



ANÁLISE DO GENE HSS1 EM CROTALARIA SPECTABILIS(FABACEAE)

Eduardo Augusto de Melo¹, Andrea Beatriz Diverio Mendes², Adriana Gonela³, Bruna Sisti Michelan de Polli⁴, Pedro Henrique Silvestre Duhatschek⁵, Liriana Belizário Cantagalli⁶

¹Doutorando. Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade estadual de Maringá. Campus Maringá-PR. Bolsista CAPES-UEM. eaugusto_melo@hotmail.com

² Docente. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR. abdmendes@uem.br

³ Docente. Departamento de Agronomia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR. agonela@uem.br

⁴Doutoranda. Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade estadual de Maringá. Campus Maringá-PR. Bolsista CAPES-brunadepolli@gmail.com

⁵Mestrando. Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade estadual de Maringá. Campus Maringá-PR. Bolsista CAPES-UEM. pedroduhatschek@outlook.com

⁶ Docente. Centro Universitário Ingá - UNINGA. Maringá-PR. prof.lirianacantagalli@uninga.edu.br

RESUMO

A espécie *Crotalaria spectabilis* é uma leguminosa reconhecida por sua capacidade de produzir alcaloides pirrolizidínicos (APs), especialmente a monocrotalina, composta com propriedades nematicidas. A biossíntese desses compostos inicia-se com a ação da enzima homospermidina sintase (HSS), originada da duplicação do gene da desoxihipusina sintase (DHS), enzima do metabolismo primário. Este trabalho teve como objetivo identificar o gene *hss1* em *C. spectabilis*, por meio de ferramentas de bioinformática, técnicas de extração de DNA, desenho de primers e amplificação via PCR. A mineração *in silico* de sequências gênicas relacionadas à rota da monocrotalina, com alinhamentos funcionais entre as sequências de HSS e DHS, evidenciou 82,85% de identidade. Foram desenhados dez pares de primers específicos baseados na sequência de RNAm do gene *hss1*, dos quais seis foram testados experimentalmente. Todos os primers foram empregados na amplificação do gene *hss1* a partir do DNA total de plantas de *C. spectabilis*, sendo todos validados quanto à sua eficiência. Os loci Hss1.7m e Hss1.8 destacaram-se por apresentarem amplicons bem definidos e cobertura significativa da sequência RNAm. Após validação, o amplicon do locus Hss1.7m foi sequenciado, revelando uma sequência de 1019 nucleotídeos, maior que o amplicon obtido *in silico*, sendo um forte indicativo de que os primers anelaram em diferentes exons, deixando visível uma parte significativa do gene *hss1*.

PALAVRAS-CHAVE: Amplificação gênica; Gene *hss1*; Homospermidina; Mineração *in silico*.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Crotalaria*, pertencente à família Fabaceae abrange uma ampla diversidade de espécies. Esta família é dividida em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae. A subfamília Papilionoideae é a mais numerosa, com 13800 espécies, incluindo o gênero *Crotalaria*, que é distribuído mundialmente e ecologicamente significativo em diversos biomas (Lewis et al., 2005).

Plantas de *Crotalaria spectabilis* são conhecidas por sua rusticidade, adaptando-se a uma ampla gama de condições ambientais, incluindo solos pobres em nutrientes, solos cascalhentos, regiões com escassez hídrica e áreas arenosas costeiras (Queiroz, 2009). Além disso, *C. spectabilis* possui valor econômico significativo, sendo cultivada para adubação verde, aumento da disponibilidade de nitrogênio (Leal et al., 2005), cobertura verde para prevenir a erosão (Choi et al., 2008), para o controle de nematoides (Nascimento et al., 2020), e para produção de fibra têxtil (García et al., 2013).

O controle de nematoides por plantas do gênero *Crotalaria* está intimamente associado à biossíntese de compostos secundários, particularmente os alcaloides pirrolizidínicos. A monocrotalina que é produzida pela *C. spectabilis* apresenta atividade nematicida sendo potencial agente para o controle desses parasitas (Carvalho, 2020). O maior número de nematoides suprimidos são endoparasitas sedentários, estes incluem



Meloidogyne spp. (Good et al., 1965; McSorley et al., 1994) *Heterodera glycines* (Kloepper et al., 1992) e *Rotylenchulus reniformis* (Zaki, 2024).

A enzima homospermidina sintase, resultante da duplicação do gene *dhs*, é a primeira enzima catalisadora na via metabólica da monocrotalina, estabelecendo uma conexão entre o metabolismo primário e o secundário (Ober e Hartmann, 2000). Análises genômicas mostram que os genes *hss* e *dhs* são altamente conservados, o evento de formação do parálogo do gene *dhs* levou ao desenvolvimento de pequenas famílias de genes em espécies produtoras de alcaloides pirrolizidínicos (Reimann et al., 2004; Ober, 2009).

