

Desenvolvimento de um marcador funcional para o estudo da biodiversidade de populações selvagens de *Hypericum perforatum* L.

Alexandre Ferreira, Hélia Cardoso, Efe Serrano & Birgit Arnholdt-Schmitt*

EU Marie Curie Chair, ICAM, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal

*Autor correspondente: eu_chair@uevora.pt

Resumo

O efeito benéfico das plantas medicinais encontra-se mais relacionado com o extracto da planta do que com os seus componentes isolados, o que dificulta a definição de características de interesse no melhoramento dessas plantas. Características agrónomicas como o crescimento e a estabilidade na produção constituem, no entanto, objectivos de interesse no melhoramento de plantas medicinais, permitindo obter quantidades elevadas de extracto homogéneo por planta. A oxidase alternativa (AOX) foi proposta como um marcador funcional para avaliação do crescimento estável sob diversos tipos de stresse ambiental. No presente artigo são descritos os trabalhos relativos ao isolamento e caracterização de sequências da família multigénica AOX de *Hypericum perforatum* L.. As sequências de AOX e os RAPD *fingerprinting* serão ulteriormente utilizados na identificação de polimorfismos genéticos em populações Portuguesas de *H. perforatum* com diferenças ao nível do crescimento.

Palavras-chave: genes AOX, stresse, Erva de São João.

Abstract

Title: Developing a functional marker for studies in biodiversity of wild populations of *Hypericum perforatum* L.

A beneficial use of medicinal plants is more often related to effects of plant extracts than to clearly identified components. Thus, in most plant species definition of traits for breeding are not possible. However, agronomic traits, such as growth and stable yield production, are worthwhile aims in breeding to obtain high amounts of homogeneous extracts per plant. Alternative oxidase (AOX) is hypothesized to be a marker for stable growth behaviour under diverse types of environmental stress. Here, we report isolation and characterization of AOX multigene sequences of *Hypericum perforatum* L.. AOX gene sequences and RAPD fingerprinting will be used to identify genetic polymorphism in natural Portuguese habitats with differences in growth characteristics.

Keywords: AOX genes, stresse, St. John's wort.

Introdução

Os recursos filogenéticos são uma componente chave no desenvolvimento sustentável da agricultura, nomeadamente na cultura de *Hypericum perforatum* L. A perda dos recursos genéticos e, em consequência, da diversidade genética que esses representam, é uma realidade generalizada. Perante esta situação, é extremamente importante o desenvolvimento de estratégias adequadas e eficazes para conservar estes recursos. As tecnologias de marcadores moleculares são o meio mais avançado e, possivelmente, o

mais eficaz para entender os fundamentos da diversidade genética. A sua aplicação permite identificar e avaliar a variação genética de forma rápida e minuciosa. Quando se aplicam tecnologias moleculares para responder a perguntas biológicas para compreensão da diversidade genética, como por exemplo a tolerância ao stress, podem fazer-se progressos notáveis ao garantir uma conservação adequada e, em consequência, disponibilizar recursos genéticos para o melhoramento. A oxidase alternativa (AOX) foi previamente relacionada com a resposta das plantas a condições de stress (Vanlerberghe & McIntosh, 1992), permitindo colocar como hipótese a existência de uma relação entre a AOX e a tolerância ao stress ambiental em *H. perforatum*. Perante esta hipótese, é objectivo desenvolver um marcador funcional para avaliação da biodiversidade nesta espécie, permitindo-nos determinar diferenças ao nível da tolerância a stresses ambientais. Plantas mais robustas e adaptadas ao stress ambiental garantem-nos um rendimento mais estável e uma qualidade mais homogênea e, consequentemente um menor uso de fertilizantes e fitofármacos. Este aspecto é especialmente importante na cultura de plantas medicinais relativamente à adopção de boas práticas de produção.

O presente trabalho está inserido num projecto Marie Curie Chair que pretende investigar a aplicação dos genes AOX no melhoramento de plantas (Arnholdt-Schmitt et al., 2006). Os genes da AOX foram já isolados em diversas espécies vegetais, como *Olea europaea* (Macedo et al., 2006), *Vigna unguiculata* (Costa et al., 2004), *Arabidopsis thaliana* (Saisho et al., 1997), *Glycine max* (Whelan et al., 1996) e *Nicotiana tabacum* (Whelan et al., 1995). No presente artigo falaremos sobre a estratégia molecular seguida para o isolamento e caracterização dos genes AOX em *H. perforatum*.

