



**Ana Rita Andrade Borba**

Licenciada

**Cultura de tecidos de *Hypericum foliosum* e análise de genes associados à biossíntese de hipericinas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Artur da Câmara Machado, Professor Auxiliar  
com Agregação, Universidade dos Açores  
Co-orientador: Duarte Mendonça, Doutor,  
Universidade dos Açores





**Ana Rita Andrade Borba**

Licenciada

**Cultura de tecidos de *Hypericum foliosum* e análise de genes associados à biossíntese de hipericinas**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur da Câmara Machado (Universidade dos Açores) e do Doutor Duarte Mendonça (Universidade dos Açores)



Cultura de tecidos de *Hypericum foliosum* e análise de genes associados à biossíntese de hipericinas

Copyright Ana Rita Borba, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

O presente trabalho foi desenvolvido no LA IBB - Centro de Biotecnologia dos Açores da Universidade dos Açores, ao qual, enquanto Instituição, estou eternamente grata.

Ao Professor Doutor Artur da Câmara Machado, orientador científico deste estudo, quero expressar o meu sincero agradecimento pela ideia original do projecto, pelos conselhos científicos e críticas construtivas, pela enorme paciência e amizade com que sempre me tratou e pela revisão da tese escrita.

Ao Doutor Duarte Mendonça, agradeço o acompanhamento e a disponibilidade que a co-orientação deste projecto exigiu, diariamente. Agradeço ainda o incentivo e os ensinamentos relativos às técnicas realizadas, bem como à correcção do trabalho escrito.

À Doutora Maria Susana Lopes, pelo apoio no desenho de *primers*, na sequenciação e na análise das sequências nucleotídicas e proteicas, além da pronta disponibilidade para rever a tese.

À Doutora Catarina Melo, o meu bem haja pelo carinho e companheirismo com que sempre me tratou, pelo apoio na análise estatística dos dados e pela revisão da tese.

À Dra. Carolina Tavares, por todo o apoio técnico ao nível da histologia.

À Mestre Sara Rocha, quero agradecer a revisão da tese.

A todos os restantes colegas do CBA, agradeço a amizade e o apoio prestados no decorrer deste projecto.

Por fim, quero expressar um profundo obrigada aos meus pais pela educação e formação que me proporcionaram, pelo estímulo diário e pelas palavras de carinho e conforto. Foi bom voltar a casa!



## Resumo

O género *Hypericum* caracteriza-se pela ocorrência de compostos biologicamente activos com grande importância farmacêutica, nomeadamente as hipericinas. Nos Açores o potencial de plantas endémicas com interesse biotecnológico, como o pequeno arbusto *Hypericum foliosum* Aiton, é em parte desconhecido. Com o presente estudo pretendeu-se estabelecer e otimizar culturas celulares de *H. foliosum* em diferentes sistemas de cultura *in vitro* e analisar a expressão dos genes *hyp-1* e *HpPKS2*, associados à biossíntese de hipericinas, em folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, bem como em culturas em suspensão e em culturas celulares estabelecidas nos TIS. Neste estudo descreve-se, pela primeira vez, o TIS como um sistema biotecnológico eficiente na produção otimizada e automatizada de *H. foliosum*, através da indução da organogénese indirecta de raízes adventícias e da embriogénese somática indirecta. As sequências dos fragmentos estudados dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* de *H. foliosum* partilham valores de similaridade elevados com as depositadas na base de dados GenBank® para os mesmos genes e género. Contudo, foram encontradas mutações *missense* e *frameshift* na sequência de *HpPKS2* de *H. foliosum* que sugerem diferenças significativas relativamente à proteína de *H. perforatum* (EF186676). O nível máximo de expressão do gene *hyp-1* foi detectado nas culturas de calos que induziram a regeneração indirecta de raízes adventícias, estabelecidas nos sistemas TIS.

**Termos-chave:** *Hypericum foliosum*; cultura de tecidos; TIS; expressão génica; *hyp-1*; *HpPKS2*.



## Abstract

The genus *Hypericum* is characterized by the presence of biologically active compounds with great pharmaceutical importance, namely the hypericins. In the Azores, the potential of endemic plants with biotechnological interest, such as the small shrub *Hypericum foliosum* Aiton, is quite unknown. The present study aims to establish and optimize cell cultures of *H. foliosum* in different *in vitro* culture systems and to analyze the expression of the *hyp-1* and *HpPKS2* genes, possibly involved in the biosynthesis of hypericins, in leaves of *in vivo* and *in vitro* plants, as well as in suspension cultures and in cell cultures established in the TIS. This study describes, for the first time, the TIS as an efficient biotechnological system for the optimized and automated production of *H. foliosum*, through the induction of the indirect organogenesis of adventitious roots and the indirect somatic embryogenesis. The sequences of the studied fragments of the *hyp-1* and *HpPKS2* genes of *H. foliosum* share a high level of nucleotide sequence similarity with those deposited in GenBank® for the same genes and genus. However, were found missense and frameshift mutations in the *HpPKS2* sequence of *H. foliosum* that suggest significant differences relatively to the protein of *H. perforatum* (EF186676). The highest level of *hyp-1* gene expression was detected in the calli cultures established in the TIS systems that induced the regeneration of adventitious roots.

**Keywords:** *Hypericum foliosum*; tissue culture; TIS; gene expression; *hyp-1*; *HpPKS2*.



## Índice geral

	Página
<i>Copyright</i> .....	i
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
<i>Abstract</i> .....	vii
Índice geral.....	ix
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xv
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>9</b>
2.1. Cultura de tecidos de <i>Hypericum foliosum</i> Aiton.....	9
2.1.1. Material vegetal.....	9
2.1.2. Micropropagação.....	10
2.1.3. Iniciação de calos.....	10
2.1.3.1. Morfologia dos calos e frequência calogénica.....	11
2.1.3.2. Análise estatística.....	11
2.1.4. Iniciação de culturas celulares.....	12
2.1.4.1. Morfologia de estruturas celulares.....	13
2.1.5. Histologia.....	13
2.2. <i>hyp-1</i> e <i>HpPKS2</i> : genes associados à biossíntese de hipericinas.....	15
2.2.1. Extração e quantificação de ADN.....	15
2.2.2. PCR.....	16

2.2.3. Sequenciação.....	17
2.2.4. Extracção e quantificação de ARN.....	18
2.2.5. Síntese de cADN e quantificação relativa da expressão dos genes <i>hyp-1</i> e <i>HpPKS2</i> ...	19
<b>3. Resultados</b>	21
3.1. Cultura de tecidos de <i>Hypericum foliosum</i> Aiton.....	21
3.1.1. Culturas de calos de <i>H. foliosum</i> .....	21
3.1.1.1. Caracterização morfológica.....	21
3.1.1.2. Número de características morfológicas e frequência calogénica das culturas de calos induzidas nos meios A <sub>1</sub> , B e C <sub>1</sub> .....	24
3.1.2. Culturas em suspensão de <i>H. foliosum</i> .....	32
3.1.2.1. Caracterização morfológica e histológica de estruturas celulares compactas.....	32
3.1.3. Culturas de calos de <i>H. foliosum</i> estabelecidas em TIS.....	34
3.1.3.1. Caracterização morfológica e histológica de estruturas celulares compactas.....	34
3.1.3.2. Caracterização morfológica e histológica de raízes adventícias.....	36
3.2. <i>hyp-1</i> e <i>HpPKS2</i> : genes associados à biossíntese de hipericinas.....	38
3.2.1. Sequências parciais dos genes <i>hyp-1</i> e <i>HpPKS2</i> de <i>H. foliosum</i> .....	38
3.2.2. Expressão dos genes <i>hyp-1</i> e <i>HpPKS2</i> de <i>H. foliosum</i> .....	45
<b>4. Discussão</b>	49
4.1. Cultura de tecidos de <i>Hypericum foliosum</i> Aiton.....	49
4.2. <i>hyp-1</i> e <i>HpPKS2</i> : genes associados à biossíntese de hipericinas.....	52
<b>5. Bibliografia</b>	55

## Índice de figuras

	Página
<b>Figura 1.1</b> - Via de biossíntese das hipericinas proposta por Karppinen (2010).....	4
<b>Figura 2.1</b> - <i>Hypericum foliosum</i> .....	9
<b>Figura 2.2</b> - Fotografia do local de colheita de <i>H. foliosum</i> (Furnas do Enxofre da ilha Terceira).....	10
<b>Figura 2.3</b> - Esquema de funcionamento do TIS RITA <sup>®</sup> composto por uma longa fase de repouso e por uma fase muito curta de imersão.....	12
<b>Figura 3.1</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio A <sub>1</sub> com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias. <b>D)</b> Primórdio radicular com pêlos radiculares, na superfície de um calo.....	21
<b>Figura 3.2</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio A <sub>2</sub> com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias.....	22
<b>Figura 3.3</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio A <sub>3</sub> com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias.....	22
<b>Figura 3.4</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio B com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias.....	22
<b>Figura 3.5</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio C <sub>1</sub> com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias.....	23
<b>Figura 3.6</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio C <sub>2</sub> com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias.....	23
<b>Figura 3.7</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio C <sub>3</sub> com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias.....	24
<b>Figura 3.8</b> - Calos de <i>H. foliosum</i> induzidos pelo meio C <sub>4</sub> com <b>A)</b> 30; <b>B)</b> 70 e <b>C)</b> 100 dias.....	24
<b>Figura 3.9</b> - Número médio de características morfológicas dos calos induzidos nos meios A <sub>1</sub> , B e C <sub>1</sub> .....	25
<b>Figura 3.10</b> - <b>A)</b> Número médio de características morfológicas dos calos, durante 115 dias de cultura no meio A <sub>1</sub> . <b>B)</b> Proporção de ocorrência de fenómenos oxidativos, de primórdios radiculares, de estruturas globulares compactas e de calos compactos, castanhos, brancos e beges, durante os 115 dias de observação.....	27
<b>Figura 3.11</b> - <b>A)</b> Número médio de características morfológicas dos calos, durante 115 dias de cultura no meio B. <b>B)</b> Proporção de ocorrência de fenómenos oxidativos, de primórdios radiculares, de estruturas globulares compactas e de calos compactos, castanhos, brancos e beges, durante os 115 dias de observação.....	28
<b>Figura 3.12</b> - <b>A)</b> Número médio de características morfológicas dos calos, durante 115 dias de cultura no meio C <sub>1</sub> . <b>B)</b> Proporção de ocorrência de fenómenos oxidativos, de primórdios radiculares, de estruturas globulares compactas e de calos compactos, castanhos, brancos e beges, durante os 115 dias de observação.....	29
<b>Figura 3.13</b> - Frequência média calogénica dos meios A <sub>1</sub> , B e C <sub>1</sub> .....	30
<b>Figura 3.14</b> - Frequência média calogénica dos meios <b>A)</b> A <sub>1</sub> e <b>B)</b> C <sub>1</sub> , durante 115 dias de cultura.....	31
<b>Figura 3.15</b> - <b>A)</b> Estruturas celulares compactas obtidas em cultura em suspensão no meio A <sub>1</sub> com 4 meses (116 dias); <b>B)</b> estrutura cordiforme e <b>C)</b> estrutura tipo “framboesa”.....	32
<b>Figura 3.16</b> - Estruturas celulares compactas obtidas em cultura em suspensão no meio C <sub>1</sub> com 4 meses (119 dias). <b>A)</b> Estrutura cordiforme e <b>B)</b> estrutura tipo “framboesa”.....	32

<b>Figura 3.17</b> - Secções histológicas de estruturas globulares compactas obtidas em cultura em suspensão no meio C <sub>1</sub> com 4 meses (130 dias). <b>A)</b> Fase inicial de desenvolvimento de um glóbulo; <b>B)</b> glóbulo compacto associado ao restante tecido parenquimatoso e <b>C)</b> glóbulos compactos completamente isolados.....	33
<b>Figura 3.18</b> – Estruturas celulares compactas <b>A)</b> cordiformes e <b>B)</b> do tipo “framboesa” obtidas em culturas no meio A <sub>1</sub> com 19 dias, estabelecidas nos TIS. Estruturas globulares compactas obtidas em culturas com 52 dias nos meios <b>C)</b> B e <b>D)</b> C <sub>2</sub> , estabelecidas nos TIS.....	34
<b>Figura 3.19</b> - Secções histológicas de culturas de calos estabelecidas nos TIS. Estruturas globulares compactas obtidas em culturas nos meios <b>A)</b> A <sub>1</sub> (cultura com 34 dias) e <b>B)</b> B (cultura com 50 dias).....	35
<b>Figura 3.20</b> - Secções histológicas de culturas de calos no meio C <sub>2</sub> com 50 dias, estabelecidas nos TIS. <b>A)</b> Massas proembriogénicas; <b>B)</b> embrião somático na fase de germinação, com o eixo bipolar estabelecido.....	35
<b>Figura 3.21</b> - Raízes adventícias induzidas pelo meio A <sub>1</sub> , em culturas de calos com 82 dias, estabelecidas nos TIS. <b>A)</b> Raízes visíveis à superfície de um calo; <b>B)</b> raízes com pêlos radiculares.....	36
<b>Figura 3.22</b> - Secções histológicas de culturas de calos no meio A <sub>1</sub> com 77 dias, estabelecidas nos TIS. <b>A)</b> Fase inicial do desenvolvimento dos primórdios radiculares; <b>B)</b> Raízes.....	36
<b>Figura 3.23</b> - Secções histológicas de raízes desenvolvidas em calos (com 46 dias), induzidos pelo meio A <sub>1</sub> . <b>A)</b> secção transversal de uma raiz; <b>B)</b> células de xilema diferenciadas	37
<b>Figura 3.24</b> - Produtos da amplificação, por PCR, de fragmentos dos genes <i>18S rRNA</i> , <i>GAPDH</i> , <i>hyp-1</i> e <i>HpPKS2</i> pelos respectivos <i>primers</i> específicos.....	38
<b>Figura 3.25</b> - Alinhamento entre as sequências do fragmento sequenciado de <i>hyp-1</i> de <i>H. foliosum</i> e o correspondente de <i>H. perforatum</i> (AY148090).....	39
<b>Figura 3.26</b> - Alinhamento múltiplo entre a sequência do fragmento sequenciado do gene <i>hyp-1</i> de <i>H. foliosum</i> e as depositadas na base de dados GenBank® para o mesmo gene e género.....	41
<b>Figura 3.27</b> - Dendograma da relação filogenética entre a sequência de 154 pb do gene <i>hyp-1</i> de <i>H. foliosum</i> e as depositadas na base de dados GenBank® para o mesmo gene e género...	42
<b>Figura 3.28</b> - Alinhamento múltiplo entre sequência do fragmento amplificado do gene <i>HpPKS2</i> de <i>H. foliosum</i> e as depositadas na base de dados GenBank® para o mesmo gene e género.....	43
<b>Figura 3.29</b> - Produtos da amplificação, por RT-PCR, de fragmentos dos genes <i>hyp-1</i> , <i>GAPDH</i> e <i>18S rRNA</i> após a utilização de hexâmeros aleatórios na RT.....	45
<b>Figura 3.30</b> - Quantificação relativa da expressão do gene <i>hyp-1</i> nas amostras de ARN total extraído de plantas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , de culturas em suspensão nos meios A <sub>1</sub> e C <sub>1</sub> e de culturas nos meios A <sub>1</sub> e C <sub>1</sub> , estabelecidas nos TIS. Dados normalizados com a utilização dos controlos internos <b>A)</b> <i>18S rRNA</i> e <b>B)</b> <i>GAPDH</i> individualmente e <b>C)</b> em conjunto.....	47

## Índice de tabelas

	Página
<b>Tabela 2.1</b> - Composição em reguladores de crescimento dos meios MS de indução de calos	11
<b>Tabela 2.2</b> - <i>Primers</i> específicos para os genes <i>hyp-1</i> , <i>HpPKS2</i> , <i>GAPDH</i> e <i>18S rRNA</i> e respectivos tamanhos esperados dos produtos de amplificação.....	16
<b>Tabela 2.3</b> - Componentes e concentrações finais utilizadas nas reacções de PCR.....	16
<b>Tabela 2.4</b> - Programa de amplificação por PCR.....	17
<b>Tabela 2.5</b> - Componentes e concentrações finais utilizadas nas reacções de RT.....	19
<b>Tabela 2.6</b> - Programa da RT.....	20
<b>Tabela 2.7</b> - Programa de amplificação por qPCR.....	20
<b>Tabela 3.1</b> - Valores de <i>F</i> e de <i>p</i> da ANOVA a um factor do número de características morfológicas dos calos (textura, cor, grau de diferenciação e fenómenos oxidativos) durante os 115 dias de cultura de calos nos meios A <sub>1</sub> , B e C <sub>1</sub> .....	25
<b>Tabela 3.2</b> - Valores de <i>F</i> e de <i>p</i> da ANOVA a um factor da frequência calogénica dos meios A <sub>1</sub> , B e C <sub>1</sub> , durante os 115 dias de cultura.....	30
<b>Tabela 3.3</b> - Correspondência entre os codões variáveis e os respectivos aminoácidos do fragmento de <i>Hyp-1</i> de <i>H. perforatum</i> (AY148090) e de <i>H. foliosum</i> . A azul estão identificados os aminoácidos que diferem nas duas sequências.....	39
<b>Tabela 3.4</b> - Similaridade entre a sequência do fragmento de 154 pb do gene <i>hyp-1</i> de <i>H. foliosum</i> e as do mesmo género depositadas na base de dados GenBank®.....	42
<b>Tabela 3.5</b> - Similaridade entre a sequência do fragmento amplificado do gene <i>HpPKS2</i> de <i>H. foliosum</i> e as do mesmo género depositadas na base de dados GenBank®.....	44
<b>Tabela 3.6</b> - Correspondência entre os codões variáveis e os respectivos aminoácidos do fragmento de <i>HpPKS2</i> de <i>H. perforatum</i> (EF186676) e de <i>H. foliosum</i> . A azul estão identificados os aminoácidos que diferem nas duas sequências e a vermelho os nucleótidos delectados em <i>H. foliosum</i> .....	44
<b>Tabela 3.7</b> - Parâmetros obtidos da análise de expressão do gene <i>hyp-1</i> , por qRT-PCR.....	48



## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
ARN	Ácido ribonucleico
arcsen	Função arco seno
BAP	Benzilaminopurina
BLASTn	<i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>
°C	Graus Celsius
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementar
CH <sub>3</sub>	Grupo metilo
CH <sub>2</sub> OH	Grupo hidroximetilo
CoA	Coenzima A
C <sub>T</sub>	Ciclo <i>treshold</i>
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamónio
DEPC	Dietilpirocarbonato
d.f.	Graus de liberdade
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
D-sacarose	Sacarose (dextrose)
DTT	Ditiotreitol
EC	Número da Comissão de Enzimas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
E.U.A	Estados Unidos da América
g	Grama
g l <sup>-1</sup>	Grama por litro
HCl	Ácido clorídrico
HSD	<i>Honestly Significant Difference</i>
IAA	Ácido 3-indol acético
IBA	Ácido 3-indol butírico
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
KIN	Cinetina
l	Litro
LiCl	Cloreto de lítio
m	Metro
M	Molaridade
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro

mg	Miligrama
mg l <sup>-1</sup>	Miligrama por litro
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
N	Norte ou Normalidade
Nº	Número
NAA	Ácido 1-naftaleno acético
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
ng µl <sup>-1</sup>	Nanograma por microlitro
nm	Nanómetro
O	Oeste
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
OKS	Octacétido sintase
pb	Pares de bases
PCR	Reacção de polimerização em cadeia
pH	Potencial hidrogeniónico
PKS III	Policétido sintase do tipo III
PPF	Fluxo de fotões fotossintético
PR-10	<i>Plant pathogenesis-related proteins - class 10</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
qRT-PCR	Reacção de polimerização em cadeia em tempo real, após a transcrição reversa
rpm	Rotações por minuto
R	Cadeia lateral
Reg. cresc.	Regulador de crescimento
RQ	Quantificação relativa
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RNase	Ribonuclease
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Reacção de polimerização em cadeia, após a transcrição reversa
s	Segundo
SDS	Dodecilo sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TE	Tampão Tris-EDTA
TIS	Sistema biorreactor de imersão temporária
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade de actividade enzimática
UV	Ultravioleta
$U \mu\text{l}^{-1}$	Unidade de actividade enzimática por microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{mol}$	Micromole
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Micromole por metro <sup>2</sup> por segundo
=	Igual a
±	Mais ou menos
/	Divisão matemática
X	Veze
%	Porcentagem
√	Raíz quadrada
©	Todos os direitos reservados
®	Marca registrada
™	<i>Trademark</i>
°	Grau
'	Minuto
“	Segundo
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3'	Extremidade 3' do ácido nucleico
5'	Extremidade 5' do ácido nucleico



## 1. Introdução

O género *Hypericum* é monofilético, pertence à família Hypericaceae (Korotkova *et al.*, 2009) e compreende cerca de 460 espécies (Robson, 2003), distribuídas por todo o Mundo (regiões temperadas e tropicais: Europa, Norte e Sul da América, Sul de África, Austrália e Nova Zelândia) (Briskin e Gawienowski, 2001; Karioti e Bilia, 2010; Karppinen, 2010). As espécies de *Hypericum* caracterizam-se, de um modo geral, pela ocorrência de compostos biologicamente activos com grande importância farmacêutica (Di Carlo *et al.*, 2001; Karioti e Bilia, 2010; Košuth *et al.*, 2011). A sua utilização medicinal remonta à Antiguidade Clássica (Don Palmer e Keller, 2010; Gadzovska *et al.*, 2005; Kusari *et al.*, 2009) e em 2001, os produtos naturais derivados de plantas de *Hypericum perforatum* L. - espécie mais utilizada comercialmente e, popularmente, denominada 'hipericão' ou 'erva de São João' (Karioti e Bilia, 2010) - estavam entre os cinco fitofármacos mais vendidos no Norte dos Estados Unidos da América (Greeson *et al.*, 2001). Estudos clínicos têm demonstrado que os extractos das partes aéreas de plantas de *Hypericum* são tão eficientes no tratamento da depressão moderada a severa quanto os antidepressivos sintéticos convencionais, apresentando porém menos efeitos secundários (Karppinen, 2010). Para além da reconhecida actividade anti-depressiva, são-lhes também atribuídas propriedades anti-cancerígenas, anti-oxidantes, anti-microbianas e anti-virais (Di Carlo *et al.*, 2001). Deste modo, o número de publicações científicas sobre o género *Hypericum* tem aumentado de forma significativa ao longo dos anos (Santos *et al.*, 1999).

Apenas 12 espécies de *Hypericum* ocorrem de forma espontânea em Portugal Continental (Franco, 1971; Núñez, 1993), de entre as quais *Hypericum perforatum* é a única reconhecida pelas farmacopeias ocidentais (Costa, 2010). Em Portugal, estudos de etnofarmacologia relatam também a utilização das espécies *H. glandulosum*, *H. humifusum*, *H. inodorum*, *H. elodes* e *H. perforatum* para fins terapêuticos, como diuréticos, sedativos e anti-reumáticos, sendo também utilizadas para o tratamento de doenças do sistema urinário, dos rins e do fígado, na maioria dos casos, sob a forma de infusões (Novais *et al.*, 2004). Duas outras espécies são ainda comercializadas no mercado português: *H. undulatum*, utilizada no tratamento da enxaqueca, inflamação intestinal, doenças da bexiga e da vesícula biliar, bem como em termos da sua actividade anti-oxidante (Ferreira *et al.*, 2006) e *H. androsaemum* como fármaco hepatoprotector e anti-hipertensivo (Novais *et al.*, 2004).

O presente estudo tem como alvo a espécie *Hypericum foliosum* Aiton que se integra, segundo Franco (1971), na secção *Androsaemum*. É uma planta endémica que ocorre em todas as ilhas dos Açores, sendo, popularmente, conhecida como 'furalha' ou 'malfurada' (Santos *et al.*, 1999; Schäfer, 2002). Embora as populações locais descrevam as suas propriedades como sendo semelhantes às conhecidas para outras espécies de *Hypericum*, não existem estudos baseados na sua utilização na medicina popular (Rainha *et al.*, 2011a). Ao nível fitoquímico, a espécie está muito pouco caracterizada, estando a investigação mais centrada nos seus óleos essenciais (Santos *et al.*, 1999). Além de ter sido isolado, recentemente, um novo derivado de acilfloroglucinol com actividade anti-bacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Gibbons *et al.*, 2005), também têm

sido descritas propriedades anti-oxidantes e anti-radicaais livres (Rainha *et al.*, 2011a; Rainha *et al.*, 2011b).

As propriedades medicinais de *Hypericum* têm origem num complexo equilíbrio químico e biológico entre os vários metabolitos presentes no extracto total da planta (Pasqua *et al.*, 2003) que se distribuem por diversos grupos químicos: naftodiantronas (hipericinas), floroglucínóis (hiperforinas), xantonas, ácidos fenólicos e uma vasta gama de flavonóides, incluindo flavonóis, biflavonas e procianidinas (Kubin *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2006). Destes são de realçar as hipericinas, pigmentos vermelhos característicos do género *Hypericum* e que, pela sua estrutura química aromática, se incluem na classe das naftodiantronas que são fotossensibilizadores naturais muito eficazes (Karioti e Bilia, 2010). Deste modo, está em estudo a sua possível utilização na terapia fotodinâmica aplicada ao tratamento e diagnóstico de vários tumores (Cole *et al.*, 2008; Kacerovská *et al.*, 2008; Kubin *et al.*, 2008; Thong *et al.*, 2009).

'Hipericinas totais' é um termo analítico que inclui quatro compostos bioactivos conhecidos: hipericina, pseudohipericina, protohipericina e protopseudohipericina (Briskin e Gawienowski, 2001; Karioti e Bilia, 2010; Sirvent e Gibson, 2002) que foram, primeiramente, isolados a partir de *Hypericum perforatum*. Alguns autores defendem que a sua acumulação (Briskin e Gawienowski, 2001) e, provavelmente, biossíntese (Čellárová *et al.*, 1994; Kornfeld *et al.*, 2007; Onelli *et al.*, 2002; Zobayed *et al.*, 2006) parecem estar estritamente ligadas à diferenciação de estruturas de cor negra ou vermelho escuro denominadas glândulas negras (Pasqua *et al.*, 2003). A par da designação de 'glândulas negras', estas também são denominadas 'nódulos' (Curtis e Lersten, 1990) ou 'nódulos negros' (Onelli *et al.*, 2002). As glândulas negras localizam-se nas margens das folhas e noutras estruturas aéreas, como no caule, nas pétalas e nos estames (Kornfeld *et al.*, 2007; Onelli *et al.*, 2002; Pasqua *et al.*, 2003; Zobayed *et al.*, 2006), mas não na raiz (Hözl e Petersen, 2003). São, inicialmente, constituídas por um agregado de células que, progressivamente, aumenta de tamanho e escurece, formando uma estrutura multicelular. A ausência de lúmen ou cavidade e a sua organização nodular, em que um núcleo de células grandes é circunscrito por uma a três camadas celulares achatadas (Curtis e Lersten, 1990; Onelli *et al.*, 2002), têm sido aspectos considerados pouco comuns desde as primeiras observações realizadas por Green (1884). Pouco se sabe acerca da ultra-estrutura e mecanismos de secreção desta glândula peculiar, apenas que a sua actividade secretora começa cedo e os nódulos maturam em estados precoces do desenvolvimento da folha, mesmo antes da diferenciação do mesófilo e da completa expansão foliar (Briskin *et al.*, 2000; Košuth *et al.*, 2007). O seu conteúdo acumula-se, progressivamente, em células glandulares que, posteriormente, perdem a sua funcionalidade, tornando-se simples áreas de armazenamento dos produtos segregados (Kornfeld *et al.*, 2007; Onelli *et al.*, 2002). Em termos de estruturas glandulares acumuladoras de metabolitos secundários, o género *Hypericum* também se caracteriza pela existência de glândulas translúcidas ou cavidades de óleo que acumulam óleos essenciais (Curtis e Lersten, 1990; Ferraz *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 1999) e hiperforinas (Soelberg *et al.*, 2007) e que se distribuem ao longo da lamina foliar, das sépalas e das pétalas (Ciccarelli *et al.*, 2001). Algumas espécies de *Hypericum* apenas apresentam glândulas translúcidas, enquanto outras dispõem dos dois tipos glandulares:

translúcidas e negras, sendo que as últimas, muito provavelmente, serão as produtoras das hipericinas (Briskin e Gawienowski, 2001).

