

POLIMORFISMUL BIOCHIMIC LA PLANTELE GENULUI *MENTHA*

**Vasile CIOBANU, Maria PISOV, Svetlana REZINCIUC, Angela PORT*, Maria DUCA*,
Veaceslav REVA, Steliana CLAPCO***

Catedra Biologie Vegetală

**Centrul universitar de Biologie Moleculară, UnAȘM*

Electrophoretic protein profiles, oil composition and morphological traits were used to study the genetic diversity of wild-growing *Mentha spicata* and four hybrids from the collection of mint of the Moldova State University. It was found out that forms with different origin and morphological peculiarities are characterized by a similar essential oil composition, rich in the carvone 60-65% and menthol 58-70%. SDS-PAGE analysis revealed 30 polypeptide components with relative molecular weights in a range of 14,15-90,0 kDa, which showed molecular heterogeneity average of 43%. A negative correlation was found among morphological parameters (inflorescence, leaf and plant length) of *Mentha spicata* and quantity of the main terpenoid - carvone. Also, a more pronounced protein polymorphism was established in the wild-growing form.

Studiul polimorfismului la plante poate contribui la identificarea markerilor moleculari utilizați în analiza genetică și filogenetică, la conservarea biodiversității, la elaborarea unor programe rapide și eficiente de ameliorare a plantelor, asistate de markeri linkați cu caracterul dorit [10,17].

Particularitățile genetice specifice ale plantelor pot fi puse în evidență prin intermediul markerilor ADN și al markerilor biochimici ai metabolismului secundar, reprezentați prin terpeni și fenoli, și ai metabolismului primar – proteinele, care în calitate de produși ai expresiei genelor reflectă variabilitatea biochimică și genetică a organismului [1,3-5,8].

Heterogenitatea proteică este determinată de variabilitatea alelică și poate fi evidențiată prin analiza electroforetică. Astfel, diferite genotipuri, soiuri, biotipuri și linii pot fi diferențiate în baza spectrului electroforetic [9].

Plantele genului *Mentha* sunt surse bogate în uleiuri eterice cu compoziție variată, folosite ca aromatizanti în industria alimentară și cosmetică sau ca remedii cu acțiune anestezică, antispasmodică, antioxidantă, antibacteriană și antiinflamatoare în farmaceutică. În acest context, capătă amploare studiul diversității genetice a plantelor de *Mentha* ce furnizează informații utile pentru elaborarea noilor strategii de ameliorare, direcționate spre creșterea cantitativă a masei verzi și, ca urmare, a productivității de ulei, sinteza preferențială a metaboliților secundari de valoare economică, reglarea adaptabilității plantelor față de condițiile mediului etc. [2,6,7,12-15]. Scopul lucrării a constat în evidențierea corelațiilor dintre aspectul morfologic a cinci forme de mentă de origine diferită și polimorfismul biochimic la nivel de terpenoizi și proteine.

Material și metode

Investigațiile morfofiziologice și biochimice au fost realizate pe cinci genotipuri de mentă: *Mentha spicata* – întâlnită spontan în regiunea raionului Ialoveni (Mileștii Mici) și patru forme hibride, notate convențional – La-21 (selectată din descendența generativă F₁ a *M. longifolia*), MS41-M4 (*M. sachalinensis* x *M. incana*), 120-11 [(*M. piperita* F₃ x *M. incana*)F₂] și 11P-310 [(*M. sachalinensis* x *M. royleana*)F₂ x *M. piperita* F₃ x *M. spicata*].

În calitate de material experimental pentru electroforeza denaturantă a proteinelor și cromatografia schimbătoare de ioni au fost utilizate frunze de mentă lipsite de pețiol. Studiul compoziției chimice a uleiurilor s-a efectuat prin metode de determinare a indicelui de refracție, a activității optice, densității, ponderii de alcoolii primari și secundari. Componentii individuali au fost identificați prin metoda spectrală în regiunea UV în baza temperaturii de topire a derivaților, cromatografie gaz-lichid și pe plăci de silufol [16]. Extractul sumar de proteine ușor solubile a fost obținut prin metode standard, fiind utilizată următoarea soluție-tampon: Tris-HCl 0,628 mM, pH=8,0, acid ascorbic 0,03%, EDTA 1 mM [11].

