

## **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.**

**Carlos Antonio F. Santos<sup>1</sup>; Leonardo S. Boiteux<sup>2</sup>; Ierla Carla N. dos Santos<sup>1</sup>; Roberta Sâmara N. de Lima<sup>1</sup>; Marciene A. Rodrigues<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Embrapa Semi-Árido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina, PE. E-mail: [casantos@cpatsa.embrapa.br](mailto:casantos@cpatsa.embrapa.br);

<sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, Caixa Postal 218, Brasília, DF.

### **RESUMO**

Trabalho recente tem demonstrado que a lacrimação provocada pela cebola não é um subproduto da ação da enzima aliinase e sim de uma enzima específica denominada “lachrymatory factor synthase” (“sintase do fator de lacrimação”). O presente trabalho teve como objetivo analisar via PCR a presença de alelos do gene codificador da “sintase do fator de lacrimação” em bulbos da cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco. O DNA genômico total foi isolado de plantas de cebola, sem seleção prévia para baixo teor de ácido pirúvico, segundo protocolo CTAB 2X. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L (0,25  $\mu$ M de cada primer, 150  $\mu$ M de cada dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 unidades da enzima DNA polimerase na solução tampão recomendada pelo fornecedor e 1,4  $\mu$ L do DNA total). Os seguintes primers foram sintetizados a partir da informação de seqüência do cDNA da “sintase do fator de lacrimação” (GenBank AB089203): *primer 1* (5'-GCTAACGGAGCTCGAAAATG-3') e *primer 2* (5'-ACCCTCCACTATTTGCATGG-3'). A reação de PCR produziu amplicons monomórficos de aproximadamente 350 pares de bases (pb) para todos os indivíduos analisados. Este resultado indica que potenciais mutações do gene que produz a “sintase do fator de lacrimação” não estejam situadas entre ou na região para onde os primers foram desenhados. Outra possibilidade é que todas as plantas avaliadas apresentem o mesmo alelo da “sintase do fator de lacrimação”. Trabalhos adicionais de síntese de novos primers e de análise de seqüência dos amplicons produzidos de materiais contrastantes serão necessários para o desenvolvimento de *primers* que possibilitem separar plantas com diferentes alelos do gene codificador do fator de lacrimação. Esta nova geração de *primers* seria extremamente útil em sistemas de seleção assistida visando o desenvolvimento de populações de cebola livre do “choro” combinada com teores elevados de compostos organosulfurados.

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

**ABSTRACT- PCR amplification of alleles of the lachrymatory factor synthase gene in the onion cultivar BRS Alfa São Francisco.**

A recent report indicated that the irritating lachrymatory effect of onion is not a by-product of the aliinase action, but a specific result of an enzyme named as lachrymatory factor synthase. The goal of the present study was to screen via PCR for alleles of the lachrymatory factor synthase in plants of the onion cultivar BRS Alfa São Francisco. Total genomic DNA was extracted (according to the CTAB 2x protocol) from plants without previous selection to low pyruvic acid values. The PCR reaction was done to a final volume of 25  $\mu$ L (0,25  $\mu$ M of each primer, 150  $\mu$ M of each dNTP, 1,5 mM of  $MgCl_2$ , 0,2 units of DNA polymerase in reaction buffer recommended by the supplier and 1,4  $\mu$ L of total DNA). The following primers sequences were obtained from the lachrymatory factor synthase gene (GenBank AB089203): primer 1 (5'-GCTAACGGAGCTCGAAAATG-3') and primer 2 (5'-ACCCTCCACTATTTGCATGG-3'). The PCR reaction resulted in a monomorphic amplicon of 325 bp present in all the screened plants. It is possible to conclude that putative mutations in the lachrymatory factor synthase gene are not located at/within the primers annealing regions or that all screened plants possess the same allele. It will be necessary additional efforts in primer synthesis and/or sequence analysis of the obtained PCR amplicons in order to design primers able to identify plants with distinct lachrymatory factor synthase alleles. These primers would be useful tools in marker assisted selection systems in order to develop non-lachrymatory onion populations without decreasing the content of the organosulfur compounds.

Keywords: *Allium cepa*, PCR and pyruvic acid.

**INTRODUÇÃO**

A pungência em cebola é produzida pela 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). Foi assumido, até recentemente, que a lacrimejação da cebola era produzida espontaneamente pela ação da aliinase. No entanto, Imai et al. (2002) demonstraram que a lacrimejação não é um subproduto da reação da aliinase e que uma enzima, a "lachrymatory factor synthase" ("sintase fator de lacrimejação"), é a responsável por uma das características mais indesejáveis da cebola: a lacrimejação. Desta forma, de acordo com Imai et al. (2002), torna-se possível a produção de cultivares sem lacrimejação, porém mantendo a integridade dos teores dos compostos organosulfurados, um dos metabólicos responsáveis pelas propriedades medicinais da cebola.