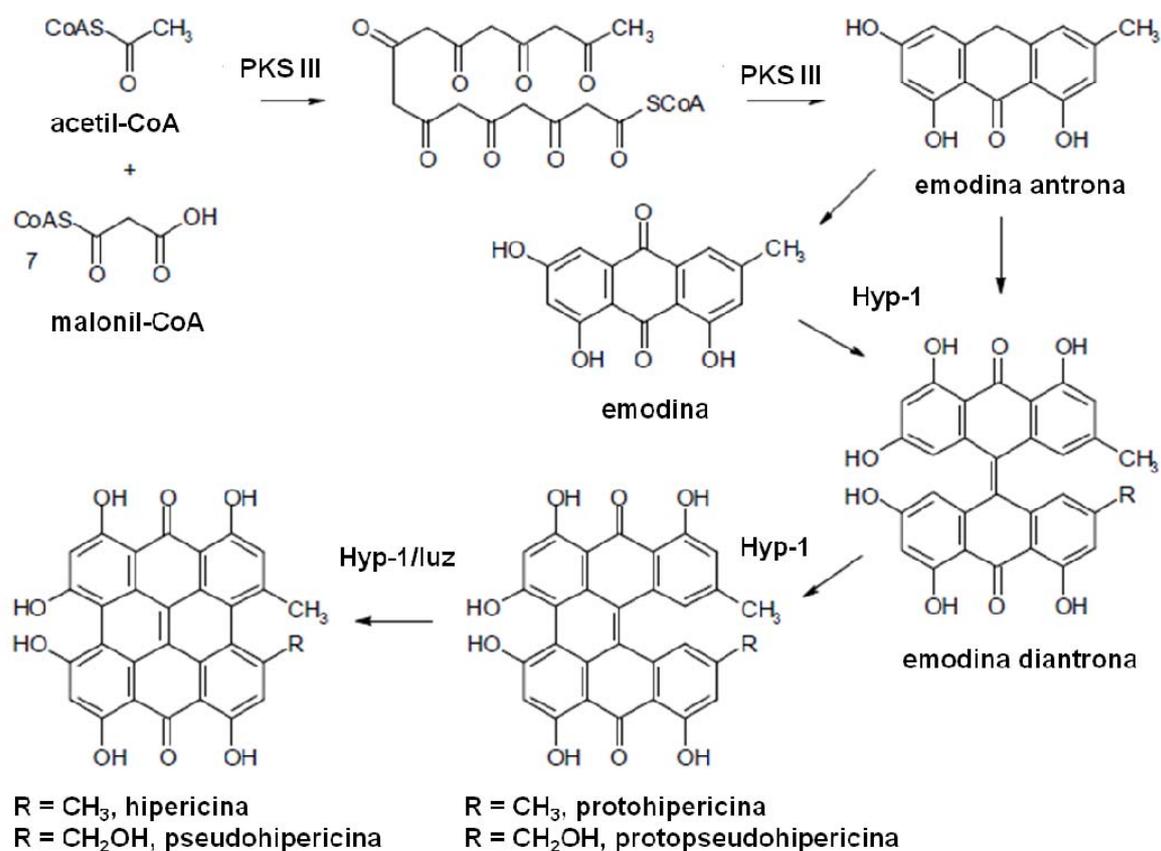
Embora a função exacta das hipericinas ainda seja desconhecida, tem sido sugerido que serão aleloquímicos de defesa com um papel protector contra potenciais predadores, tais como herbívoros que atacam, preferencialmente, os tecidos jovens da planta, e fungos (Fields *et al.*, 1990; Onelli *et al.*, 2002; Sirvent e Gibson, 2002). As hipericinas apresentam propriedades tóxicas na presença de luz, devido à formação de radicais livres, e por essa razão pensa-se que a sua localização nas glândulas negras tenha evoluído como um mecanismo de prevenção da sua autotoxicidade (Briskin e Gawienowski, 2001). Deste modo, assumindo que as hipericinas são aleloquímicos de defesa nas partes aéreas da planta, não há necessidade desses compostos se acumularem na raiz, embora devido à condição escuro existente nessa zona, não seriam activados pela luz e, por conseguinte, não seriam tóxicos para a planta (Košuth *et al.*, 2007). Tem sido observado que os insectos que se alimentam das folhas de *Hypericum* ajustam o seu padrão de alimentação, evitando a parte da folha com glândulas negras contendo hipericinas, e são capazes de contornar os efeitos fototóxicos desses compostos mediados pela luz (Guillet *et al.*, 2000). Sirvent *et al.* (2003) demonstraram que os níveis das hipericinas aumentam após o ataque por herbívoros generalistas, enquanto que sofrem pequena alteração ou diminuem na presença da herbivoria especialista. A teoria da co-evolução fitoquímica enfatiza que os herbívoros especialistas co-evoluem com os respectivos hospedeiros, escapando assim aos seus mecanismos de defesa (Ehrlich e Raven, 1964). Além dos vastos danos causados por insectos em culturas de *Hypericum*, o fungo *Colleototrichum gloeosporioides* é responsável pela doença antracnose, a qual se caracteriza pela modificação da composição química dos extractos da planta (Conceição *et al.*, 2006). Em 1984, *C. gloeosporioides* foi responsável por prejuízos avultados em plantações de *Hypericum perforatum* na Nova Escócia e no Canadá, atacando caules jovens, folhas e flores (Hildebrand e Jensen, 1991).

Há evidências de que a biossíntese das hipericinas é induzida em resposta a processos de infecção, pelo que alguns dos recursos disponíveis do metabolismo primário são canalizados para a biossíntese química secundária (Conceição *et al.*, 2006; Sirvent e Gibson, 2002). Sirvent e Gibson (2002) defendem que, havendo um nível constitutivo de hipericinas nos tecidos vegetais, esses fitoquímicos não devem ser considerados de fitoalexinas (definidos, segundo Verpoorte (1998), como compostos antimicrobianos sintetizados e acumulados numa planta após esta ser infectada por microrganismos) mas sim de fitoanticipinas, compostos antimicrobianos presentes nas plantas em baixos níveis antes do processo de infecção e induzidos após ataque patogénico (Verpoorte, 1998).

Pouco se sabe acerca da biossíntese das hipericinas, presumindo-se que siga a via dos policétidos apresentada na Figura 1.1 (Jin *et al.*, 2010; Karppinen *et al.*, 2010; Košuth *et al.*, 2011), na qual as policétido sintases do tipo III (PKSs III) actuam como enzimas-chave (Karppinen e Hohtola, 2008; Košuth *et al.*, 2007; Košuth *et al.*, 2011; Zobayed *et al.*, 2006). PKSs III desempenham um papel crucial na biossíntese de muitos metabolitos secundários nas plantas. São enzimas homodiméricas simples compostas por subunidades de 40 a 45 kDa e com uma

tríada catalítica muito conservada (cisteína-histidina-asparagina) presente no seu centro activo (Flores-Sanchez e Verpoorte, 2009). Catalisam uma condensação descarboxilativa sequencial de unidades de malonil-CoA com um tioéster-CoA aromático ou alifático (unidade iniciadora), de modo a originar uma cadeia de policétido linear que, subsequentemente, sofre ciclização e aromatização no mesmo centro activo. A sequência da reacção partilha semelhanças com a síntese de ácidos gordos do metabolismo primário, a partir do qual terão evoluído as PKSs (Flores-Sanchez e Verpoorte, 2009; Karioti e Bilia, 2010; Karppinen *et al.*, 2010).

Num primeiro passo, uma molécula de acetil-CoA condensa com sete moléculas de malonil-CoA, formando uma cadeia de octacétido que, subsequentemente, é submetida a ciclizações sucessivas e a uma descarboxilação que culmina na formação da emodina antrona. A reacção é catalisada por uma PKS III com actividade octacétido sintase (OKS) (Karioti e Bilia, 2010; Kirakosyan *et al.*, 2004; Michalska *et al.*, 2010; Zobayed *et al.*, 2006). Tem sido sugerido que a emodina antrona é oxidada a emodina, provavelmente, pela enzima emodina antrona-oxigenase (Karioti e Bilia, 2010). A condensação dos compostos emodina antrona e emodina, seguida de uma reacção de desidratação, origina a emodina diantrona, a qual, mediante oxidação fenólica, forma a protohipericina e/ou a protopseudohipericina que, por irradiação com luz visível, se transformam em hipericina e pseudohipericina, respectivamente (Bais *et al.*, 2003; Karioti e Bilia, 2010; Kirakosyan *et al.*, 2004; Michalska *et al.*, 2010; Zobayed *et al.*, 2006).



**Figura 1.1** Via de biossíntese das hipericinas proposta por Karppinen (2010).

Os genes e as proteínas responsáveis pela biossíntese das naftodiantronas têm sido caracterizados (Bais *et al.*, 2003; Karppinen e Hohtola, 2008; Karppinen *et al.*, 2008; Košuth *et al.*, 2007; Košuth *et al.*, 2011), tendo sido, inicialmente, sugerido que essas reacções eram catalisadas por uma proteína de acoplamento fenólico denominada Hyp-1 (17,8 kDa), uma enzima monomérica pertencente à família de proteínas PR-10 (*plant pathogenesis-related proteins - class 10*) (Bais *et al.*, 2003; Kirakosyan *et al.*, 2004; Michalska *et al.*, 2010). Michalska *et al.* (2010) descreveram que a forma e o tamanho do centro activo de Hyp-1 são compatíveis com a ligação de duas moléculas de emodina ou de uma de hipericina. Contudo, Košuth *et al.* (2011) demonstraram que o gene *hyp-1* é expresso quer em espécies produtoras, quer em espécies não produtoras de hipericinas, mostrando que não há uma correlação directa entre a expressão do gene e a síntese desses compostos. Košuth *et al.* (2007) também detectaram níveis elevados de expressão do gene em órgãos de *Hypericum perforatum* que não contêm hipericinas. Assim, o gene *hyp-1* parece não ser um factor limitante na biossíntese das hipericinas. Factores limitantes na biossíntese e acumulação das hipericinas podem ser os seguintes: a ausência ou baixa actividade de outras enzimas presentes nos passos iniciais da via biossintética e a ausência de glândulas negras que impede a acumulação dos compostos produzidos. Por outro lado, para que ocorra a biossíntese das hipericinas, é necessário que todos os intermediários estejam acessíveis e que ocorra a síntese coordenada de todas as enzimas envolvidas no processo. Concluindo, a expressão do gene *hyp-1* é apenas um passo que pode ou não levar à conversão final da emodina a hipericina (Košuth *et al.*, 2011).

Karppinen e Hohtola (2008) identificaram e clonaram um novo gene, o *HpPKS2*, que codifica para uma enzima PKS III (43,1 kDa), a qual está, potencialmente, envolvida na biossíntese das hipericinas. A mesma localização dos transcritos do gene, das hipericinas e da emodina nas glândulas negras multicelulares indicia o envolvimento de *HpPKS2* na biossíntese desses compostos (Karppinen *et al.*, 2008). A análise funcional da proteína mostrou que esta dispõe de actividade OKS, usando acetil-CoA como substrato iniciador. Contudo, a sua incapacidade de ciclizar a cadeia de octacétido em emodina antrona, o suposto precursor das hipericinas, parece pressupor o envolvimento de enzimas adicionais na reacção, cuja função será estabilizar a cadeia linear de policétido muito reactiva, prevenindo, deste modo, a ocorrência de ciclizações não específicas (Karppinen *et al.*, 2008).

Em virtude do seu tradicional uso medicinal, *Hypericum perforatum* tem sido a espécie mais estudada do género *Hypericum* para a descoberta e síntese de novos compostos químicos. Embora também seja a principal fonte de aquisição industrial das hipericinas, o isolamento e purificação destas a partir da própria planta são processos difíceis e não muito eficientes (Łotocka e Osińska, 2010). A eficácia e a segurança são aspectos fulcrais quando consideramos produtos derivados de plantas medicinais e as preparações comerciais da erva de São João, geralmente, obtidas a partir de plantas crescidas no campo ou em estufa, são inconsistentes relativamente ao seu conteúdo em compostos bioactivos (Briskin e Gawienowski, 2001; Kirakosyan *et al.*, 2004; Murch *et al.*, 2000; Zobayed *et al.*, 2004). Os níveis das hipericinas nesses extractos são muito influenciados pela origem geográfica (Walker *et al.*, 2001), oscilando entre diferentes espécies e

populações de *Hypericum* (Kartnig *et al.*, 1989; Kartnig *et al.*, 1996; Kitanov, 2001). A quantidade desses compostos também pode ser afectada por uma panóplia de factores sazonais e abióticos (Southwell e Bourke, 2001; Walker *et al.*, 2001), tais como: a concentração de dióxido de carbono (Mosaleeyanon *et al.*, 2005), a temperatura (Couceiro *et al.*, 2006; Zobayed *et al.*, 2005), a disponibilidade hídrica (Zobayed *et al.*, 2007) e a concentração de azoto e intensidade luminosa (Briskin e Gawienowski, 2001).

Na indústria farmacêutica, a cultura *in vitro* de células, de tecidos e de órgãos tem sido descrita como uma estratégia eficaz para o estudo da actividade biológica *in vitro* de compostos bioactivos (Kirakosyan *et al.*, 2000a; Walker *et al.*, 2002; Yesil-Celiktas *et al.*, 2010), e para a produção comercial de material vegetal, de modo a satisfazer o crescente interesse por produtos naturais e a obter preparações menos variáveis relativamente ao conteúdo em metabolitos secundários (Karuppusamy, 2009; Kirakosyan *et al.*, 2004). A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa que permite a produção de um elevado número de plantas geneticamente uniformes, quimicamente caracterizadas e em ambiente asséptico com condições estritamente controladas (Zobayed e Saxena, 2003; Zobayed *et al.*, 2004), tendo sido descrita por Moura (1998) para *Hypericum foliosum*. Vários autores sugerem uma relação directa entre o nível de diferenciação celular e a biossíntese das hipericinas em quantidades que possam ser consideradas apropriadas para aplicações comerciais (Bais *et al.*, 2002; Karppinen *et al.*, 2006a; Kirakosyan *et al.*, 2000a; Pasqua *et al.*, 2003), pelo que têm sido estabelecidas culturas de calos (definidos, segundo Canhoto (2010), como massas de células meristemáticas) compactos de *H. perforatum* com algum grau de diferenciação celular (Jianfeng *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). Segundo Kirakosyan *et al.* (2004), culturas de calos e culturas em suspensão de *H. perforatum* são capazes de produzir hipericinas apenas sob a forma de sistemas celulares multi-componentes complexos.

Um sistema alternativo para a produção de metabolitos secundários consiste em transformar as células vegetais com a bactéria *Agrobacterium rhizogenes*, a qual provoca um fenótipo particular que se manifesta pela formação de um grande número de raízes denominadas *hairy roots*. Estas são muito finas, alongadas e, por vezes, ramificadas, apresentando crescimento plagiotrópico (Canhoto, 2010). Além desse fenótipo característico, *A. rhizogenes* induz alterações no metabolismo secundário das plantas (Gómez-Galera *et al.*, 2007). Embora possa ser considerado um sistema promissor para a produção de muitos compostos bioactivos, tem as suas limitações, nomeadamente a ocorrência de fenómenos de variação cromossómica e somaclonal (Canhoto, 2010) e o facto dos organismos geneticamente modificados (OGMs) não serem facilmente aceites em muitos países como a Austrália, o Japão, a França e a Nova Zelândia, especialmente, no que se refere aos medicamentos contendo OGMs (Cui *et al.*, 2010). Posto isto, o estabelecimento de sistemas optimizados de culturas de raízes adventícias induzidas por auxinas poderá ser considerada uma alternativa para a multiplicação de raízes em larga escala, em biorreactores, com a, subsequente, produção de metabolitos secundários (Cui *et al.*, 2010; Goel *et al.*, 2009).

Biorreactores de imersão temporária (*temporary immersion systems* - TIS) constituem também uma alternativa para a produção de metabolitos secundários que tem sido muito utilizada na cultura de uma grande variedade de tecidos, nomeadamente de caules, de embriões somáticos e de microtubérculos. São sistemas semi-automáticos e de baixo custo que permitem o aumento de escala (Wilken *et al.*, 2005). Os TIS do tipo RITA<sup>®</sup> desenvolvidos por Teisson *et al.* (1995) constituem uma ferramenta útil para a investigação à escala laboratorial, pelo que vários autores têm estudado a sua eficácia e possível aplicação na obtenção quer de biomassa celular, quer de metabolitos secundários de *Hypericum perforatum* (Wilken *et al.*, 2005; Zobayed e Saxena, 2003; Zobayed *et al.*, 2004).

Estratégias biotecnológicas que visam o aumento da biossíntese de metabolitos secundários específicos passam, de um modo geral, pela elicitação, biotransformação de precursores e engenharia genética, adicionalmente à optimização das condições de cultura e à selecção de linhas celulares de alta produção (Karuppusamy, 2009; Verpoorte *et al.*, 2002). Deste modo, têm sido desenvolvidos diversos estudos com o objectivo de aumentar a produção das hipericinas em culturas celulares de *Hypericum perforatum*, mediante a adição de elicitadores (Kirakosyan *et al.*, 2000b; Kirakosyan *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007a; Pavlíč *et al.*, 2007; Travis *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2002) e potenciais precursores (Liu *et al.*, 2007b). A eficiente manipulação de metabolitos secundários em culturas *in vitro* requer o conhecimento das suas vias biossintéticas e mecanismos de regulação (Karuppusamy, 2009; Kirakosyan *et al.*, 2004; Verpoorte *et al.*, 2002).

Com o presente estudo pretendeu-se estabelecer e otimizar culturas celulares de *Hypericum foliosum* em diferentes sistemas de cultura *in vitro*, procedendo-se à sua caracterização morfológica e histológica, e analisar também a expressão dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* em folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, bem como em culturas em suspensão e em culturas celulares estabelecidas nos TIS. Visou-se, assim, estabelecer as bases para o potencial aproveitamento biotecnológico de *H. foliosum*.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Cultura de tecidos de *Hypericum foliosum* Aiton

#### 2.1.1. Material vegetal

Neste estudo foram utilizadas plantas de *Hypericum foliosum*, arbustos relativamente pequenos e muito ramificados com folhas ovais, estreitas e sésseis, com flores que se agrupam em cimos, constituídas por 5 pétalas amarelas e com 5 sépalas que persistem nos frutos subglobosos (Figura 2.1) (Santos *et al.*, 1999; Schäfer, 2002).

À data do início do presente estudo, as plantas colhidas na zona das Furnas do Enxofre da ilha Terceira (38°43'47.09"N e 27°13'54.87"O) (Figura 2.2), em Abril de 2008, já estavam estabelecidas *in vitro* no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Biotecnologia dos Açores. O material vegetal introduzido *in vitro* foi utilizado para a micropropagação, indução de calos e de culturas celulares, bem como para a extracção de ADN e de ARN. Em Outubro de 2010, procedeu-se, novamente, à colheita de *Hypericum foliosum* no mesmo local, tendo as plantas *in vivo* sido guardadas num congelador a -80 °C (Sanyo. San Diego, Califórnia, E.U.A.) até posterior utilização para a extracção de ADN e de ARN.

A cultura de tecidos vegetais exige ambiente asséptico, tendo sido realizada numa câmara de fluxo laminar vertical, classe 2 (TopSafe™ 1.5, EuroClone®. Siziano, Pavia, Itália).



Figura 2.1 *Hypericum foliosum*.



**Figura 2.2** Fotografia do local de colheita de *H. foliosum* (Furnas do Enxofre da ilha Terceira).

### 2.1.2. Micropropagação

As plantas de *Hypericum foliosum* previamente introduzidas *in vitro* foram micropropagadas em meio basal MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo D-sacarose a  $30 \text{ g l}^{-1}$  (Duchefa. Haarlem, Holanda) e suplementado com BAP a  $0,36 \text{ mg l}^{-1}$  (Duchefa. Haarlem, Holanda) e IBA a  $0,03 \text{ mg l}^{-1}$  (Duchefa. Haarlem, Holanda). O meio foi solidificado com agar a  $8 \text{ g l}^{-1}$  (Duchefa. Haarlem, Holanda) e o pH ajustado para 5,8 com NaOH e/ou HCl a 1 N (Merck. Darmstadt, Alemanha). Seguiu-se a distribuição do meio em frascos (25 ml por frasco) antes da esterilização na Uniclave 88 (AJC. Lisboa, Portugal) a 1 bar,  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos.

A multiplicação das plantas foi realizada mensalmente, quer utilizando segmentos nodais com fitómeros formados desde o último processo de multiplicação, quer através da fragmentação das massas de rebentos em massas mais pequenas. O material vegetal multiplicado foi incubado com um fotoperíodo de 16 horas (luz à intensidade de  $70 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPF)/8 horas (escuro), a  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (FITOCLIMA 30000E, ARALAB™. Rio de Mouro, Portugal).

### 2.1.3. Iniciação de calos

A iniciação de calos foi realizada em meios contendo macro e microelementos (de acordo com o proposto por Murashige e Skoog (1962)), D-sacarose a  $30 \text{ g l}^{-1}$ , ácido L-ascórbico a 0,01% (Sigma-Aldrich®. St. Louis, E.U.A.) e agar a  $8 \text{ g l}^{-1}$ . Foram utilizados oito meios com diferentes combinações de reguladores de crescimento (Tabela 2.1). Após a esterilização, os meios foram distribuídos por placas de Petri com 9 mm de diâmetro (VWR®. West Chester, Pensilvânia, E.U.A.) e deixados solidificar.

As culturas de calos foram iniciadas utilizando como explantes folhas de plantas micropropagadas *in vitro* com 2 a 3 cortes transversais. De acordo com Franklin e Dias (2006), as

folhas foram colocadas com a face adaxial em contacto com os meios. Inicialmente, as culturas foram mantidas à luz (fotoperíodo de 16 horas dia<sup>-1</sup>; intensidade de luz de  $70 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF) e no escuro, a  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Contudo, devido aos fenómenos de oxidação potenciados pela luz, passaram a ser mantidas apenas no escuro. De acordo com Pasqua *et al.* (2003), a cada 20 dias, foram realizadas subculturas para meio fresco.

**Tabela 2.1** Composição em reguladores de crescimento dos meios MS de indução de calos.

Reg. cresc. (mg l <sup>-1</sup> ) Meios	BAP	IBA	NAA	KIN	2,4-D
A <sub>1</sub> <sup>1</sup>	0,04	0,06	1,00		
A <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,04		1,00		
A <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,04	1,00			
B <sup>3</sup>				0,02	0,20
C <sub>1</sub> <sup>4</sup>				0,50	0,50
C <sub>2</sub> <sup>2</sup>				0,50	0,70
C <sub>3</sub> <sup>2</sup>				0,10	0,70
C <sub>4</sub> <sup>2</sup>				0,10	0,50

<sup>1</sup> da Câmara Machado *et al.* (1995); <sup>2</sup> desenvolvido neste estudo; <sup>3</sup> Bais *et al.* (2002); <sup>4</sup> Ayan *et al.* (2005).

### 2.1.3.1. Morfologia dos calos e frequência calogénica

Durante 3 meses, os calos induzidos nos meios MS, no escuro, foram observados à lupa (SteREO Discovery. V8, ZEISS. Nova Iorque, E.U.A.) de 15 em 15 dias para as seguintes características morfológicas: textura (compacto ou friável), cor (branco, bege ou castanho) e grau de diferenciação (estruturas globulares compactas, embriogénese somática e primórdios radiculares). Foram também registados os fenómenos oxidativos (visíveis pela presença de zonas escuras). A lupa possui um sistema de aquisição directa de imagem AxioCam MRc 5 (ZEISS. Nova Iorque, E.U.A.).

Simultaneamente, foi avaliada a frequência calogénica. A percentagem calogénica foi calculada relativamente ao número de explantes foliares colocado em cada placa no processo de iniciação das culturas.

### 2.1.3.2. Análise estatística

O número de características morfológicas e a frequência calogénica das culturas de calos induzidas nos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub> foram analisados estatisticamente, recorrendo ao programa Minitab<sup>®</sup> (versão 13.31, 2000) ([www.minitab.com](http://www.minitab.com)). A homogeneidade de variâncias para cada parâmetro analisado foi evidenciada através da representação gráfica de resíduos. Utilizou-se o

modelo linear estatístico *General Linear Model* para realizar a análise de variância a um factor, ANOVA, com um nível de significância de 5%. A comparação múltipla de médias foi feita pelo teste de Tukey HSD *post hoc*. Na análise da frequência média calogénica, os dados foram normalizados, utilizando-se a transformação:  $x' = \arcsen\sqrt{(x/100)}$ .

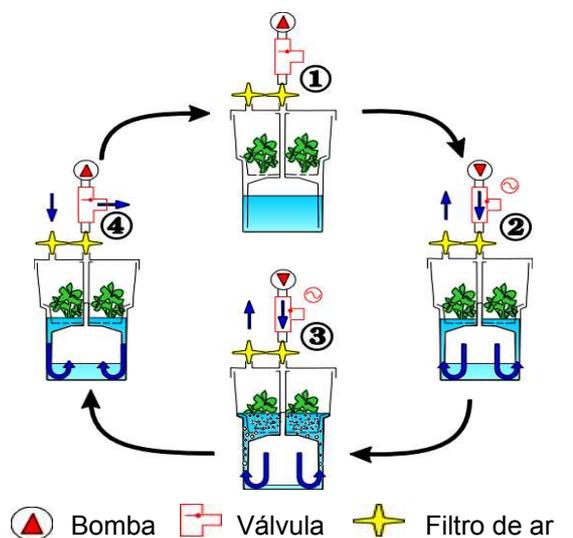
Devido ao baixo número de réplicas para os restantes meios, não foi possível fazer a análise estatística dos respectivos dados.

#### 2.1.4. Iniciação de culturas celulares

Foram utilizados dois sistemas para a cultura de células *in vitro*: frascos Erlenmeyer de 250 ml (VWR<sup>®</sup>. West Chester, Pensilvânia, E.U.A.) com meio líquido e arejamento difuso, através de tampa ventilada com filtro de 0,20 µm; e TIS de 250 ml (RITA<sup>®</sup>, CIRAD. Paris, França) com meio líquido, cujo modo de arejamento, à semelhança dos Erlenmeyers, também era difuso.