Paralelamente ao isolamento e caracterização dos genes da AOX, assume elevado interesse a caracterização adicional de genótipos provenientes de distintos locais. Para esta abordagem molecular, procurando diferenças ao nível do genótipo, seleccionou-se a técnica de RAPD. Esta técnica foi previamente referida por Arnholdt-Schmitt (2000, 2002) como aplicável em *H. perforatum* para distinção de populações, tornando-a por isso do nosso interesse. No presente artigo será também descrito o caminho a percorrer no estudo de polimorfismos genéticos existentes entre genótipos provenientes de diversos locais.

Material e métodos

1. Isolamento e caracterização dos genes da AOX

a) Material vegetal e extracção de DNA: Foram utilizadas folhas jovens de uma planta de *Hypericum perforatum* L. germinada e cultivada em condições *in vitro* (Fig. 1-A). O DNA foi extraído utilizando o DNEasy kit (Qiagen). A sua integridade foi analisada por electroforese em gel de agarose (1%) após coloração numa solução de Brometo de Etídio (EtBr) (0.2 µg/ml). A quantificação foi efectuada utilizando concentrações definidas de DNA lambda no software GeneTools da SynGene.

b) Análise por PCR: Os fragmentos relativos aos genes AOX foram amplificados utilizando o *primer forward* P1 e *reverse* P2 (Saisho et al., 1997), e os *primers forward* 41AOX1, 41AOX2, 40AOX2 combinados com o *primer reverse* 44AOXR (estes *primers* foram desenhados por José Hélio Costa et al. (não publicados) no âmbito de um outro projecto integrado na Marie Curie Chair relacionado com os estudos em cenoura). O programa de amplificação consistiu num passo inicial de 5 min a 94°C seguido de 35 ciclos, cada ciclo consistindo em 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C. Efectuou-se um passo de extensão final durante 10 min a 72°C. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose (1,4%) após coloração numa solução de EtBr (0.2

µg/ml).

c) Clonagem: Os fragmentos obtidos por PCR foram purificados utilizando o GFX PCR DNA e Gel Purification kit (Amersham Biosciences) e clonados no vector de clonagem pGEM®-T Easy System I (Promega). O produto da reacção de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes *E. coli* JM109 (Promega). O DNA plasmídico dos clones obtidos foi extraído segundo o método da Lise Alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Os diferentes clones foram caracterizados utilizando as enzimas de restrição: *EcoRI*, *HpyF3I* e *AluI* (Fermentas).

d) Análise de sequências: Os clones seleccionados foram sequenciados na empresa MACROGEN (www.magrogen.com), utilizando o *primer* universal T7. A pesquisa de sequências homólogas na base de dados NCBI foi efectuada usando o algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para estabelecer o alinhamento das sequências de *H. perforatum* obtidas no presente trabalho e sequências homólogas retiradas da base de dados utilizou-se o método ClustalW do programa BioEdit. O programa MEGA 3.1 foi utilizado para construção do dendrograma.

2. Estabelecimento do método RAPD *fingerprinting* para análise de polimorfismos genéticos

a) Material vegetal e extracção de DNA: Para avaliação da existência de um efeito do método de extracção no resultado obtido por RAPD foram efectuadas oito extracções de DNA de uma mesma planta. Para avaliação da aplicabilidade do método na distinção de genótipos da região do Alentejo foram iniciadas as análises de plantas provenientes de alguns dos locais de estudo – Aljustrel, Beja e Évora.

O procedimento seguido para extracção de DNA foi idêntico ao descrito no ponto 1a).

b) Análise por PCR: Para estabelecimento da técnica de RAPD *fingerprinting* foram testados os 20 *primers* do Kit D Random (ROTH®). O programa de amplificação consistiu num passo inicial de 5 min a 95°C seguido de 45 ciclos, cada ciclo consistindo em 1 min a 95°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C. Para avaliação da existência de polimorfismos foram já testados os *primers* D11, D13, D16 e D20. As amplificações foram analisadas em gel de agarose (1,4%) após coloração numa solução de EtBr (0.2 µg/ml).