Tendo em vista a importância do esclarecimento do metabolismo secundário na rota metabólica de alcaloides pirrolizidínicos, a investigação do gene *hss1* pode fornecer importantes informações sobre a rota metabólica da monocrotalina, ampliando a elucidação da sua via de biossíntese. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenhar e validar os marcadores moleculares gerados para identificar e sequenciar o gene *hss1* de *C. spectabilis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal utilizado no estudo consistiu em sementes de *Crotalaria spectabilis*, obtidas junto ao Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR). As sementes foram semeadas em vasos de 7 litros em casa de vegetação da Universidade Estadual de Maringá. Quinze dias após a emergência (15 DAE), folhas jovens foram coletadas por conterem menos fibras e menor teor de lignina, o que facilita a extração do DNA. As amostras foram desidratadas com sílica gel e armazenadas em geladeira a 5°C no Laboratório Nupagri até o momento da extração. O experimento foi conduzido com três repetições biológicas, sendo cada repetição composta por folhas coletadas de plantas distintas. Além da PCR convencional, foram consideradas análises complementares de integridade do DNA por eletroforese em gel e espectrofotometria em Nanodrop.

A mineração das sequências gênicas foi conduzida inicialmente com uma revisão bibliográfica sobre o sequenciamento de espécies do gênero *Crotalaria*. Em seguida, foram realizadas buscas nos bancos de dados NCBI, UNIPROT e EMBL-EBI, com foco em genes associados à produção de monocrotalina. As sequências selecionadas foram alinhadas com genes das famílias produtoras de alcaloides pirrolizidínicos, utilizando a ferramenta BLAST para verificar a similaridade com os genes *hss* e *dhs*.

O desenho de primers foi realizado com o programa Primer3Plus, que gerou dez pares de primers específicos com base na sequência com maior identidade. Os parâmetros para desenho seguiram critérios como tamanho de 18 a 20 nucleotídeos, temperatura de melting entre 53°C e 63°C e conteúdo de citosina/guanina entre 40% e 60%. Seis pares foram selecionados para uso posterior, incluindo dois com mutações específicas.

A extração do DNA genômico foi feita com protocolo adaptado de Dellaporta (1983), utilizando tampão com SDS e β -mercaptoetanol. Após a maceração das folhas, o DNA foi purificado com clorofórmio:álcool isoamílico e precipitado com isopropanol. As amostras foram armazenadas a -80°C antes da ressuspensão em tampão TE com adição de RNase. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop, e a integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A amplificação por PCR foi conduzida com reação de 20 μ L contendo tampão PCR, $MgCl_2$, dNTPs, Taq polimerase, primers e DNA molde. O programa térmico incluiu 40 ciclos com temperaturas específicas para desnaturação, anelamento e extensão. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, com voltagem de 60 V por cerca de 2 horas, sendo posteriormente visualizados sob luz UV.



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A mineração *in silico* realizada nos bancos NCBI, UNIPROT e EMBL-EBI permitiu a identificação de uma sequência de RNAm do gene *hss1* em *Crotalaria spectabilis*, correspondente à enzima homospermidina sintase. Essa identificação foi baseada em similaridades com genes conhecidos de outras famílias produtoras de alcaloides pirrolizidínicos. Estudos anteriores com análise enzimática e ensaios cromatográficos confirmaram que a homospermidina é um intermediário essencial para a biossíntese desses compostos.

O alinhamento da sequência de RNAm do gene *hss1* com a do gene *dhs1* (desoxihipusina sintase) revelou uma identidade de 82,85%, confirmando a hipótese de que *hss* se originou de duplicações de *dhs*. Esses achados corroboram com a literatura, que já descrevia alta similaridade entre as enzimas e a dificuldade de distingui-las apenas por sequências. Foram desenhados dez pares de primers específicos para o gene *hss1*, com base na sequência de RNAm de *C. spectabilis*. Entre eles, dois pares apresentaram mutações em relação ao gene *dhs*, o que pode indicar presença de íntrons e variações nos tamanhos dos amplicons. Os primers foram utilizados em DNA genômico, o que justifica possíveis diferenças entre os tamanhos esperados e os obtidos experimentalmente.

Seis pares de primers foram testados por PCR, e todos mostraram amplificação, inclusive os que apresentavam mutações. A amplificação bem-sucedida desses loci confirma a presença das mutações no genoma analisado. Os loci Hss1.7m e Hss1.8 foram os que apresentaram melhores resultados, permitindo cobrir aproximadamente 64,5% da sequência de RNAm do gene *hss1*.