As suspensões celulares foram iniciadas nos Erlenmeyers, utilizando-se calos com 40 a 50 dias, provenientes dos meios sólidos A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> (2 g de peso fresco em 50 ml do mesmo meio usado aquando da iniciação dos respectivos calos (líquido/sem agar)). As culturas foram mantidas no escuro, de acordo com Bais *et al.* (2003), a 22 ± 2 °C, e a 90 rpm no agitador rotatório VKS-75 (Edmund Bühler GmbH. Hechingen, Alemanha). A cada 15 dias, procedeu-se à adição de 15 ml de meio líquido fresco.

As culturas celulares estabelecidas nos TIS (Figura 2.3) foram iniciadas a partir de culturas de calos com 40 a 50 dias, provenientes dos meios A<sub>1</sub>, B, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, (6 g de peso fresco em 150 ml de meio). Os calos foram colocados directamente sobre a rede da parte superior do TIS e a sua imersão com meio líquido foi realizada diariamente, durante 15 minutos, através de um sistema de bomba de vácuo (LABOPORT<sup>®</sup>, KNF Neuberger GmbH. Freiburg-Munzingen, Alemanha). Foram montados filtros de 0,20 µm (Sartorius Stedim Biotech. Göttinger, Alemanha) nas portas de entrada e de saída de ar dos TIS, de modo a prevenir a eventual entrada de microrganismos. As culturas celulares foram expostas à luz (fotoperíodo de 16 horas dia<sup>-1</sup>; 70 ± 2 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPF), de acordo com Wilken *et al.* (2005), a 22 ± 2 °C. A cada 30 dias, procedeu-se à substituição de 100 ml de meio por meio líquido fresco.



**Figura 2.3** Esquema de funcionamento do TIS RITA<sup>®</sup> composto por uma longa fase de repouso e por uma fase muito curta de imersão.

#### 2.1.4.1. Morfologia de estruturas celulares

A morfologia das estruturas celulares desenvolvidas nas culturas em suspensão e nas culturas celulares estabelecidas nos TIS foi caracterizada à lupa.

#### 2.1.5. Histologia

O processamento histológico das culturas de calos e das estruturas celulares obtidas quer em culturas em suspensão, quer em culturas nos TIS, foi adaptado de Chamberlain (1932). As amostras foram acondicionadas em cassetes de impregnação (Simport. Beloleil, Quebec, Canadá) forradas internamente com papel de filtro. Foram fixadas com uma solução de formaldeído (Merck. Darmstadt, Alemanha) : 96% etanol (Merck. Darmstadt, Alemanha) : 100% ácido acético glacial (Merck. Darmstadt, Alemanha) (5:90:5), durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas por incubação com 70% etanol, durante a noite, seguindo-se incubações com 80%, 90% e 100% etanol cada uma de uma hora, tendo-se repetido a última duas vezes. Após a desidratação, procedeu-se à descoloração do material com xilol (Merck. Darmstadt, Alemanha). A transferência de 100% etanol para o agente descolorante utilizado deve ser gradual, tendo sido aplicada a seguinte série de descoloração: xilol : 100% etanol nas proporções de 25:75, 50:50 e 75:25, seguida de duas aplicações de xilol. As amostras foram incubadas durante uma hora em cada solução. A impregnação também deve ser um processo gradual, de modo a prevenir o colapso do material vegetal, que ocorre, frequentemente, quando se faz a transferência directa do agente descolorante para a parafina. As amostras descoloradas foram incubadas, durante a noite, numa solução de xilol : parafina (Merck. Darmstadt, Alemanha) (50:50) a 42 °C na estufa (Memmert GmbH. Schwabach, Alemanha), tendo sido depois incubadas, durante 48 horas, em parafina derretida a 60 °C. A parafina (contendo o material vegetal a analisar histologicamente) foi transferida para moldes metálicos quentes numa disposição que facilitasse o subsequente corte das amostras. Depois do material estar correctamente posicionado, os blocos de parafina foram rapidamente arrefecidos com água fria. A parafina foi facilmente removida do molde e procedeu-se ao corte das amostras vegetais em secções de 4 µm, tendo sido utilizado o micrótopo AO 820 (Spencer Scientific Corporation. Derry, New Hampshire, E.U.A.).

A adesão das secções à lâmina foi feita na estufa a 60 °C, durante uma hora. O excesso de parafina foi removido com xilol, durante 20 minutos, e os cortes desidratados com uma série de diluições de álcool (100%, 70% e 50%), tendo-se incubado 5 minutos em cada solução. Os corantes utilizados no processo de coloração foram a safranina O (vermelho) (Merck. Darmstadt, Alemanha) e o *fast green* (verde) (Merck. Darmstadt, Alemanha). As secções de 4 µm foram colocadas numa solução de 0,1% safranina O (solvente: 50% etanol), durante uma hora. O excesso de corante foi eliminado com água e as lâminas agitadas numa solução de 50% etanol. As secções foram imersas numa solução de 1% *fast green* (solvente: 92% etanol), durante 30 segundos. O excesso de corante foi removido com 2-propanol (Merck. Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram montadas em meio de montagem à base de tolueno *Shandon Synthetic Mountant* (Thermo Electron Corporation. Cheshire, Reino Unido).

A observação das secções foi feita por microscopia óptica, no microscópio AXIO Imager. A1 (ZEISS. Nova Iorque, E.U.A.), e o registo fotográfico através da câmara digital monocromática AxioCam MRm (ZEISS. Nova Iorque, E.U.A.).

## 2.2. hyp-1 e HpPKS2: genes associados à biossíntese de hipericinas

### 2.2.1. Extracção e quantificação de ADN

O ADN de plantas de *Hypericum foliosum in vivo* foi extraído a partir de folhas, de acordo com o protocolo publicado por Porebski *et al.* (1997). Foi triturada 1 g de tecido vegetal em azoto líquido, em almofariz previamente autoclavado. Adicionaram-se 10 ml de tampão de extracção 2X CTAB (2% CTAB (Calbiochem<sup>®</sup>. Darmstadt, Alemanha); 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA (Merck. Darmstadt, Alemanha), pH 8,0; 1,4 M NaCl (Merck. Darmstadt, Alemanha); 1% PVP (Merck. Darmstadt, Alemanha) e 0,3% β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. St. Louis, E.U.A.)) previamente aquecido a 60 °C. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60 °C com agitação, durante 30 minutos. Adicionaram-se 6 ml de clorofórmio (Merck. Darmstadt, Alemanha) : octanol (Merck. Darmstadt, Alemanha) (24:1). Centrifugou-se a 4000 rpm, durante 20 minutos, a 22 °C. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de 15 ml e repetiu-se a extracção com 6 ml de clorofórmio : octanol (24:1), até a nebulosidade da fase aquosa ser eliminada por completo. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 15 ml e adicionaram-se: 1/2 volume de 5 M NaCl e 2 volumes de 100% etanol a -20 °C. Incubou-se a -20 °C, durante 30 minutos, de modo a acelerar o processo de precipitação do ADN. Centrifugou-se a 4000 rpm, durante 6 minutos, a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 1 ml de 75% etanol a -20 °C. Transferiu-se o sedimento em etanol para um tubo de 2 ml e centrifugou-se a 10 000 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C, e descartou-se o sobrenadante. Secou-se o sedimento a 30 °C no concentrador de vácuo (5301, Eppendorf. Hamburgo, Alemanha). e ressuspendeu-se em 300 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0). Adicionaram-se 30 µg de RNase A (EC 3.1.27.5) (Fermentas. Burlington, Canadá) e incubou-se a 37 °C, durante 30 minutos. Adicionaram-se 3 µg de Proteinase K (EC 3.4.21.64) (Fermentas Inc. Burlington, Canadá) e incubou-se a 37 °C, durante 30 minutos. Adicionaram-se 300 µl de fenol (Ambion<sup>®</sup>. Austin, Texas, E.U.A.) : clorofórmio (1:1) arrefecido a 4 °C e centrifugou-se a 14 000 rpm, durante 15 minutos, a 4 °C. Transferiu-se a camada superior da fase aquosa (contendo o ADN) para um novo tubo de 1,5 ml. Repetiu-se este procedimento as vezes necessárias até a camada superior do sobrenadante ficar translúcida e aparentemente livre de impurezas. Adicionaram-se ao sobrenadante: 1/10 do volume de 2 M acetato de sódio (Merck. Darmstadt, Alemanha) e dois volumes de 100% etanol a -20 °C. Para precipitar o ADN, incubou-se a 4 °C, durante a noite. Lavou-se o sedimento com 1 ml de 70% etanol e centrifugou-se a 14 000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, secou-se o ADN no concentrador de vácuo a 30 °C e ressuspendeu-se em 150 µl de água ultrapura esterilizada.

Quantificou-se o ADN obtido por espectrofotometria, determinando-se as absorvâncias a 260 nm e a 280 nm, no espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific. Cheshire, Reino Unido). O ADN foi guardado a -20 °C.

### 2.2.2. PCR

A amplificação de fragmentos dos genes de interesse, *hyp-1* e *HpPKS2*, associados à biossíntese das hiperquinas e dos controlos internos *18S rRNA* e *GAPDH*, subsequentemente, utilizados na técnica de qRT-PCR, foi realizada por PCR, utilizando pares de *primers* específicos.

Os *primers* direccionados para o gene *hyp-1* foram desenhados para a região codificante, recorrendo aos seguintes programas: RepeatMasker ([www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)) e Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) (Tabela 2.2). Os *primers* utilizados para o gene *HpPKS2* e para o controlo interno *18S rRNA* foram os descritos por Karppinen e Hohtola (2008) (Tabela 2.2). O gene de referência *GAPDH* foi amplificado com os *primers* publicados por Karppinen (2010) (Tabela 2.2). Para a monitorização de possíveis contaminações, utilizou-se água ultrapura esterilizada em substituição do ADN na PCR dos controlos negativos.

**Tabela 2.2** *Primers* específicos para os genes *hyp-1*, *HpPKS2*, *GAPDH* e *18S rRNA* e respectivos tamanhos esperados dos produtos de amplificação.

Gene	Nº de acesso GenBank	<i>Primers</i> (5' -3')		Tamanho do produto (pb)
		Senso - F	Anti-senso - R	
<i>HpPKS2</i>	EF186676	F: TAC ACA AGG AGA CAC CCA AGC	R: GGA ACT GGC AAC ATA GCA TCC	218
<i>hyp-1</i>	AY148090	F: CGG AGG AAG CAA GGG TAA G	R: CCA AGC ATC GCA AAA CAC AA	236
<i>GAPDH</i>	GU014528	F: ATG GAC CAT CAA GCA AGG ACT G	R: GAA GGC CAT TCC AGT CAA CTT C	134
<i>18S rRNA</i>	AF206934	F: AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	R: CAA CCC AAA GTC CAA CTA CG	246

As reacções de PCR foram realizadas no termociclador TGradient (Biometra®. Göettingen, Alemanha). Foram preparadas para um volume final de 25 µl, estando apresentados nas Tabelas 2.3 e 2.4 os componentes (Fermentas Inc. Burlington, Canadá) e a programação utilizada, respectivamente.

**Tabela 2.3** Componentes e concentrações finais utilizadas nas reacções de PCR.

Componentes	Concentração final (num volume de 25 µl)
<i>Dream Taq™ Buffer</i>	1X
dNTPs	0,2 mM de cada
<i>Primer</i> senso	0,4 µM
<i>Primer</i> anti-senso	0,4 µM
<i>Dream Taq™ DNA Polymerase</i>	1 U
ADN	50 ng

**Tabela 2.4** Programa de amplificação por PCR.

Fase da PCR	Temperatura (°C)	Duração	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	5'	1
Desnaturação	95	10''	35
Hibridação	60	20''	
Extensão	72	10''	
Extensão final	72	5'	1
	4		

Os produtos obtidos foram separados por uma electroforese em gel de 2% agarose (Invitrogen™. Carlsbad, Califórnia, E.U.A.), em tampão 1X TAE (40 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0; 20 mM ácido acético glacial) a 100 Volts, durante 60 minutos, numa tina de separação horizontal (V-Gel, Consort. Turnhout, Bélgica) ligada a uma fonte eléctrica (EV243, Consort. Turnhout, Bélgica). O gel foi corado com 1% brometo de etídeo (Sigma-Aldrich®. St. Louis, E.U.A.), visualizado com luz UV num transiluminador (Vilber Lourmat. Marne-la-Vallée, França) e fotografado (DC120, Kodak. Rochester, Nova Iorque, E.U.A.). As dimensões moleculares dos fragmentos foram estimadas através das suas mobilidades relativas e por comparação com fragmentos de dimensão conhecida (3 µg *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA ladder* (Fermentas Inc. Burlington, Canadá)).

### 2.2.3. Sequenciação

Para confirmar a especificidade da PCR, sequenciaram-se nos dois sentidos (senso e anti-senso) os fragmentos obtidos para os genes *hyp-1* e *HpPKS2*. Para tal, precipitaram-se os produtos de PCR com 300 µl de 100% etanol, durante a noite, a -20 °C. Centrifugou-se a 13 000 rpm, durante 40 minutos, a 4 °C. Secou-se o sedimento no concentrador de vácuo a 30 °C, durante 10 minutos, e ressuspendeu-se em 10 µl de água ultrapura esterilizada. Colocou-se a 4 °C, durante a noite, e, para a reacção de sequenciação, utilizou-se o *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems™. Foster City, Califórnia, E.U.A.) num volume final de 10 µl, contendo: 4 µl de *premix*, 20 µM de *primer* e 2 a 8 ng de produto de PCR. Os produtos da reacção foram precipitados, adicionando-se 300 µl de 100% etanol e colocando-os a -20 °C, durante a noite. Centrifugou-se a 13 000 rpm, durante 40 minutos, a 4 °C. Secou-se o sedimento no concentrador de vácuo a 30 °C, durante 10 minutos, e ressuspendeu-se em 20 µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™. Foster City, Califórnia, E.U.A.). Os produtos foram separados por electroforese no sequenciador automático ABI Prism® 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems™. Foster City, Califórnia, E.U.A.).

As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências depositadas na base de dados GenBank® do NCBI para os genes em questão e para o género *Hypericum* com o programa Vector NTI® Suite 7.1, através do módulo AlignX® (Informax, Inc., 1998. North Bethesda, Maryland, E.U.A.). As sequências nucleotídicas dos fragmentos dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* de *Hypericum*

*foliosum* foram comparadas com as de *H. perforatum* (AY148090 e EF186676, respectivamente), de modo a identificar eventuais mutações que resultem em alterações na sequência proteica.

Para o fragmento do gene *hyp-1* de *Hypericum foliosum*, construiu-se um dendograma da relação filogenética entre a sequência de *H. foliosum* e as disponíveis para o fragmento do gene de diferentes espécies de *Hypericum* (*H. androsaemum*, *H. annulatum*; *H. balearicum*; *H. bupleuroides*; *H. canariense*; *H. erectum*; *H. humifusum*; *H. kalmianum*; *H. kouytchense*; *H. maculatum*; *H. orientale*; *H. perforatum*; *H. pulchrum* e *H. tetrapterum*).

#### 2.2.4. Extracção e quantificação de ARN

O ARN total foi extraído a partir de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* de *Hypericum foliosum*, de culturas em suspensão nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> e de culturas nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS, de acordo com o protocolo descrito por Chang *et al.* (1993).

Utilizou-se uma solução de 0,1% DEPC (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. St. Louis, E.U.A.), eficiente inibidor não-específico de RNases, para a preparação das soluções e para o tratamento de todo o material de plástico utilizado. Incubou-se o material de vidro a 180 °C, durante 8 horas, para inibir a acção das RNases.

Colocaram-se as amostras (100 a 500 mg) em tubos de 1,5 ml, as quais foram mantidas em azoto líquido até serem trituradas no moinho MM20 (Retsch<sup>®</sup>. Amsterdão, Holanda). A cada amostra, adicionaram-se 600 µl de tampão de extracção 2X CTAB (2% CTAB; 2% PVP; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 0,05% espermidina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. St. Louis, E.U.A.); 3 M NaCl; 1/10 do volume de Tris-HCl, pH 8,0 e 2% β-mercaptoetanol) previamente aquecido a 65 °C. Misturou-se por inversão e incubou-se a 65 °C, durante 5 minutos. Adicionou-se o mesmo volume (600 µl) de clorofórmio : álcool isoamílico (Merck. Darmstadt, Alemanha) (24:1). Centrifugou-se a 13 000 rpm, durante 15 minutos, a 22 °C, e recolheu-se a fase aquosa para um novo tubo de 1,5 ml. Repetiu-se o processo de extracção com clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e adicionou-se 1/4 de volume de 10 M LiCl (Merck. Darmstadt, Alemanha). Misturou-se a solução e colocou-se a 4 °C, durante a noite. Centrifugou-se a 12 000 rpm, durante 20 minutos, a 4 °C. Descartou-se a fase aquosa e ressuspendeu-se o ARN precipitado em 500 µl de SSTE (1 M NaCl; 0,5% SDS; 1 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) a 37 °C. Para remover eventuais proteínas e polissacáridos do ARN, adicionou-se o mesmo volume (500 µl) de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). Centrifugou-se a 13 000 rpm, durante 10 minutos, a 22 °C e recolheu-se a fase aquosa para um novo tubo de 1,5 ml, repetindo-se o processo anterior. O ARN foi precipitado, adicionando-se 2½ volumes de 100% etanol a -20 °C e incubando-se duas horas a -20 °C. Centrifugou-se a 13 000 rpm, durante 20 minutos, a 4 °C e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o sedimento com 250 µl de 70% etanol e centrifugou-se a 13 000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento. Ressuspendeu-se o ARN em 25 µl de dH<sub>2</sub>O com 0,1% DEPC.

Trataram-se as amostras de ARN com 1 U µl<sup>-1</sup> de DNase RQ1 (Promega. Madison, Wisconsin, E.U.A), de modo a eliminar possíveis contaminações com ADN genómico. De acordo com as instruções do fabricante, para um volume final de 10 µl, utilizaram-se: 8 µl de ARN,

1  $\mu$ l de 10X RQ1 RNase-Free Reaction Buffer e 1 U de RQ1 RNase-free DNase por  $\mu$ g de ARN. Incubou-se a 37 °C, durante 30 minutos, e adicionaram-se 1,5  $\mu$ l de 50 mM EDTA. Incubou-se a 75 °C, durante 10 minutos, para inactivar a DNase.

Quantificou-se o ARN por espectrofotometria, a 260 nm e a 280 nm, utilizando-se o espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific. Cheshire, Reino Unido). O ARN foi guardado a -80 °C.

### 2.2.5. Síntese de cADN e quantificação relativa da expressão dos genes *hyp-1* e *HpPKS2*

A expressão dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* foi quantificada pela técnica de PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR). Primeiro, foi sintetizado o cADN, por transcrição reversa (RT) com hexâmeros aleatórios, a partir de ARN extraído, tendo-se, posteriormente, procedido à quantificação relativa da expressão dos genes de interesse por qPCR. A reacção de RT foi realizada num volume final de 50  $\mu$ l, utilizando-se os componentes e programação descritos nas Tabelas 2.5 e 2.6, respectivamente.

**Tabela 2.5** Componentes e concentrações finais utilizadas nas reacções de RT.

	Componentes	Concentração final (num volume de 50 $\mu$ l)
Mix 1 (Volume final = 20 $\mu$ l)	Hexâmeros aleatórios (Applied Biosystems™)	1 $\mu$ M
	dNTPs (Invitrogen™)	0,5 mM de cada
	ARN	600-700 ng $\mu$ l <sup>-1</sup>
5 minutos a 65 °C, seguindo-se 2 minutos no gelo		
Mix 2 (Volume final = 30 $\mu$ l)	<i>First-Strand Buffer</i> (Invitrogen™)	2X
	DTT (Invitrogen™)	0,005 M
	<i>RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor</i> (Invitrogen™)	100 U
	<i>SuperScript® III Reverse Transcriptase</i> (Invitrogen™)	500 U

**Tabela 2.6** Programa da RT.

Fase da RT	Temperatura (°C)	Duração
Hibridação	25	5'
Síntese de cADN	50	45'
Inactivação da <i>SuperScript</i> <sup>®</sup> <i>III Reverse Transcriptase</i>	70	15'
	4	

Após a reacção de RT, a síntese de cADN alvo foi verificada por PCR, utilizando-se os *primers* específicos para *hyp-1*, *HpPKS2*, *GAPDH* e *18S rRNA*. As reacções foram realizadas, de acordo com os componentes e programação descritos nas Tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente. Os produtos de PCR foram separados por uma electroforese em gel de 2% agarose em 1X TAE.

A quantificação relativa da expressão dos genes de interesse *hyp-1* e *HpPKS2* em folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* de *Hypericum foliosum*, em culturas em suspensão nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> e em culturas nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS, foi realizada no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, Califórnia, E.U.A.), tendo sido utilizada o *Power SYBR*<sup>®</sup> *Green Master Mix kit* (Applied Biosystems™, Foster City, Califórnia, E.U.A.). Foram preparadas reacções de 25 µl para cada par de *primers* utilizado na qPCR (Tabela 2.7), contendo: 1X *Power SYBR*<sup>®</sup> *Green Master Mix*, 0,2 µM *primers* senso e anti-senso (à excepção dos *primers* para *18S rRNA*, em que a concentração final foi de 0,1 µM) e 2 µl de cADN. As reacções foram realizadas em triplicado para cada amostra em estudo. O gene *18S rRNA* e/ou o gene *GAPDH* foram utilizados como controlos internos na quantificação dos produtos de qRT-PCR. A amplificação de apenas um produto específico, por qRT-PCR, foi confirmada pela análise das curvas de desnaturação.

**Tabela 2.7** Programa de amplificação por qPCR.

Fase da qPCR	Temperatura (°C)	Duração	Taxa de transição de temperatura	Ciclos
Activação da <i>AmpliTaq Gold</i> <sup>®</sup> <i>DNA Polymerase</i>	95	10'	100%	1
Desnaturação	95	15''	100%	40
Hibridação/Extensão	60	1'	100%	
Curva de desnaturação	95	15''	100%	1
	60	1'	1%	
	95	30''	100%	
	60	15''		

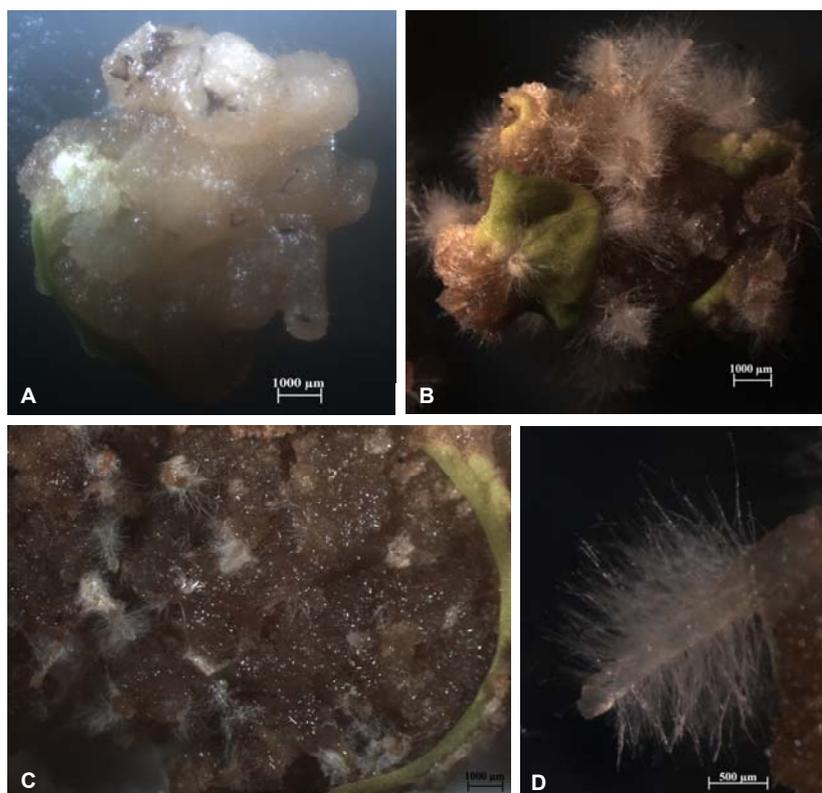
### 3. Resultados

#### 3.1. Cultura de tecidos de *Hypericum foliosum* Aiton

##### 3.1.1. Culturas de calos de *H. foliosum*

###### 3.1.1.1 Caracterização morfológica

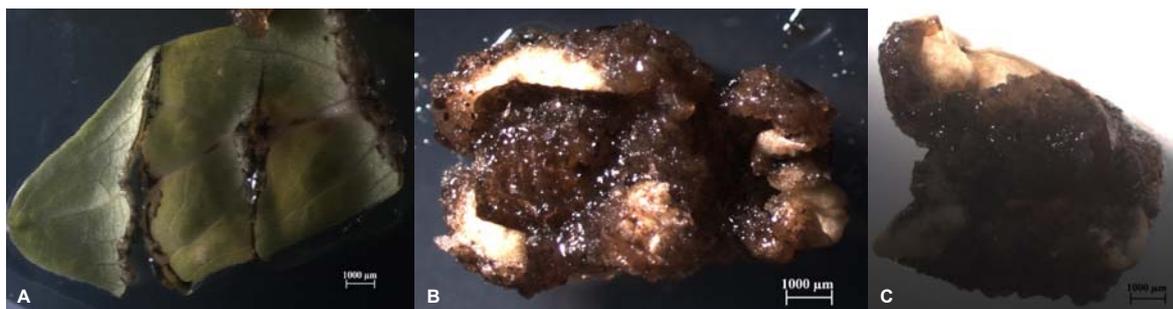
Os calos de *Hypericum foliosum* induzidos pelo meio A<sub>1</sub> com a composição hormonal BAP a 0,04 mg l<sup>-1</sup>, IBA a 0,06 mg l<sup>-1</sup> e NAA a 1,00 mg l<sup>-1</sup> apresentaram algum grau de diferenciação. Eram compactos, constituídos por agregados esféricos, e cuja cor escureceu com o decorrer do tempo de cultura (Figura 3.1). Aos 30 dias, os calos apresentaram-se claros (brancos/bege) (Figura 3.1 A), aos 70 dias, a sua cor já tinha escurecido para bege e castanho (Figura 3.1 B) e, aos 100 dias de cultura, praticamente todos se observaram castanhos/escuros (Figura 3.1 C). O meio de indução de calos A<sub>1</sub> foi o único em que se observou a regeneração de primórdios radiculares com um desenvolvimento anatómico típico, incluindo a diferenciação de pêlos radiculares brancos (Figura 3.1 D). Foram observados fenómenos oxidativos desde o início do período de observação (Figura 3.10 B).



