

TÉCNICA DE EXTRAÇÃO E ELETROFORESE DE ISOENZIMAS DE *Anadenanthera peregrina* Speg.



Luciano Arruda RIBAS

Prof. Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal (FAEF)

Acelino Couto ALFENAS

Prof. Titular Universidade Federal de Viçosa (UFV)

RESUMO

Desenvolveu-se metodologia de eletroforese horizontal de isoenzimas em gel de amido 13% para a espécie arbórea *Anadenanthera peregrina* Speg. (angico vermelho). Compararam-se dois tampões para a extração das enzimas obtidas de folhas jovens e de sementes pré-germinadas; sendo estes combinados a quatro diferentes tampões gel/eletrodo e quinze enzimas: ACP, ADH, EST, F-EST, DIA, GDH, GOT, IDH, LAP, MDH, PGI, PGM, PO, SKDH e SOD. O estudo demonstrou que, extraindo-se enzimas de sementes pré-germinadas, sem discriminação quanto ao tampão de extração, deve-se optar pela revelação da ADH, EST, DIA, GDH, GOT, IDH, SKDH, SOD, EST-f. Por outro lado, folhas jovens são a melhor opção para DIA, PGM, PO. Como sistema tampão gel/eletrodo, deve-se optar pelo tris-citrato/borato de lítio, pH 8,1/8,6.

Palavras chave: isoenzimas, angico vermelho, protocolo

ABSTRACT

Desenvolveu-se metodologia de eletroforese horizontal de isoenzimas em gel de amido 13% para a espécie arbórea *Anadenanthera peregrina* Speg. (angico vermelho). Compararam-se dois tampões para a extração das enzimas obtidas de folhas jovens e de sementes pré-germinadas; sendo estes combinados a quatro diferentes tampões gel/eletrodo e quinze enzimas: ACP, ADH, EST, F-EST, DIA, GDH, GOT, IDH, LAP, MDH, PGI, PGM, PO, SKDH e SOD. O estudo demonstrou que, extraindo-se enzimas de sementes pré-germinadas, sem discriminação quanto ao tampão de extração, deve-se optar pela revelação da ADH, EST, DIA, GDH, GOT, IDH, SKDH, SOD, EST-f. Por outro lado, folhas jovens são a melhor opção para DIA, PGM, PO. Como sistema tampão gel/eletrodo, deve-se optar pelo tris-citrato/borato de lítio, pH 8,1/8,6.

Keywords: isozyme, angico vermelho, protocolo

1 . INTRODUÇÃO

Com a introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas, nos meados da década de 60, iniciou-se um fascinante e rápido desenvolvimento nos estudos de genética por permitir a análise direta da variação na sequência do DNA. Hoje, um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo, por meio de diversas técnicas de biologia molecular. Dentre esses, a análise de isoenzimas tem sido usada para estudos de taxonomia, fisiologia e genética de plantas, animais e microrganismos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Para a aplicação da técnica de eletroforese de isoenzimas em seus diversos usos, é necessário realizar a adequação da sua metodologia para a espécie que se pretende estudar. A adequação visa escolher o tecido vegetal a ser macerado para obtenção das enzimas, o tampão de extração ideal para preservar a idoneidade das enzimas extraídas, o sistema-tampão gel/eletrodo e os sistemas enzimáticos. A adequação de todas estas variáveis metodológicas são responsáveis por se conseguir uma perfeita corrida eletroforética envolvendo boa migração das enzimas através da matriz, atividade e resolução de bandas satisfatórias para a análise dos zimogramas. Assim, este trabalho objetivou adaptar metodologia de extração e eletroforese de isoenzimas para a espécie arbórea *Anadenanthera peregrina* Speg. (angico vermelho).

2 . MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com CARVALHO (1994), *Anadenanthera peregrina* Speg. é espécie arbórea da família Mimosaceae, perenifólia a semicaducifólia, que ocorre entre as latitudes 04oS (CE) a 24o20' S (Telêmaco Borba-PR), no Brasil. É espécie secundária inicial, rústica e de rápida germinação; podendo ser plantada em povoamentos puros a pleno sol e em plantios misto, apresentando crescimento moderado a rápido, chegando a produzir até 25,55 m³/ha.ano. Pode ser utilizado para mourões (aos 5 anos), lenha e carvão (6 anos) e madeira (20 a 25 anos). Além de ser útil na medicina caseira, como planta apícola e forrageira,

também é indicada como planta ornamental e recomendada na reposição de mata ciliar e em sistemas silvipastoris. Visando determinar as melhores combinações de sistemas tampão gel/eletrodo e os sistemas isoenzimáticos com melhor atividade e resolução, utilizaram-se dois tampões de extração, quatro sistemas tampão gel/eletrodo e 15 enzimas, testados para os extratos obtidos da maceração de dois diferentes tecidos vegetais.