Profilurile SDS-PAGE au fost obținute în plăci verticale de poli-acrilamidă, 12,5%. Separarea electroforetică s-a realizat la 30 mA, 180 V, fiind utilizat aparatul de electroforeză model „Himifil AVGA-2” (Estonia). Operațiile postelectroforetice s-au realizat conform metodei standard [11]. Masele moleculare ale proteinelor sumare au fost determinate după curba de etalonare folosind proteinele standard: lizocimă – 14,3 kDa, β-lactoglobulină –

18,4 kDa, tripsinogen – 24,0 kDa, pepsină – 34,7 kDa, ovalbumină – 45,0, albumină serică bovină – 66,0 kDa (*SDS Molecular Weight Markers*, Sigma). Logaritmiile maselor moleculare relative ale fracțiilor polipeptidice separate au fost determinați în funcție de indicii mobilității electroforetice.

Cromatografia schimbătoare de ioni, bazată pe principiul separării moleculelor cu sarcină diferită, s-a realizat la cromatograful Pharmacia L.K.B. GP-10 (Germania) pe coloană PD10 ce conține extractul proteic și Q-Sepharose în calitate de matrice, în conformitate cu metoda specificată în [11].

Rezultate și discuții

Particularități morfologice ale speciilor de mentă. Plantele de mentă incluse în studiu diferă din punct de vedere morfologic – sistemul radicular, forma și nuanța frunzelor, florilor, forma tufei etc., majoritatea caracteristicilor morfologice ale hibridilor corelând cu cele ale formelor parentale.

Caracterele cantitative au o contribuție majoră la formarea productivității plantelor, care depinde de genotipul plantei, de interrelația creșterii diferitelor părți ale plantei și de condițiile mediului înconjurător. Din aceste considerente, au fost analizați diferiți parametri morfologici (înălțimea plantei, lungimea inflorescenței, suprafața frunzei) ce determină productivitatea plantelor de mentă. Măsurările au fost realizate la plantele mature, ceea ce a permis obținerea valorilor optime caracteristice pentru fiecare formă analizată.

Estimarea parametrilor morfologici a patru hibridi și a speciei spontane de mentă a relevat valori mai mari ale înălțimii plantei și ale lungimii inflorescenței la hibridul La-21, iar după suprafața foliară s-a remarcat hibridul MS41-M4. Specia spontană a prezentat cele mai mici valori la toți indicii analizați (Fig. 1A-C).