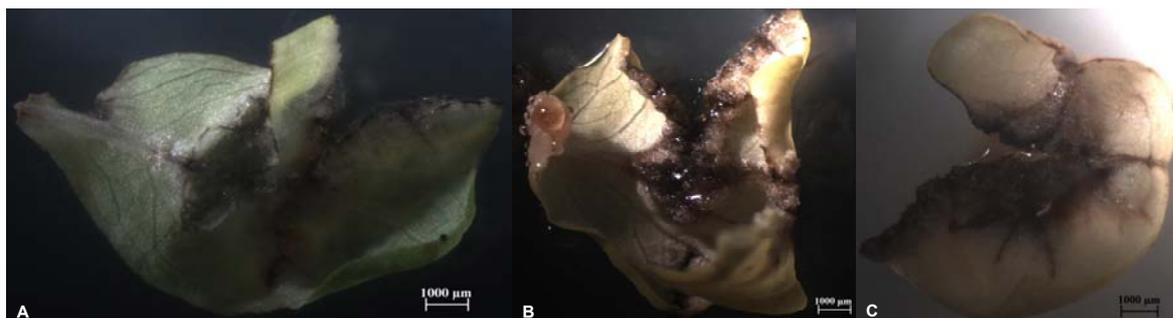
**Figura 3.1** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio A<sub>1</sub> com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. **D)** Primórdio radicular com pêlos radiculares, na superfície de um calo. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X, e **D)** 32X.

No meio A<sub>2</sub> (BAP a 0,04 mg l<sup>-1</sup> e NAA a 1,00 mg l<sup>-1</sup>), aos 30 dias de cultura, a indução de calos em explantes foliares era pouco pronunciada (Figura 3.2 A). Contudo, aos 70 e aos 100 dias, observou-se tecido caloso compacto, castanho, muito oxidado e formado por algumas estruturas esféricas (Figuras 3.2 B e C).

O meio de cultura A<sub>3</sub> (BAP a 0,04 mg l<sup>-1</sup> e IBA a 1,00 mg l<sup>-1</sup>) foi o único que não induziu a formação de calos, potenciando também os fenómenos de oxidação e de necrose da folha (Figura 3.3).

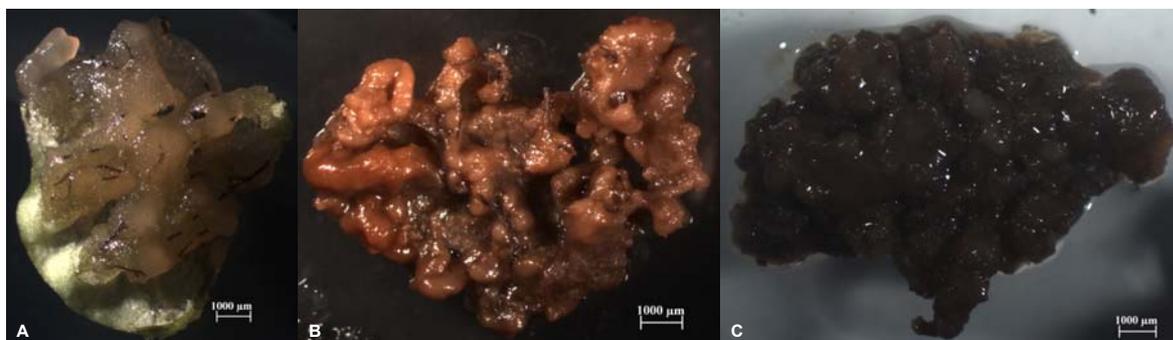


**Figura 3.2** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio A<sub>2</sub> com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X.



**Figura 3.3** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio A<sub>3</sub> com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X.

O meio B, cuja composição hormonal consiste em KIN a 0,02 mg l<sup>-1</sup> e 2,4-D a 0,20 mg l<sup>-1</sup>, levou à formação de calos com massas globulares compactas que, na fase inicial de cultura, se apresentaram claros (brancos/beges) (Figura 3.4 A) mas que com 70 e 100 dias eram na sua grande maioria castanhos e muito oxidados (Figuras 3.4 B e C e Figura 3.10 D).



**Figura 3.4** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio B com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X.

O meio C<sub>1</sub> (KIN a 0,5 mg l<sup>-1</sup> e 2,4-D a 0,5 mg l<sup>-1</sup>) induziu calos compactos brancos e beges (Figura 3.5 A) que, posteriormente, evoluíram para um tom acastanhado (Figuras 3.5 B e C). Observou-se também a ocorrência de agregados celulares compactos e de fenômenos oxidativos, durante todo o período de observação (Figura 3.10 F). Os calos induzidos pelo meio C<sub>2</sub> (KIN a 0,5 mg l<sup>-1</sup> e 2,4-D 0,7 mg l<sup>-1</sup>) eram embriogênicos, pelo que se apresentaram num estado bem diferenciado em que, a partir dos 70 dias de cultura, eram visíveis estruturas globulares compactas bem definidas, mais claras do que o restante tecido caloso (Figuras 3.6 B e C). À semelhança dos calos induzidos no meio C<sub>1</sub>, iniciaram-se beges (Figura 3.6 A), escurecendo com o aumento da ocorrência dos fenômenos oxidativos (Figuras 3.6 B e C). Com a utilização do meio C<sub>3</sub> (KIN a 0,1 mg l<sup>-1</sup> e 2,4-D a 0,7 mg l<sup>-1</sup>), a oxidação dos calos evidenciou-se desde cedo, pelo que estes se apresentaram compactos, castanhos/escuros e com agregados celulares globulares desde os 30 dias de cultura (Figura 3.7). Na Figura 3.8 apresentam-se os calos induzidos pelo meio C<sub>4</sub>, (KIN a 0,1 mg l<sup>-1</sup> e 2,4-D a 0,5 mg l<sup>-1</sup>) que eram compactos e castanhos, sendo que os fenômenos oxidativos se observaram desde o início do período de observação. Foram ainda observadas estruturas globulares compactas beges e brancas, aos 70 e 100 dias de cultura, respectivamente (Figuras 3.8 B e C).

Os fenômenos de oxidação que levam ao escurecimento dos calos parecem ocorrer em estreita relação com o tempo, mesmo com a incorporação de ácido ascórbico anti-oxidante nos meios de cultura.



**Figura 3.5** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio C<sub>1</sub> com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X.



**Figura 3.6** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio C<sub>2</sub> com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X.



**Figura 3.7** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio C<sub>3</sub> com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X.

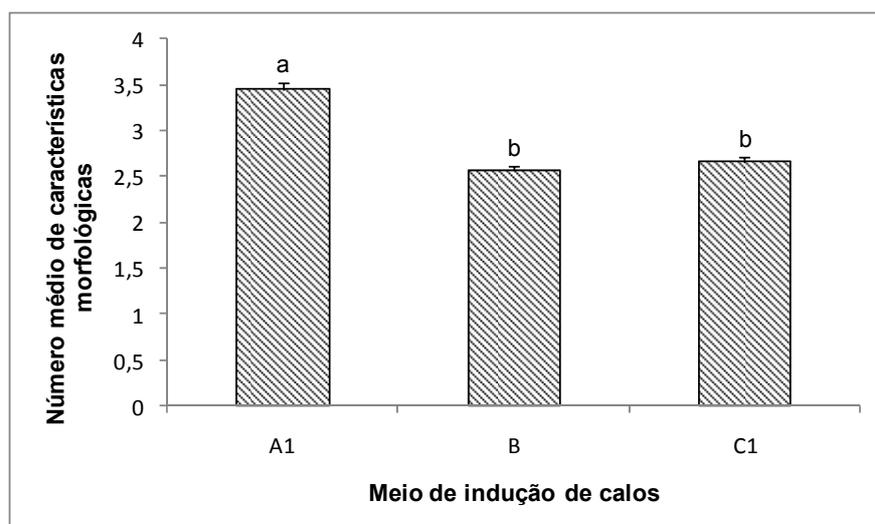


**Figura 3.8** Calos de *H. foliosum* induzidos pelo meio C<sub>4</sub> com **A)** 30; **B)** 70 e **C)** 100 dias. Ampliação: **A), B)** e **C)** 10X.

### 3.1.1.2. Número de características morfológicas e frequência calogénica das culturas de calos induzidas nos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub>

A análise estatística do número de características morfológicas observado nos calos de *Hypericum foliosum* e da frequência calogénica foi realizada para as culturas induzidas nos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub>. Devido ao baixo número de réplicas para os restantes meios, não foi possível proceder à análise estatística dos dados.

O número de características morfológicas (textura, cor, grau de diferenciação e fenómenos oxidativos) observado nos calos variou significativamente com o meio de cultura utilizado (ANOVA:  $F = 130,10$ ; d.f. = 2,612;  $p = 0,000$ ). O teste de Tukey HSD *post hoc* revelou que o número médio de características morfológicas apresentado pelos calos induzidos no meio A<sub>1</sub> ( $3,45 \pm 0,06$ ) foi significativamente superior, relativamente ao apresentado pelos calos dos meios B ( $2,56 \pm 0,04$ ) e C<sub>1</sub> ( $2,66 \pm 0,05$ ). No entanto, entre os dois últimos meios esse número não diferiu significativamente (Figura 3.9).



**Figura 3.9** Número médio de características morfológicas dos calos induzidos nos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub>. As barras correspondem aos valores de erro padrão da média. Para cada parâmetro, diferentes letras acima das barras de erro padrão indicam diferenças significativas entre tratamentos, após os testes ANOVA a um factor e Tukey HSD.

Para o meio de indução de calos A<sub>1</sub>, o número de características morfológicas variou significativamente durante o período de observação (ANOVA:  $F = 17,70$ ; d.f. = 6,231;  $p = 0,000$ ) (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** Valores de  $F$  e de  $p$  da ANOVA a um factor do número de características morfológicas dos calos (textura, cor, grau de diferenciação e fenómenos oxidativos) durante os 115 dias de cultura de calos nos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub>. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. (não significativo)  $p > 0,05$ .

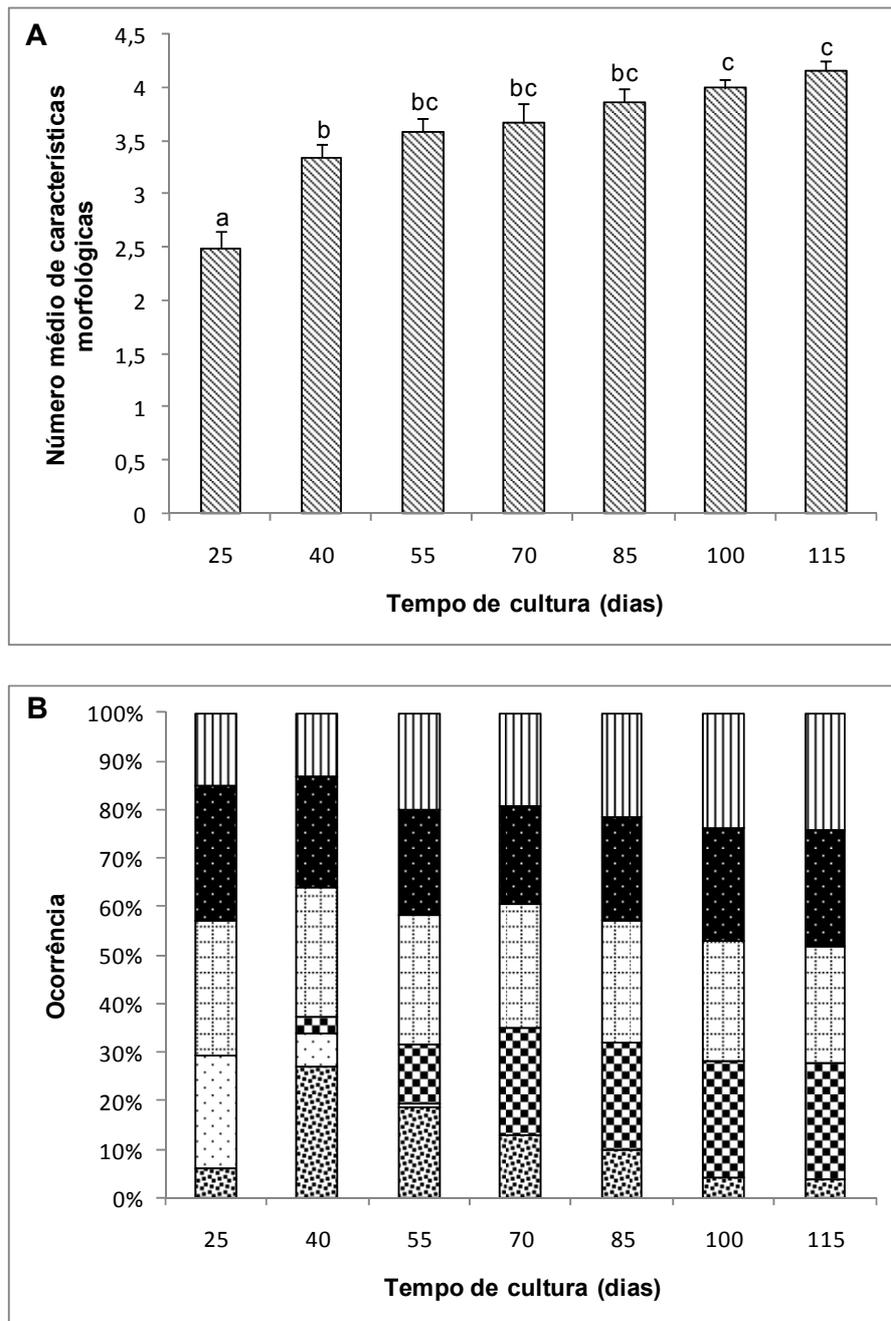
	$F$	$p$
Nº de características morfológicas dos calos		
Meios:		
A <sub>1</sub>	17,70	***
B	4,36	***
C <sub>1</sub>	14,74	***

O teste de comparação múltipla de médias Tukey HSD mostrou que o número médio de características morfológicas apresentado pelos calos induzidos no meio  $A_1$  aumentou significativamente até aos 40 dias de cultura (25 dias:  $2,49 \pm 0,16$ ; 40 dias:  $3,35 \pm 0,12$ ), não variando depois significativamente até aos 85 dias (55 dias:  $3,58 \pm 0,13$ ; 70 dias:  $3,68 \pm 0,17$ ; 85 dias:  $3,86 \pm 0,14$ ). Aos 100 dias de cultura, observou-se um número médio de características morfológicas dos calos de  $4,00 (\pm 0,09)$ , valor que se manteve semelhante até aos 115 dias ( $4,17 \pm 0,08$ ). Deste modo, observou-se um aumento gradual no número médio de características morfológicas observado nos calos induzidos no meio de cultura  $A_1$  (Figura 3.10 A). Num período inicial do tempo de cultura (entre os 25 e os 55 dias), os calos do meio  $A_1$  eram predominantemente compactos, brancos e beges e a partir dessa altura tornaram-se maioritariamente castanhos, devido aos fenómenos oxidativos que ganharam proporção de ocorrência com o passar do tempo. O tecido caloso formado no meio  $A_1$  apresentou algum grau de diferenciação evidenciado pela elevada proporção de estruturas globulares compactas e de primórdios radiculares ao longo dos 115 dias de observação (Figura 3.10 B).

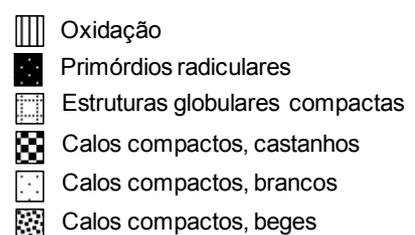
O número de características morfológicas apresentado pelos calos formados no meio B diferiu significativamente entre os diferentes tempos de observação (ANOVA:  $F = 4,36$ ; d.f. = 6,186;  $p = 0,000$ ) (Tabela 3.1). O teste de Tukey HSD *post hoc* mostrou um aumento significativo do número médio dessas características dos 25 para os 70 dias de cultura (25 dias:  $2,23 \pm 0,14$ ; 40 dias:  $2,52 \pm 0,11$ ; 55 dias:  $2,68 \pm 0,10$ ; 70 dias:  $2,78 \pm 0,08$ ), o qual posteriormente diminuiu (85 dias:  $2,32 \pm 0,10$ ; 100 dias:  $2,71 \pm 0,09$ ; 115 dias:  $2,74 \pm 0,09$ ) (Figura 3.11 A).

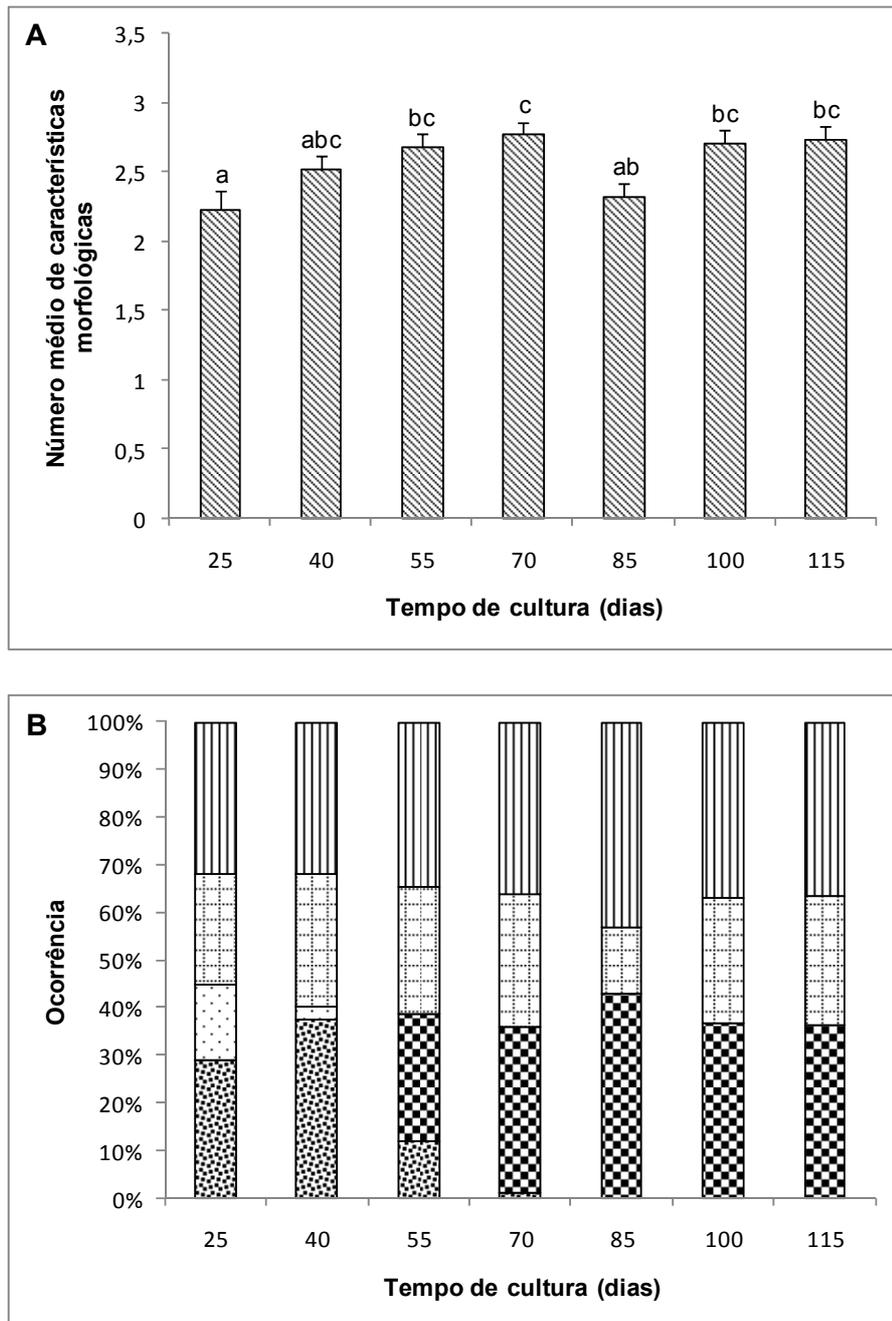
À semelhança do que se observou para os outros dois meios de cultura, o número de características morfológicas apresentado pelos calos formados no meio  $C_1$  variou significativamente ao longo do tempo de cultura ( $F = 14,74$ ; d.f. = 6, 201;  $p = 0,000$ ) (Tabela 3.1). Pelo teste de Tukey HSD *post hoc*, foi possível detectar um aumento significativo do número médio dessas características apenas dos 25 ( $2,00 \pm 0,09$ ) para os 40 dias de cultura ( $2,64 \pm 0,15$ ). Os restantes tempos de observação não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo o número médio máximo obtido aos 55 dias de cultura (55 dias:  $3,04 \pm 0,11$ ; 70 dias:  $2,86 \pm 0,11$ ; 85 dias:  $2,92 \pm 0,06$ ; 100 dias:  $2,90 \pm 0,07$ ; 115 dias:  $2,90 \pm 0,07$ ) (Figura 3.12 A).

As características morfológicas observadas nos calos induzidos pelos meios de cultura B (Figura 3.11 B) e  $C_1$  (Figura 3.12 B) foram idênticas e a sua distribuição de proporção de ocorrências também. Observaram-se calos compactos, brancos entre os 25 e os 40 dias de cultura e calos compactos, beges até aos 70 dias. Assim, todos os calos com 85 dias apresentavam-se compactos, castanhos. A ocorrência de estruturas globulares compactas e de fenómenos de oxidação evidenciou-se logo desde o início do período de observação. Os fenómenos oxidativos observaram-se em proporções de ocorrência superiores às obtidas para os calos do meio  $A_1$ . Em oposição a  $A_1$ , os meios B e  $C_1$  não foram capazes de induzir a organogénese de primórdios radiculares (Figuras 3.11 B e 3.12 B).

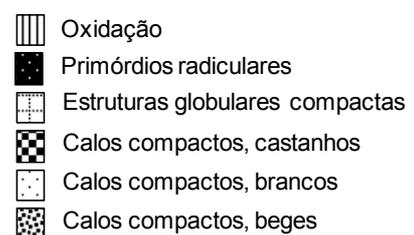


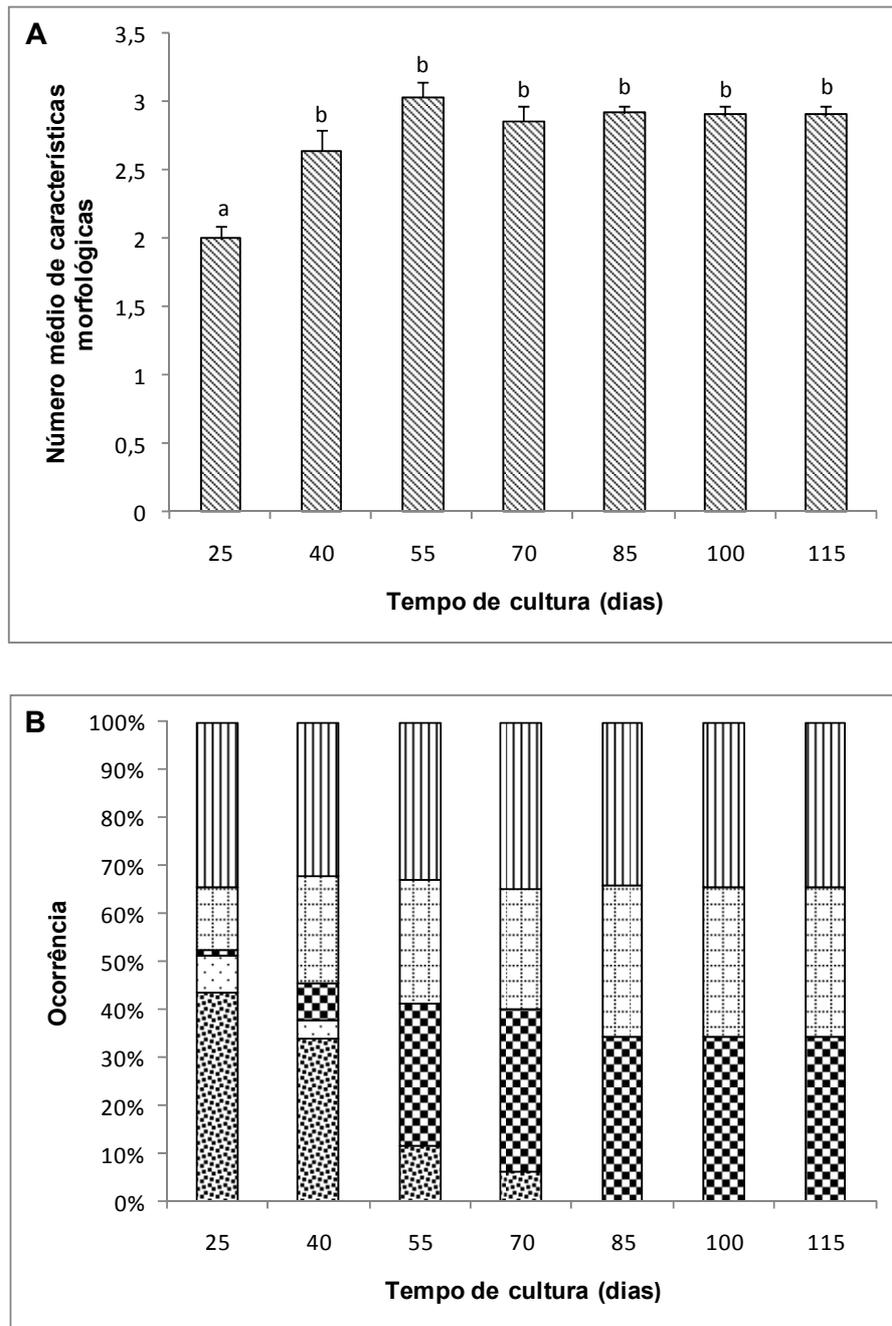
**Figura 3.10 A)** Número médio de características morfológicas dos calos, durante 115 dias de cultura no meio A<sub>1</sub>. As barras correspondem aos valores de erro padrão da média. Para cada parâmetro, diferentes letras acima das barras de erro padrão indicam diferenças significativas entre tratamentos, após os testes ANOVA a um factor e Tukey HSD. **B)** Proporção de ocorrência de fenómenos oxidativos, de primórdios radiculares, de estruturas globulares compactas e de calos compactos, castanhos, brancos e beges, durante os 115 dias de observação.



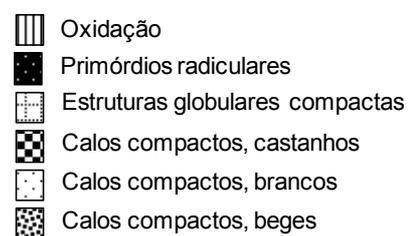


**Figura 3.11 A)** Número médio de características morfológicas dos calos, durante 115 dias de cultura no meio B. As barras correspondem aos valores de erro padrão da média. Para cada parâmetro, diferentes letras acima das barras de erro padrão indicam diferenças significativas entre tratamentos, após os testes ANOVA a um factor e Tukey HSD. **B)** Proporção de ocorrência de fenómenos oxidativos, de primórdios radiculares, de estruturas globulares compactas e de calos compactos, castanhos, brancos e beges, durante os 115 dias de observação.