Resultados

1. Isolamento e caracterização dos genes da AOX

A reacção de amplificação, utilizando como *template* DNA genómico de uma planta de *H. perforatum* e os *primers* P1 e P2, permitiu obter um amplicão próximo de 450 pb (Fig. 1-B), resultado coincidente com o referido por Saisho *et al.* (1997) em *A. thaliana*. No entanto, os mesmos autores referem a amplificação de um fragmento único, resultado não visível com *H. perforatum*, onde ocorreu sempre a amplificação de um outro fragmento de peso superior (~650 pb), independentemente das condições de amplificação testadas (Fig. 1-B). A utilização dos *primers forward* 41AOX1, 41AOX2, 40AOX2 combinados com o *primer reverse* 44AOXR permitiram amplificar fragmentos de pesos moleculares bastante superiores ao amplicão originado com os *primers* P1 e P2 (próximos de 1300 pb, Fig. 1-B). Este resultado era esperado, pois esses amplicões incluíam dois intrões, parte do exão 1, o exão 2 completo e parte do exão 3.

Após clonagem dos fragmentos obtidos por PCR a existência de diferentes genes foi determinada através da análise dos padrões de restrição obtidos com as três enzimas de restrição (ver exemplo Fig. 2). Foram analisados 108 clones recombinantes, seleccionando-se 49 para ulterior sequenciação. A identificação das sequências de *H. perfo-*

ratum como sendo de AOX baseou-se na elevada homologia com sequências de genes codificantes de AOXs presentes na base de dados NCBI. Segundo esta análise identificaram-se 18 clones com elevada homologia com sequências codificantes de AOX.

Os clones 1, 2, 8, 9 e 31 obtidos com os *primers* P1 e P2 apresentaram a maior homologia com *Catharanthus roseus* (82%, no. de acesso AB009395.1), os clones 16 e 18 com *Mangifera indica* (82%, no. de acesso AF329898.1) e o clone 28 com o híbrido *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (83%, no. de acesso AJ251511.2). O alinhamento destas sequências permitiu confirmar que a região amplificada em *H. perforatum* com os *primers* P1 e P2 corresponde a uma zona mais conservada do exão 3, tal como referido por Saisho et al. (1997) para *A. thaliana*. Os clones 2, 6 e 10, isolados com o *primer* 40AOX2 e os clones 2 e 3 isolados com o *primer* 41AOX2, apresentaram uma homologia com *Glycine max* (entre 83% e 84%, no. de acesso AY303971.1). Por outro lado, o clone 14 isolado com o *primer* 40AOX2 apresentou a maior homologia com *Catharanthus roseus* (90%, no. de acesso AB009395.1). Os clones seleccionados com o *primer* 41AOX1 (clones 1, 15, 20 e 30) apresentaram todos a maior homologia com *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (85%, no. de acesso AJ251511.2).

O alinhamento das sequências obtidas com os *primers* P1 e P2 permitiu confirmar que a região amplificada em *H. perforatum* corresponde a uma região do exão 3, tal como referido por Saisho et al. (1997) em *A. thaliana*. Da mesma forma, as sequências isoladas com os *primers forward* 40AOX1, 40AOX2 e 41AOX2 em combinação com o *primer reverse* 44AOXR, permitiu determinar as diferentes regiões dos genes (exão 1/intrão 1/exão 2/intrão 2/exão 3).

Após dedução das sequências de nucleótidos em aminoácidos, efectuou-se um novo BLAST. Essa análise revelou homologias próximas dos 90% com AOXs de diferentes espécies. O dendrograma construído utilizando o péptido resultante da dedução das sequências isoladas de *H. perforatum* e sequências homologas obtidas na base de dados NCBI (péptido utilizado refere-se apenas a uma região do exão 3) permitiu a separação das sequências em dois grupos, correspondentes às duas sub-famílias, a AOX1 e AOX2 (Fig. 3). No dendrograma é possível observar a inclusão da AOX1d de *A. thaliana* no grupo da sub-família da AOX2, resultado possivelmente relacionado com a grande diferença desta proteína com os outros membros da sub-família AOX1. Da análise da figura 3 verifica-se que um grupo de sequências de *H. perforatum* se encontra incluído na sub-família da AOX2 e dois grupos na sub-família da AOX1. Perante este resultado sugere-se a existência de um gene AOX2, representado pelos clones 9, 16 e 18 originados pelos *primers* P1 e P2; pelos clones 2, 6, 10 e 14 originados pelos *primers* 40AOX2 e 44AOXR; e pelos clones 2 e 3 originados pelos *primers* 41AOX2 e 44AOXR. Relativamente aos genes AOX1, os resultados obtidos no dendrograma sugerem a existência de 2 genes: um gene correspondente ao grupo constituído pelos clones 2 e 28 originado pelos *primers* P1 e P2, e pelos clones 1, 15, 20 e 30 originado pelos *primers* 41AOX1 e 44AOXR; e o outro gene correspondente ao grupo constituído pelos clones 1, 8 e 31 originado pelos *primers* P1 e P2.