Foi observada amplificação não específica em alguns loci, exigindo ajustes nos parâmetros da PCR para melhorar a especificidade, como sugerido na literatura. No entanto, os resultados indicam que os primers foram eficientes para amplificar regiões do gene *hss1*. Considerando a identificação de dois loci, Hss1.7m e Hss1.8, que permitem uma cobertura de 64,5% do RNAm *hss1*, foi realizada uma padronização da PCR para que se realizasse o sequenciamento. No locus Hss1.7m foi possível verificar que o amplicon de 2100pb, com aproximadamente o dobro do tamanho do obtido *in silico*, permaneceu forte e reproduzível, demonstrando que esta é a região alvo do gene *hss1*. Este amplicon foi enviado para ser sequenciado. No caso do locus Hss1.8, não foi possível padronizar a PCR, portanto, o amplicon não foi enviado para o sequenciamento.

O resultado do sequenciamento propiciou a obtenção de uma sequência de DNA composta por 1019 nucleotídeos (nt) (Figura 1), sendo menor que o amplicon visualizado no gel e maior do que o amplicon obtido *in silico* (597 nt) a partir do RNAm, indicando que os primers, provavelmente, anelaram em exons distintos. Um exemplo que validaria essa suposição foi obtido por Nurhayati e Ober (2005). Os autores analisaram o gene *dhs2c-Cj* de *Crotalaria juncea* e, após o sequenciamento, identificaram que o gene possuía 1633 nt, sendo formado por dois exons, o primeiro com 1071 nt e o segundo com 80 nt, separados por um intron composto por 480 nt.



```
TTCCGACGTTAGTCTGAGCGACTGCCTTCTAGGGCTGATCTTCTCTCCTTAGAG  
ATACGGTTTTGCTCTGGATGGACGATTAACCTGTGGCAATGAAGGTACGGTCTAT  
TCTGGCATGTCTGCCGATGCCAGCTTTGGATCTTTGTTCCGCTGAGAAAGTGA  
CCCCACTGTCTCGAGTTCTTGGGGCAAACCGGAGGTATCCTTATCTTCATTGATC  
TGACTCGCTCAGCGCTTAAATGTTCCCTCCCTTGTGGTGTCCGGTCCGGTGTCTG  
ATATTTCGCCCTTGCACTAACTCTGTCAGCAGAACTGTGCCTTACCGAGTTTAA  
CTTTTTTCAGGGAAGGTTGGGGTTCCTTTGTTTGGCTAAACTGGCCGTGTAGCA  
AAGCCTGGCGGCTTCTGTCTGCTCGGAACGGTATTACCTTGTCCCTTGGCCCTTA  
CGAAATTAATTGGCTTATGGGCGTTGAAACACCGCTTCAAAGGCTGCTTACA  
TGTGCTTCTCAAAGGGCATTGACGAGGAAAGACAGGCCACCACAAAACATTT  
AATAATTTCCGGTTGTGCCGACGGCTGTTCCCATAGTACTGAACCCCATCTCT  
CTGAAAAAAAATGAATTGTATCTCCGGTGAACCTGCTGCTGCACATCGATAG  
ATGGGCGACTGGATTCTATCCCTTTCAGAGACTGAAAGGGGGAGGAACTGAT  
GTCTGTGAGATTCGTGAACAATGAAGATTCGATAGGGCTCGGAGTTCCCGAT  
CAATGTTGAGATGACCTTGGGGTCACTCTCAGACCACAAAACACCTTCTAGAT  
TGGCTCCGTGAGAGATATCAGGATGTGCTTTTAGCTTCAITCTTTCAAGGGCAT  
TTTCTTAGCTGCCACAATATCGTGTATACATAATCAGATCAGATCTCTGT  
ACACTGCATCTGCATAGCCGAAACGATAGTGACCTGTGGAGCTCTGTTCCGGT  
TCACTAAAAACACTCCA
```

