

Reamplificação de fragmentos do cDNA do gene da lacrimação” da cebola amplificado por PCR e excisados de gel de poliacrilamida.

Roberta Sâmara N. de Lima^{1,2}, Carlos Antonio F. Santos², Patrícia Pires Batista^{1,2}; Marciane A. Rodrigues^{1,2}.

¹Bolsista CNPq, ²Embrapa Semi-Árido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina, PE. E-mail: casantos@cpatsa.embrapa.br.

O objetivo deste trabalho foi a reamplificação e visualização em gel de agarose e de poliacrilamida denaturante de dois fragmentos do cDNA da sintase do fator de lacrimação (SFL), amplificados por PCR em 15 genótipos de cebola e um de *Allium tuberosum* Rottl. Ex Spreng, para analisar-se a reprodutibilidade dos mesmos. As bandas dos fragmentos de 330 e 260 pb, excisadas do gel de poliacrilamida, foram re-amplificadas e visualizadas com sucesso em gel de agarose 1,5% e poliacrilamida, não sendo observadas contaminações entre as bandas. As bandas do fragmento de 330 pb foram novamente amplificadas em todos os genótipos, exceto *A. tuberosum*, enquanto a reamplificação do fragmento de 260 bp resultou em dois fragmentos, sendo um de 330 e outro de 260 pb, reproduzindo o resultado da amplificação. Estes resultados indicam que o fragmento inesperado visualizado, excisado do gel de poliacrilamida, re-amplificado, re-visualizado em gel de agarose e poliacrilamida denaturante não é um artefato, mas resultado de amplificação diferenciada na região alvo do cDNA da SFL. A reamplificação dos fragmentos de 330 e 260 pb a partir do fragmento excisado de 260 pb permanece, contudo, sem explicação, sendo que outros estudos são necessários para elucidar a natureza do fragmento de 260 pb. ‘Screening’ via PCR dentro das famílias de meio-irmãs (FMI) das plantas deste estudo são também necessários para observar-se a consistência genética da amplificação do fragmento de 260 pb numa dada FMI.

Palavras-chaves: *Allium cepa*, genótipos e ácido pirúvico.

ABSTRACT- Re-amplification of cDNA fragment of the lachrymatory gene of onion amplified via PCR and excised from polyacrylamide gel.

The goal of this study was to re-amplify and to visualize in agarose and denaturing polyacrylamide gels two fragments of the lachrymatory factor synthase (SFL) cDNA, amplified by PCR from 15 onion genotypes and one of *Allium tuberosum*, in order to analyze its reproducibility. The fragment bands of 330 and 260 bp excised from polyacrylamide gel were successfully re-amplified and re-visualized in 1,5% agarose and 5.7% polyacrylamide gels. It was not observed any contamination among the fragments bands. All 330 bp fragments were re-amplified in all genotypes, except in *A. tuberosum*. Re-amplification of the 260 bp fragment resulted again in two fragment, one of 330 and

other of 260 bp, reproducing the same result of the primary amplification. These results suggest that the unexpected fragment visualized and excised from polyacrylamide gel and re-amplified and re-visualized in agarose and denaturing polyacrylamide gels was not an artifact, but a result of a different amplification in the targeted region of the SFL cDNA. However, a deep genetic explanation for this phenomenon remains open, being necessary other studies to elucidate the nature of the 260 bp fragment. Screening via PCR within families of half sib (FHS) are also necessary to investigate the genetic consistency of the amplification of the 260 bp fragment in a given FHS.

Keywords: *Allium cepa*, genotypes, pyruvic acid.

INTRODUÇÃO

A lacrimejação não é um subproduto da reação da aliinase, conforme assumido anteriormente, sendo a sintase do fator de lacrimejação (SFL) a responsável por uma das características mais indesejáveis da cebola: a lacrimejação (Imai *et al.*, 2002). Estes resultados abriram a possibilidade para o desenvolvimento de populações de cebola sem lacrimejação, mantendo-se os compostos responsáveis pela pungência, desde que sejam facilmente identificadas, via reações de PCR de sequência do gene da SFL, em plantas com a sequência inativa para a lacrimejação.

Amplificação via PCR de parte do cDNA do SFL em 14 genótipos de cebola resultou na amplificação e visualização de dois fragmentos em gel de poliacrilamida denaturante, corado com nitrato de prata: um esperado de, aproximadamente, 330 pares de bases (pb) e outro inesperado de, aproximadamente, 260 pb (Lima *et al.*, submetido, 2007).