Até então, a seleção de cebola sem lacrimejação tem sido conduzida pela quantificação do ácido pirúvico, um subproduto da ação da aliinase (Yoo & Pike, 2001), o que pode resultar na quase completa eliminação dos benéficos compostos organosulfurados. A publicação da seqüência do cDNA da “sintase fator de lacrimejação” por Imai et al. (2002) permite o avanço para uma nova etapa de estudos que envolve trabalhos de avaliação de populações de cebola em busca de alelos mutantes (“não-funcionais”) do gene codificador da “sintase do fator de lacrimejação”.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar via PCR a presença de alelos do gene codificador da “sintase do fator de lacrimejação” em bulbos da cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

DNA genômico total foi isolado de 19 plantas de cebola, sem seleção prévia para baixo teor de ácido pirúvico, segundo protocolo CTAB 2X. Cerca de 0,2 g folhas, mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram maceradas na presença de nitrogênio líquido em almofariz de porcelana, tratados previamente em ácido clorídrico 3N. O pó foi transferido para uma solução extratora de 0,9 mL de CTAB 2% (500 mM Tris pH 8,0, 1,4 M NaCl, CTAB 2% (p/v), 0,2 % beta-mercaptoethanol, 20 mM de EDTA) e incubado a  $65^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos. Após os demais procedimentos, o “pellet” de DNA total foi colocado para secar a temperatura ambiente e em seguida adicionou-se 120 mL de tampão. A integridade do DNA total foi observada em gel de agarose 1,5 %. O DNA concentrado foi mantido estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 0,25  $\mu\text{M}$  de cada primer, 150  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 unidades da enzima DNA polimerase da Biometrix na solução tampão recomendada pelo fornecedor e 1,4  $\mu\text{L}$  do DNA total (não quantificado). As seqüências dos primers foram obtidas a partir de informações do cDNA (GenBank AB089203) publicadas por Imai et al. (2002). Os seguintes primers foram sintetizados utilizando-se o software “Primer3”: primer 1 (5'-GCTAACGGAGCTCGAAAATG-3') e primer 2 (5'-ACCCTCCACTATTTGCATGG-3'). As reações com os primers desenhados para um segmento do gene codificador da “sintase do fator de lacrimejação” foram incubadas em termociclador segundo o protocolo: a) um ciclo a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min seguido por b) 40 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $56^{\circ}\text{C}$  por 1 min e  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min, seguidos por c) um ciclo de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese de agarose 1,5 %, na presença da solução tampão de TAE 1x e observados em transiluminador na presença de brometo de etídio. Os géis de agarose foram fotografados e as bandas analisadas com apoio do software Adobe Photoshop.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de PCR com o primer de parte do cDNA produziu fragmentos monomórficos de aproximadamente 350 pares de bases (pb) de um tamanho esperado de 327 pb do cDNA para todas as amostras das plantas de cebola analisadas (Fig. 1). Este resultado indica que potenciais mutações do gene que produz a “sintase do fator de lacrimejação” não estejam situadas entre ou na região para onde os primers foram desenhados. Outra possibilidade é que todas plantas avaliadas (sem prévia seleção para baixo teor de ácido pirúvico) apresentem o mesmo alelo da “sintase do fator de lacrimejação”.

Trabalhos adicionais de análise de seqüência do cDNA publicado por Imai et al. (2002) bem como de análise de seqüência dos amplicons produzidos de materiais contrastantes (baixo e alto teor de ácido pirúvico) serão necessários para o desenvolvimento de primers que possibilitem identificar regiões do DNA que contenham mutações no gene da “sintase do fator de lacrimejação”. Estes primers poderiam permitir uma genotipagem eficiente de plantas com diferentes alelos do gene codificador da “sintase do fator de lacrimejação” e identificar aquelas plantas de cebolas livres da irritante lacrimejação. Os ajustes e o desenvolvimento destes primers específicos para os alelos da “sintase do fator de lacrimejação” poderá facilitar tremendamente o desenvolvimento de populações de cebola livre da lacrimejação, ao tempo em que mantém os teores dos compostos organosulfurados, talvez de forma inédita no mercado mundial de cebola.

## LITERATURA CITADA

IMAI, S.; TSUGE, N.; TOMOTAKE, M.; NAGATOME, Y.; SAWADA, H.; NAGATA, T.; KUMAGAI, H. An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature*, v. 419, 685, 2002.  
 WHITAKER, J. Development of flavor, odor, and pungency in onion and garlic. *Advanced Food Research*, v. 22, 73 – 133, 1976.  
 YOO, K.S.; PIKE, L.M. Determination of background of pyruvic acid concentration in onions, *Allium* species and other vegetables. *Scientia Horticulturae*, 89, 249-256, 2001.

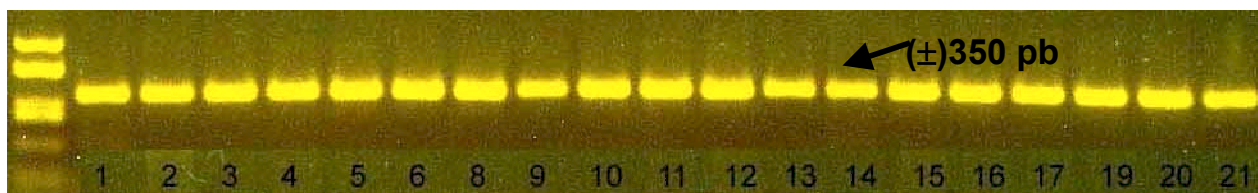


Figura 1. Gel de agarose com fragmentos do fator de lacrimejação presente em plantas da cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco. A primeira coluna do lado esquerdo é o padrão de 50 pb da Amresco DNA MicroMarker. Petrolina, PE, 2005.

## AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro do BNB-Etene-Fundeci.