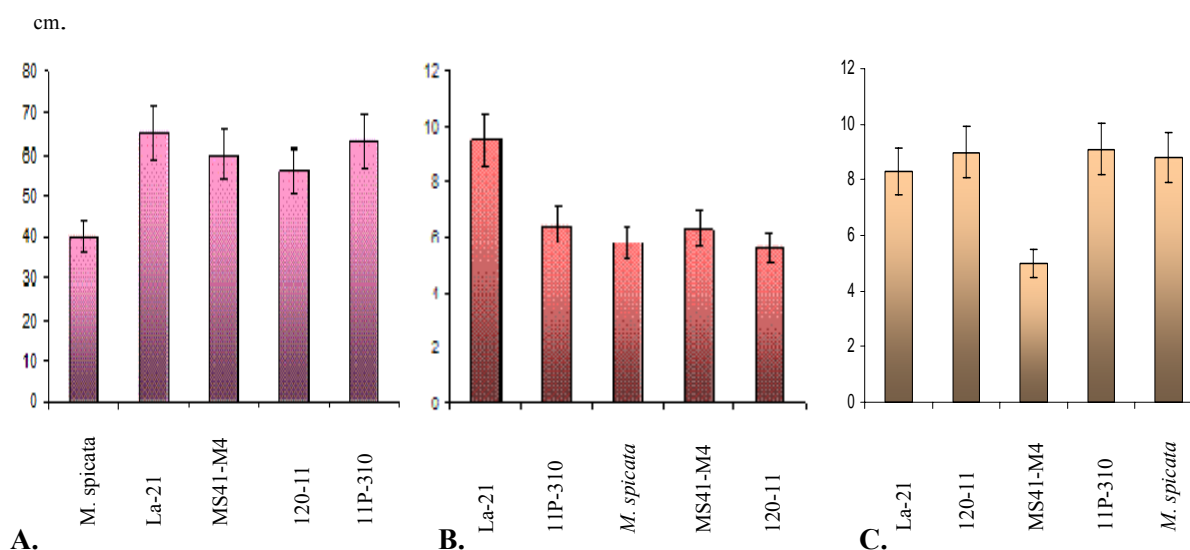
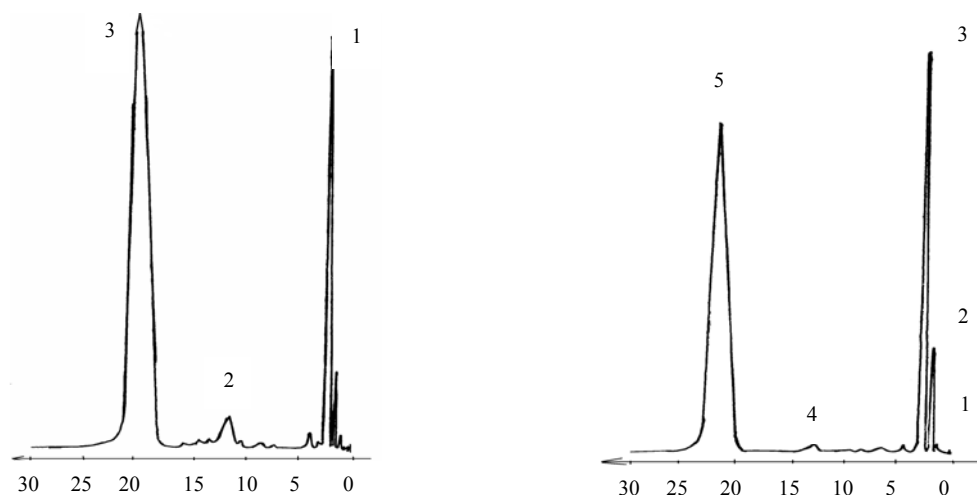


Fig.1. Parametrii morfologici ai mentei: înălțimea tulpinii (A); lungimea inflorescenței (B) și suprafața frunzei (C).

Particularități ale metabolismului secundar. Analiza probelor de ulei eteric a pus în evidență diversitatea metaboliților secundari cu un anumit grad de specificitate determinat atât de genotipul plantei, cât și de caracteristica diferită a productivității acestora.

Metodele cromatografice reflectă toată gama componentilor minori și majori care intră în componența uleiului (Fig. 2,3).

Studiul după indicii chimici ai uleiului hibridului 120-11 și ai speciei *M. spicata* a relevat o asemănare după compoziția uleiului, ambele forme având același set de terpenoizi, componentul principal fiind carvona și derivații ei (Fig. 2A,B). Pe de altă parte, studiul caracterelor morfologice a relevat o deosebire considerabilă între aceste două forme. *M. spicata* este de o nuanță verde-închis spre vârf și ușor antocianie spre bază. Frunzele sunt mari glabre, practic lipsite de pețiol, de o culoare verde-închis, ovale, cu marginea puternic dințată, suprafața limbului foliar slab încrețită. Florile de o culoare roză-violacee sunt grupate în inflorescențe de tip spic situate în vârful tulpinii. În ce privește hibridul 120-11, el este pubescent, frunzele ovat-lanceolate de o culoare verde-închis, pe partea inferioară în regiunile nervațiunilor având o nuanță antocianie.