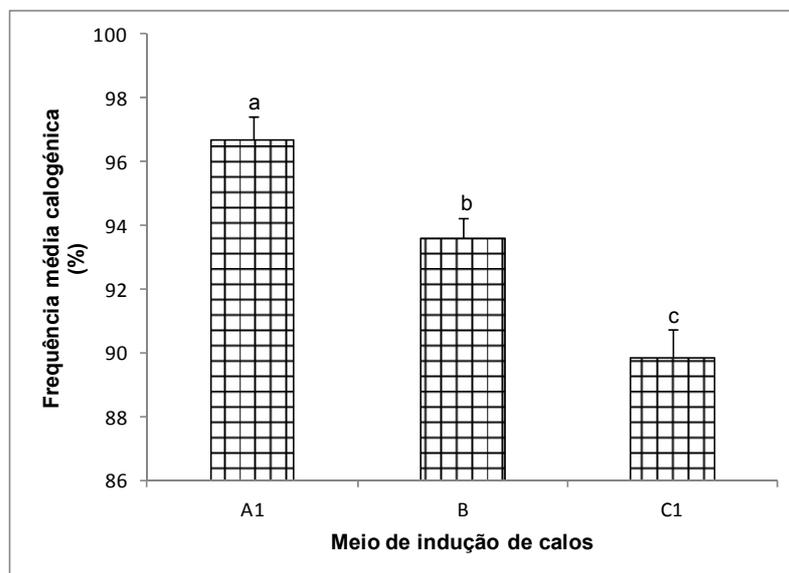




**Figura 3.12 A)** Número médio de características morfológicas dos calos, durante 115 dias de cultura no meio C<sub>1</sub>. As barras correspondem aos valores de erro padrão da média. Para cada parâmetro, diferentes letras acima das barras de erro padrão indicam diferenças significativas entre tratamentos, após os testes ANOVA a um factor e Tukey HSD. **B)** Proporção de ocorrência de fenômenos oxidativos, de primórdios radiculares, de estruturas globulares compactas e de calos compactos, castanhos, brancos e beges, durante os 115 dias de observação.



A frequência calogénica foi afectada pela composição em reguladores de crescimento dos meios, variando significativamente nos três meios: A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub> (ANOVA:  $F = 33,37$ ; d.f. = 2,615;  $p = 0,000$ ). Pelo teste de comparação múltipla de médias Tukey HSD, concluiu-se que a frequência média calogénica foi significativamente superior no meio A<sub>1</sub> ( $97 \pm 0,74$ ) relativamente ao B ( $94 \pm 0,65$ ) e ao C<sub>1</sub> ( $90 \pm 0,91$ ), e superior no meio B relativamente ao C<sub>1</sub> (Figura 3.13).



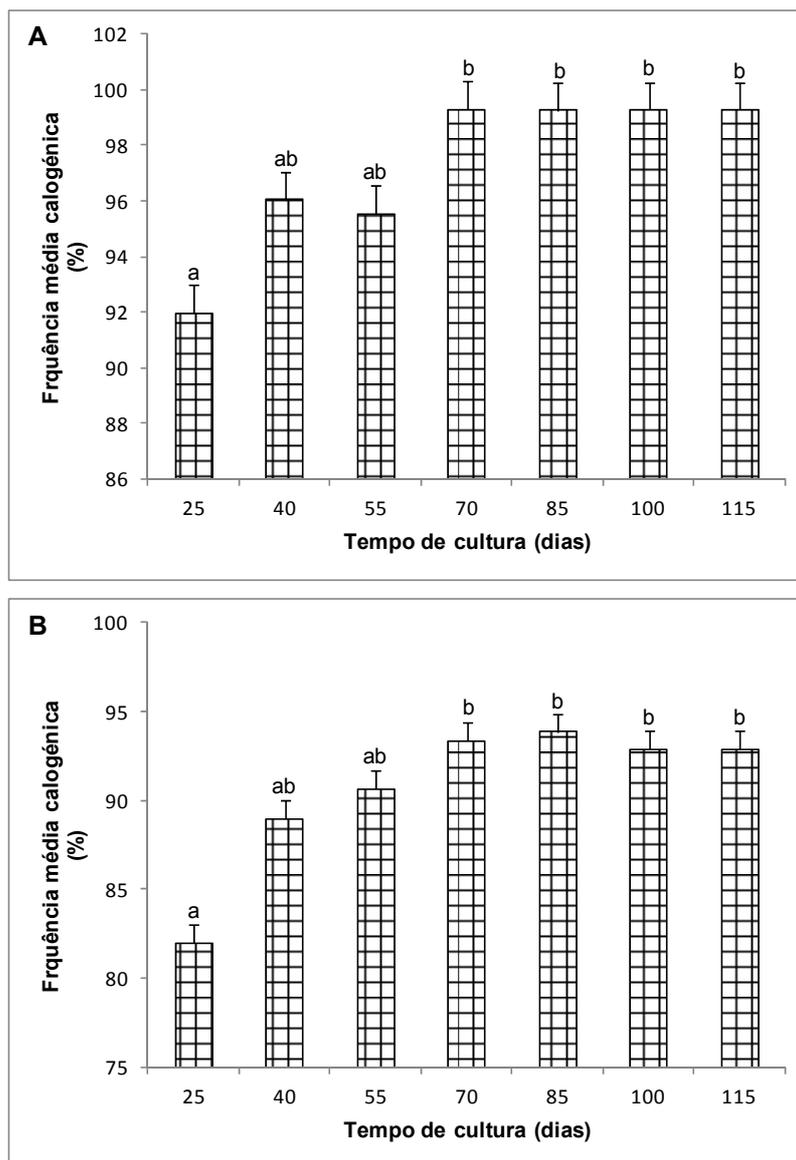
**Figura 3.13** Frequência média calogénica dos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub>. As barras correspondem aos valores de erro padrão da média. Os valores de percentagem estão convertidos em proporções pela transformação arco seno da raiz quadrada. Para cada parâmetro, diferentes letras acima das barras de erro padrão indicam diferenças significativas entre tratamentos, após os testes ANOVA a um factor e Tukey HSD.

Durante o período de observação, apenas foram encontradas variações significativas na progressão da frequência calogénica nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> (ANOVA: A<sub>1</sub>:  $F = 4,86$ ; d.f. = 6,231;  $p = 0,000$ ; B:  $F = 0,69$ ; d.f. = 6,180;  $p = 0,657$ ; C<sub>1</sub>:  $F = 4,83$ ; d.f. = 6,202;  $p = 0,000$ ) (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** Valores de  $F$  e de  $p$  da ANOVA a um factor da frequência calogénica dos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub>, durante os 115 dias de cultura. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. (não significativo)  $p > 0,05$ .

	F	p
Frequência calogénica		
Meios:		
A <sub>1</sub>	4,86	***
B	0,69	n.s.
C <sub>1</sub>	4,83	***

Para ambos os meios, o teste de Tukey HSD *post hoc* revelou uma progressão da frequência calogénica semelhante ao longo do tempo: aumentou significativamente até aos 70 dias de cultura, mantendo-se depois, aproximadamente, constante até aos 115 dias de cultura (Figura 3.14). No meio A<sub>1</sub>, aos 25 dias, a frequência média calogénica foi de, aproximadamente, 92% ( $\pm 2,28$ ) e aos 70 dias de 99% ( $\pm 0,50$ ) (Figura 3.14 A). No meio C<sub>1</sub>, as frequências médias calogénicas foram menores do que em A<sub>1</sub>, pelo que no primeiro tempo de observação foi de cerca de 82% ( $\pm 2,53$ ) e, aos 85 dias de cultura, foi obtida a frequência máxima de 94% ( $\pm 2,04$ ) (Figura 3.14 B).

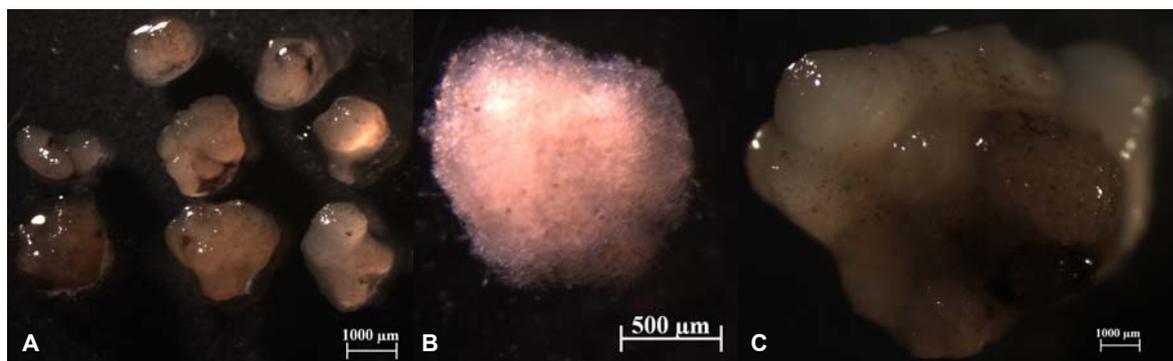


**Figura 3.14** Frequência média calogénica dos meios **A)** A<sub>1</sub> e **B)** C<sub>1</sub>, durante 115 dias de cultura. As barras correspondem aos valores de erro padrão da média. Os valores de percentagem estão transformados pela função arco seno da raiz quadrada. Para cada parâmetro, diferentes letras acima das barras de erro padrão indicam diferenças significativas entre tratamentos, após os testes ANOVA a um factor e Tukey HSD.

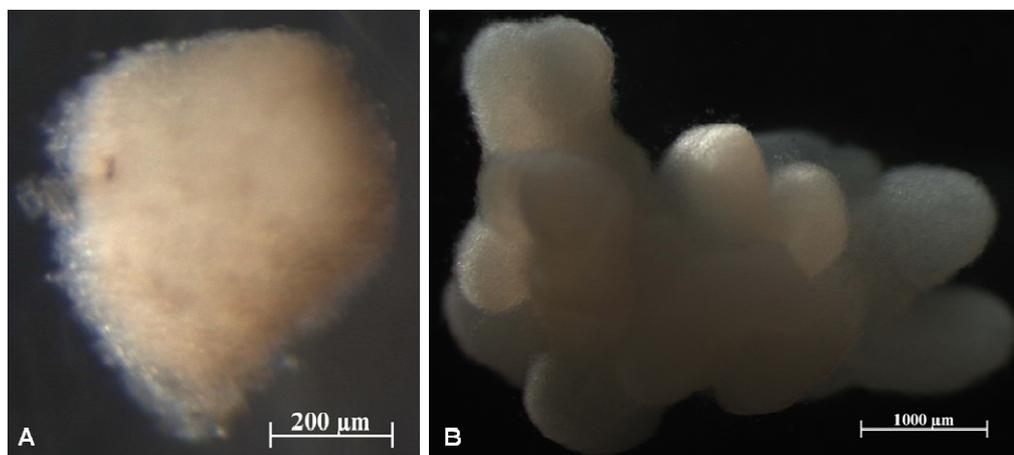
### 3.1.2. Culturas em suspensão de *H. foliosum*

#### 3.1.2.1. Caracterização morfológica e histológica de estruturas celulares compactas

As suspensões celulares de *Hypericum foliosum* nos meios  $A_1$  e  $C_1$  com 4 meses caracterizaram-se por uma composição heterogénea, em que, para além de células isoladas e de pequenos agregados celulares, se desenvolveram estruturas celulares compactas de cor clara: brancas e beges. Para ambos os meios de cultura, foram observadas estruturas cordiformes ( $A_1$ : Figura 3.15 B;  $C_1$ : Figura 3.16 A), bem como agregados celulares que apresentavam a forma semelhante à do fruto framboesa, constituídos por um conjunto de glóbulos bem definidos ( $A_1$ : Figura 3.15 C;  $C_1$ : Figura 3.16 B). Durante o período cultura, o número de glóbulos aumentou.



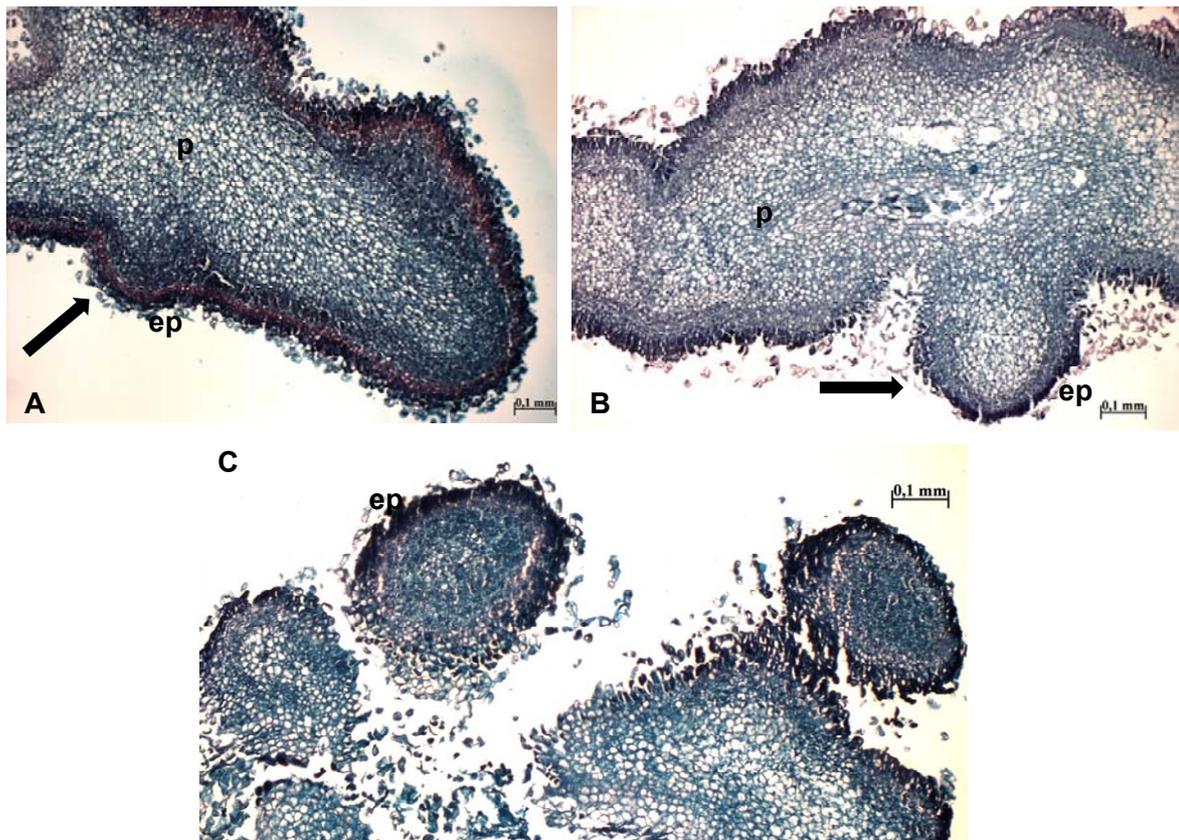
**Figura 3.15** **A)** Estruturas celulares compactas obtidas em cultura em suspensão no meio  $A_1$  com 4 meses (116 dias); **B)** estrutura cordiforme e **C)** estrutura do tipo “framboesa”. Ampliação: **A)** e **B)** 10X, e **C)** 25X.



**Figura 3.16** Estruturas celulares compactas obtidas em cultura em suspensão no meio  $C_1$  com 4 meses (119 dias). **A)** Estrutura cordiforme e **B)** estrutura do tipo “framboesa”. Ampliação: **A)** 25X e **B)** 80X.

As secções histológicas das estruturas globulares em forma de “framboesa” desenvolvidas em culturas em suspensão no meio  $C_1$  revelaram algum grau de organização e diferenciação tecidual, sendo possível a visualização de uma epiderme exterior (corada de vermelho pela safranina O), subjacente à qual se encontram células muito pequenas, ricas em citoplasma e num processo de divisão muito activo (fortemente coradas de verde pelo *fast green*). Numa localização

mais interna, é possível identificar tecido parenquimatoso, constituído por células maiores do que as anteriores e pouco especializadas (Figura 3.17 A). Na Figura 3.17, observa-se o processo de formação dos glóbulos que consistiu na progressiva exteriorização dos mesmos, podendo alguns destes destacar-se e, por conseguinte, isolar-se do restante tecido parenquimatoso (Figura 3.17 C).

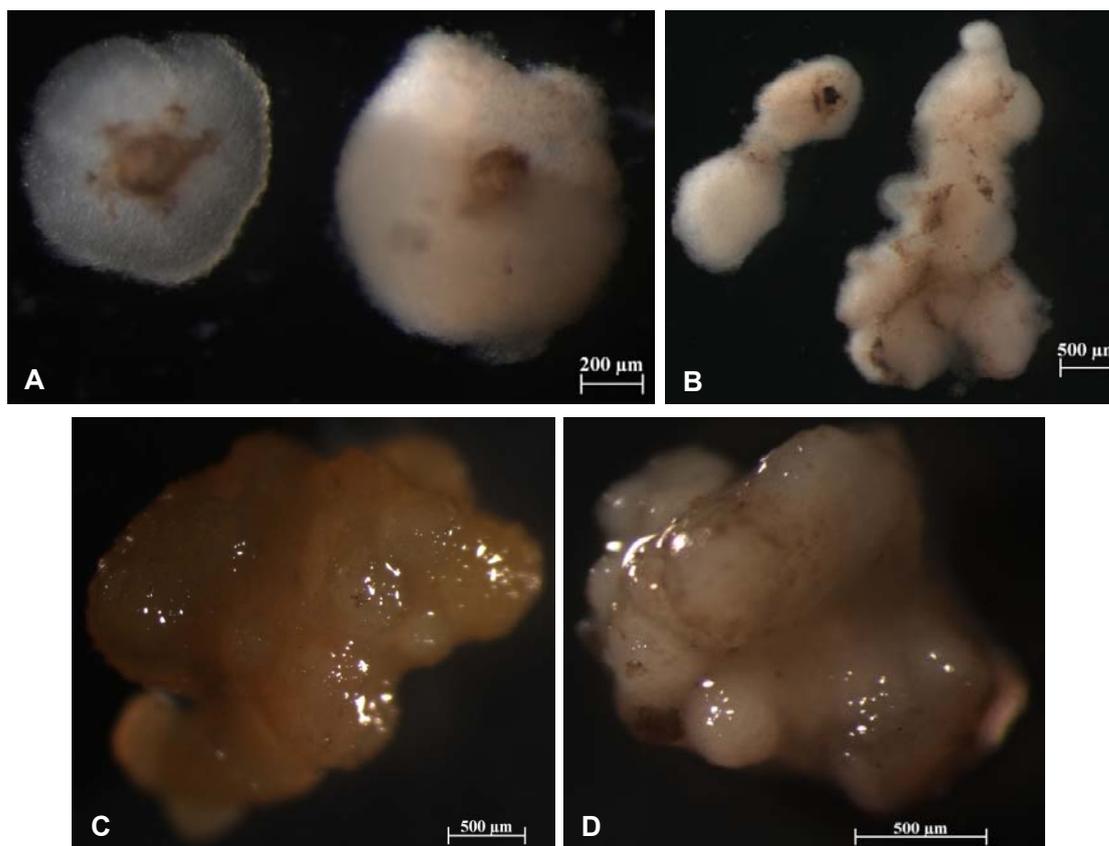


**Figura 3.17** Secções histológicas de estruturas globulares compactas obtidas em cultura em suspensão no meio  $C_1$  com 4 meses (130 dias). **A)** Fase inicial de desenvolvimento de um glóbulo (seta); **B)** glóbulo compacto (seta) associado ao restante tecido parenquimatoso e **C)** glóbulos compactos completamente isolados. (ep: epiderme; p: parênquima). Ampliação: **A), B)** e **C)** 100X.

### 3.1.3. Culturas de calos de *H. foliosum* estabelecidas em TIS

#### 3.1.3.1. Caracterização morfológica e histológica de estruturas celulares compactas

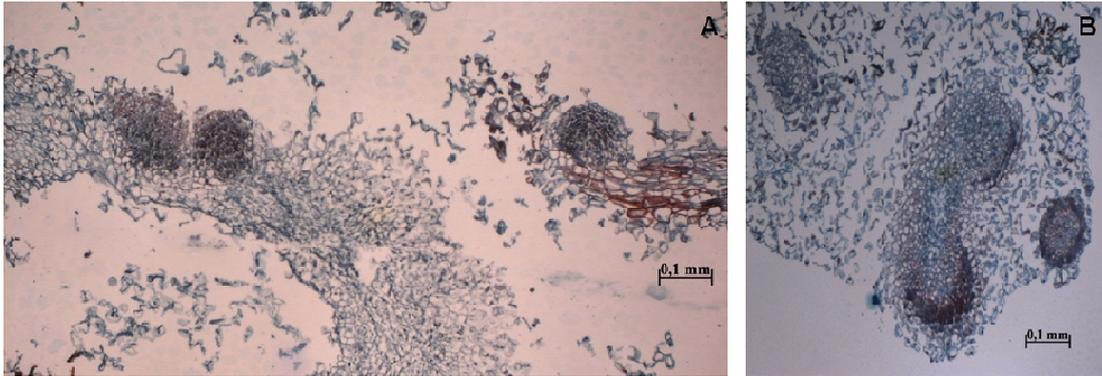
Desenvolveram-se estruturas celulares compactas nas culturas de calos de *Hypericum foliosum* nos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>2</sub>, estabelecidas nos TIS (Figura 3.18). O meio A<sub>1</sub>, à semelhança do que se observou nas culturas em suspensão (Figura 3.15), induziu a formação de estruturas brancas cordiformes (Figura 3.18 A) e do tipo “framboesa” (Figura 3.18 B), em culturas com apenas 19 dias. Estruturas globulares compactas bege e brancas foram observadas nas culturas celulares dos meios B (Figura 3.18 C) e C<sub>2</sub> (Figura 3.18 D) com 52 dias, respectivamente.



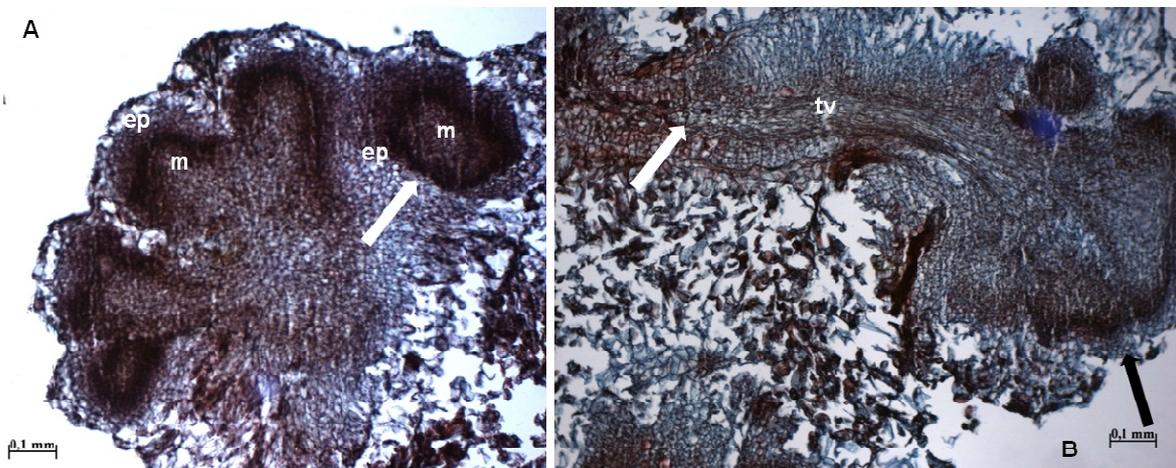
**Figura 3.18** Estruturas celulares compactas **A)** cordiformes e **B)** do tipo “framboesa” obtidas em culturas no meio A<sub>1</sub> com 19 dias, estabelecidas nos TIS. Estruturas globulares compactas obtidas em culturas com 52 dias nos meios **C)** B e **D)** C<sub>2</sub>, estabelecidas nos TIS. Ampliação: **A)** e **C)** 50X, **B)** 32X, e **D)** 10X.

Nas secções histológicas do tecido caloso obtido nos meios A<sub>1</sub> (Figura 3.19 A) e B (Figura 3.19 B), observam-se nichos de células pequenas que formam glóbulos - zonas de divisão mitótica activa. As estruturas globulares permaneceram coesas, enquanto todo o tecido caloso circundante se desintegrou durante o processamento histológico. O meio C<sub>2</sub> induziu calos embriogénicos, uma vez que, nas secções histológicas dessas culturas, se observou a formação de massas proembriogénicas constituídas por células meristemáticas em divisão, subjacentes à epiderme. As massas proembriogénicas eram estruturas globulares formadas por grupos de células pequenas, muito coradas e em rápida divisão (Figura 3.20 A) que, gradualmente, progrediram para o exterior

e estabeleceram polaridade, originando embriões somáticos. Na Figura 3.20 B apresenta-se a secção histológica de um embrião somático com diferenciação apical-basal na fase de germinação, onde é possível identificar a radícula e a porção apical do embrião, bem como uma zona de tecido vascular no futuro eixo hipocótilo-raíz.



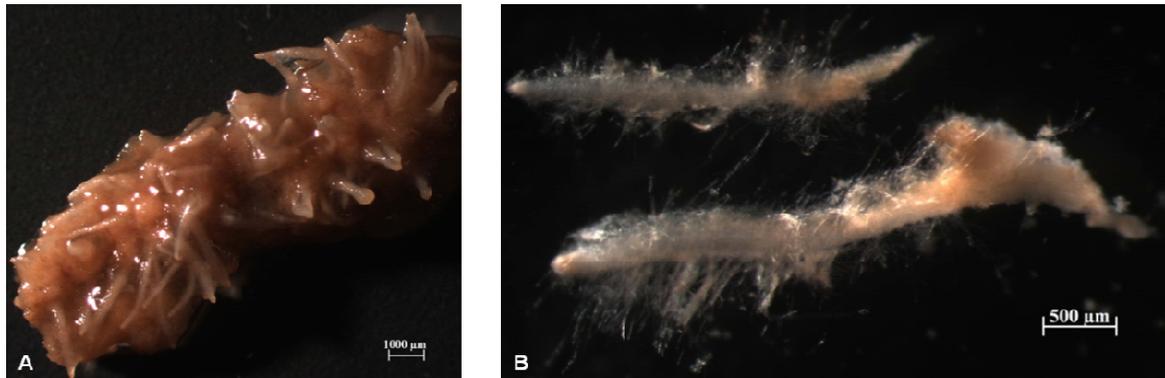
**Figura 3.19** Secções histológicas de culturas de calos estabelecidas nos TIS. Estruturas globulares compactas obtidas em culturas nos meios **A)** A<sub>1</sub> (cultura com 34 dias) e **B)** B (cultura com 50 dias). Ampliação: **A)** e **B)** 100X.



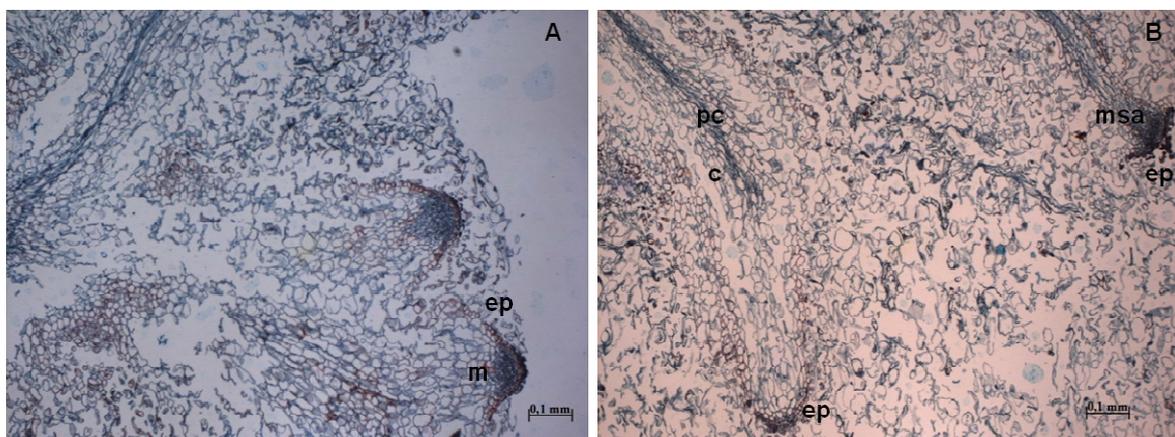
**Figura 3.20** Secções histológicas de culturas de calos no meio C<sub>2</sub> com 50 dias, estabelecidas nos TIS. **A)** Massas proembriogénicas (seta); **B)** embrião somático na fase de germinação, com o eixo bipolar estabelecido (seta branca: radícula; seta preta: porção apical do embrião). (ep: epiderme; m: meristema; tv: tecido vascular). Ampliação **A)** e **B)** 100X.

