

## **Abordagens moleculares para o estabelecimento da *Corema album* como nova cultura**

Filomena Nóbrega<sup>1</sup>, Isabel Evaristo<sup>1</sup>, Ana Lisboa<sup>2</sup>, Teresa Valdiviesso<sup>1</sup>, Cândida S. Trindade<sup>1</sup> & Pedro B. Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., UEIS-SAFSV, Av. da República, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

<sup>2</sup>Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

### **Resumo**

A camarinha ou camarinheira, *Corema album* (L.) D. Don da família das Ericáceas, é uma espécie que pode integrar o mercado dos pequenos frutos devido ao elevado valor nutritivo e características importantes quanto à composição em antioxidantes que os seus frutos apresentam. O sucesso desta integração no mercado passa pelo estabelecimento desta espécie como nova cultura, ou seja, pela intensificação e diversificação a fim de se aumentar a produção de fruto. Nesta perspetiva, o conhecimento sobre a identificação de plantas masculinas e femininas (dimorfismo sexual) a fim de se proceder a uma seleção precoce de jovens plantas provenientes de semente é de grande importância. Neste sentido, iniciou-se este estudo, em plantas masculinas e femininas selecionadas na época da floração, recorrendo a marcadores moleculares ISSR. O objetivo consiste em desenvolver e validar um marcador genético que permita a identificação do género em qualquer estágio de desenvolvimento do ciclo de vida da planta. Também de grande importância para a intensificação desta espécie como cultura é o conhecimento das alterações da semente ao longo do processo de germinação. Assim, iniciou-se também o estudo das alterações proteicas e moleculares em sementes colhidas em diferentes tempos de um ensaio de germinação implementado no INIAV. Na análise molecular estudaram-se os polimorfismos relacionados com os genes associados ao crescimento do embrião e à degradação do endosperma micropilar, utilizando *primers* específicos já descritos em diferentes estudos de transcriptómica para outras espécies. Simultaneamente, e em sementes dos mesmos tempos de recolha realizaram-se as análises de proteínas totais utilizando a técnica SDS-PAGE. A comparação e integração destes resultados preliminares pretendem auxiliar quer na seleção atempada de plantas com interesse económico para a intensificação da cultura bem como na interpretação da dificuldade de germinação das sementes de *C. album* em condições controladas.

**Palavras-chave:** Dimorfismo sexual, marcadores moleculares ISSR, polimorfismos, genes, proteínas.

### **Abstract**

*Corema album* (L.) D. Don, known as camarinhas or camarinheira, belongs to the family Ericaceae and it is an endemic species with potential in the berries market due to its fruits have a distinct white color, offer a high nutritional value and have important characteristics related to the composition of antioxidants. For the success of this berries market it is important the establishment of this species as a new culture, for the intensification and diversification in order to increase the production. For this, the knowledge about plant sex identification is very important in order to carry out a

selection at the early stages of development before flowering. The utilization of molecular markers at this stage for early and rapid identification of sex is important due to the lack of morphological markers. In this study, molecular markers Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) were screened among male and female plants to identify putative sex-specific marker. Another important knowledge for the establishment of a new culture is related to the seed changes during germination process. So, two other approaches were developed: the study of storage proteins and the detection of polymorphisms associated genes related to embryo growth and degradation of endosperm. All results of these research activities are intended to assist both in the timely selection of plants with economic importance to the intensification of culture as well as in the interpretation of the difficulty of germination of seeds of *C. album* under controlled conditions.