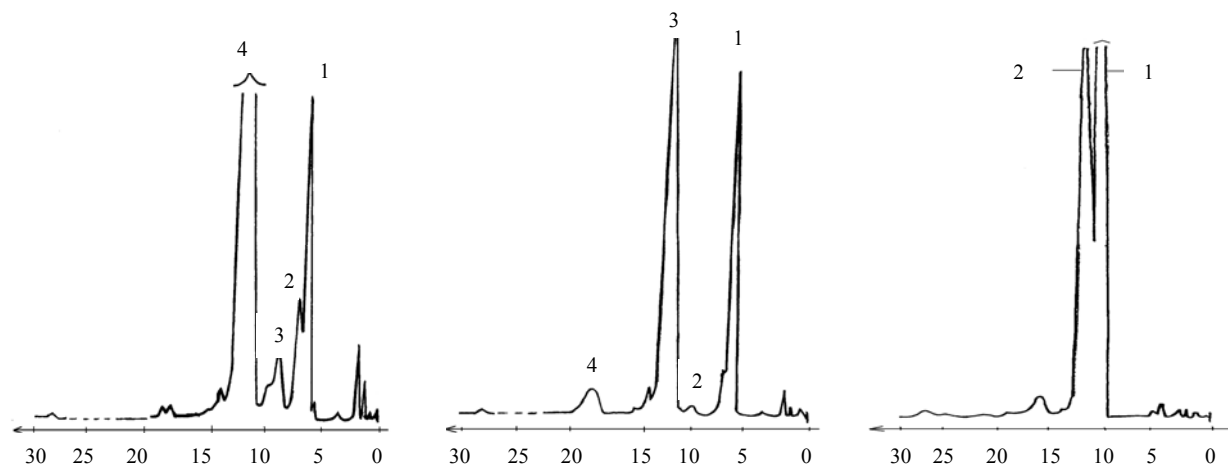


A. 1) limonenă; 2) dihidrocarvonă;
3) carvonă.

B. 1) α - pinenă; 2) β -pinenă; 3) limonenă;
4) dihidrocarvonă; 5) carvonă.

Fig.2. Cromatograma uleiului la *M. spicata* (A) și la hibridul 120-11 (B).

Hibrizii 11P-310 și MS41-M4 (Fig.3, A,B) de asemenea au un set comun de terpenoizi, componentul major fiind mentolul, și un aspect morfologic diferit. Hibridul 11P-310 are tulpina pigmentată roșietic, glabră, iar hibridul MS41-M4 este pubescent și lipsit de pigmenți antociani.



A. 1) mentonă; 2) izomentonă;
3) mentilacetat; 4) mentol.

B. 1) mentonă; 2) mentilacetat;
3) mentol; 4) piperitonă.

C.1) linalool; 2) linalilacetat.

Fig.3. Cromatograma uleiului la hibridul 11P-310 (A), MS41-M4 (B) și La-21 (C)

Forma La-21 sintetizează în special terpenoizi aciclici – linalool și derivații lui. Plantele sunt slab pubescente, de o culoare verde-deschis, frunzele scurt pețiolate, lanceolate, ascuțite la vârf, rar zimțate pe margini. Se deosebește de forma maternă prin culoarea violetă a florilor (la forma inițială culoarea este albă), acestea fiind grupate în inflorescențe spiciforme, precum și prin dimensiunile mai mici ale plantelor.

După setul de terpenoizi sintetizați formele de mentă studiate pot fi divizate în trei grupe (*a se vedea* Tabelul).

Tabel

Indicii fizico-chimici ai uleiului

Forma de mentă		Ulei, %	n_D^{20}	α_D^{20} , grad	d_{20}^{20}	λ_{max} , nm	Componenți de bază, %
I	120-11	2,64	1,4905	-50,0	0,9375	235	Carvonă – 62,0 Limonenă – 23,4
	<i>M. spicata</i>	1,43	1,4855	-57,5	0,9390	235	Carvonă – 65,6 Limonenă – 15,1
II	11P-310	2,65	1,4615	-27,5	0,9042	231	Mentol – 69,5 Mentonă – 21,1
	MS41-M4	3,53	1,4600	-33,5	0,9030	233	Mentol – 57,7 Mentonă – 27,7
III	La-21	2,57	1,4630	+20,0	0,8970	-	Linalool – 37,0 Linalilacetat – 39,0