### 3.1.3.2. Caracterização morfológica e histológica de raízes adventícias

O meio A<sub>1</sub> foi o único que induziu a organogênese de raízes adventícias em culturas de calos de *Hypericum foliosum* estabelecidas nos TIS (Figura 3.21 A), tendo-se observado a regeneração de raízes brancas e alongadas que afunilam na extremidade correspondente ao ápice radicular. Um pouco acima do ápice radicular inserem-se pêlos radiculares brancos e finos (Figura 3.21 B). A organogênese indirecta de raízes adventícias foi confirmada por secções histológicas, apresentando-se na Figura 3.22 A a fase precoce de formação das raízes, em que já é possível identificar a diferenciação de duas protuberâncias constituídas por uma epiderme protectora bem delineada (corada de vermelho pela safranina O), formada por uma única camada de células muito compactadas. Numa posição mais interna observa-se um centro de células meristemáticas em rápido processo de divisão (coradas de verde pelo *fast green*) que dão origem aos diversos tecidos característicos de uma raiz completamente desenvolvida e diferenciada como as apresentadas na secção histológica da Figura 3.22 B. O ápice radicular é formado por um meristema sub-apical composto por células pequenas e sem diferenciação nítida, acima do qual se inicia o processo de diferenciação dos diversos tecidos, nomeadamente do procâmbio ou cilindro central (que compreende o tecido vascular) e da região do córtex que se situa entre a epiderme e o procâmbio e que é constituída pelo meristema fundamental (Mader, 1998). O córtex apresenta-se desintegrado devido ao impacto mecânico do processamento histológico (Figura 3.22 B).

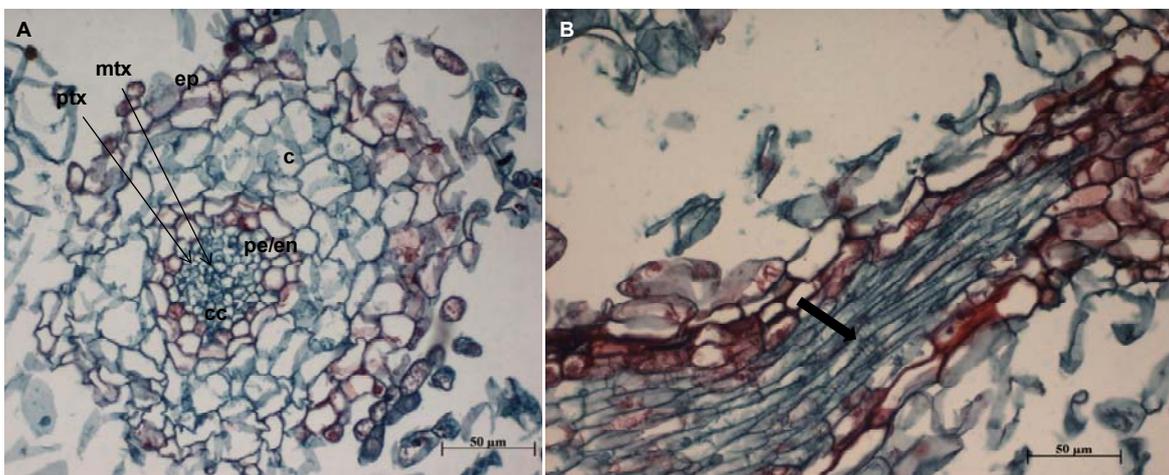


**Figura 3.21** Raízes adventícias induzidas pelo meio A<sub>1</sub>, em culturas de calos com 82 dias, estabelecidas nos TIS. **A)** Raízes visíveis à superfície de um calo; **B)** raízes com pêlos radiculares. Ampliação: **A)** 10X e **B)** 25X.



**Figura 3.22** Secções histológicas de culturas de calos no meio A<sub>1</sub> com 77 dias, estabelecidas nos TIS. **A)** Fase inicial do desenvolvimento dos primórdios radiculares; **B)** raízes. (ep: epiderme; c: córtex; m: meristema; msa: meristema sub-apical; pc: procâmbio). Ampliação: **A)** e **B)** 100X.

A secção histológica transversal da Figura 3.23 A é característica de raízes, observando-se as seguintes estruturas da periferia para o centro: epiderme, zona cortical formada por células parenquimatosas com forma irregular e pouco compactadas, endoderme que separa fisicamente o córtex do cilindro central e periciclo que constitui a primeira camada de células do cilindro central, sendo este último constituído por tecido vascular e células parenquimatosas (Mader, 1998). Tendo em conta que a epiderme sintetiza cutina e suberina para o exterior, cora de vermelho pela safranina O, à semelhança das células da endoderme, cujas paredes contêm algumas zonas lenhificadas e suberificadas (banda de Caspari) (Mader, 1998). A região da endoderme e do periciclo é constituída por células com citoplasma denso e mais pequenas do que as da epiderme e do córtex (Figura 3.23 A). Nas secções histológicas obtidas, é difícil visualizar a organização típica do cilindro central de uma raiz de dicotiledónea que, em oposição às monocotiledóneas, se caracteriza pela inexistência de medula (células parenquimatosas), apresentando, deste modo, o padrão tetraarca (em forma de estrela) formado por quatro feixes de xilema (Mader, 1998). Embora o detalhe da zona do cilindro central seja limitado, é possível identificar que as células que ocupam uma posição mais externa apresentam menor diâmetro do que as mais internas, uma vez que as primeiras que constituem o protoxilema completam a diferenciação primeiro do que as últimas que constituem o metaxilema (Figura 3.23 A). Na Figura 3.23 B observam-se células de xilema alongadas, o que reflecte o grau de diferenciação das culturas de calos do meio A<sub>1</sub>, sendo visíveis os espessamentos reticulados e lenhificados, característicos destas células mortas e sem conteúdo celular (Figura 3.23 B).

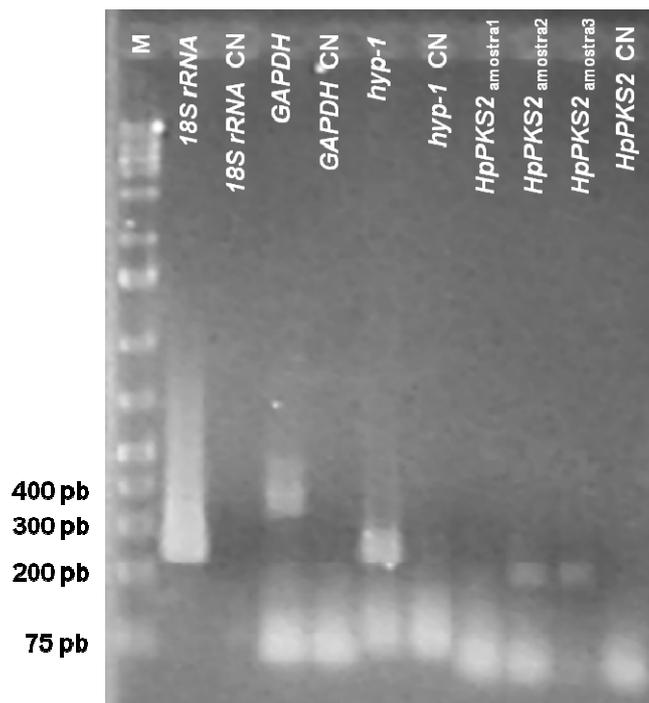


**Figura 3.23** Secções histológicas de raízes desenvolvidas em calos (com 46 dias), induzidos pelo meio A<sub>1</sub>. **A)** secção transversal de uma raiz; **B)** células de xilema diferenciadas (seta). (c: córtex; cc: cilindro central; ep: epiderme; mtx: metaxilema; pe/en: região do periciclo e da endoderme; ptx: protoxilema). Ampliação: **A)** 100X e **C)** 400X.

### 3.2. *hyp-1* e *HpPKS2*: genes associados à biossíntese de hipericinas

#### 3.2.1. Sequências parciais dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* de *H. foliosum*

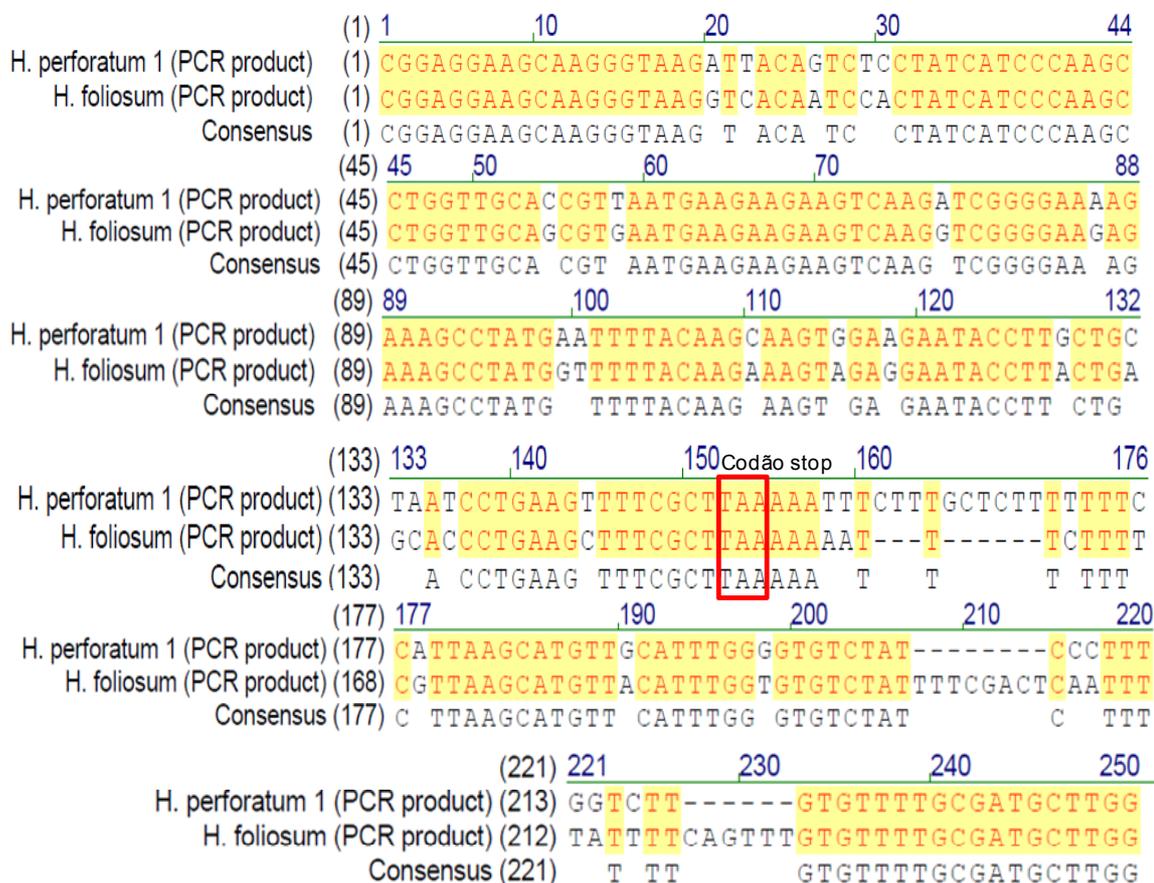
Na amplificação por PCR dos fragmentos de ADN dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* e do controlo interno *18S rRNA* obtiveram-se produtos com as dimensões moleculares aproximadas aos tamanhos esperados (*hyp-1*: 236 pb; *HpPKS2*: 218 pb e *18S rRNA*: 246 pb) (Figura 3.24). No entanto, os produtos de amplificação de parte do gene *GAPDH* têm entre 300 e 400 pb (Figura 3.24), o que não está de acordo com a dimensão esperada de 134 pb.



**Figura 3.24** Produtos da amplificação, por PCR, de fragmentos dos genes *18S rRNA*, *GAPDH*, *hyp-1* e *HpPKS2* pelos respectivos *primers* específicos. *HpPKS2* foi amplificado a partir de três amostras de ADN extraídas de plantas de *H. foliosum in vivo* distintas. (M: marcador *GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder*; CN: controlo negativo).

Na Figura 3.25 apresenta-se o alinhamento entre as sequências do fragmento sequenciado do gene *hyp-1* de *Hypericum foliosum* e de *H. perforatum* (AY148090 - sequência de referência para o desenho dos *primers* específicos). O fragmento de *H. foliosum* tem 241 pb, mais cinco nucleótidos do que os 236 pb esperados. Isto deve-se à ocorrência de duas deleções de três (CTT) e de seis (GCTCTT) nucleótidos, nas posições 568 a 570 e 572 a 577 da sequência de referência respectivamente e à ocorrência de inserções de oito nucleótidos na posição 614 (TTTCGACT) e de seis nucleótidos na posição 633 (CAGTTT). As deleções e as inserções ocorrem a jusante do codão *stop* (TAA), não alterando a respectiva sequência proteica de Hyp-1 de *H. foliosum* (Figura 3.25). A sequência nucleotídica de *H. foliosum* apresenta três mutações silenciosas (duas transições e uma transversão) e 17 mutações *missense* (10 transições e sete transversões) na região codificante amplificada (Figura 3.25) que resultam na alteração de 24%

dos aminoácidos (12 em 50) relativamente aos codificados pela sequência de referência (Tabela 3.3). Ambas as sequências nucleotídicas partilham um valor de similaridade de 78%.



**Figura 3.25** Alinhamento entre as sequências do fragmento sequenciado de *hyp-1* de *H. foliosum* e o correspondente de *H. perforatum* (AY148090).

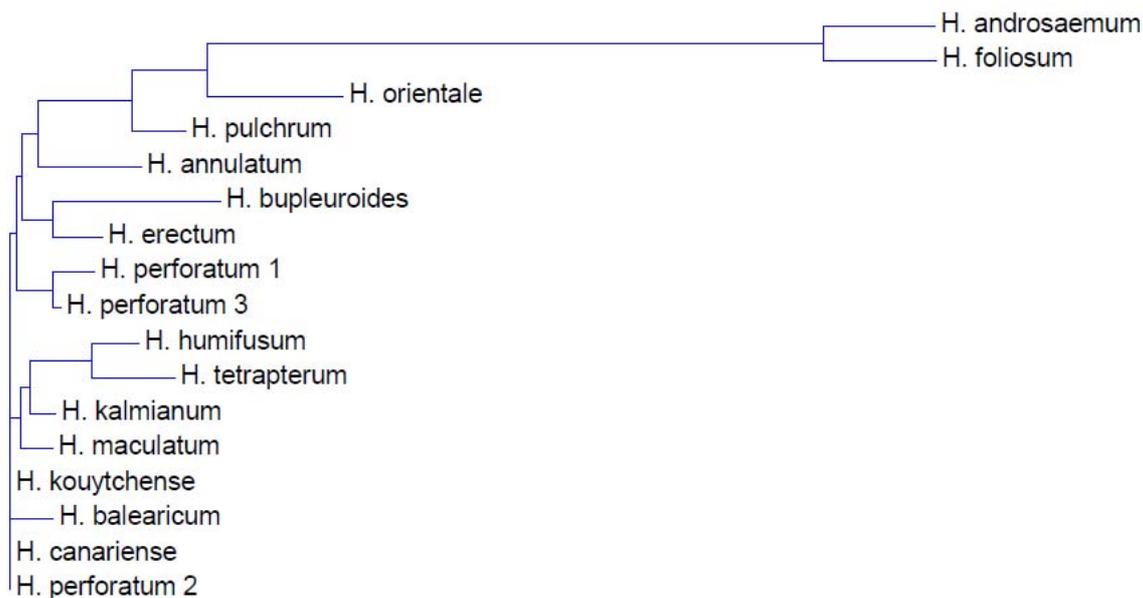
**Tabela 3.3** Correspondência entre os códons variáveis e os respectivos aminoácidos do fragmento de Hyp-1 de *H. perforatum* (AY148090) e de *H. foliosum*. A azul estão identificados os aminoácidos que diferem nas duas sequências.

	Aminoácido														
	116	118	119	127	128	135	138	142	146	147	148	152	153	154	157
<i>H. perforatum</i> (AY148090)	Ile ATT	Val GTC	Ser TCC	Thr ACC	Val GTT	Ile ATC	Lys AAG	Glu GAA	Gln CAA	Val GTG	Glu GAA	Ala GCT	Ala GCT	Asn AAT	Val GTT
<i>H. foliosum</i>	Val GTC	Ile ATC	His CAC	Ser AGC	Val GTG	Val GTC	Glu GAG	Gly GGT	Lys AAA	Val GTA	Glu GAG	Thr ACT	Glu GAG	His CAC	Ala GCT

Dos 241 pb sequenciados do gene *hyp-1* de *Hypericum foliosum*, apenas uma região de 138 pb foi utilizada para alinhar com as 16 sequências nucleotídicas de 14 espécies de *Hypericum* depositadas no GenBank<sup>®</sup>, pelo facto de serem sequências incompletas e apenas este fragmento ser comum a todas elas (Figura 3.26). Esta região corresponde aos nucleótidos 407 a 544 da sequência de referência *H. perforatum* (AY148090). A similaridade partilhada por esta região do gene *hyp-1* de *H. foliosum* com as restantes sequências varia entre os 74% para a do *H. perforatum* (JF774163) e os 93% para a do *H. androsaemum* (Tabela 3.4). Esta similaridade reflecte-se no dendograma da relação filogenética apresentado na Figura 3.27, onde se evidencia *H. androsaemum* como a espécie filogeneticamente mais próxima de *H. foliosum*. As sequências de *H. foliosum* e de *H. androsaemum* apresentam apenas quatro substituições (três transições e uma transversão) nas posições nucleotídicas 7, 22, 64 e 150 do alinhamento da Figura 3.26. Adicionalmente, na posição 115, a sequência de *H. foliosum* apresenta o nucleótido guanina, enquanto a de *H. androsaemum* apresenta um R que corresponde a uma purina (guanina ou adenina), não se podendo afirmar que se trata de uma mutação pontual. As sequências nucleotídicas das taxa *H. canariense*, *H. kouytchense* e *H. perforatum* (GU324243) são iguais, apresentando 83% de similaridade com a de *H. foliosum* (Figura 3.27 e Tabela 3.4). A sequência do fragmento de amplificação do gene *hyp-1* de *H. foliosum* apresenta 84% de similaridade com a de *H. perforatum* (AY148090) (Tabela 3.4), um valor superior em 6% ao anteriormente obtido para o alinhamento da Figura 3.25.

	(1)	10	20	30	40	52			
H. androsaemum	(1)	CGTAGGTGGAGGAAGCAAGGG	CAAGGTCACAAATCCACTAT	CATCCCAAGCCT					
H. annulatum	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCCT					
H. balearicum	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCACCCCAAGCCT					
H. bupleuroides	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	GACCTATCATCCCAAGGCT					
H. canariense	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCCT					
H. erectum	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCT					
H. humifusum	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATTATCCCAAGCCT					
H. kalmianum	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATTATCCCAAGCCT					
H. kouytchense	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCCT					
H. maculatum	(1)	CGTAGGTGGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCCT					
H. orientale	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CCACTATCATCCCAAACCT					
H. perforatum 1	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CTCCTATCATCCCAAGCCT					
H. perforatum 2	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCCT					
H. perforatum 3	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCCT					
H. pulchrum	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CCACTATCATCCCAAGCCT					
H. tetrapterum	(1)	CGTAGGTGGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	GACCTATCATCCCAAGCCT					
H. foliosum	(1)	-----CGGAGGAAGCAAGGG	TAAGGTCACAAATCCACTAT	CATCCCAAGCCT					
Consensus	(1)	CGTAGGC GGAGGAAGCAAGGG	TAAGATTACAGT	CACCTATCATCCCAAGCCT					
	(53)	53	60	70	80	90	104		
H. androsaemum	(53)	GGTTGCAGCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAGG	TCTGGGGAAAGAGAAAGCCTATG						
H. annulatum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. balearicum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. bupleuroides	(53)	GGTTGCACAGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. canariense	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. erectum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. humifusum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. kalmianum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. kouytchense	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. maculatum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. orientale	(53)	GGTTGCACCGTTGATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. perforatum 1	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. perforatum 2	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. perforatum 3	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. pulchrum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTACG						
H. tetrapterum	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
H. foliosum	(47)	GGTTGCAGCGTGAATGAAGAAGAAGTCAAG	GTCGGGGAAAGAGAAAGCCTATG						
Consensus	(53)	GGTTGCACCGTTAATGAAGAAGAAGTCAAG	ATCGGGGAAAGAAAGCCTATG						
	(105)	105	110	120	130	140	156	157	160
H. androsaemum	(105)	GT	TTTTACAARAAGTAGAGGAATA	CCTTACTGAGCACCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. annulatum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCGAACCC	TGAAGTTTTTCGC	ATAA			
H. balearicum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. bupleuroides	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTACTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTGA			
H. canariense	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. erectum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. humifusum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. kalmianum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. kouytchense	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. maculatum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. orientale	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTACTGCTCACCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. perforatum 1	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	CCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. perforatum 2	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. perforatum 3	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	CCTTGCTGCTAATCC	-----	-----			
H. pulchrum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTACTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. tetrapterum	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
H. foliosum	(99)	GT	TTTTACAAGAAGTAGAGGAATA	CCTTACTGAGCACCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			
Consensus	(105)	AA	TTTTACAAGCAAGTGGAAAGAATA	TCTTGCTGCTAATCC	TGAAGTTTTTCGC	TTAA			

Figura 3.26 Alinhamento múltiplo entre a sequência do fragmento sequenciado do gene *hyp-1* de *H. foliosum* e as depositadas na base de dados GenBank® para o mesmo gene e género.

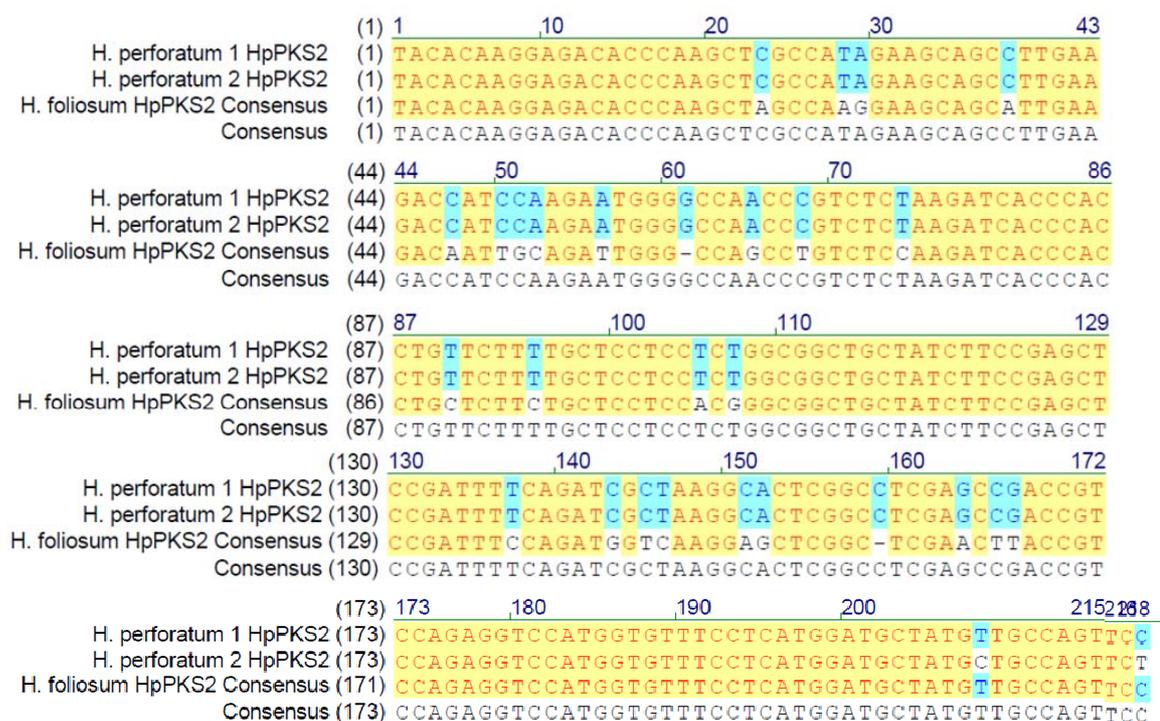


**Figura 3.27** Dendrograma da relação filogenética entre a sequência de 154 pb do gene *hyp-1* de *H. foliosum* e as depositadas na base de dados GenBank® para o mesmo gene e género.

**Tabela 3.4** Similaridade entre a sequência do fragmento de 154 pb do gene *hyp-1* de *H. foliosum* e as do mesmo género depositadas na base de dados GenBank®.

Espécie	Nº de acesso GenBank	<i>H. foliosum</i>
<i>H. androsaemum</i>	HM584911	93%
<i>H. annulatum</i>	GU324247	84%
<i>H. balearicum</i>	GU324248	83%
<i>H. bupleuroides</i>	GU324246	81%
<i>H. canariense</i>	GU324255	83%
<i>H. erectum</i>	GU324253	82%
<i>H. humifusum</i>	GU324245	81%
<i>H. kalmianum</i>	HM584912	83%
<i>H. kouytchense</i>	GU324254	83%
<i>H. maculatum</i>	GU324244	82%
<i>H. orientale</i>	GU324251	84%
<i>H. perforatum</i> (1)	AY148090	84%
<i>H. perforatum</i> (2)	GU324243	83%
<i>H. perforatum</i> (3)	JF774163	74%
<i>H. pulchrum</i>	GU324252	84%
<i>H. tetrapterum</i>	GU324250	81%

Na Figura 3.28 apresenta-se o alinhamento múltiplo entre a sequência do fragmento amplificado do gene *HpPKS2* de *Hypericum foliosum* e as de *H. perforatum* (HQ529467 e EF186676). A elevada similaridade partilhada com as sequências nucleotídicas de *H. perforatum* confirma a amplificação específica do gene de interesse por PCR (88% e 87% de similaridade relativamente a *H. perforatum* EF186676 e HQ52946, respectivamente) (Tabela 3.5). O produto de PCR sequenciado tem 216 pb, isto é, menos dois nucleótidos do que os 218 pb esperados, devido à ocorrência de duas deleções (mutações *frameshift*) a montante do codão *stop*, nas posições nucleotídicas 61 e 159 do alinhamento da Figura 3.28 que correspondem aos nucleótidos 442 e 540 da sequência EF186676. A sequência nucleotídica de *H. foliosum* também apresenta cinco mutações *missense* (uma transição e quatro transversões) e quatro mutações silenciosas (uma transição e três transversões) a montante da primeira deleção (Figura 3.28). As mutações pontuais *missense* e *frameshift* resultam na alteração de 69% dos aminoácidos do fragmento proteico de *H. foliosum* (49 em 71) relativamente ao de *H. perforatum* (EF186676) (Tabela 3.6).