2. Estabelecimento do método RAPD *fingerprinting* para análise de polimorfismos genéticos

Com o objectivo de estabelecer o método de análise por RAPD para ulterior caracterização de génotipos de distintas origens foi previamente analisada a existência de um efeito da técnica de extracção de DNA. Para tal foram efectuadas oito extracções de DNA de uma mesma planta. O DNA obtido foi usado como *template* em oito reacções de amplificação, utilizando *primers* seleccionados de um *kit* de 20 *primers*. Os

resultados obtidos permitiram verificar que os *fingerprints* produzidos eram idênticos, o que garante a reprodutibilidade deste método no nosso laboratório. Como exemplo é apresentado na figura 4-A a análise resultante da amplificação com o *primer* D20.

Para iniciar os testes de aplicabilidade do método na distinção de plantas de diferentes origens é necessário efectuar um *screening* dos *primers*. A figura 4-B mostra os primeiros resultados obtidos na aplicação de apenas dois *primers* (D16 e D20) em plantas de três origens distintas (Aljustrel, Beja e Évora). Os dois *primers* utilizados nesta primeira avaliação revelaram polimorfismos entre a planta de Évora e as plantas provenientes de Aljustrel e Beja (Figura 4-B), possivelmente relacionado com a maior proximidade entre estes dois locais. Contudo, os *primers* não foram capazes de revelar possíveis diferenças entre as plantas provenientes de Aljustrel e Beja, encontrando-se, no entanto, a decorrer o *screening* de um maior número de *primers*.

Discussão

A identificação de genes da AOX pertencentes às duas sub-famílias, *AOX1* e *AOX2*, encontra-se em concordância com os resultados referidos por diversos autores noutras espécies vegetais (Saisho et al., 1997; Considine et al., 2002). O esclarecimento quanto ao número de genes pertencentes à sub-família *AOX1* requererá trabalho ulterior, nomeadamente o isolamento das extremidades das sequências. Neste momento decorrem já trabalhos nesse sentido, assim como no sentido de averiguar a existência de mais genes em *H. perforatum*.

Os resultados obtidos na análise por RAPD permitem concluir que a técnica foi estabelecida com sucesso e que pode ser utilizada como ferramenta na análise de polimorfismos genéticos existentes entre plantas de *H. perforatum* provenientes de distintos locais, permitindo assim a caracterização desses genótipos. Esta técnica foi previamente referida por Arnholdt-Schmitt como metodologia para avaliação da biologia da reprodução (2000) e também na caracterização da biodiversidade em *H. perforatum* (2002). A aplicação desta técnica consistirá numa abordagem complementar ao desenvolvimento de um marcador funcional baseado nos genes da AOX, pois permite uma análise mais abrangente ao avaliar a biodiversidade ao nível de uma maior parte do genoma.

Agradecimentos

Os trabalhos de investigação foram financiados pela Comissão Europeia (Marie Curie Chair de Birgit Arnholdt-Schmitt) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (atribuição de uma bolsa de investigação a Alexandre Ferreira: SFRH/ BI/15993/2006).

Referências

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Arnholdt-Schmitt, B. 2000. RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L.. Theor. Appl. Genet. 100, 906-911.
- Arnholdt-Schmitt, B. 2002. Characterization of *Hypericum perforatum* L. Plants from Various Accessions by RAPD Fingerprinting. In: Johnson CB and Franz C (eds.), Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants, New York. pp.163-169.
- Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J.H. & Melo, D.F. 2006. AOX - a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? Trends in Plant Science 11(6), 281-287.