A composição dos tampões está relacionada no rodapé da tabela 1. As enzimas foram extraídas de folhas jovens de mudas com 110 dias e de sementes pré-germinadas em papel de filtro (plântulas de 4 dias). Todo o procedimento de extração das enzimas seguiu as recomendações de ALFENAS et al. (1998). Os quatro sistemas tampão gel/eletrodo utilizados correspondendo aos sistemas 9, 16, 20 e 26 descritos em ALFENAS e BRUNE (1998). Os tecidos, tampões de extração e sistemas tampão gel/eletrodo foram testados para as enzimas ACP (fosfatase ácida), ADH (álcool desidrogenase), EST (esterase), F-EST (esterase fluorescente), DIA (diaforase), GDH (glutamato desidrogenase), GOT (glutamato-oxaloacetato transaminase), IDH (isocitrato desidrogenase), LAP (leucina aminopeptidase), MDH (malato desidrogenase), PGI (fosfoglucoose isomerase), PGM (fosfoglucomutase), PO (peroxidase), SKDH (xiquimato desidrogenase) e SOD (superóxido dismutase). Detalhes sobre cada uma das enzimas, bem como as soluções e metodologia para revelação podem ser obtidos em BRUNE et al. (1998).

Os procedimentos de preparo do gel, aplicação das amostras e eletroforese, corte do gel em fatias, revelação das enzimas e secagem dos géis, seguiram a metodologia descrita por ALFENAS e BRUNE (1998). Para avaliação dos resultados atribuíram-se notas de acordo com a atividade e resolução de bandas de cada amostra, resultantes da combinação do tampão de extração, tecido macerado, sistema tampão gel/eletrodo e sistemas enzimáticos testados. Para tanto, atribuiu-se nota 0 para ausência de atividade e resolução, nota 1 para atividade e resolução satisfatórias e nota 2 para presença de atividade, mas pobre resolução.

3 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

As notas para atividade e resolução indicadas às possíveis combinações entre tecidos, tampão de extração, tampão gel/eletrodo e enzima revelada para *Anadenanthera peregrina* estão apresentadas na Tabela 1. Obtiveram-se melhores resultados no uso do extrato obtido de sementes pré-germinadas. Este resultado pode estar relacionado à influência do clima na atividade enzimática nos tecidos macerados e/ou à concentração de substâncias fenólicas nas folhas.

Dentre os tampões de extração, de forma geral, não houve grande distinção entre as opções testadas. O sistema tampão gel/eletrodo III apresentou melhores resultados.

TABELA 1 - Avaliação da atividade/resolução de 15 enzimas, em quatro sistemas-tampão gel/eletrodo (I, II, III e IV), dois tampões de extração (A e B) e dois tecidos vegetais para a espécie angico vermelho (*Anadenanthera peregrina*).

Enzima	Folhas Jovens				Sementes Pré-germinadas			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
	A B	A B	A B	A B	A B	A B	A B	A B
ACP	0 0	0 0	0 0	2 2	0 2	0 0	0 0	0 0
ADH	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1	1 1	1 1	2 2
EST	0 0	2 2	2 2	0 0	2 2	0 0	1 1	2 2
DIA	0 0	0 0	1 0	0 0	2 2	0 0	1 1	1 1
GDH	0 0	0 0	0 0	2 0	0 0	1 1	1 1	1 1
GOT	0 0	0 0	0 0	0 0	2 2	0 0	1 1	2 2
IDH	2 0	0 0	0 0	2 0	1 1	0 0	0 0	2 2
LAP	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 2	2 2
MDH	2 0	0 0	0 0	2 2	0 0	0 0	0 0	0 0
PGI	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 2	0 0	0 0
PGM	2 0	0 0	1 0	0 0	2 2	0 0	2 2	0 0
PO	2 2	1 1	1 1	1 1	2 2	0 0	0 0	2 2
SKDH	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1	0 0	0 0	2 2
SOD	0 0	1 0	0 0	0 0	2 2	2 2	1 1	0 0
EST-F	0 0	2 0	0 0	0 0	X X	1 1	1 1	2 2

