

Nº 12, dez/98, p.1-4



PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO ISOENZIMÁTICA PARA A PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervum*)

Marcelo Nascimento de Oliveira¹

No Brasil, como em outros países de clima tropical, uma exploração puramente extrativista vem sendo empregada para as espécies nativas. A extinção dessas espécies carrega informações importantes no que concerne às particularidades genéticas das populações e ao potencial de exploração das espécies nativas para viabilizar a utilização em prol das comunidades locais. Neste contexto, tornam-se necessárias pesquisas sobre a estrutura e variabilidade genética de espécies extrativistas tradicionais e/ou de potencial ecológico e econômico, que deverão contribuir para a definição de novos rumos do extrativismo e manejo florestal.

A pimenta longa (*Piper hispidinervum*) é uma planta de alta rusticidade, podendo formar populações de grande densidade em áreas de capoeira, onde domina perante as demais espécies. Muitas excursões científicas foram realizadas pela Amazônia brasileira, sendo possível somente localizar indivíduos desta espécie em algumas regiões do Estado do Acre e em áreas de fronteiras da Bolívia e do Peru.

O interesse maior destinado a essa espécie é a produção de um óleo essencial rico em safrol. Na Amazônia brasileira, esta planta nativa conhecida como pimenta longa apresenta-se como a única alternativa viável no fornecimento do safrol. Com a descoberta desta nova fonte de safrol, a tendência da demanda e produção é aumentar, favorecendo a criação de um mercado seguro e estável. Considerando o alto valor comercial do safrol, bem como a ocorrência natural de pimenta longa no Acre, esta espécie poderá constituir-se em mais uma alternativa econômica de produção para os pequenos, médios e grandes produtores do Estado.

Sendo uma espécie pouco conhecida geneticamente, desenvolveu-se um protocolo de análise isoenzimática com o objetivo de avaliar a estrutura genética e distribuição da variabilidade genética entre as populações nativas da espécie, visando traçar uma estratégia de coleta de material vegetal mais adequada para conservação da variabilidade *ex situ* e detectar populações superiores com relação aos teores de safrol, rendimento em base livre de umidade, resistência a pragas e/ou doenças e outros parâmetros de interesse.

METODOLOGIA

O referido protocolo foi desenvolvido e adaptado no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), localizado na USP-ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), em Piracicaba - SP.

Solução extratora: SOLTIS 3 completa foi a que melhor se comportou com relação aos padrões de banda revelados. Na extração do material, utilizou-se nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana para melhor maceração do tecido foliar.

¹ Eng.-Agr., M.Sc., Embrapa Acre, Caixa Postal 392, 69908-970, Rio Branco AC.

Solução extratora SOLTIS 3:

100 mM de TRIS – HCl ou TRIS Maleato (tampão), pH 7,5
 7% de sacarose (w/v)
 10% de PVP-40 (w/v)
 14 mM de mercaptoetanol (0,1% v/v)
 250 mM de ácido ascórbico, Na salt
 20 mM de DIECA (diethyldithiocarbamate)
 1,0% de Bovine Serum Albumine (w/v)
 20 mM de Metabissulfito de Sódio
 200 mM de Tetraborato de sódio (bórax)

Fonte: Soltis & Soltis (1989).

Obs.: Acrescentar o mercaptoetanol somente na solução a ser utilizada, não armazenar a solução com este produto.

Sistemas enzimáticos: Foram testados 16 sistemas enzimáticos para a espécie (6PGDH, ADH, α -EST, CAT, ME, ACP, PGM, PGI, G2DH, GOT, IDH, LAP, MDH, PO, SDH, SKDH), sendo que somente quatro são recomendados para utilização devido à constância no padrão de bandas e facilidade na interpretação e avaliação dos alelos apresentados.

Nos sistemas MDH e 6PGDH, houve a presença de duas zonas de atividade enzimática formadas por dois locos, sendo um monomórfico (na região catódica do gel), apresentando apenas um alelo (fixado) e outro loco polimórfico contendo duas subunidades (enzima dimérica) na região anódica do gel. Nos sistemas IDH e SKDH revelou-se apenas uma região com atividade enzimática, formada por um loco polimórfico contendo duas subunidades (enzima dimérica) (Fig. 1).