**Keywords:** Sexual dimorphism, molecular markers ISSR, polymorphisms, genes, proteins.

### Introdução

*Corema album* (L.) D. Don, de nome comum camarinha ou camarinheira, é uma espécie endémica dos sistemas dunares de toda a costa atlântica da Península Ibérica, desde o Cabo Finisterra até ao estreito de Gibraltar. É um arbusto que pertence à família das Ericáceas, conhecido internacionalmente como ‘portuguese crowberry’, e que produz uma drupa branca (camarinha), comestível, de sabor refrescante e agridoce, com um elevado valor nutritivo e importante quantidade em água e antioxidantes. Este conhecimento das características do fruto tem conduzido a diferentes esforços para que se estabeleça esta espécie como uma nova cultura para intensificação da produção e, consequentemente, da disponibilidade de frutos para comercialização. O estabelecimento desta espécie como uma nova cultura que reúna as características desejáveis à comercialização constitui um grande desafio a ser enfrentado e implica a aplicação do conhecimento obtido em vários domínios de investigação que ofereçam suporte a um programa de melhoramento. Um dos domínios prioritários a desenvolver relaciona-se com o dimorfismo sexual da espécie e com a necessidade de identificar, precocemente, as plantas femininas e masculinas. Para a *Corema album*, não existem caracteres morfológicos e fenotípicos que possam diferenciar os indivíduos femininos e masculinos na fase jovem, o que limita a adoção de estratégias de melhoramento que envolvam a seleção ou amostragem de plantas na fase ainda não reprodutiva. Nesta espécie dioica, a identificação do sexo das plantas no campo só pode ser visualizada na época da primeira floração que ocorre após 5 a 6 anos, o que implica a necessidade de aumentar o número de plantas no campo, o que termina por contribuir para o encarecimento dos custos de produção. Por isso, a identificação tardia constitui a primeira limitação para o estabelecimento de uma cultura. Atualmente é possível identificar precocemente o sexo das plantas com o uso de marcadores moleculares. Os marcadores microssatélites ou ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) são indicados como uma ferramenta molecular adequada para o desenvolvimento de um método rápido para a determinação do sexo em plantas (Zietkiewicz et al. 1994, Parasnis et al. 1999, Deputy et al. 2002, Samantaray et al. 2010).

Assim, neste estudo, recorreu-se a marcadores moleculares ISSR para desenvolver um marcador genético que permita a identificação do sexo das plantas num estágio inicial de desenvolvimento, ou seja, antes da floração. Outro domínio de investigação importante para o estabelecimento da espécie é o conhecimento

relacionado com as alterações que podem ocorrer nas sementes ao longo do processo de germinação a fim de se poder acelerar a obtenção de plântulas. Segundo Calvinó-Cancela (2004, 2006) as sementes possuem um endocarpo lenhoso e elevada dormência e a germinação da espécie é difícil em condições laboratoriais pois na natureza está associada a vetores animais. Por isso, o conhecimento da semente é também de grande importância para o estabelecimento desta cultura. A biologia molecular associada ao controle de qualidade de sementes tem evoluído rapidamente e novas técnicas têm-se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares (Clemente et al. 2015). Contudo, ainda são escassos os trabalhos dedicados à expressão de genes durante o processo germinativo e, em particular, para esta espécie. No entanto, tendo como base os genes já identificados para outras espécies em estudos de transcriptômica, na análise molecular estão a ser estudados os polimorfismos dos genes actina, ciclina e  $\alpha$ -expansina, associados ao crescimento do embrião e  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -manosidase e endo- $\beta$ -mananase, associados à degradação do endosperma micropilar. Sendo as proteínas importantes constituintes da semente, simultaneamente foram analisados os perfis das proteínas totais nas sementes ao longo do processo de germinação. O objetivo final é identificar um marcador genético para análise de material vegetativo em estágio de desenvolvimento inicial, ou em qualquer estágio de maturação sexual e contribuir para a definição do tratamento a adotar para uma rápida germinação. Apresentam-se neste trabalho os resultados preliminares obtidos para as linhas de investigação acima referidas.

