

Visualização de fragmento de PCR do gene codificador da “sintase do fator de lacrimejação” em cebola em géis de poliacrilamida e agarose.

Roberta Sâmara Nunes de Lima¹; Carlos Antonio Fernandes Santos^{1,2}; Patrícia Pires Batista^{1,2}; Leonardo Silva Boiteux³

¹Bolsista CNPq, ²Embrapa Semi-Árido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina, PE. ³Embrapa Hortaliças, Caixa Postal 218, Brasília, DF. E-mail: casantos@cpatsa.embrapa.br.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo visualizar em géis de agarose comum 1,5% e poliacrilamida 5,7% o fragmento do gene codificador da “sintase do fator de lacrimejação - SFL”, amplificado via PCR, em plantas de 15 genótipos de cebola e uma de *Allium tuberosum*. DNA genômico total foi extraído pelo protocolo CTAB 2x. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL (0,25 µM de cada primer, solução de 4 x 150 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 U de Taq DNA polimerase e 30 ng do DNA). Os *primers* foram sintetizados a partir da seqüência do cDNA da SFL (GenBank AB089203). No gel de agarose foram visualizados fragmentos de, aproximadamente, 330 pb para todos os genótipos analisados, exceto *A. tuberosum*. No gel de poliacrilamida foram observados dois fragmentos: um de grande intensidade, de, aproximadamente, 330 pb, em todos os genótipos, exceto em ‘IPA 10’, ‘Alfa São Francisco’ com 0,85 µmol de ácido pirúvico/mL e *A. tuberosum*, que apresentaram fragmento de menor intensidade, e outro de, aproximadamente, 260 pb em todos os genótipos, exceto, na ‘IPA 10’, ‘Alfa São Francisco’ com 0,85 µmol de ácido pirúvico/mL e *A. tuberosum*. A intensidade do fragmento de 260 pb foi também menor em ‘IPA 12’ e na ‘IPA 8’. Os resultados em gel de poliacrilamida sugerem que os genótipos que não apresentaram o segundo fragmento são homozigotos e os demais heterozigotos, sendo necessários novos estudos para que a amplificação via PCR do SFL seja ser útil em programas de melhoramento de cebola para ausência da lacrimejação.

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

ABSTRACT- Visualization of PCR fragment of the lachrymatory factor synthase gene of onion in gels of polyacrylamide and agarose.

The goal of this study was to resolve, in common 1.5% agarose and 5.7% polyacrylamide gels, the lachrymatory factor synthase(SFL) gene fragments, amplified by PCR, in plants of 15 onion genotypes and one of *Allium tuberosum*. Total genomic DNA was extracted according to CTAB 2x protocol. The PCR reactions were performed to a final volume of 25 µL (0,25 µM of each primer, 150 µM of each dNTP, 1,5 mM of MgCl₂, 0,2 U of Taq DNA

polymerase and 30 ng of DNA). The primers were designed from a public SFL cDNA sequence (GenBank AB089203). It was visualized a fragment, around, 330 bp for all genotypes, except *A. tuberosum*. It was visualized two fragments in the polyacrilamide gels: one with a greater intensity, around 330 bp in all genotypes, except in 'IPA 10', 'Alfa São Francisco' with 0,85 μ mol of pyruvic acid and *A. tuberosum*, which presented a fragment with a lesser intensity, and another fragment, around, 260 bp in all genotypes, except in 'IPA 10', 'Alfa São Francisco' with 0,85 μ mol of pyruvic acid and *A. tuberosum*. The 'IPA 12' and 'IPA 8' genotypes showed a lesser intensity in the 260 bp fragment. The results of polyacrilamide gel suggest that the genotypes without the second fragment were homozygotes and the others were heterozygotes. More studies of the PCR amplified SFL fragments are necessary in order to be useful in breeding programs of onion, aiming to develop lines without the lachrymatory factor.

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

INTRODUÇÃO

A pungência em cebola decorre da hidrólise de compostos precursores sulfóxidos, S-alk(en)il-L-cisteína, quando as células são mecanicamente quebradas. A reação de hidrólise é catalisada pela enzima aliinase, em presença de água, produzindo tiopropanal, ácido pirúvico, amônia e muitos compostos sulfurados voláteis (Whitaker, 1976). Alguns autores sugeriram que a lacrimação da cebola era produzida espontaneamente pela ação da aliinase. No entanto, Imai et al. (2002) demonstraram que a lacrimação não é um subproduto da reação da aliinase e que uma enzima, a "lachrymatory factor synthase" ("sintase fator de lacrimação"), é a responsável por uma das características mais indesejáveis da cebola: a lacrimação. Programas de melhoramento podem ser elaborados para a produção de cultivares sem lacrimação, porém mantendo a integridade dos teores dos compostos organosulfurados, um dos metabólicos responsáveis pelas propriedades medicinais da cebola.