Prima grupă include hibridul 120-11 și *M. spicata* ce acumulează ulei bogat în terpenoizi cu funcția oxigenată la carbonul din poziția doi al inelului p-mentanic, componentul principal fiind carvona – 62,0% și 65,6%, respectiv. La grupa a doua se atribuie hibridii 11P-310 și MS41-M4, în uleiul cărora predomină mentolul (69,5% și 57,7%), însoțit de alți compuși cu funcția oxigenată la C₃. Grupei a treia îi aparține forma La-21, care sintetizează, în special, linalool și derivații lui. Acest studiu demonstrează că formele studiate reprezintă chemorase care au același set de terpenoizi, iar aspectul morfologic este diferit.

Particularități ale metabolismului primar. Analiza complexului proteinelor sumare a demonstrat specificitatea spectrului polipeptidic pentru fiecare genotip de mentă, fiind atestate deosebiri esențiale după numărul de componenți și intensitatea zonelor identificate (Fig.4).

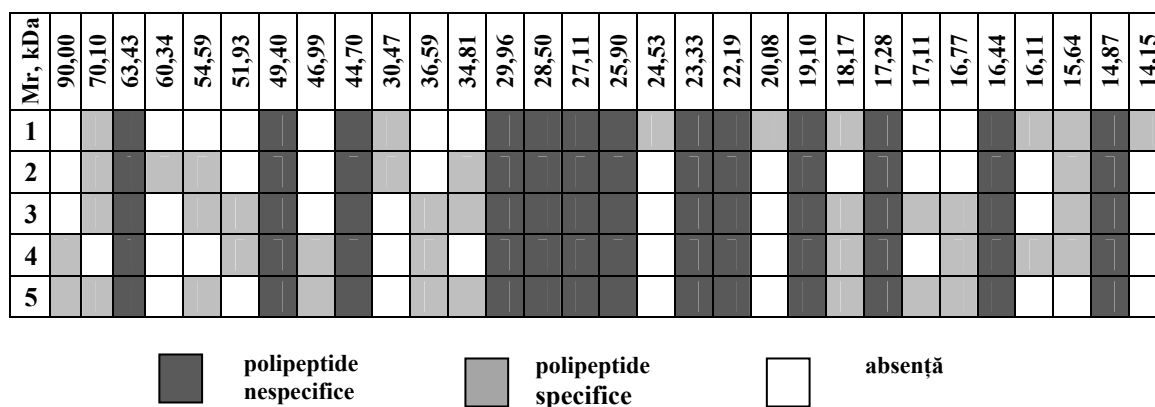


Fig.4. Reprezentarea schematică a spectrului electroforetic:

1 – *M. spicata*; 2 – 120-11; 3 – 11P-310; 4 – MS41-M4; 5 – La-21;

Profilul SDS-PAGE din frunzele de mentă a relevat prezența a 30 componenți, repartizați într-un diapazon cu masa moleculară de 14,15-90,0 kDa, numărul de benzi proteice variind în funcție de genotip. Astfel, la hibridul La-21 au fost evidențiate 23 benzi polipeptidice cu masa moleculară cuprinsă între 14,87-90 kDa, la formele MS41-M4, 11P-310 și *M. spicata* au fost detectate 21 benzi polipeptidice, iar la hibridul 120-11 – 19 benzi. 13 fracții proteice cu masele moleculare cuprinse între 14,87-63,43 kDa au fost comune pentru toți hibridii, iar 17 fracții polimorfe. Polipeptidul cu masa moleculară de 70 kDa se identifică la toate formele, cu excepția hibridului MS41-M4, pe când polipeptidul de 90 kDa este prezent doar la hibridul La-21 și la MS41-M4. Cele mai elocvente diferențe dintre spectrele polipeptidice au fost stabilite la nivelul polipeptidelor cu un conținut redus în paternul electroforetic. Formele La-21 și 11P-310 s-au evidențiat printr-un spectru polipeptidic mai variat, prezentând 9 fracții, comparativ cu genotipurile MS41-M4, 120-11, *M. Spicata*, la care au fost detec-

tate 8, 6 și 7 fracții, respectiv. Complexul fracțiilor proteice ale formelor analizate a prezentat o similaritate în 43% cazuri doar la nivelul polipeptidelor comune pentru toate genotipurile studiate. La *M. spicata* s-au evidențiat trei componente, cu masă moleculară joasă – 14,15; 16,11 și 20,08 kDa, specifice acestei forme, ceea ce demonstrează o variabilitate caracteristică formei spontane.