Este trabalho teve como objetivo reamplificar e visualizar em gel de agarose dois fragmentos do gene da SFL, amplificados por PCR e excisados de gel de poliacrilamida denaturante para analisar a reprodutibilidade dos fragmentos, especialmente, os de 260 pb, para possibilitar novas investigações que resultem na utilização dos fragmentos para o desenvolvimento de populações de cebola sem o fator de lacrimejação.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA genômico total foi extraído de 15 genótipos de cebola (Fig.1) e um de *Allium tuberosum* segundo o protocolo CTAB 2x. As reações e o programa de PCR, para amplificação de parte da SFL, foram realizados para um volume final de 25 µL, segundo procedimentos descritos por Santos *et al.* (2006).

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 5,7% (16 mL de tampão TBE, 36 g de uréia, 12 mL de 40% acrilamida/bis (19:1), 410 µL de APS 10% e 40 µL de Temed, ajustado para volume final

de 80 mL). As bandas no gel de poliacrilamida denaturante foram visualizadas em nitrato de prata, segundo protocolo de Creste *et al.* (2001).

As bandas foram excisadas do gel seco de poliacrilamida com uma lâmina de bisturi, segundo protocolo descrito por Santos e Simon (2002). As re-amplificações das bandas excisadas foram visualizadas em gel de agarose comum a 1,5 % e em gel de poliacrilamida denaturante, adotando-se os mesmos protocolos para a amplificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de PCR de parte do fragmento de SFL resultou na amplificação e visualização de duas bandas no gel de poliacrilamida, sendo uma de, aproximadamente, 330 pb, e outra de, aproximadamente, 260 pb (Fig. 1A). As bandas dos fragmentos de 330 e 260 pb, excisadas do gel de poliacrilamida (Fig. 1B), foram re-amplificadas e visualizadas com sucesso em gel de agarose 1,5% (Fig. 2).

As bandas do fragmento de 330 pb foram novamente amplificadas em todos os genótipos, exceto *A. tuberosum* (Fig. 3A), enquanto a reamplificação do fragmento de 260 bp resultou em dois fragmentos, sendo um de 330 e outro de 260 pb (Fig. 3B), reproduzindo o resultado da amplificação (Fig. 1A). Estes resultados indicam que o fragmento inesperado visualizado e excisado em gel de poliacrilamida, re-amplificado e visualizado em gel de agarose e de poliacrilamida denaturante não é um artefato, mas um resultado de amplificação diferenciada na região alvo do gene da SFL. DNA denaturado migra através do gel de poliacrilamida a uma taxa constante que quase independe da composição de bases e sequência (Sambrook e Russell, 2001).

Estudos de sequenciamento, bem como de nível de expressão do RNA do SFL, entre outros, são necessários para elucidar a natureza do fragmento de 260 pb excisado e re-amplificado em géis de agarose e poliacrilamida. 'Screening' via PCR será realizado dentro das famílias de meio-irmãs (FMI) das plantas selecionadas para baixo teor de ácido pirúvico neste estudo, visando observar-se a consistência genética da amplificação do fragmento de 260 pb numa dada FMI.

LITERATURA CITADA

- CRESTE, S; TULMANN NETO, A; FIGUEIRA, A 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v.19, n.4, p.299-306.
- IMAI, S; TSUGE, N; TOMOTAKE, M; NAGATOME, Y; SAWADA, H; NAGATA, T; KUMAGAI, H. 2002. An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature*, v. 419, 685.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: CSHL Press. p. 5.40
- SANTOS, CAF; SIMON, PW. 2002. Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F2 populations of carrot. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 2: 195-201.

SANTOS, C. A. F.; BOITEUX, L.S ; SANTOS, I.C.N.dos; LIMA, R.S.N.; RODRIGUES, M.A. 2006. Análise via PCR da presença de alelos do gene codificador da sintase do fator de lacrimação dentro da população de cebola BRS Alfa São Francisco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 46. *Resumos...* Goiânia. ABH (CDROM).