Este trabalho teve como objetivo visualizar o fragmento do gene codificador da "sintase do fator de lacrimação" de diferentes genótipos de cebola amplificado por PCR em géis de poliacrilamida e agarose de forma a identificar possíveis diferenças do tamanho dos produtos amplificados.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA genômico total foi extraído, segundo o protocolo CTAB 2x, de 15 genótipos de cebola, quais sejam, Granex 429, IPA 11, TEG 502 PRR, plantas de Alfa São Francisco com 0,99, 0,59, 1,78, 1,05, 1,57, 0,85, 1,59 e 1,02 μ mol de ácido pirúvico/mL, IPA 10, IPA 12, Alfa São Francisco ciclo VII, IPA 8 e um genótipo de *Allium tuberosum*. As reações de

PCR foram realizadas para um volume final de 25 μ L, contendo 0,25 μ M de cada primer, solução de 4 x 150 μ M de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 U de Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA total. As seqüências dos primers foram obtidas a partir do cDNA da sintase do fator de lacrimejação (SFL) publicadas por Imai et al. (2002), GenBank número AB089203. Os seguintes primers foram sintetizados utilizando o software "Primer3": primer 1 (5'-GCTAACGGAGCTCGAAAATG-3') e primer 2 (5'-ACCCTCCACTATTTGCATGG-3'). O programa para as reações de PCR consistiu de: uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 56 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Os 25 μ L de cada reação de PCR foram submetidos: 1) 12 μ L + 3 μ L de solução de carregamento à eletroforese horizontal em gel de agarose comum a 1,5 %, com tempo de corrida de 4,5 h e visualizados na presença de brometo de etídio, 2) 6 μ L + 3 μ L de solução de carregamento 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 μ L de APS 10% e 40 μ L de Temed, ajustado para volume final de 80 mL). As bandas no gel de poliacrilamida foram visualizadas em nitrato de prata, segundo protocolo de Creste et al. (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No gel de agarose comum 1,5 % foram visualizados fragmentos de, aproximadamente, 340 pb para todos os genótipos analisados, exceto *A. tuberosum* (Fig. 1). O tamanho do fragmento foi compatível com o tamanho esperado de 327 bp do cDNA do SFL amplificado pelo par de *primers*. A ausência do SFL de *A. tuberosum* era também esperada, pois as folhas da espécie não deixam provocar a conhecida halitose da cebola.

No gel de poliacrilamida foram observados dois fragmentos: um de grande intensidade, de, aproximadamente, 330 bp, em todos os genótipos, exceto em 'IPA 10', 'Alfa São Francisco' com 0,85 μ mol de ácido pirúvico/mL e *A. tuberosum*, que apresentaram um fragmento de pequena intensidade, e outro fragmento de, aproximadamente, 260 pb em todos os genótipos, exceto 'IPA 10', 'Alfa São Francisco' com 0,85 μ mol de ácido pirúvico/mL e *A. tuberosum* (Fig. 2). A intensidade fragmento de 260 pb foi também menor em 'IPA 12' e 'IPA 8'. O fragmento de 260 pb não era esperado, pois segundo Imai et al. (2002) existe apenas um gene para o fator de lacrimejação. Uma provável explicação é a de que os genótipos que não apresentaram o segundo fragmento são homozigotos e os demais heterozigotos, e que não foram visualizados em gel de agarose devido a seu baixo poder de resolução do mesmo. Outra explicação é a de que o fragmento de 260 pb é um artefato, resultado de amplificação não específica.

A visualização do fragmento do gene do SFL em gel de poliacrilamida indica que novas amplificações via PCR, seguida de sequenciamento, bem como nível de expressão do RNA do SFL, entre outros estudos, sejam realizados para que o mesmo possa ser útil em programas de melhoramento de cebola para ausência da lacrimação.

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, 19(4): 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*, 419: 685.

WHITAKER, J. Development of flavor, odor, and pungency in onion and garlic. 1976. *Advanced Food Research*, 22: 73-133.