Atividade e Resolução: 0 - ausência de atividade e/ou resolução, 1 -atividade e resolução satisfatórias, 2 - presença de atividade, mas resolução insatisfatória, X - não testado. Composição dos **sistemas gel/eletrodo:** sistema I - morpholina-citrato, pH 7,1/6,1, sistema II - tris-citrato/sódio-borato, pH 7,5/8,6 (CHELIAK & PITEL, 1984), sistema III - tris-citrato/lítio-borato, pH 8,1/8,6 (MORAN & BELL, 1983) e sistema IV - histidina-HCl/tris-citrato, pH 7,0/7,0 (HAKIM-ELAHI, 1980). Composição dos **tampões de extração:** A - fosfato de sódio bibásico (0,034M), sucrose (0,2M), PVP-40 (2,56%), DTT (3mM), L-ascorbic acid (5,7mM), DIECA (5,8Mm), sodium bisulfite (2,6mM), BORAX (2,5mM), 2-mercaptoetanol (0,2%), polietilenoglicol-6000 (1%); e B - sodium borate 0,05M, DTT e PVP40, pH 9,0.

A grande distinção da atividade e resolução enzimática quanto ao tecido vegetal macerado é ilustrado na Figura 1. Já a importância de se testar diferentes soluções de extração está ilustrada na Figura 2.

Figura 1 - Atividade e resolução da enzima ADH, no sistema tampão gel/eletrodo III e tampão de extração B, variando em função do tecido vegetal.

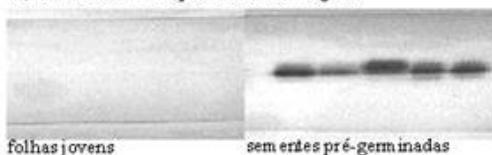
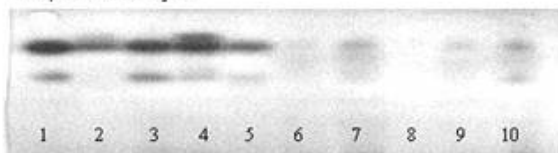


Figura 2 - Atividade e resolução da enzima PGM, obtida de folhas jovens, no sistema gel/eletrodo III, variando com o tampão de extração.



Amostras de 1 a 5 - Tampão de extração A
Amostras de 6 a 10 - Tampão de extração B

Na maioria dos zimogramas não houve formação de bandas, ou seja, não foram detectadas enzimas nos géis. Por outro lado, foram verificados muitos borrões nos géis, indicando atividade enzimática, sem resolução das bandas. Pode-se optar por tentar obter melhor resolução, manipulando-se o volume de tampão de extração utilizado em relação à quantidade de tecido macerado, com um estudo da posição das fatias nos géis ao serem reveladas, uso de outros tecidos na obtenção das enzimas e outras variáveis que influenciam a migração e resolução das bandas.

4 . CONCLUSÕES

Sementes pré-germinadas de angico vermelho (*Anadenanthera peregrina*) podem ser usadas para se analisar as enzimas ADH, EST, DIA, GDH, GOT, IDH, SKDH, SOD, EST-f. Por outro lado, folhas jovens de mudas desta espécie são a melhor opção para DIA, PGM, PO. O sistema tampão gel/eletrodo mais indicado para as análises de eletroforese de isoenzimas da espécie é o tris-citrato/lítio-borato (pH 8,1/8,6), por oferecer mais opções quanto aos sistemas enzimáticos.

5 . REFERÊNCIAS

ALFENAS, C.A.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J.R.; ALONSO, S.K.; SCORTICNHINI, M. **Extração de proteínas para eletroforese.** In: ALFENAS, A.C. (editor). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, p.85-114, 1998.

ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. **Eletroforese em gel de amido.** In: ALFENAS, A.C. (editor). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, p.115-150, 1998.

ALFENAS, A.C., PETERS-ROBINSON, I., BRUNE, W. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa, MG: SIF, 1991, 242p.

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C.; JUNGHANS, T.G. **Identificações específicas de enzimas em géis.** In: ALFENAS, A.C. (editor). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, p.200-328,

1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA-CNPQ/SPI 1994, 640p.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995, 220p.