**Figura 3.28** Alinhamento múltiplo entre sequência do fragmento amplificado do gene *HpPKS2* de *H. foliosum* e as depositadas na base de dados GenBank® para o mesmo gene e género.

**Tabela 3.5** Similaridade entre a sequência do fragmento amplificado do gene *HpPKS2* de *H. foliosum* e as do mesmo género depositadas na base de dados GenBank®.

Espécie	Nº de acesso GenBank	<i>H. foliosum</i>
<i>H. perforatum</i> (1)	EF186676	88%
<i>H. perforatum</i> (2)	HQ529467	87%

**Tabela 3.6** Correspondência entre os códons variáveis e os respectivos aminoácidos do fragmento de *HpPKS2* de *H. perforatum* (EF186676) e de *H. foliosum*. A azul estão identificados os aminoácidos que diferem nas duas sequências e a vermelho os nucleótidos que sofreram deleção em *H. foliosum*.

Aminoácido		108	110	113	116	117	118	119	121	122	123	124	125	126	127	128
<i>H. perforatum</i> (EF186676)	Leu	Ile	Ala	Thr	Ile	Gln	Glu	Gly	Gln	Pro	Val	Ser	Lys	Ile	Thr	
	CTC	ATA	GCC	ACC	ATC	CAA	GAA	GGC	CAA	CCC	GTC	TCT	AAG	ATC	ACC	
<i>H. foliosum</i>	Leu	Lys	Ala	Thr	Ile	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Pro	
	CTA	AAG	GCA	ACA	ATT	GCA	GAT	GCC	AGC	CTG	TCT	CCA	AGA	TCA	CCC	

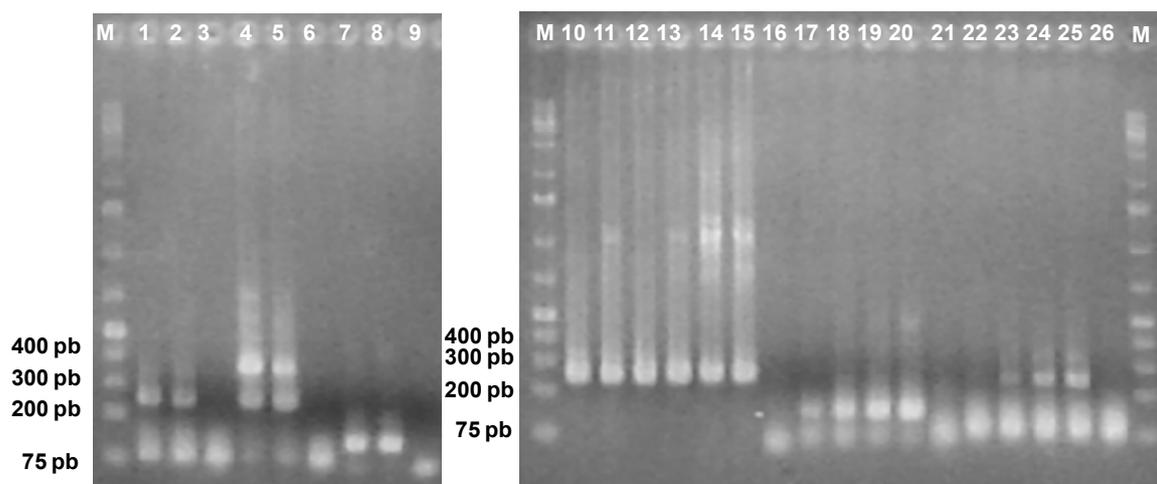
Aminoácido		129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143
<i>H. perforatum</i> (EF186676)	His	Leu	Phe	Phe	Cys	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Tyr	Leu	Pro	Ser	
	CAC	CTG	TTC	TTT	TGC	TCC	TCC	TCT	GGC	GGC	TGC	TAT	CTT	CCG	AGC	
<i>H. foliosum</i>	Thr	Cys	Ser	Phe	Ala	Pro	Pro	Arg	Ala	Ala	Ala	Tyr	Phe	Arg	Ala	
	ACC	TGC	TCT	TCT	GCT	CCT	CCA	CGG	GCG	GCT	GCT	ATC	TTC	CGA	GCT	

Aminoácido		144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
<i>H. perforatum</i> (EF186676)	Ser	Asp	Phe	Gln	Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Thr	Val	
	TCC	GAT	TTT	CAG	ATC	GCT	AAG	GCA	CTC	GGC	CTC	GAG	CCG	ACC	GTC	
<i>H. foliosum</i>	Pro	Ile	Ser	Arg	Ile	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Arg	Thr	Tyr	Arg	Pro	
	CCG	ATT	TCC	AGA	TGG	TCA	AGG	AGC	TCG	GCT	CGA	ACT	TAC	CGT	CCA	

Aminoácido		159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172
<i>H. perforatum</i> (EF186676)	Gln	Arg	Ser	Met	Val	Phe	Pro	His	Gly	Cys	Tyr	Val	Ala	Ser	
	CAG	AGG	TCC	ATG	GTG	TTT	CCT	CAT	GGA	TGC	TAT	GTT	GCC	AGT	
<i>H. foliosum</i>	Glu	Val	His	Gly	Val	Ser	Ser	Trp	Met	Leu	Tyr	Cys	Gln	Phe	
	GAG	GTC	CAT	GGT	GTT	TCC	TCA	TGG	ATG	CTA	TGT	TGC	CAG	TTC	

### 3.2.2. Expressão dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* de *H. foliosum*

Os fragmentos dos genes *hyp-1* e *18S rRNA* amplificados por RT-PCR, a partir do ARN total, têm dimensões moleculares aproximadas às previamente esperadas (*hyp-1*: 236 pb e *18S rRNA*: 246 pb) (Figura 3.29). Contrariamente ao que se observou na amplificação por PCR a partir de ADN, os fragmentos do gene *GAPDH* amplificados por RT-PCR a partir de ARN apresentam a dimensão molecular esperada de 134 pb (Figura 3.29).

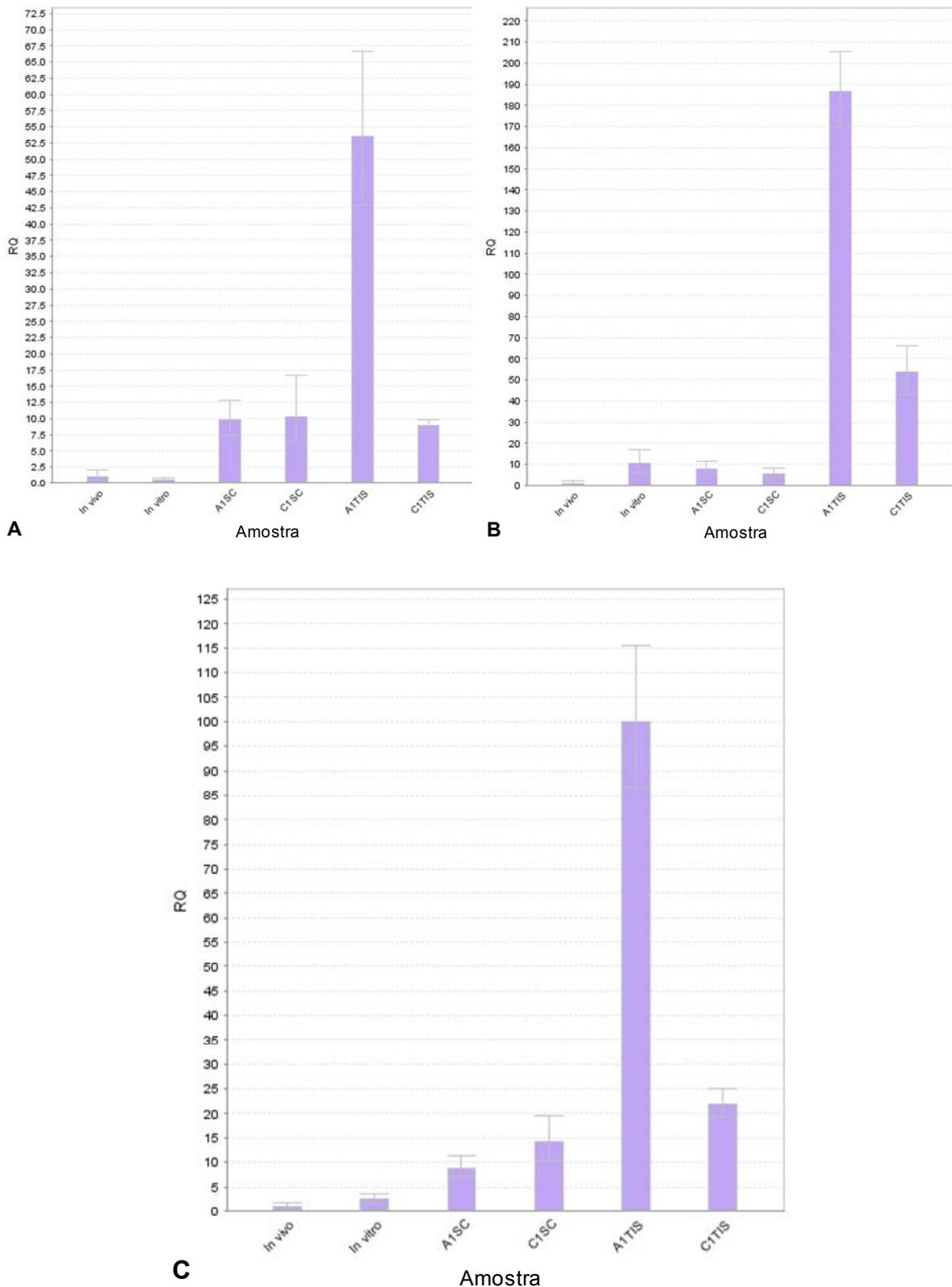


**Figura 3.29** Produtos da amplificação, por RT-PCR, de fragmentos dos genes *hyp-1*, *GAPDH* e *18S rRNA* após a utilização de hexâmeros aleatórios na RT. Em 4, 5 e 6, foram utilizados *primers* Hyp-1 (específicos). Utilização, na RT, de seis amostras de ARN (de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, de culturas em suspensão (SC) nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> e de culturas nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> estabelecidas nos TIS). **M**: marcador *GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder*; **1**: C<sub>1</sub> SC/*hyp-1*; **2**: A<sub>1</sub> TIS/*hyp-1*; **3**: controlo negativo/*hyp-1*; **4**: C<sub>1</sub> SC/*hyp-1*; **5**: A<sub>1</sub> TIS/*hyp-1*; **6**: controlo negativo/*hyp-1*; **7**: C<sub>1</sub> SC/*GAPDH*; **8**: A<sub>1</sub> TIS/*GAPDH*; **9**: controlo negativo/*GAPDH*; **10**: C<sub>1</sub> SC/*18S rRNA*; **11**: A<sub>1</sub> TIS/*18S rRNA*; **12**: *in vitro*/*18S rRNA*; **13**: A<sub>1</sub> SC/*18S rRNA*; **14**: *in vivo*/*18S rRNA*; **15**: C<sub>1</sub> TIS/*18S rRNA*; **16**: controlo negativo/*18S rRNA*; **17**: *in vitro*/*GAPDH*; **18**: A<sub>1</sub> SC/*GAPDH*; **19**: *in vivo*/*GAPDH*; **20**: C<sub>1</sub> TIS/*GAPDH*; **21**: controlo negativo/*GAPDH*; **22**: *in vitro*/*hyp-1*; **23**: A<sub>1</sub> SC/*hyp-1*; **24**: *in vivo*/*hyp-1*; **25**: C<sub>1</sub> TIS/*hyp-1*; **26**: controlo negativo/*hyp-1*.

Os níveis de expressão dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* foram analisados por qRT-PCR, mais especificamente pelo método comparativo  $\Delta\Delta C_T$  ( $\Delta C_T = C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ controlo interno}}$ ;  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ amostra teste}} - \Delta C_{T \text{ calibrador}}$ ) em amostras de ARN extraídas das folhas de plantas de *Hypericum foliosum* *in vivo* e micropropagadas *in vitro*, de culturas em suspensão nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> e de culturas celulares nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS. Os valores da quantificação relativa ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) calculados consistem na alteração da expressão do gene relativamente à expressão do mesmo na amostra *in vivo*, considerada como referência, cuja RQ é igual a 1.

Para o gene *HpPKS2*, foram obtidos valores médios de  $C_T$  elevados (entre 33,69 e 35,53) (Tabela 3.7) e o sinal de fluorescência (do SYBR® Green) foi muito fraco, pelo que não foi possível determinar a RQ da expressão do gene nas diferentes condições de cultura estudadas.

A RQ da expressão do gene *hyp-1* para cada amostra estudada variou consoante tenham sido utilizados como controlos internos os genes *18S rRNA* e *GAPDH* individualmente ou em conjunto (Figura 3.30 e Tabela 3.7). Quando foi utilizado o gene *18S rRNA*, o nível de expressão de *hyp-1* mais elevado foi obtido para as amostras provenientes das culturas no meio A<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS (RQ = 53,46), enquanto quantidades mínimas dos transcritos do gene foram detectadas em folhas de plantas *in vitro* (RQ = 0,59) (Figura 3.30 A e Tabela 3.7). Quando o gene *GAPDH* foi utilizado para normalizar a expressão de *hyp-1*, as amostras que apresentaram maior e menor nível de expressão foram as provenientes das culturas no meio A<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS (RQ = 186,70), e das folhas de plantas *in vivo* (RQ = 1,00), respectivamente (Figura 3.30 B e Tabela 3.7). Quando se utilizaram os dois genes de referência (controlos internos múltiplos), detectou-se uma quantidade de transcritos de *hyp-1* superior nas culturas provenientes dos TIS (culturas A<sub>1</sub> (RQ = 99,91) e C<sub>1</sub> (RQ = 21,95)), quando comparada com a das folhas de plantas *in vivo* (RQ = 1,00) e *in vitro* (RQ = 2,48). As culturas em suspensão caracterizaram-se por níveis de expressão intermédios (A<sub>1</sub> (RQ = 8,83) e C<sub>1</sub> (RQ = 14,17)) (Figura 3.30 C e Tabela 3.7). O padrão da expressão relativa do gene *hyp-1* nas várias amostras estudadas foi semelhante para as três situações em que se utilizaram diferentes controlos internos, em que se observaram: níveis de expressão inferiores em folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, níveis de expressão intermédios em culturas em suspensão e níveis de expressão superiores em culturas estabelecidas nos TIS, sendo que as culturas celulares no meio A<sub>1</sub> estabelecidas nos TIS apresentaram sempre o nível de expressão máximo do gene.



**Figura 3.30** Quantificação relativa da expressão do gene *hyp-1* nas amostras de ARN total extraído de plantas *in vivo* e *in vitro*, de culturas em suspensão nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub> e de culturas nos meios A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS. Dados normalizados com a utilização dos controlos internos **A)** *18S rRNA* e **B)** *GAPDH* individualmente e **C)** em conjunto. As barras correspondem à variação entre o valor de RQ mínimo e RQ máximo, para um nível de confiança de 95%. (A1: cultura no meio A<sub>1</sub>; C1: cultura no meio C<sub>1</sub>; RQ: quantificação relativa; SC: cultura em suspensão; TIS: cultura estabelecida em sistema de imersão temporária).

**Tabela 3.7** Parâmetros obtidos da análise de expressão do gene *hyp-1*, por qRT-PCR. (A1: cultura no meio A<sub>1</sub>; C1: cultura no meio C<sub>1</sub>; máx.: máximo; mín.: mínimo; SC: cultura em suspensão; SE: erro padrão; TIS: cultura estabelecida em sistema de imersão temporária).

Amostra	Gene	Controlo interno	C <sub>T</sub> médio	ΔC <sub>T</sub> médio	ΔC <sub>T</sub> SE	ΔΔC <sub>T</sub>	RQ	RQ mín.	RQ máx.
<i>in vivo</i>	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>	18S rRNA	35,18	22,71	0,34	0,00	1,00	0,48	2,10
<i>in vitro</i>	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		32,35 35,42	23,47 26,54	0,21	0,76	0,59	0,40	0,88
A1SC	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		30,80 33,69	19,42 22,31	0,12 0,70	-3,29	9,78	7,48	12,80
C1SC	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		28,71 34,51	19,35 25,15	0,16 0,27	-3,36	10,28	6,35	16,65
A1TIS	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		24,32 35,53	16,97 28,17	0,12 0,34	-5,74	53,46	42,87	66,67
C1TIS	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		24,93 34,60	19,54 29,21	0,04 0,40	-3,17	9,00	8,22	9,86
<i>in vivo</i>	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		35,18	12,61	0,37	0,00	1,00	0,44	2,27
<i>in vitro</i>	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		32,35 35,42	9,23 12,30	0,25	-3,38	10,41	6,44	16,82
A1SC	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		30,80 33,69	9,62 12,51	0,17 0,71	-3,00	7,97	5,45	11,65
C1SC	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		28,71 34,51	10,16 15,96	0,20 0,29	-2,45	5,47	3,56	8,40
A1TIS	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		24,32 35,53	5,07 16,28	0,05 0,33	-7,55	186,70	169,58	205,53
C1TIS	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		24,93 34,60	6,87 16,54	0,10 0,41	-5,74	53,53	43,18	66,36
<i>in vivo</i>	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>	18S rRNA + GAPDH	35,18	17,66	0,35	0,00	1,00	0,55	1,82
<i>in vitro</i>	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		32,35 35,42	16,35 19,42	0,23	-1,31	2,48	1,70	3,61
A1SC	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		30,80 33,69	14,52 17,41	0,15 0,71	-3,14	8,83	6,86	11,37
C1SC	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		28,71 34,51	13,84 19,64	0,18 0,28	-3,82	14,17	10,30	19,49
A1TIS	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		24,32 35,53	11,02 22,23	0,09 0,33	-6,64	99,91	86,42	115,50
C1TIS	<i>hyp-1</i> <i>HpPKS2</i>		24,93 34,60	13,20 22,87	0,07 0,40	-4,46	21,95	19,34	24,92

## 4. Discussão

### 4.1. Cultura de tecidos de *Hypericum foliosum* Aiton

Os reguladores de crescimento vegetal, nomeadamente as auxinas e as citocininas, controlam vários aspectos do desenvolvimento das plantas. As auxinas estão envolvidas numa grande variedade de processos, nomeadamente nos tropismos, na regulação da dominância apical, na diferenciação dos cotilédones e das folhas, bem como no estabelecimento dos padrões de filotaxia. Intervêm ainda na formação das raízes laterais e adventícias e na diferenciação do tecido vascular. Em virtude do efeito das citocininas na divisão celular, estas são muitas vezes utilizadas em conjunto com as auxinas para promover a formação de calos, promovendo também a expansão cotiledonar e foliar, além da formação dos meristemas axilares (Canhoto, 2010; Koperdákóvá *et al.*, 2009; Mader, 1998).

da Câmara Machado *et al.* (1995) descreveram a formação de calos de *Prunus subhirtella* friáveis beges, verdes e castanhos induzidos no meio A<sub>1</sub> e Ayan *et al.* (2005) e Bais *et al.* (2002) descreveram, respectivamente, calos de *Hypericum perforatum* friáveis verdes formados nos meios C<sub>1</sub> e B. Contrariamente, os meios de cultura A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub> induziram a formação de calos de *H. foliosum* com características morfológicas idênticas entre si: calos compactos com agregados celulares esféricos, cuja cor escureceu (do branco/bege para o castanho) durante o período de cultura, mesmo após a realização periódica de subculturas para meio fresco. Estas diferenças devem-se, provavelmente, ao facto de nos estudos anteriores terem sido utilizadas outras espécies. Pretto e Santarém (2000), utilizando um meio contendo KIN a 0,99 mg l<sup>-1</sup> e 2,4-D a 1,00 mg l<sup>-1</sup>, descreveram a formação de calos pouco friáveis e castanhos de *H. perforatum*. As concentrações desses reguladores de crescimento são aproximadas às utilizadas, neste estudo, nos meios C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, nos quais também se observou a formação de calos compactos que se tornaram castanhos durante o período de observação. Para a indução de calos compactos de *H. perforatum* com algum grau de diferenciação, também tem sido proposta a utilização da citocinina BAP (a 0,50 mg l<sup>-1</sup>) em conjunto com as auxinas 2,4-D e/ou NAA (a 1,00 mg l<sup>-1</sup> e a 5,00 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente) (Karppinen *et al.*, 2006a; Karppinen *et al.*, 2006b).

Relativamente ao número de características morfológicas dos calos, foi determinado um número médio significativamente mais elevado, em cerca de uma unidade, para o meio A<sub>1</sub> relativamente aos meios B e C<sub>1</sub>, uma vez que o primeiro induziu uma característica morfológica adicional: a regeneração de raízes adventícias. Com o meio A<sub>1</sub> da Câmara Machado *et al.* (1995) induziram calos embriogénicos em pecíolos foliares de *Prunus subhirtella*, enquanto no presente estudo foi induzida a organogénese de raízes em calos de *Hypericum foliosum*. Ambos os processos são, em grande parte, mediados por auxinas (Canhoto, 2010) que induziram respostas diferentes na presença de explantes e de espécies distintas. Os três meios de cultura apresentaram padrões de progressão do número médio de características morfológicas distintos: no meio A<sub>1</sub>, o número máximo foi atingido aos 115 dias de cultura, em B aos 70 dias e, em C<sub>1</sub> aos 55 dias, concluindo-se que, em cultura em meio sólido os calos nos meios A<sub>1</sub> e B se mantêm num estado fisiologicamente activo mais prolongado do que em C<sub>1</sub> - período em que ocorrem

alterações morfológicas nos calos. Nas culturas de calos nos meios A<sub>1</sub>, B e C<sub>1</sub>, mantidas no escuro, também foram observadas diferenças significativas na frequência média calogênica. Ayan *et al.* (2005) determinaram o valor de 35% para a frequência média calogênica em explantes foliares de *H. perforatum* no meio C<sub>1</sub>, no escuro, um valor muito inferior aos 90% calculados neste estudo para *H. foliosum*.

De acordo com vários autores, *Hypericum perforatum* tem uma elevada capacidade de regeneração (Franklin e Dias, 2006; Pasqua *et al.*, 2003; Zobayed *et al.*, 2004) e o mesmo se observou para *H. foliosum*, tendo sido conseguida a organogênese *de novo* de raízes adventícias, quer nos calos em meio sólido, quer nas culturas de calos estabelecidas nos TIS. Enquanto os reguladores de crescimento 2,4-D e KIN são consideradas eficazes na indução de calos (Ayan *et al.*, 2005; Bais *et al.*, 2002; Karppinen *et al.*, 2006a; Karppinen *et al.*, 2006b; Travis *et al.*, 2002), as auxinas IBA, IAA e NAA têm sido muito utilizadas para melhorar o enraizamento de diferentes espécies de *Hypericum* (Pretto e Santarém, 2000). A auxina IBA foi escolhida para a regeneração de raízes, uma vez que há evidências de que IAA é instável em meio de cultura à temperatura ambiente (Tocci *et al.*, 2011). As raízes adventícias regeneradas a partir dos calos, no meio de cultura A<sub>1</sub>, apresentaram cor branca e forma alongada, dispendo de pêlos radiculares brancos e finos, tendo sido também identificados os principais tecidos da raiz. A presença de células de xilema alongadas reflecte o grau de diferenciação das raízes. Karppinen *et al.* (2006b) também observaram células de xilema em culturas de calos compactos de *H. perforatum* induzidos com o meio MS suplementado com BAP a 0,50 mg l<sup>-1</sup>, NAA a 5,00 mg l<sup>-1</sup> e 2,4-D a 1,00 mg l<sup>-1</sup>.

De acordo com o descrito por Moura (1998), não foram observados primórdios radiculares de *Hypericum foliosum* no meio A<sub>2</sub> suplementado apenas com a auxina NAA. No entanto, o papel dessa auxina na indução de raízes ainda não está completamente esclarecido, uma vez que, embora haja evidências de que a organogênese de raízes adventícias de *H. perforatum* é fracamente ou não é de todo induzida em meios de cultura suplementados apenas com NAA (Cui *et al.*, 2010; Goel *et al.*, 2009; Zobayed *et al.*, 2003), Karppinen *et al.* (2006a) e Wójcik e Podstolski (2007) descreveram que os meios contendo essa auxina são capazes de induzir a regeneração de raízes. Também tem sido descrito que o IBA a 1,00 mg l<sup>-1</sup> é eficaz na indução de raízes de *H. perforatum* (Cui *et al.*, 2010; Tocci *et al.*, 2011; Zobayed e Saxena, 2003) e que a sua combinação com a KIN aumenta a biomassa radicular (Cui *et al.*, 2010). Contudo, em *H. foliosum*, o meio A<sub>3</sub> suplementado com BAP a 0,04 mg l<sup>-1</sup> e IBA a 1,00 mg l<sup>-1</sup> não induziu a formação de raízes adventícias, devendo ser considerada a substituição do BAP pela KIN. Embora a auxina IAA não tenha sido utilizada neste estudo, tem sido proposto que esta induz a organogênese de um elevado número de raízes adventícias de *H. perforatum* e de biomassa radicular (Wójcik e Podstolski 2007; Zobayed e Saxena, 2003), tendo sido descrito que na concentração de 4,00 mg l<sup>-1</sup> também promove uma maior rapidez no crescimento das mesmas (Goel *et al.*, 2009).

Em culturas em suspensão de *Hypericum perforatum*, Vardapetyan *et al.* (2000) observaram a formação de estruturas globulares compactas e completamente diferenciadas, em forma de framboesa. Neste estudo, estruturas idênticas de *H. foliosum* foram identificadas em culturas em suspensão no meio A<sub>1</sub>, bem como nas estabelecidas nos TIS, em culturas em suspensão no meio

C<sub>1</sub> e em culturas estabelecidas nos TIS nos meios B e C<sub>2</sub>. Apesar da morfologia das estruturas globulares obtidas sugira a ocorrência de um eventual processo de embriogénese somática, não foram encontrados embriões somáticos nas secções histológicas desses tecidos, à excepção dos provenientes das culturas no meio C<sub>2</sub>. No género *Hypericum*, embora a embriogénese somática raramente tenha sido conseguida com sucesso, foram descritas massas proembriogénicas de *H. perforatum* com o, subsequente, desenvolvimento em embriões somáticos em dois meios suplementados com diferentes reguladores de crescimento: BAP a 0,49 mg l<sup>-1</sup> e IAA a 1,00 mg l<sup>-1</sup> (Franklin e Dias, 2006) e KIN a 0,25 mg l<sup>-1</sup>, 2,4-D a 1,28 mg l<sup>-1</sup> e NAA a 0,23 mg l<sup>-1</sup> (Pasqua *et al.*, 2008). No presente estudo, nos TIS, a combinação da citocinina KIN a 0,50 mg l<sup>-1</sup> com a auxina 2,4-D a 0,70 mg l<sup>-1</sup> (meio C<sub>2</sub>) foi eficaz na indução da embriogénese somática numa fase e indirecta de *H. foliosum*, isto é, os embriões foram induzidos e desenvolveram-se no mesmo meio de cultura, mediante a ocorrência de uma fase de calo, não se tendo desenvolvido directamente a partir das células diferenciadas do explante foliar (Canhoto, 2010). Formaram-se calos embriogénicos, em que foi possível identificar massas proembriogénicas que, gradualmente, estabeleceram polaridade e originaram embriões somáticos detectados já na fase de germinação. Contudo, o número de embriões observado foi muito baixo, pelo que necessitam ser estudados parâmetros adicionais com o objectivo de otimizar a embriogénese somática. À semelhança do descrito por Malgorzata (2004), os resultados sugerem que, embora a embriogénese somática requiera a aplicação exógena de uma auxina, as citocininas, estimulam o processo de divisão celular e a, subsequente, diferenciação em embriões somáticos.