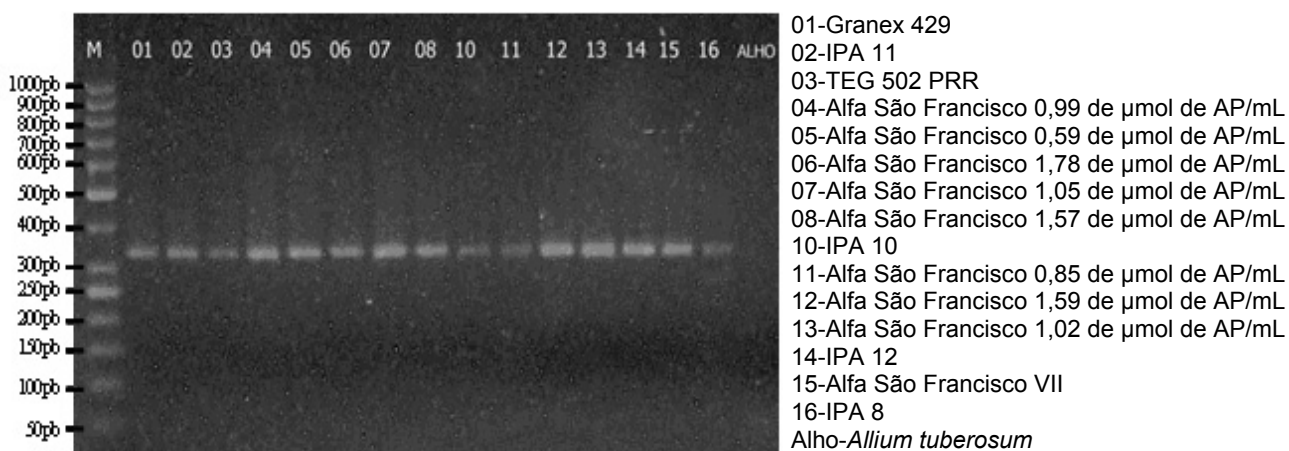


Figura 1. Gel de agarose 1,5% com fragmentos do fator de lacrimação de 15 genótipos de cebola e um de *Allium tuberosum*. A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Fermentas. Petrolina, PE, 2007 (AP= ácido pirúvico).

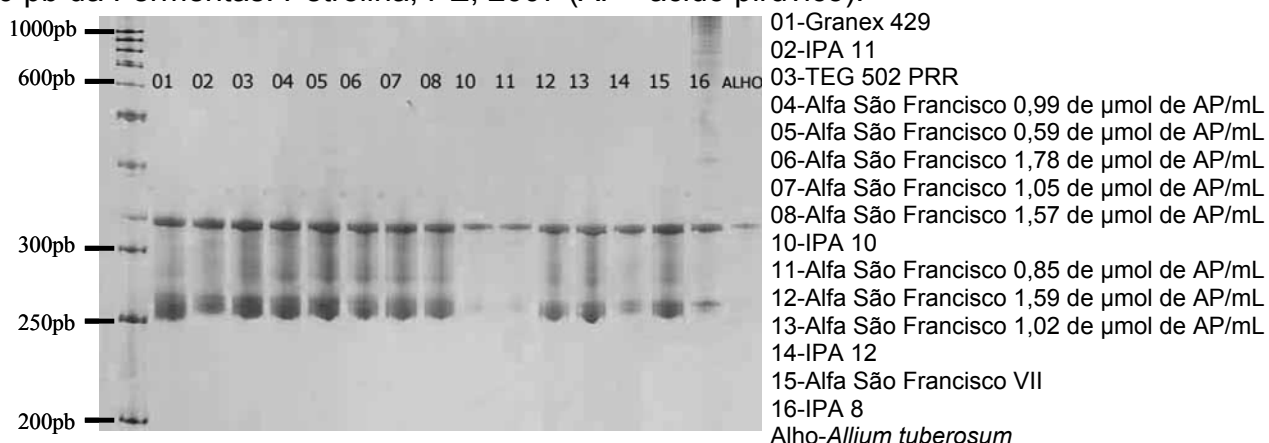


Figura 2. Gel de poliacrilamida 5.7% com fragmentos do fator de lacrimação de 15 genótipos de cebola e um de *Allium tuberosum*. A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Fermentas. Petrolina, PE, 2007 (AP= ácido pirúvico).

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro do BNB-Etene-Fundeci.