## Material e métodos

### Material vegetal

O estudo da identificação sexual das plantas foi realizado em amostras de folhas colhidas em 7 plantas adultas femininas e 7 plantas adultas masculinas, na época da floração, amostradas numa população original localizada na região da Fonte da Telha. Após a colheita, as amostras de folhas foram imediatamente transportadas para o Laboratório e adequadamente congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até ao momento da extração do ADN. Para o estudo das proteínas totais e dos polimorfismos moleculares associados aos genes actina, ciclina,  $\alpha$ -expansina,  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -manosidase, utilizaram-se as sementes do ensaio de germinação estabelecido no INIAV. O ensaio de germinação foi estabelecido com sementes provenientes de 4 genótipos diferentes (AM8, AM11, AM17 e AM19) e foram submetidas a 2 tratamentos: imersão em água e escarificação química em ácido sulfúrico concentrado. Estas sementes foram colocadas em câmaras fitoclima com condições de humidade relativa, fotoperíodo e temperatura diferentes. As sementes foram retiradas no tempo zero (C1 - colheita 1- referência T0 e T1), ao fim de 3 meses (C2 - colheita 2) e depois ao fim de mais 3 meses (C3 e C3\* - colheitas 3 e 3\*) (fig.1).

### Extração de ADN e amplificação por PCR

A extração do ADN foi realizada recorrendo-se ao DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo-se as instruções do fornecedor. A concentração e integridade do ADN foram determinadas usando o espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Para a identificação das plantas femininas e masculinas foram testados 12 *primers* ISSR (Quadro 1). Para a identificação de polimorfismos moleculares nas sementes utilizaram-se os *primers* específicos de embrião e endosperma micropilar de sementes de café utilizados para análises de PCR em tempo real (Faria, 2012) (Quadro 2). As reações de PCR foram realizadas num termociclador TGradient da Biometra (Biometra, Gotting, Germany) para um volume final de 25  $\mu\text{l}$  utilizando o Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase kit

(Promega, Madison). Cada mistura de reação continha 10 ng de ADN, 5 µl de solução tampão GoTaq Flexi PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.20 mM de cada dNTPs, 1.25 U GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison) e 0.4 µM de cada primer. As condições de PCR foram as seguintes: 1 ciclo a 94°C durante 2min, seguido de 40 ciclos com as etapas de 30s a 94°C para desnaturação; 45s a Ta (Quadro 1) para emparelhamento e 2 min para extensão à temperatura de 72°C e, por último, um ciclo de 7 min a 72°C para extensão final.

Para o estudo dos polimorfismos moleculares nas sementes foram utilizadas as mesmas misturas de reação com as seguintes condições de PCR: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação de 2min a 94 °C, emparelhamento a 55 °C durante 1 min e extensão a 72 °C durante 1 min, seguindo-se uma extensão final a 72 °C durante 10 min. Após a PCR, os produtos amplificados foram submetidas à eletroforese utilizando gel de agarose a 2% contendo 0.5 µg.ml<sup>-1</sup> de brometo de etídio e 0.5x Tris-borato-EDTA (TBE) de tampão de corrida. A eletroforese realizou-se a 5 V/cm. As amplificações foram visualizadas num sistema de imagem VersaDoc Gel Imaging System (Bio-Rad, USA).

#### Proteínas totais

Pesaram-se cerca de 10 mg de amostra de sementes previamente maceradas em azoto líquido. As amostras moídas foram colocadas num tubo Eppendorf com 700 µl de solução tampão de extração (475 µl solução tampão Laemmli + 25µl β-mercaptoetanol + 200 µl ureia a 10%) e agitadas durante 2 minutos. Deixaram-se repousar durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida procedeu-se à centrifugação das amostras a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Recuperou-se o sobrenadante e procedeu-se à desnaturação das amostras a 100°C durante 5 minutos. As amostras foram aplicadas de seguida em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), utilizando um gel de separação a 15% e gel de concentração a 4%. A eletroforese realizou-se a 70 volts, em solução tampão Tris:Glicina a 25 mM e 0,1% de SDS utilizando o sistema Mini-Protean (Bio-Rad). Para estimar o tamanho das proteínas foi utilizado um marcador de peso molecular: Precision plus protein dual color standards (Bio-Rad). A revelação dos géis para deteção das proteínas efetuou-se por coloração com a solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma).