Fracționarea extractului proteic sumar prin cromatografie schimbătoare de ioni, cu anionit puternic Q-Sepharose în calitate de matrice, a pus în evidență trei fracții, care se deosebesc prin sarcină electrică: bazice (pozitivă), acide (negativă) și neutre (Fig.5).

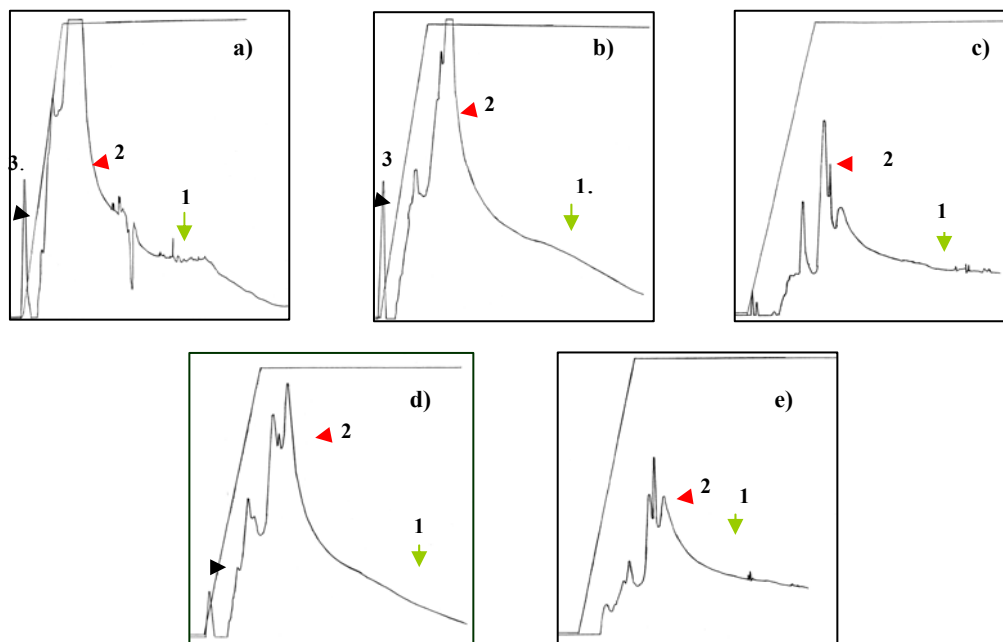


Fig.5. Cromatogramele proteinelor sumare la genotipurile de mentă La-21 (a), MS41-M4 (b), *M. spicata* (c), 120-11 (d) și 11P-310 (e):

1 – proteine cu sarcină negativă; 2 – proteine neutre; 3 – proteine cu sarcină pozitivă.

Proteinele cu sarcină pozitivă, fiind respinse de substrat, sunt spălate din coloană primele și se prezintă în fața liniei ce indică gradientul. Cele cu sarcină negativă cu o afinitate puternică de substrat, reprezentate printr-o linie ascendentă, prezintă majoritatea din totalitatea proteinelor, iar cele neutre (linia în descreștere) sunt reprezentate de fracții minore.

După gradul de similaritate a cromatogramelor, genotipurile studiate au fost divizate în 3 grupuri. În grupul I au fost incluși hibridii La-21 și MS41-M4, care s-au evidențiat prin 4 populații de proteine, dintre care una cu sarcină pozitivă. Grupul II a inclus *M. spicata* cu 6 picuri principale, iar hibridii 120-11 și 11P-310, cu câte 7 picuri de proteine cu sarcină neutră și numeroase picuri cu sarcină negativă, au fost atribuiți grupului III.