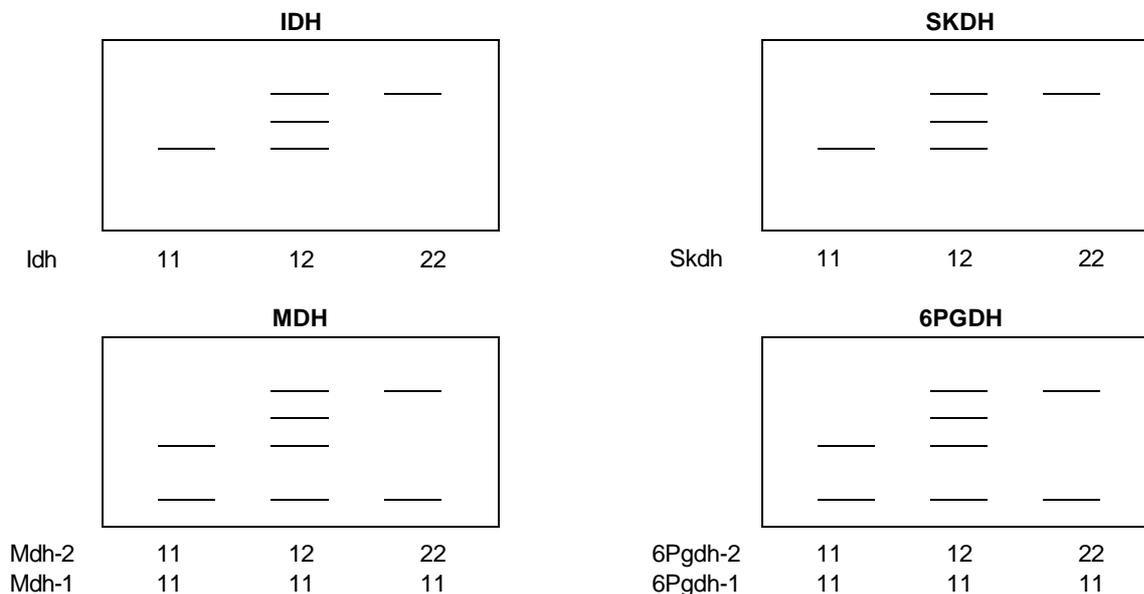


FIG.1. Representação esquemática dos fenótipos observados nos zimogramas de *Piper hispidinervum*, nos locos Mdh-1, Mdh-2, 6Pgdh-1, 6Pgdh-2, Idh-1 e Skdh-1, juntamente com seus respectivos genótipos. 1998.

Na Tabela 1 encontram-se os protocolos de preparo das soluções de revelação dos sistemas enzimáticos selecionados para a espécie ora estudada. Estes protocolos foram adaptados dos usualmente utilizados no LARGEA (Ferraz et al., 1996).

TABELA 1. Sistemas enzimáticos utilizados para o estudo genético de *Piper hispidinervum*. ESALQ/USP. 1998.

Tampão	MDH	6PGDH	IDH	SKDH
Tampão TRIS-HCl 0,1M, pH 8,5	50 ml	-----	-----	-----
Tampão TRIS-HCl 0,1M, pH 8,0	-----	50 ml	-----	50 ml
Tampão TRIS-HCl 0,1M, pH 7,5	-----	-----	50 ml	-----
Substrato	DL-ácido málico 0,5, pH 8,0 1 ml	Ácido 6-fosfogluconico 20 mg	DL-ácido isocítrico, Na ₃ 100 mg	Ácido xiquímico 70 mg
Catalisador MgCl ₂ 0,1 M	-----	1 ml	1 ml	-----
Cofator	NAD ⁺ , Na ₂ – 10 mg	NADP ⁺ , Na ₂ – 10 mg	NADP ⁺ , Na ₂ – 10 mg	NADP ⁺ , Na ₂ – 10 mg
PMS	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg
MTT	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg

Sistema de tampão eletrodo/gel: O sistema de tampão eletrodo/gel Citrato Morfolina (CM) para eletroforese de isoenzimas em *Piper hispidinervum* comportou-se melhor para a resolução dos sistemas de coloração selecionados. O referido sistema consta do seguinte:

Tampão eletrodo: Ácido cítrico 0,04M (8,40 g/l). Titular com morfolina até pH 6,1.

Tampão gel: 50 ml do tampão eletrodo para 950 ml de água destilada (1:20).

Fonte: Sebbenn (1997), adaptado pelo autor.

Preparo do gel: O gel utilizado constou de uma mistura de 30 g de penetrose de milho e 16 g de amido de batata, juntamente com 350 ml da solução do tampão gel CM.

Condições de corrida do gel: As amostras foram dispostas no gel e submetidas por 30 minutos a uma corrente elétrica de 150 V na fonte ou até 15 V no gel. Após este período, os wicks são retirados e aumenta-se a corrente elétrica até 300 V na fonte ou até 25 V no gel, por até 12 horas.

Revelação das bandas: Após a corrida do gel, este pode ser cortado em até 6 fatias e, em cada uma, submete-se solução reveladora dos sistemas enzimáticos selecionados (Tabela 1). As fatias do gel são dispostas em recipientes de porcelana, cobertos com tampas que evitam a entrada de luz e incubados em estufa de ventilação forçada a 37 °C.

Observação: Sugere-se proceder à leitura das bandas reveladas nos géis logo após sua coloração, para evitar dúvidas quanto à posição das bandas.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece o professor titular da ESALQ-USP Paulo Y. Kageyama pela disponibilidade na utilização do LARGEA para as análises efetuadas, bem como nas discussões técnicas durante o decorrer do trabalho; aos funcionários e estudantes de pós-graduação do LARGEA, que não mediram esforços no apoio logístico e nas discussões técnicas para enriquecimento do trabalho; à estudante de Agronomia da UFAC Laucieny Santana de Barros e ao agrônomo Marcos Rocha da Silva pelo auxílio na coleta de folhas de pimenta longa para o trabalho; à Embrapa e ao Conselho Britânico pelo financiamento da pesquisa desenvolvida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERRAZ, E.M.; LACERDA, C.M.B.; GANDARA, F.B.; REIS, M.S.; CUNHA, N.L.; KAGEYAMA, P.Y. **Eletroforese de isoenzimas para espécies arbóreas**: manual do laboratório de reprodução e genética de espécies arbóreas. Piracicaba: ESALQ-USP, 1996. 73p.

SEBBENN, A.M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas**. Piracicaba: USP-ESALQ, 1997. 108p. Tese Mestrado.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S., eds. **Isozymes in plant biology**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1989. 268p. (Advances in Plant Sciences Series, v.4).