## **Resultados**

### Dimorfismo sexual

Dos 12 primers ISSR ensaiados, dois *primers* com repetições di-nucleotídicas e ancorados, um na extremidade 3' com 2 bases degeneradas (ISSR3 - (CA)<sub>8</sub>RT) e o outro ancorado na extremidade 5' com 3 bases degeneradas (ISSR6 - HVH(TG)<sub>7</sub>) apresentaram diferenças entre as plantas masculinas e femininas. As repetições di-nucleotídicas, quando ancoradas na extremidade 3' ou 5' revelam alto polimorfismo e tornam a extremidade dos microssatélites mais específica e reprodutível (Joshi et al. 2000). Como exemplo, apresentam-se a seguir, os perfis obtidos para os produtos de amplificação resultantes do PCR-ISSR com os 2 *primers* referidos, para plantas masculinas e femininas (Figura 2). Estes resultados estão a ser validados e outros *primers* estão ainda a ser ensaiados.

### Perfis das proteínas das sementes

As análises em SDS-PAGE mostraram que os extratos proteicos das sementes com os diferentes tratamentos apresentaram bandas que variaram de 10 a 75 kDa. Comparando-se os padrões das bandas para o mesmo genótipo e para os diferentes

tempos de colheita das sementes, observa-se que as amostras apresentaram o mesmo número de bandas, como mostra o exemplo apresentado na Figura 3.

#### Polimorfismos moleculares

Apresentam-se a seguir, como exemplo, os perfis obtidos para os produtos de amplificação resultantes de polimorfismos moleculares detetados com os *primers* específicos dos genes actina, ciclina,  $\alpha$ -expansina,  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -manosidase, para as sementes colhidas ao longo do processo de germinação para do genótipo AM8 (Figura 4). Observam-se algumas alterações nos perfis dos produtos amplificados. Para as sementes submetidas ao tratamento de escarificação química em ácido sulfúrico concentrado não se conseguiu a amplificação do ADN.

#### **Conclusão**

As linhas de investigação iniciadas neste trabalho deram informações importantes e mostraram também quais as estratégias a seguir no futuro. Todas as metodologias terão ainda de ser melhoradas e outros caminhos estão a ser já iniciados.

#### **Referências**

- Boudreau, S., P. Ropars & Harper, K.A.. 2010. Population dynamics of *Empetrum hermaphroditum* (Ericaceae) on a subarctic sand dune: Evidence of rapid colonization through efficient sexual reproduction. *American Journal of Botany* 97: 770–781.
- Clemente, A.C.S., Guimarães, R.M., Martins, D.C., Gomes, L.A.A., Caixeta, FReis, R.G.E. & S.D.V.F. Rosa. 2015. Expression of genes associated with the biosynthetic pathways of abscisic acid, gibberellin, and ethylene during the germination of lettuce seeds. *Genetics and Molecular Research* 14 (2): 4703-4715.
- Calvinõ-Cancela, M. 2004. Ingestion and dispersal: direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae). *Acta Oecologica* 26, 55-64.
- Calvinõ-Cancela, M. 2006. Seed and microsite limitations of recruitment and the impacts of postdispersal seed predation at the within population level. *Plant Ecol* 192, 35-44.
- Deputy J.C., Ming R., Ma H., Liu Z., Fitch M.M.M., Wang M., Manshardt R. & Stiles J.I.. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Caricapapaya* L.). *Theor Appl Genet* 106:107–111.
- Farias, E.T. 2012. Expressão gênica no embrião e no endosperma micropilar de sementes de café (*Coffea arabica* L.) durante a germinação. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Agricultura).
- Joshi, S. P., Gupta, V. S., Aggarwal, R. K., Ranjekar, P. K., Brar, D. S. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 100, p. 1311–1320.
- Mukherjee, A., B. Sikdar, B. Ghosh, A. Banerjee, E. Ghosh, M. Bhattacharya & S.C. Roy. 2013. RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties, and cultivars of the genus *Allium* (Alliaceae). *Turkish Journal of Botany* 37: 605–618.
- Parasnis A.S., Ramakrishna W., Chowdari K.V., Gupta V.S., Ranjekar P.K. 1999. Microsatellite (GATA)<sub>n</sub> reveals sex-specific differences in papaya. *Theoretical and Applied Genetics* 99:1047-1052.