Concluzii

- ✓ Formele ce se deosebesc prin origine și aspectul morfologic (120-11 și *M. spicata*; MS41-M4 și 11P-310) acumulează ulei cu o compoziție similară (predomină carvona 60-65% și, respectiv, mentolul 58-70%).
- ✓ Analiza SDS-PAGE a relevat 30 de componenți polipeptidici cu mase moleculare relative incluse în intervalul 14,15–90,0 kDa, care au demonstrat heterogenitate moleculară în medie de 43%.
- ✓ Profilul proteic SDS-PAGE și cel obținut prin cromatografie schimbătoare de ioni au relevat același nivel de polimorfism, care a pus în evidență similaritatea genotipurilor La-21 și MS41-M4 și a formei spontane *M. spicata* cu hibridii 120-11 și 11P-310.
- ✓ Specia spontană, spre deosebire de celelalte genotipuri investigate, s-a evidențiat prin corelație negativă dintre parametrii morfologici și ponderea terpenoidului principal – carvona. De remarcat că același genotip se distinge și printr-un polimorfism proteic mai pronunțat.

Referințe:

1. Al-Rawashdeh I. Molecular taxonomy among *Mentha spicata*, *Mentha longifolia* and *Ziziphora tenuior* populations using the rapid technique // Jordan Journal of Biological Sciences, 2011, vol.4, no 2, p.63-70.
2. Arhip L., Pisov M., Ciobanu V., Peleah E. Caracteristica hibridilor perspectivi de mentă // Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”, 1998, p.154-161.
3. Badr A. et al. Genetic diversity among mentha populations in Egypt as reflected by morphological and protein electrophoretic variations // Proceedings of Egypt. & Syr. Congress For Agric.& Food, El Minia, 2003, vol. J, no J, p.269-286.
4. Baes P, Custsem V. Electrophoretic analysis of eleven isozyme system and their possible use as biochemical markers in breeding chicory (*Chichorium intybus* L.) // Plant Breed V, 1993, vol.110, p.16-23.
5. Bohlmann J., Martin N., Oldham J., Gershenzon J. Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/E-β-ocimene synthase // Arch. Biochem. Biophys., 2000, vol.375, p.261-269.
6. Fenwick A.L., Ward S.M. Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint // Hortscience, 2001, vol.36, p.761-764.
7. Gobert V., Moja S., Colson M., Taberlet P. Hybridization in the section *Mentha* (*Lamiaceae*) inferred from AFLP markers // American Journal of Botany, 2002, vol.89, no.12, p.2017-2023.
8. Kumar P., Gupta V., Misra A. et al. Potential of molecular markers in plant biotechnology // Plant Omics Journal, 2009, vol.2. no 4, p.141-162.
9. Lodish H., Scott M.P., Matsudaira P., Darnell J., Zipursky L., Kaiser C.A., Berk A., Krieger M. Molecular Cell Biology. 5th Edition, W.H. Freeman Publisher, 2003.
10. Mohan M., Nair S. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants // Molecular Breeding, 1997, vol.3, p.87-103.
11. Reva V., Ciobanu V., Mueller-uri F. Strategia și tactica izolării și purificării proteinelor. - Chișinău, 2001, p.93-134.
12. Sharafi S., Rasooli I., Owlia P. et al. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials // Pharmacogn Mag., 2010, vol.6, no 23, p.147-153.
13. Soković M., Vukojević J., Marin P., Brkić D., Vajs V. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities // Moleculare, 2009, vol.14, p.238-249.
14. Sousa P., Linard C., Azevedo-Batista D., Oliveira A.C. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice // Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2009, vol.42, p.655-659.
15. Zineb E. et al. GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* // Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2010, vol.6, no 3, p.191-198.
16. Горяев М.И., Плива И. Методы исследования эфирных масел. - Алма-Ата, 1962.
17. Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. и др. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Том 1. - Москва: Колос, 1993.

Prezentat la 06.07.2012