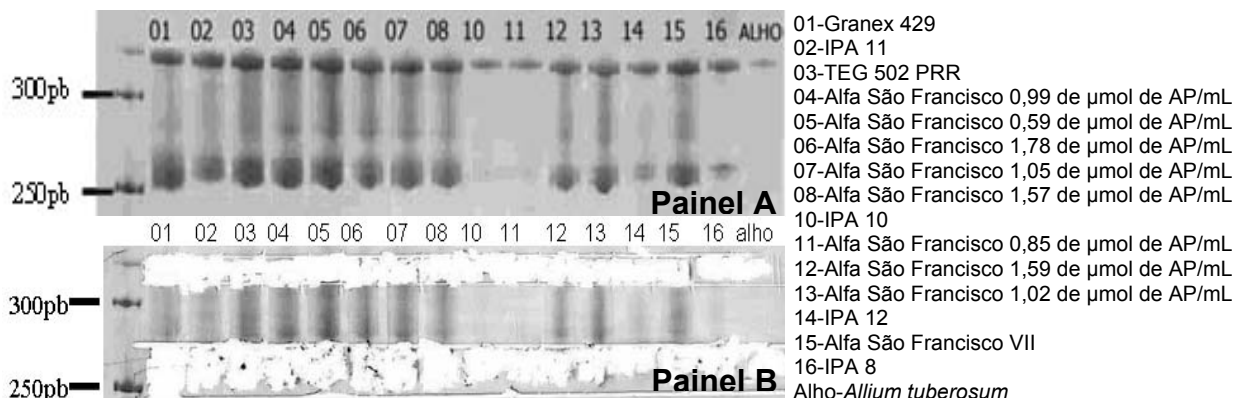


Figura 1. Painel A: Gel de poliácridamida 5.7% com fragmentos do fator de lacrimação de 15 genótipos de cebola e um de *Allium tuberosum*. Painel B: fragmentos excisados do gel de poliácridamida. A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Fermentas. Petrolina, PE, 2007(AP= ácido pirúvico).

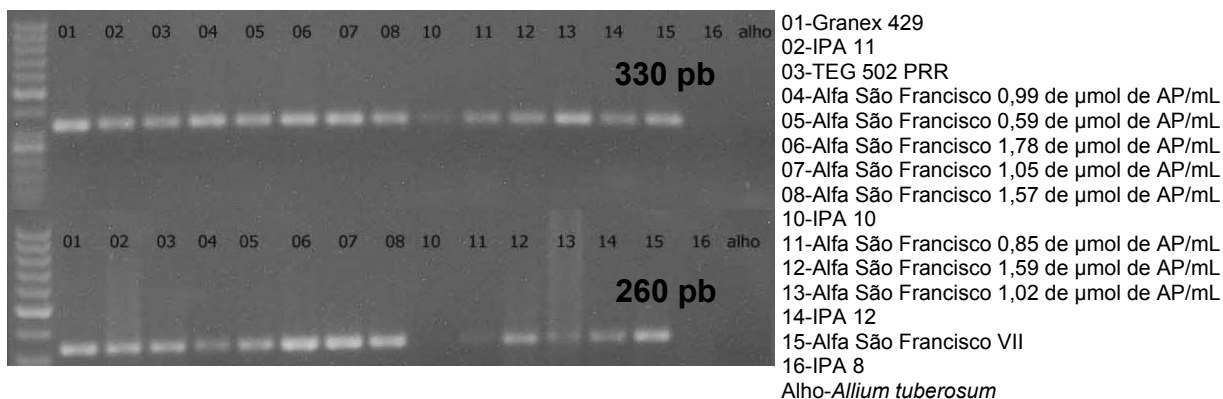


Figura 2. Visualização de fragmentos em gel agarose 1,5% de parte do cDNA da lacrimação excisado de poliácridamida denaturante 5.7% de 15 genótipos de cebola e um de *Allium tuberosum*. A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Fermentas. Petrolina, PE, 2007(AP= ácido pirúvico).

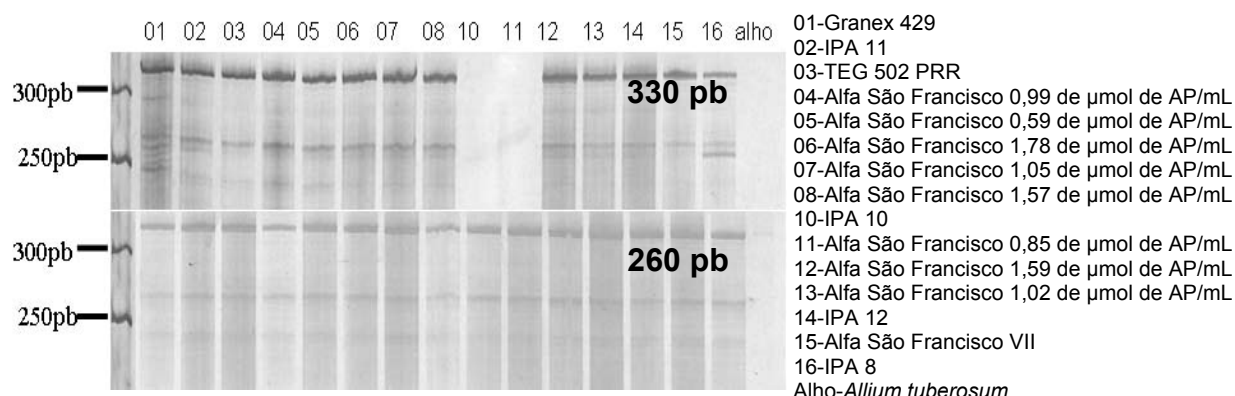


Figura 3. Visualização de fragmentos em gel poliácridamida denaturante de parte do cDNA da lacrimação excisado de poliácridamida denaturante 5.7% de 15 genótipos de cebola e um de *Allium tuberosum*. A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Fermentas. Petrolina, PE, 2007(AP= ácido pirúvico).

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro do BNB-Etene-Fundeci.