- Birnboim, H.C. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24, 7(6), 1513-1523.
- Considine, M.J., Holtzapffel, R.C., Day, D.A., Whelan, J. & Millar, H. 2002. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.* 129, 949-953.
- Costa, J.H., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Pham-Thi, A.T., Lima, M.G., Dizengremel, P., Jolivet, Y. & de Melo, D.F. 2004. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b. *Plant Science* 167, 233-239.
- Macedo, E., Cardoso, H., Peixe, A. & Arnholdt-Schmidt, B. 2006. Isolation of alternative oxidase (AOX) genes of *Olea europaea* L. *Proceedings of the Olivebiotech 2006*, vol. I, pp. 131-134.
- Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. & Nakazono, M. 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 35, 585-596.
- Vanlerberghe, G.C. & McIntosh, L. 1992. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol.* 100, 115-119.
- Whelan, J., Millar, A.H. & Day, D.A. 1996. The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta* 198, 197-201.
- Whelan, J., Smith, M.K., Meijer, M., Yu, J.W., Badger, M.R., Price, G.D. & Day, D.A. 1995. Cloning of an additional cDNA for alternative oxidase in tobacco. *Plant Physiol.* 107, 1469-1470.

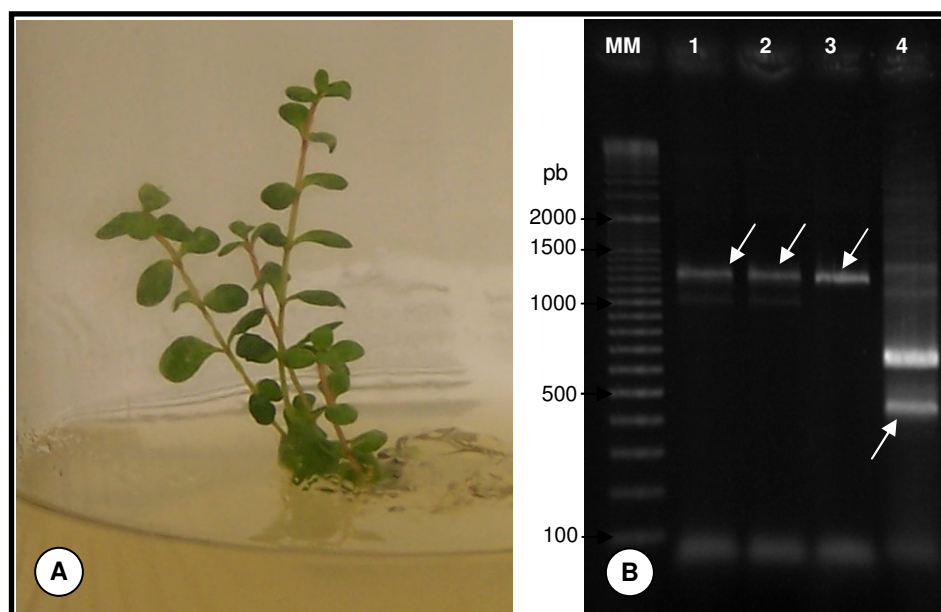


Figura 1. (A) Planta de *H. perforatum* in vitro. (B) Resultado da amplificação com os primers 41AOX1 e 44AOXR (1), 40AOX2 e 44AOXR (2), 41AOX2 e 44AOXR (3), P1 e P2 (4); MM: marcador molecular O'RangeRuler 100bp+500bp (Fermentas).

