

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



Alexandre Ferreira, Hélia Cardoso, Joaquim Efe Serrano & Birgit Arnholdt-Schmitt*
EU Marie Curie Chair, ICAM, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal

*Autor correspondente: eu_chair@uevora.pt

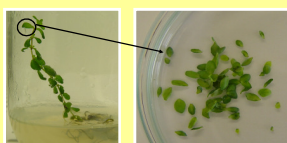


RESUMO

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 diversas tipos de stress ambiental. No presente trabalho 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.

METODOLOGIA - RESULTADOS E DISCUSSÃO

I. Material Vegetal e Extração de DNA

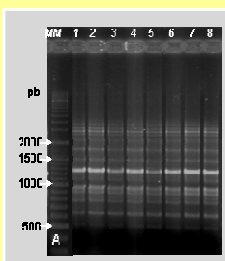


O DNA genómico de *H. perforatum* L., utilizado no isolamento dos genes AOX e nos trabalhos de RAPD Fingerprinting, foi extraído de folhas jovens de plantas germinadas e cultivadas em condições *in vitro*. Para os trabalhos de RAPD fingerprint foram utilizadas plantas de 10 locais diferentes no Alentejo, tendo como critério de selecção o crescimento diferencial.

O DNA foi extraído utilizando o DNEasy kit (Qiagen).

II. RAPD Fingerprinting

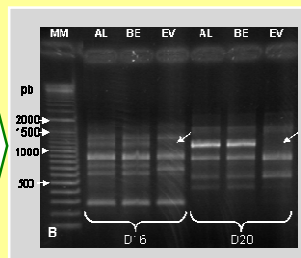
Para estabelecimento da técnica de RAPD fingerprinting foram testados os 20 primers do Kit D Random (ROTH®).



Para avaliação da existência de um efeito do método de extração foram efectuadas oito extrações de DNA de uma mesma planta.

Os resultados obtidos permitiram verificar que os fingerprints produzidos eram idênticos, garantindo a reprodutibilidade deste método resultante da amplificação com o primer D20.

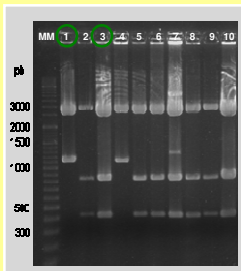
Para avaliação da aplicabilidade do método na distinção de genótipos da região do Alentejo foram iniciadas as análises de plantas provenientes de Aljustrel (AL), Beja (BE) e Évora (EV). Os primeiros resultados, obtidos com os primers D16 e D20, revelaram polimorfismos entre a planta EV e as plantas AL e BE.



III. Isolamento e Clonagem dos Genes AOX

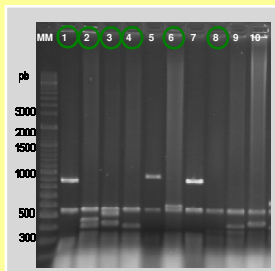
Para amplificar os fragmentos relativos aos genes AOX utilizaram-se os primers P1 e P2 (1), e os primers 41AOX1, 41AOX2, 40AOX2 combinados com o 44AOXR (Costa *et al.*, não publicado). Os fragmentos obtidos foram clonados no vector pGEM®-T Easy System I (Promega).

O produto da reacção de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes *E. coli* JM109 (Promega).



O DNA plasmídico dos clones recombinantes foi extraído segundo o método da Lise Alcalina (2).

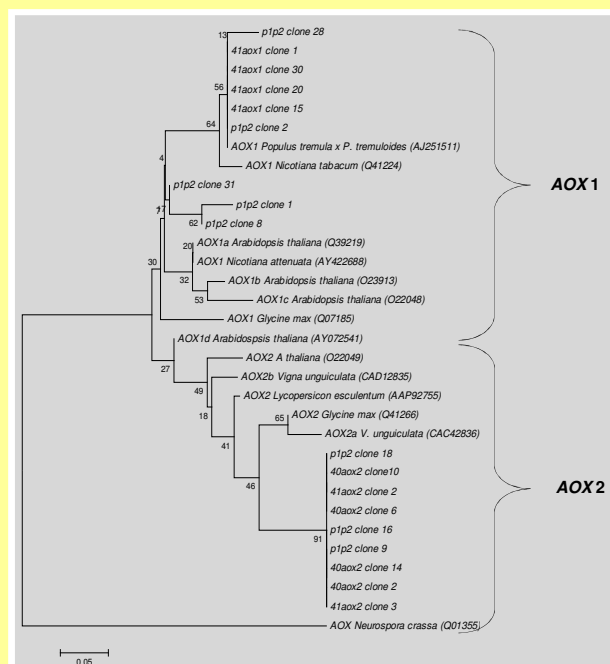
Para a caracterização dos clones utilizaram-se as enzimas *EcoRI* (à esquerda), *HpyF3I* e *AluI* (à direita).



IV. Análise das Sequências Clonadas

Foram analisados 108 clones recombinantes seleccionando-se 49 para sequenciação. A identificação das sequências de *H. perforatum* como sendo de AOX baseou-se na elevada homologia com sequências de genes codificantes de AOXs publicadas na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Segundo esta análise identificaram-se 18 clones recombinantes com elevada homologia com sequências codificantes da AOX.

Para construção do dendrograma considerou-se o péptido putativo resultante da dedução de uma parte da região do exão 3 das sequências isoladas de *H. perforatum* e de sequências homólogas. Para estabelecer o alinhamento dessas sequências utilizou-se o método ClustalW do programa BioEdit. Para a construção do dendrograma utilizou-se o programa MEGA 3.1 (*Neighbor-Joining*, 1000 *bootstrap*).



De acordo com o dendrograma obtido pode sugerir-se a existência de **2 genes AOX1** (um representado 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 outro gene correspondente ao grupo constituído pelos clones 1, 8 e 31 originado pelos primers P1 e P2) e **1 gene AOX2** (representado pelos clones 9, 16 e 18 originado pelos primers P1 e P2; pelos clones 2, 6, 10 e 14 originado pelos primers 40AOX2 e 44AOXR; e pelos clones 2 e 3 originado pelos primers 41AOX2 e 44AOXR).

CONCLUSÕES

► A identificação de genes AOX pertencentes às duas sub-famílias, AOX1 e AOX2, encontra-se em concordância com os resultados referidos por diversos autores noutras espécies vegetais (1; 3). O esclarecimento quanto ao número de genes pertencentes à sub-família AOX1 requererá trabalho ulterior, nomeadamente o isolamento das extremidades das sequências.

► 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. 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. & Nakazono, M. 1997. Plant Mol. Biol. 35, 585-596. (2) Birnboim, H.C. & Doly, J. 1979. Nucleic Acids Res. 24, 7(6), 1513-1523. (3) Considine, M.J., Holtzapfel, R.C., Day, D.A., Whelan, J. & Millar, H. 2002. Plant Physiol. 129, 949-953.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Comissão Europeia por atribuir uma Cátedra Marie Curie Chair a Birgit Arnholdt-Schmitt, e à Fundação para a Ciência e Tecnologia pela atribuição de bolsas a Hélia Cardoso (FCT/SFRH/BPD/27016/2006) e a Alexandre Ferreira (GRICES/FCT: SFRH/BI/15993/2006).