- Samantaray S., Geetha K.A., Hidayath K.P. and Maiti S. 2010. Identification of RAPD markers linked to sex determination in guggal [*Commiphora wightii* (Arnott.)] Bhandari Plant Biotechnology Reports 4:95–99.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

### Quadros e Figuras

Quadro 1. *Primers* PCR-ISSR testados na amplificação do ADN de folhas de *Corema album*, suas respectivas seqüências de nucleótidos e temperaturas de emparelhamento.

Primers ISSR	Seqüência de nucleótidos (5'–3')	Ta (°C)
30FN	(CAG) <sub>5</sub>	53
31FN	(GATA) <sub>4</sub>	53
32FN	(GACA) <sub>4</sub>	50
ISSR1	(GA) <sub>8</sub> YT	49
ISSR2	(TG) <sub>8</sub> RT	50
ISSR3	(CA) <sub>8</sub> RT	52
ISSR5	(TCC) <sub>5</sub>	52
ISSR6	HVH(TG) <sub>7</sub>	50
ISSR7	D8D(AC) <sub>7</sub>	50
MR	GAGGGTGGCGGTTCT	55
ISA1	(AG) <sub>8</sub> T	47
ISA2	(AC) <sub>8</sub> T	51

Ta – Temperatura de emparelhamento

Y = (C, T); R = (A, G); H = (A, C, T); B = (C, G, T); V = (A, C, G); D = (A, G, T)

Quadro 2. *Primers* específicos associados aos genes do embrião e endosperma micropilar de sementes de café (Faria, 2012)

Genes	Seqüência nucleotídica (5'–3')
Actina	F-TTGGCTCCCAGCAGCATGAA R- TGCTGGAATGTGCTGAGGGA
Ciclina	F- TTTGGATTGGCCCGTGCCTT R- AGCCAACCTGACCACACGTCA
α-Expansina	F- TCGTGCAGGCATCGGTCAAA R- AAGAGCGACGGTCACTTGCT
α-Galactosidase	F- TCCATGGACGGTGC GACTTT R- AAGAGGTCCAGCCCAAACCT
β-Manosidase	F- TTGGGCCGTGAAGTCGTGAA R- AAGGCAGCAACCACTCTTGG

F, *primer forward*; R, *primer reverse*

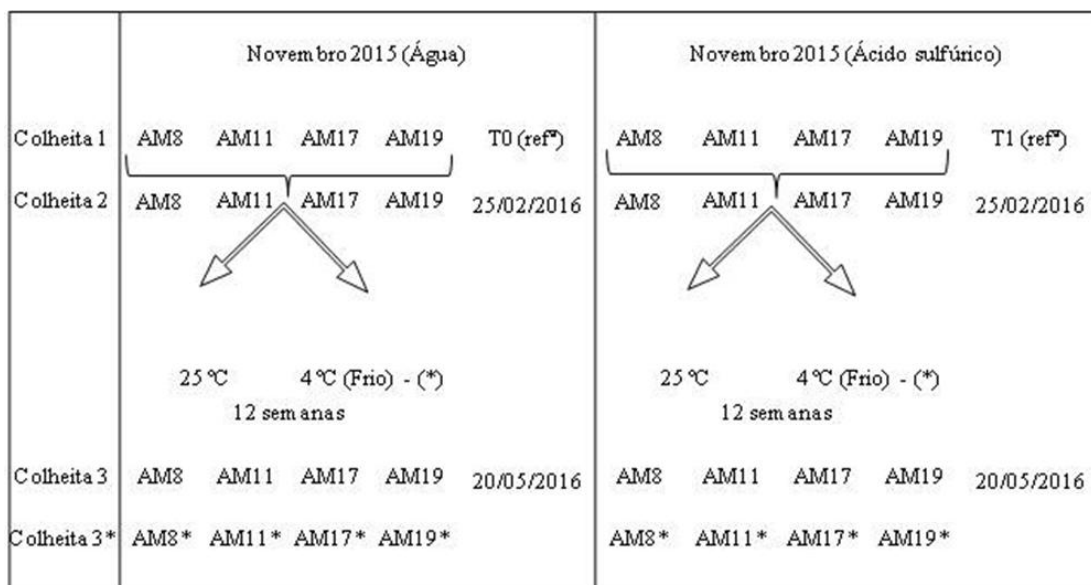


Figura 1. Esquema representativo da colheita das sementes do ensaio de germinação implementado no INIAV