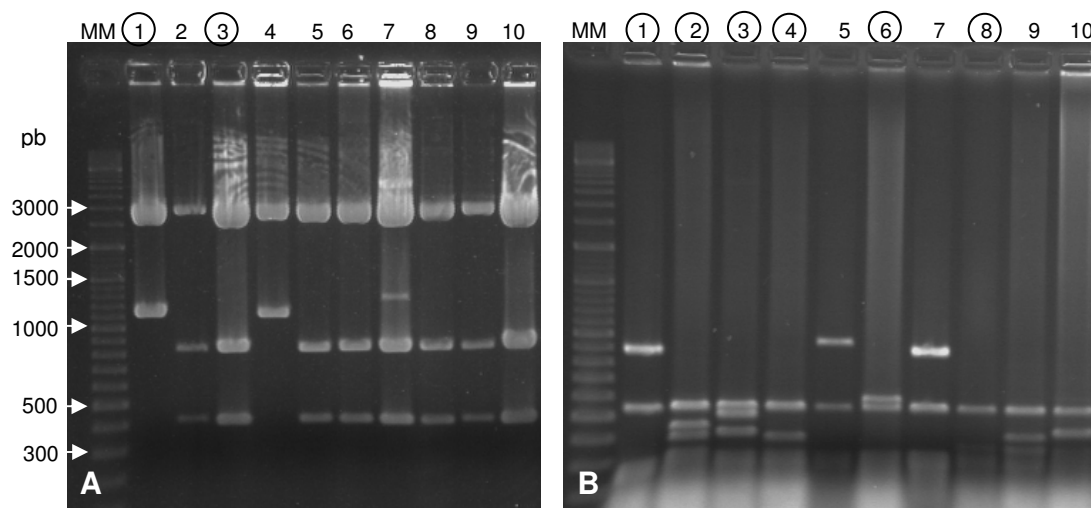


Figura 2. Padrões de restrição de 10 clones obtidos com os *primers* 41AOX2 e 44AOXR utilizando a enzima *EcoRI* (A) e as enzimas *AluI* e *HpyF3I* (B). Os clones com diferentes padrões de restrição, seleccionados para sequenciar, estão identificados com um círculo. A primeira linha de cada gel (MM) corresponde ao marcador molecular O'RangeRuler 100bp+500bp (Fermentas).

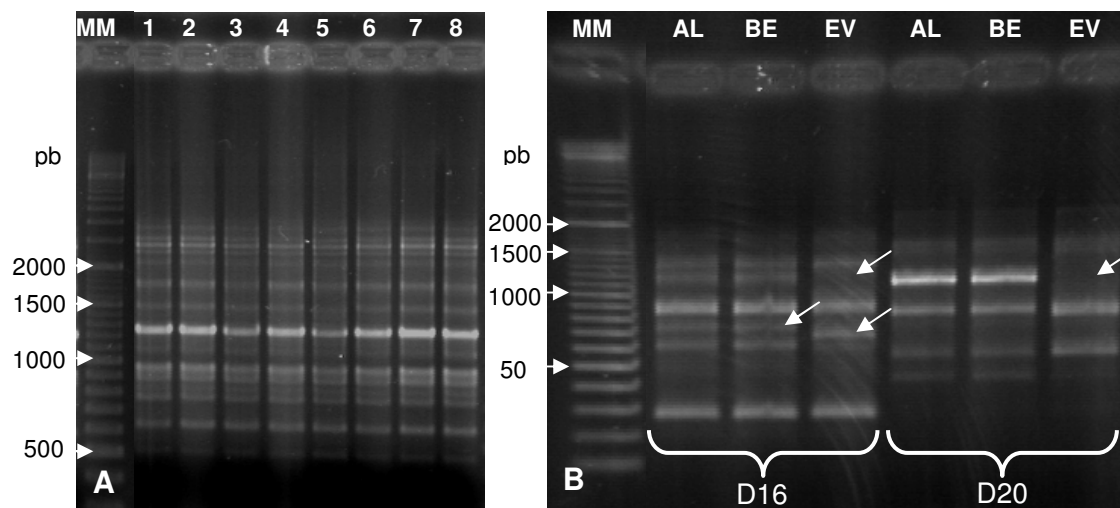


Figura 4. Exemplo referido no estabelecimento do método de análise por RAPD *fingerprinting*. (A) Resultado da amplificação com o *primer* D20 utilizando como *template* o DNA de 8 extracções independentes, não sendo visíveis diferenças; (B) Resultado da avaliação de polimorfismos genéticos entre plantas de origens distintas (AL: Aljustrel, BE: Beja e EV: Évora) utilizando dois *primers* (D16 e D20). Os polimorfismos visíveis entre a planta proveniente de Évora e as plantas de Aljustrel e Beja estão assinalados com setas.