Figura 1: Sequência do gene *hss1* identificado em *C. spectabilis*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise *in silico* das sequências do gênero *Crotalaria* demonstrou ser uma ferramenta importante de bioinformática e eficiente para os estudos de análise genômica. Foi possível avançar significativamente na identificação do gene *hss1* em *Crotalaria spectabilis*. Os primers desenhados foram eficientes para permitir a amplificação, entretanto é necessário que se invista mais na padronização das PCRs para que se consiga obter a estrutura do gene *hss1*. Os resultados obtidos apresentam potencial aplicação na biotecnologia, como na produção de biomoléculas com atividade nematicida, e no manejo agrícola sustentável, auxiliando no controle biológico de nematoides em sistemas produtivos. Dessa forma, o gene *hss1* de *C. spectabilis* se mostra um alvo promissor para estratégias de melhoramento genético e desenvolvimento de bioinsumos.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, J. L. B. R. D. de. Cultivo tradicional e *in vitro* de *Crotalaria retusa* para isolamento, identificação e quantificação de alcaloides pirrolizidínicos. 2020. 54 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020.
- CHOI, B.; OHE, M.; HARADA, J.; DAIMON, H. Role of belowground parts of green manure legumes, *Crotalaria spectabilis* and *Sesbania rostrata*, in N uptake by the succeeding tendergreen mustard plant. *Plant Production Science*, v. 11, n. 1, p. 116–123, 2008.
- CINTRA, L.D.; IVO, W.M.P. DE M.; SILVA, L.V.; LEAL, M. DE L. DA S. **Distribuição das raízes de cana-de-açúcar em sistemas de cultivo com adubação orgânica e *Crotalaria spectabilis***. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2006/bp-12.pdf>. Acesso em: 15, jun. 2023.
- DELLAPORTA S.L.; WOOD J.; HICKS J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1:19-21, 1983.
- FERRAZ, S.; VALLE, L.A.C. **Controle de fitonematóides por plantas antagonistas**. Viçosa: Editora UFV, 1997. 73 p. (Cadernos Didáticos, 7).
- FISCHLER, M., WORTMANN, C.; FEIL, B. *Crotalaria (C. ochroleuca G. Don.)* as a green manure in maize–bean cropping systems in Uganda. **Field Crops Research**, 61(2), 97–107, 1999. doi:10.1016/s0378-4290(98)00150-6.



FLORES, A.S.; FILLIETTAZ, A.M.; TOZZI, A.M.G. DE A. Novidades taxonômicas em espécies brasileiras de *crotalaria* sect. *calyciniae* wight &arn. (leguminosae-papilionoideae). **Rodriguésia**, 57:127–130, 2006.

GARCIA, J.M.; KAWAKITA, K.; MIOTTO, S.T.S.; SOUZA, M.C. DE. O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae, Crotalarieae) na planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 209-226. 2013.

GERMANI, G.; PLENCHETTE, C. Potential of *crotalaria* species as green manure crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, 266(1-2):333–342, 2005.

GOODEY, J.B.; FRANKLIN, M.T.; HOOPER, D.J. The nematode parasites of plant catalogued under their hosts. **Farnham Royal, UK: CAB**, 1965. 214 p.

ISLAM, MD.M.; URMI, T.A.; RANA, MD.S.; ALAM, M.S.; HAQUE, M.M. Green manuring effects on crop morpho-physiological characters, rice yield and soil properties. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 25(1):303–312, 2019.

KLOEPPER, J.W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; MCLNROY, J.A.; YOUNG, R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, 139(1):75–84, 1992.

LEWIS, G.P. **Legumes of the world**. Richmond, Uk: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577p.

MCSORLEY, R.; DICKSON, D.W.; BRITO, J.A. DE. Host Status of Selected Tropical Rotation Crops to Four Populations of Root-Knot Nematodes. **Nematropica**, 45–53, 1994.

NASCIMENTO, D.D.DO.; VIDAL, R.L.; PIMENTA, A.A.; CASTRO, M.G.C.DE.; SOARES, P.L.M. *Crotalaria* and millet as alternative controls of root-knot nematodes infecting okra. **Bioscience Journal**, 36(3): 2020.

NURHAYATI, N.; GONDÉ, D. Recruitment of alkaloid-specific homospermidine synthase (HSS) from ubiquitous deoxyhypusine synthase: Does *Crotalaria* possess a functional HSS that still has DHS activity? **Phytochemistry**, 66(11): 1346-1357, 2005.

OBER D, HARTMANN T. Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. **Plant Mol Biol.**, 44(4):445-50, 2000.

OBER D., HARTMANN T. Homospermidina sintase, a primeira enzima específica da via da biossíntese de alcalóides pirrolizidínicos, evoluiu da desoxihipusina sintase. **Processo. Nacional. Acad. Ciência. EUA**, 96:14777–14782, 1999.

OBER, D.; KALTENEGER, E. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, 70(15):1687–1695, 2009.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTO, C.H. Evolução e sistemática das Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H., Eds., Advances in legume systematics, Part I, **Royal Botanic Garden**, Kew, 1-26. 1981.



QUEIROZ, L.P. DE. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana. 467 p. 2009.

REIMANN, A. NURHAYATI, N.; BACKENKÖHLER, A.; OBER, D. Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages w. **The Plant Cell**, 16(10):2772–2784, 2004.

ZAKI, M.M.M.; AFIA, A.I.B.; AL-NAGAR, H.I.A.; ABDEL-RA'OUF, E.O. Multifarious management of the reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* infecting cowpea. **Indian Phytopathology**, 77:175–182, 2024.