Em conclusão, são de realçar os meios de cultura A<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> que induzem, respectivamente, a organogénese *de novo* de raízes adventícias e a embriogénese somática indirecta em culturas de calos estabelecidas nos TIS, com apenas 50 dias. O TIS permite também a rápida formação de estruturas globulares compactas em ambos os meios (20 a 50 dias após a iniciação das culturas), em comparação com as respectivas culturas em suspensão (cerca de 4 meses). Deste modo, o presente estudo descreve, pela primeira vez, o TIS como um sistema biotecnológico eficiente na produção otimizada e automatizada de *Hypericum foliosum*, através da regeneração de raízes adventícias, de estruturas globulares compactas e de embriões somáticos. Embora não esteja documentada a cultura de embriões somáticos e de estruturas globulares de *Hypericum* nos TIS, têm sido desenvolvidos alguns protocolos de regeneração *in vitro* nesses sistemas (Wilken *et al.*, 2005; Zobayed *et al.*, 2004), nomeadamente através da utilização de raízes de *H. perforatum* como explantes (Zobayed e Saxena, 2003). De acordo com Tocci *et al.* (2011) e Zobayed e Saxena (2003), a elevada capacidade regenerativa e a facilidade de manutenção e manipulação *in vitro* fazem das raízes adventícias de *Hypericum* um potencial sistema de rápida produção de biomassa.

Com o objectivo de contribuir para valorização da flora endémica açoreana, pretende-se desenvolver um sistema biotecnológico sustentável para a produção de *Hypericum foliosum*. Deste modo, será estudada a tecnologia mais apropriada para o aumento de escala da cultura otimizada de raízes adventícias e de embriões somáticos de *H. foliosum*.

#### 4.2. *hyp-1* e *HpPKS2*: genes associados à biossíntese de hipericinas

A análise filogenética com base no alinhamento entre a sequência do fragmento do gene *hyp-1* de *Hypericum foliosum* e as depositadas na base de dados GenBank<sup>®</sup> para o mesmo gene e género indicou que *H. androsaemum* é a espécie filogeneticamente mais próxima de *H. foliosum*. Os resultados estão de acordo com a classificação proposta por Franco (1971), em que *H. foliosum* Aiton se integra na secção *Androsaemum* caracterizada pela ausência de glândulas negras. A variabilidade das sequências do gene *hyp-1* de diferentes espécies de *Hypericum* pode afectar a funcionalidade da proteína. Contudo, Košuth *et al.* (2011) descreveram que as sequências do gene depositadas no GenBank<sup>®</sup> apresentam um valor de similaridade elevado, superior a 86%, não tendo sido observadas mutações *nonsense* ou *frameshift*. De acordo com o descrito, no fragmento sequenciado de *H. foliosum*, além de mutações silenciosas, apenas foram observadas mutações pontuais *missense* que resultaram na codificação de 24% de aminoácidos diferentes relativamente aos do fragmento proteico de *H. perforatum* (AY148090). As inserções e deleções presentes na sequência de *hyp-1* de *H. foliosum* ocorrem a jusante do codão *stop*, pelo que não alteraram a sequência proteica. Contrariamente, no fragmento de *HpPKS2* de *H. foliosum*, foram observadas mutações *frameshift* a montante do codão *stop* que, em conjunto com mutações pontuais *missense*, resultaram na alteração de uma grande extensão do fragmento proteico relativamente à sequência de *H. perforatum* (EF186676) (69% dos aminoácidos sofreram alteração). Deste modo, as mutações descritas, provavelmente, contribuem para o facto de Rainha *et al.* (2011a) não terem detectado hipericina em extractos obtidos a partir das partes aéreas de *H. foliosum*. A funcionalidade da proteína pode estar alterada relativamente à das espécies consideradas produtoras de hipericinas.

A expressão do gene *hyp-1* foi estudada, por qRT-PCR, tendo sido utilizados como controlos internos os genes *18S rRNA* e *GAPDH*. Para confirmar a especificidade dos *primers* utilizados no estudo de expressão, foram amplificados fragmentos a partir de ADN e de ARN. Para os genes *hyp-1* e *18S rRNA*, quer os fragmentos amplificados do ADN, quer do ARN têm as dimensões moleculares aproximadas aos tamanhos esperados. Contrariamente, para o gene *GAPDH*, os produtos obtidos a partir de ADN têm entre 300 e 400 pb, enquanto os obtidos do ARN estão de acordo com o tamanho esperado de 134 pb, o que sugere a amplificação de um intrão na sequência de ADN. Deste modo, torna-se necessário sequenciar e analisar os fragmentos de ADN e de cADN resultantes da amplificação de parte do gene *GAPDH* de *H. foliosum* para perceber se, de facto, existe o intrão sugerido neste estudo.

A utilização de controlos internos múltiplos permite minimizar eventuais erros relacionados com a normalização da expressão do gene alvo (Thellin *et al.*, 1999; Vandesompele *et al.*, 2002). Nas culturas provenientes dos TIS (culturas A<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>), detectou-se uma maior quantidade de transcritos de *hyp-1* relativamente à das folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* e níveis de expressão semelhantes nestas duas últimas amostras. Também Košuth *et al.* (2007) descreveram que os níveis de expressão do gene *hyp-1* nas folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* de *H. perforatum* não apresentam diferenças significativas. No presente estudo, as folhas das plantas *in vivo* de *H. foliosum* caracterizaram-se pelo nível de expressão mais baixo do gene, tendo-se observado o

nível máximo nas culturas de calos no meio A<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS, que induziram a organogénese *de novo* de raízes adventícias. Os resultados obtidos são consistentes com os de Košuth *et al.* (2007), em que plantas de *H. perforatum* a crescer em condições *in vitro* expressam níveis significativamente mais elevados do gene *hyp-1* nas raízes do que nas folhas. Cui *et al.* (2010) descreveram, recentemente, a síntese das hipericinas por culturas de raízes adventícias de *H. perforatum*, em biorreactores. Deste modo, sugerem a síntese desses compostos em sistemas *in vitro* de cultura de raízes, contrariamente ao que foi descrito por Karppinen e Hohtola (2008) para as raízes primárias de plantas *in vivo*.

Embora, inicialmente, a proteína Hyp-1 tenha sido sugerida como uma enzima-chave na biossíntese das hipericinas (Bais *et al.*, 2003), a sua função tem sido muito questionada, uma vez que o gene é expresso em espécies de *Hypericum* não produtoras desses compostos e pelo facto da expressão de *hyp-1* não ser mais elevada nas glândulas negras, onde são detectadas maiores concentrações de hipericinas (Košuth *et al.*, 2007; Košuth *et al.*, 2011).

Karppinen e Hohtola (2008) e Karppinen *et al.* (2008) analisaram a expressão do gene *HpPKS2* e detectaram-no nas margens das folhas, nas pétalas das flores e nos estames de *H. perforatum*, locais ricos em glândulas negras multicelulares, onde se localizam as hipericinas. Recentemente, Zobayed *et al.* (2006) descreveram que a emodina (a forma oxidada da emodina antrona, o putativo precursor das hipericinas) também se acumula em elevadas concentrações nas glândulas negras de *H. perforatum*. Tendo em conta que vários autores descrevem as glândulas negras como locais não só de acumulação mas também de biossíntese das hipericinas (Čellárová *et al.*, 1994; Kornfeld *et al.*, 2007; Onelli *et al.*, 2002; Zobayed *et al.*, 2006), a elevada expressão de *HpPKS2* aliada à presença das hipericinas e da emodina nessas estruturas indicam que a proteína HpPKS2, provavelmente, está envolvida na biossíntese desses compostos, pelo menos numa fase inicial, isto é, até à formação da emodina antrona (Karppinen e Hohtola, 2008; Karppinen *et al.*, 2008). Neste estudo, a análise da expressão do gene *HpPKS2* de *H. foliosum* não foi eficazmente conseguida, sendo necessário melhorar a eficiência das reacções de PCR, nomeadamente através do desenho optimizado de *primers* específicos, com base nas sequências de ADN e de cADN de *H. foliosum*.

Concluindo, com base na sequência do fragmento amplificado do gene *hyp-1*, *H. androsaemum* é a espécie filogeneticamente mais próxima de *H. foliosum*. No geral, as sequências parciais dos fragmentos dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* de *H. foliosum* partilham valores de similaridade elevados com as depositadas na base de dados GenBank<sup>®</sup> para os mesmos genes e género. Contudo, foram encontradas mutações *missense* e *frameshift* na sequência de *HpPKS2* de *H. foliosum* que sugerem diferenças significativas relativamente à proteína de *H. perforatum* (EF186676). O nível máximo de expressão do gene *hyp-1* foi detectado nas culturas de calos que induziram a organogénese indirecta de raízes adventícias no meio A<sub>1</sub>, estabelecidas nos TIS.

É importante proceder à análise detalhada dos níveis das hipericinas em diversos órgãos das plantas de *H. foliosum* com o objectivo de perceber se a espécie é ou não produtora desses compostos. A análise da expressão dos genes *hyp-1* e *HpPKS2* nas mesmas condições,

provavelmente, permitirá clarificar as suas funções. De modo a obter mais informação acerca das sequências de *hyp-1* e de *HpPKS2*, proceder-se-á à sua sequenciação para montante e jusante dos fragmentos obtidos no presente estudo. A comparação das sequências das proteínas Hyp-1 e HpPKS2 de espécies produtoras e não produtoras das hipericinas permitirá analisar a ocorrência ou não de alterações conformacionais e estruturais que poderão estar directamente relacionadas com a sua funcionalidade.

## 5. Bibliografia

- Ayan, A. K., Çirak, C., Kevseroğlu, K. e Sökmen, A. 2005. Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 29:197-204.
- Bais, H. P., Vepachedu, R., Lawrence, C. B., Stermitz, F. R. e Vivanco, J. M. 2003. Molecular and biochemical characterization of an enzyme responsible for the formation of hypericin in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). The Journal of Biological Chemistry 278:32413-32422.
- Bais, H. P., Walker, T. S., McGrew, J. e Vivanco, J. M. 2002. Factors affecting growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) and production of hypericin. In Vitro Cellular and Developmental Biology 38:58-65.
- Briskin, D. P. e Gawienowski, M. C. 2001. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. Plant Physiology and Biochemistry 39:1075-1081.
- Briskin, D. P., Leroy, A. e Gawienowski, M. C. 2000. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. Plant Physiology and Biochemistry 38:413-420.
- Canhoto, J. M. 2010. Suspensões celulares e metabolitos secundários. In Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação, pp 215-217, Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Čellárová, E., Daxnerova, Z., Kimakova, K. e Haluskova, J. 1994. The variability of hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum*. Acta Biotechnologica 14:267-274.
- Chamberlain, C. J. 1932. Plant histology: The Paraffin method. In Methods in Plant Histology, 5<sup>a</sup> ed., pp 112-132, The University of Chicago Press, Chicago.
- Chang, S., Puryear, J. e Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter 11:113-116.
- Ciccarelli, D., Andreucci, A. C. e Pagni, A. M. 2001. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical, and histochemical studies during course of ontogenesis. Annals of Botany 88:637-644.
- Couceiro, M. A., Afreen, F., Zobayed, S. M. A. e Kozai, T. 2006. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. Plant Science 170:128-134.

- Cole, C. D., Liu, J. K., Sheng, X., Chin, S. S., Schmidt, M. H., Weiss, M. H. e Couldwell, W. T. 2008. Hypericin-mediated photodynamic therapy of pituitary tumors: preclinical study in a GH4C1 rat tumor model. *Journal of Neuro-Oncology* 87:255-261.
- Conceição, L. F. R., Ferreres, F., Tavares, R. M. e Dias, A. C. P. 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry* 67:149-155.
- Costa, S. R. A. G. 2010. Técnicas de Estudo micromorfológico e molecular aplicadas ao género *Hypericum*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Cui, X. H., Chakrabarty, D., Lee, E. J. e Paek, K. Y. 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology* 101:4708-4716.
- Curtis, J. D. e Lersten, N. R. 1990. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. *New Phytologist* 114:571-580.
- da Câmara Machado, A., Puschmann, M., Pühringer, H., Kremen, R., Katinger, H. e da Câmara Machado, M. L. 1995. Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 14:335-340.
- di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E. e Izzo, A. A. 2001. St John's wort: prozac from the plant kingdom. *Trends in Pharmacological Sciences* 22:292-297.
- Don Palmer, C. e Keller, W. A. 2010. Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105:129-134.
- Ehrlich, P. e Raven, P. H. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* 18:586-608.
- Ferraz, A. B. F., Limberger, R. P., Bordignon, S. A. L., von Poser, G. L. e Henriques, A. T. 2005. Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal* 20:335-339.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M. e Araújo M. E. M. 2006. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108:31-37.
- Fields, P. G., Arnason, J. T. e Fulcher, R. G. 1990. The spectral properties of *Hypericum perforatum* leaves: the implications for its photoactivated defences. *Canadian Journal of Botany* 68:1166-1170.

- Flores-Sanchez, I. J. e Verpoorte, R. 2009. Plant polyketide synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:167-174.
- Franco, J. A. 1971. Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Volume I, *Lycopodiaceae-Umbelliferae*. Sociedade Astória, Lisboa.
- Franklin, G. e Dias, A. C. 2006. Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 42:324-330.
- Gadzovska, S., Maury, S., Ounnar, S., Righezza, M., Kascakova, S., Refregiers, M., Spasenoski, M., Joseph, C. e Hagège, D. 2005. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:591-601.
- Gibbons, S. Moser, E., Hausmann, S., Stavri, M., Smith, E. e Clennet, C. 2005. An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. *Phytochemistry* 66:1472-1475.
- Goel, M. K., Kukreja, A. K. e Bisht, N. S. 2009. In vitro manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale-up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96:1-9.
- Gómez-Galera, S., Pelacho, A., Gené, A., Capell, T. e Christou, P. 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Reports* 26:1689-1715.
- Green, J. R. 1884. On the organs of secretions in the Hypericaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 20:451-464.
- Greeson, J. M., Sanford, B. e Monti, D. A. 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology* 153:402-414.
- Guillet, G., Podeszinski, C., Regnault-Roger, C., Arnason, J. T. e Philogene, B. J. R. 2000. Behavioral and biochemical adaptations of generalist and specialist herbivorous insects feeding on *Hypericum perforatum* (Guttiferae). *Environmental Entomology* 29:135-139.
- Hildebrand, P. D. e Jensen, K. I. N. 1991. Potential for the biological control of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) with an endemic strain of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13:60-70.
- Hözl, J. e Petersen, M. 2003. Chemical constituents of *Hypericum* ssp. In *Hypericum: The genus Hypericum* (E. Ernst ed), vol 31, pp 77-93, Taylor & Francis, Londres.

- Jianfeng, X., Zhiguo, S. e Pusun, F. 1998. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production. *Enzyme and Microbial Technology* 23:20-27.
- Jin, M. L., Ahn, J. C., Hwang, B., Park, H-S., Lee, H. S. e Choi, D-W. 2010. Isolation and functional analysis of cDNAs similar to *Hyp-1* involved in hypericin biosynthesis from *Hypericum erectum*. *Biologia Plantarum* 54:725-729.
- Kacerovská, D., Pizinger, K., Majer, F. e Šmíd, F. 2008. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with tropical *Hypericum perforatum* extract – a pilot study. *Photochemistry and Photobiology* 84:779-785.
- Karioti, A. e Bilia, A. R. 2010. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 11:562-594.
- Karppinen, K. 2010. Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) – precursors and genes involved. *Universitatis Ouluensis, Scientiae Rerum Naturalium A 564*. Tese de doutoramento. Faculty of Science, University of Oulu.
- Karppinen, K., György, Z., Kauppinen, M., Tolonen, A., Jalonen, J., Neubauer, P., Hohtola, A. e Häggman, H. 2006a. In vitro propagation of *Hypericum perforatum* L. and accumulation of hypericins, pseudohypericins and phloroglucinols. *Propagation of Ornamental Plants* 6:170-179.
- Karppinen, K., Hohtola, A., György, Z., Neubauer, P., Tolonen, A. e Jalonen, J. 2006b. Comparison of growth and secondary metabolite accumulation in cultures of compact callus aggregates and shoots of *Hypericum perforatum* L. in shake flasks and in a bubble column bioreactor. *V<sup>th</sup> International Symposium on In Vitro culture and Hort. Breeding, Acta Horticulturae 725*, Debrecen, Húngria.
- Karppinen, K. e Hohtola, A. 2008. Molecular cloning and tissue-specific expression of two cDNAs encoding polyketide synthases from *Hypericum perforatum* L. 2008. *Journal of Plant Physiology* 165:1079-1086.
- Karppinen, K., Hokkanen, J., Mattila, S., Neubauer, P. e Hohtola, A. 2008. Octaketide-producing type III polyketide synthase from *Hypericum perforatum* is expressed in dark glands accumulating hypericins. *FEBS Journal* 275:4329-4342.
- Kartnig, T., Gobel, I. e Heydel, B. 1996. Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell culture of various *Hypericum* species and their chemotypes. *Planta Medica* 62:51-53.
- Kartnig, T., Gruber, A. e Sauer, H. 1989. Comparative phytochemical investigations of *Hypericum* species. *Planta Medica* 55:215.

- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239.
- Kirakosyan, A., Hayashi, H., Inoue, K., Charchoglyan, A. e Verdapetyan, H. 2000b. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry* 53:345-348.
- Kirakosyan, A., Sirvent, T. M., Gibson, D. M. e Kaufman, P. B. 2004. The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39:71-81.
- Kirakosyan, A., Vardapetyan, R. R. e Charchoglyan, A. G. 2000a. The content of hypericin and pseudohypericin in cell cultures of *Hypericum perforatum*. *Russian Journal of Plant Physiology* 47:270-273.
- Kitanov, G. M. 2001. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 29:171-178.
- Koperdaková, J., Katkovčinová, Z., Košuth, J., Giovannini, A. e Čellárová, E. 2009. Morphogenetic response to plant growth regulators in transformed and untransformed *Hypericum perforatum* L. clones. *Acta Biologica Cracoviensia* 51:61-70.
- Kornfeld, A., Kaufman, P. B., Lu, C. R., Gibson, D. M., Bolling, S. F., Warber, S. L., Chang, S. C. e Kirakosyan, A. 2007. The production of hypericins in two selected *Hypericum perforatum* shoot cultures is related to differences in black gland structure. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:24-32.
- Korotkova, N., Schneider, J. V., Quandt, D., Worberg, A., Zizka, G. e Borsch, T. 2009. Phylogeny of the eudicot order Malpighiales: analysis of a recalcitrant clade with sequences of the *petD* group II intron. *Plant systematics and evolution* 282:201-228.
- Košuth, J., Katkovčinová, Z., Olexová, P. e Čellárová, E. 2007. Expression of the *hyp-1* gene in early stages of development of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Reports* 26:211-217.
- Košuth, J., Smelcerovic, A., Borsch, T., Zuehlke, S., Karppinen, K., Spitteller, M., Hohtola, A. e Čellárová, E. 2011. The *hyp-1* gene is not a limiting factor for hypericin biosynthesis in the genus *Hypericum*. *Functional Plant Biology* 38:35-43.
- Kubin, A., Meissner, P., Wierrani, F., Burner, U., Bodenteich, A., Pytel, A. e Schemeller, N. 2008. Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-hypericin. *Photochemistry and Photobiology* 84:1560-1563.
- Kubin, A., Wierrani, F., Burner, U., Alth, G. e Crünberger, W. 2005. Hypericin – the facts about a controversial agent. *Current Pharmaceutical Design* 11:233-253.

- Kusari, S., Zühlke, S., Borsch, T. e Spiteller, M. 2009. Positive correlations between hypericin and putative precursors detected in the quantitative secondary metabolite spectrum of *Hypericum*. *Phytochemistry* 70:1222-1232.
- Liu, X-N., Zhang, X-Q. e Sun, J-S. 2007a. Effects of cytokinins and elicitors on the production of hypericins and hyperforin metabolites in *Hypericum sampsonii* and *Hypericum perforatum*. *Plant Growth Regulation* 53:207-214.
- Liu, X-N., Zhang, X-Q., Zhang, S-X. e Sun, J-S. 2007b. Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91:1-7.
- Łtocka, B. e Osińska, E. 2010. Shoot anatomy and secretory structures in *Hypericum* species (Hypericaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 163:70-86.
- Mader, S. S. 1998. Plant Structure and Function. *In* *Biology* 6<sup>a</sup> ed., pp 636-715, WCB/McGraw-Hill, Boston.
- Malgorzata, D. G. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43:27-47.
- Medina, M. A., Martínez-Poveda, B., Amores-Sánchez, M. I. e Quesada, A. R. 2006. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sciences* 79:105-111.
- Michalska, K., Fernandes, H., Sikorski, M. e Jaskolski, M. 2010. Crystal structure of Hyp-1, a St. John's wort protein implicated in the biosynthesis of hypericin. *Journal of Structural Biology* 169:161-171.
- Mosaleeyanon, K., Zobayed, S. M. A., Afreen, F. e Kozai, T. 2005. Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. *Plant Science* 169:523-531.
- Moura, M. 1998. Conservation of *Hypericum foliosum* Aiton, an endemic azorean species, by Micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 34:244-248.
- Murashige, T. e Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-497.
- Murch, S. J., KrishnaRaj, S. e Saxena, P. K. 2000. Phytopharmaceuticals: problems, limitations and solutions. *Scientific Review of Alternative Medicine* 4:33-38.
- Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S. e Pinto-Gomes, C. 2004. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 93:183-195.

- Núñez, A. F. R. 1993. *Hypericum* L. In Flora Iberica, Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares (S. Castroviejo, C. Aedo, S. Cirujano, M. Lainz, P. Montserrat, R. Morales, F. M. Garmendia, C. Navarro, J. Paiva e C. Soriano eds), Volume III, Real Jardín Botánico, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, Madrid.
- Onelli, E., Rivetta, A., Giorgi, A., Bignami, M., Cocucci, M. e Patrignani, G. 2002. Ultrastructural studies on the developing secretory nodules of *Hypericum perforatum*. *Flora* 192:92-102.
- Pasqua, G., Avato, P., Monacelli, B., Santamaria, A. R. e Argentieri, M. P. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science* 165:977-982.
- Pasqua, G., Santamaria, A. R., Caniato, R. e Filipini, R. 2008. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from leaf derived callus of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh. *Plant Biosystems* 142:106-110.
- Pavlic, M., Vacek, J., Klejdus, B. e Kubáň, V. 2007. Hypericin and hyperforin production in St. John's wort *in vitro* culture: influence of saccharose, polyethylene glycol, methyl jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:6147-6153.
- Porebski, S., Bailey, L. G. e Baum, B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:8-15.
- Pretto, F. R. e Santarém, E. R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62:107-113.
- Rainha, N., Lima, E. e Baptista, J. 2011a. Comparison of the endemic Azorean *Hypericum foliosum* with other *Hypericum* species: antioxidant activity and phenolic profile. *Natural Product Research* 25:123-135.
- Rainha, N., Lima, E., Baptista, J. e Rodrigues, C. 2011b. Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:1930-1940.
- Robson, N. K. B. 2003. *Hypericum* botany. In *The Genus Hypericum* (E. Ernst ed), pp 1-22, Francis & Taylor, Londres.
- Rozen, S. e Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology* (S. Krawetz e S. Misener eds), pp 365-386, Humana Press, Totowa.
- Santos, P. A. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. e Scheffer, J. C. 1999. Composition of the essential oil of *Hypericum foliosum* Aiton from five Azorean islands. *Flavour and Fragrance Journal* 14:283-286.

- Schäfer, H. 2002. Flora of the Azores. Margraf Verlag, Weikersheim.
- Sirvent, T. e Gibson, D. 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60:311-320.
- Sirvent, T. M., Krasnoff, S. B. e Gibson, D. M. 2003. Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 29:2667-2681.
- Soelberg, J., Jørgensen, L. B. e Jäger, A. K. 2007. Hyperforin accumulates in the translucent glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 99:1097-1100.
- Southwell, I. A. e Bourke, C. A. 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry* 56:437-441.
- Teisson, C., Alvard, D., Berthouly, M., Cote, F., Escalant, J. V. e Etienne, H. 1995. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. *Plantations* 2:32-33.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. e Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75:291-295.
- Thong, P. S. P., Olivo, M., Chin, W. W. L., Bhuvaneswari, R., Mancer, K. e Soo, K-C. 2009. Clinical application of fluorescence endoscopic imaging using hypericin for the diagnosis of human oral cavity lesions. *British Journal of Cancer* 101:1580-1584.
- Tocci, N., Simonetti, G., D'Auria, F. D., Panella, S., Palamara, A. T., Valletta, A. e Pasqua, G. 2011. Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91:977-987.
- Travis, S., Bais, W. e Vivanco, H. P. 2002. Jasmonic-acid induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry* 60:289-293.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. e Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:1-12.
- Vardapetyan, H. R., Kirakosyan, A. B. e Charchoglyan, A. G. 2000. The kinetics regularities of the globular structures growth in cell cultures of *Hypericum perforatum* L. *Biotechnologia* 4:53-58.

- Verpoorte, R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Elsevier Science* 3:232-238.
- Verpoorte, R., Contin, A. e Memelink, J. 2002. Biotechnology for production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1:13-25.
- Walker, T. S., Bais, H. P. e Vivanco, J. M. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry* 60:289-293.
- Walker, T., Sirvent, T., Gibson, D. e Vance, N. 2001. Regional differences in hypericin and pseudohypericin concentrations and five morphological traits among *Hypericum perforatum* plants in the northwestern United States. *Canadian Journal of Botany* 79:1248-1255.
- Wilken, D., González, E. J., Hohe, A., Jordan, M., Kosky, R. G., Hirschmann, G. S. e Gerth, A. 2005. Comparison of secondary metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. *In Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (A. K. Hvoslef-Eide e W. Preil eds), pp 525-537, Springer, Holanda.
- Wójcik, A. e Podstolski, A. 2007. Leaf explant response in *in vitro* culture of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 29:151-156.
- Xu, J. F., Sun, Y. e Su, Z. G. 1998. Enhanced peroxidase production by suspension culture of carrot compact callus aggregates. *Journal of Biotechnology* 65:203-208.
- Yesil-Celiktas, O., Gurel, A. e Vardar-Sukan, F. 2010. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. *Transworld Research Network*, Trivandrum, Índia.
- Zobayed, S. M., Afreen, F., Goto, E. e Kozai, T. 2006. Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 98:793-804.
- Zobayed, S. M. A., Afreen, F. e Kozai, T. 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:977-984.
- Zobayed, S. M. A., Afreen, F. e Kozai, T. 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany* 59:109-116.
- Zobayed, S. M. A., Murch, S. J., Rupasinghe, H. P. V. e Saxena, P. K. 2003. Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75:143-149.

Zobayed, S. M. A., Murch, S. J., Rupasinghe, H. P. V. e Saxena, P. K. 2004. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). Plant Science 166:333-340.

Zobayed, S. M. A. e Saxena, P. K. 2003. *In vitro*-grown roots: a superior explants for profilic shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. Plant Science 165:463-470.