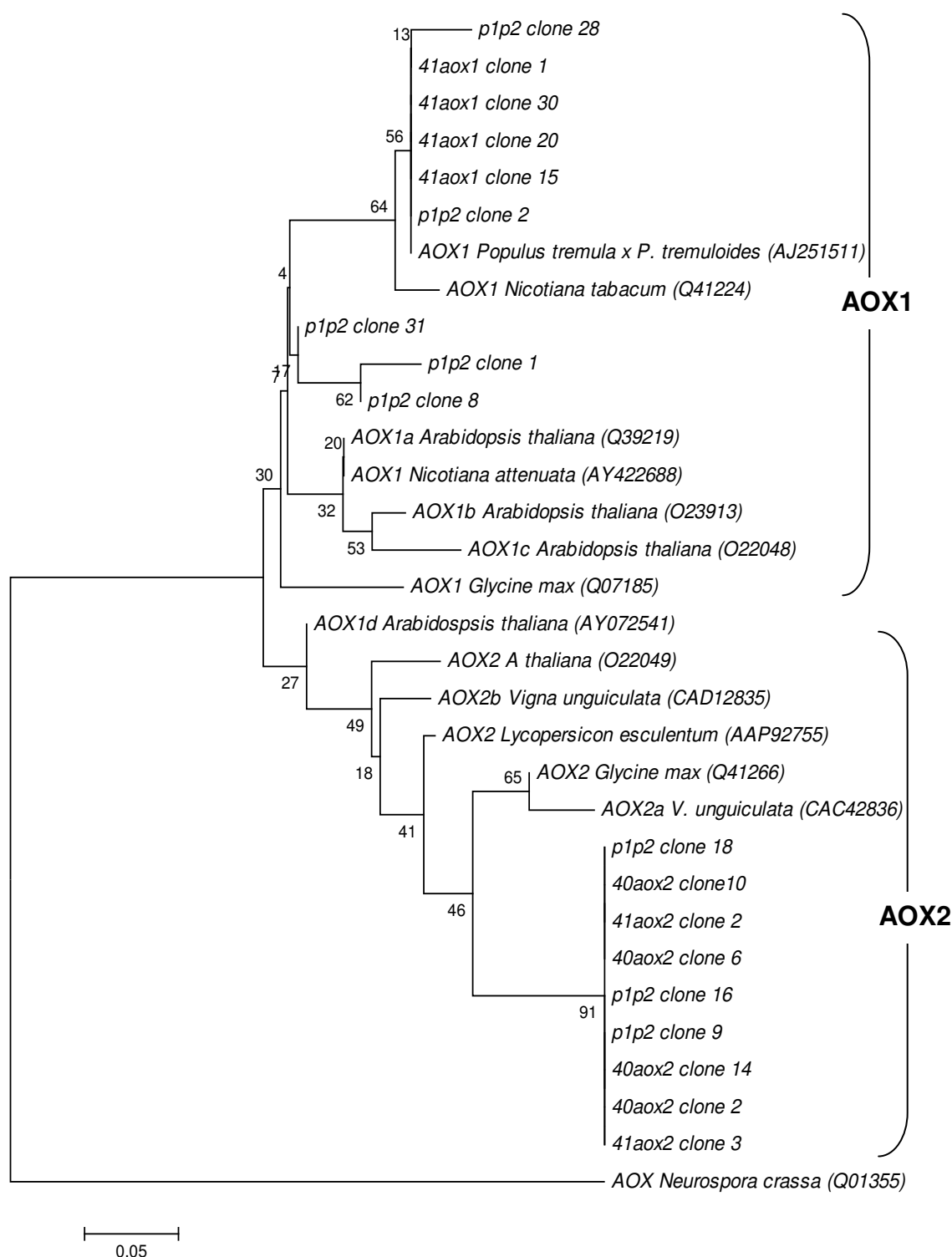


Figura 3. Dendrograma construído com a sequência parcial de algumas proteínas de AOX (sequencia parcial do exão 3) de plantas, fungos e *Trypanosoma*. As sequências foram obtidas no GenBank do NCBI e Swiss-Prot/TrEMBL. As diferentes sequências de *H. perforatum* encontram-se identificadas pelo número dos clones seleccionados para sequenciação e os primers usados para o isolamento. O dendrograma é *Neighbor-Joining* (1000 *bootstrap*). A barra indica 0,05 substituições por sítio.