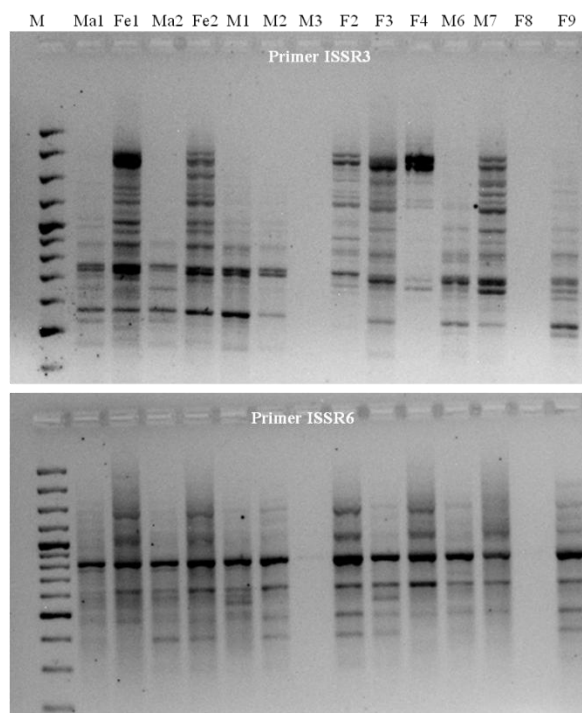


Figura 2. Géis de agarose com os produtos amplificados para os *primers* ISSR3 e ISSR6. M: marcador: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas); Ma1, Ma2, M1, M2, M3, M6, M7: plantas masculinas; Fe1, Fe2, F2, F3, F4, F8, F9: plantas femininas.

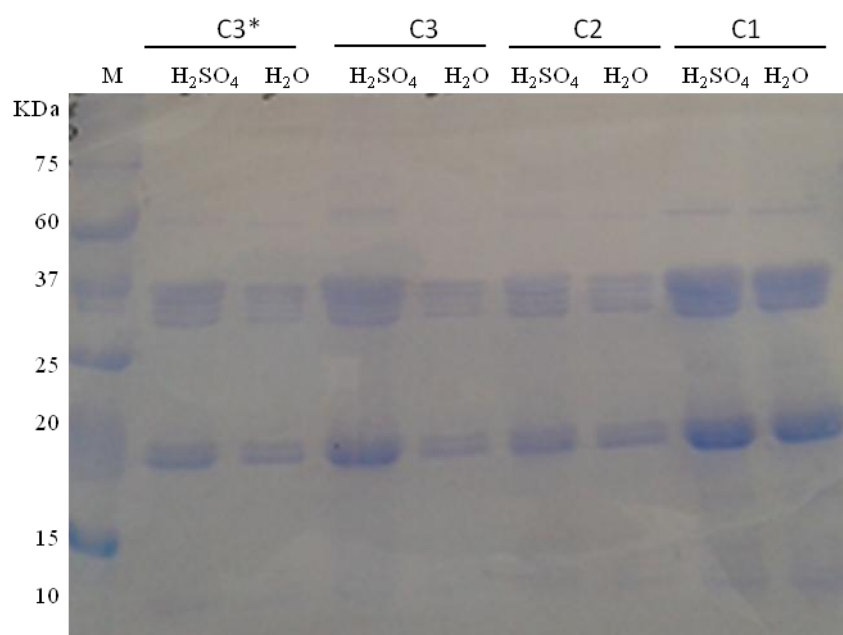


Figura 3. Perfis eletroforéticos de extratos proteicos das sementes do genótipo AM8 com diferentes tratamentos (fig.1) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue. M-Marcador molecular (KDa), C1- colheita no tempo zero, C2- colheita após 3 meses, C3-colheita após 6 meses, C3\*-colheita após 6 meses com 3 meses de frio.