

Foto: Juliana Martins Ribeiro



Adaptação de um protocolo para extração do fluido de lavagem intercelular (FLI) de plantas de *Vigna unguiculata*

Juliana Martins Ribeiro¹
Eduardo Alves Gamosa de Oliveira²
Kátia Valevski Sales Fernandes³
Márcio dos Santos Teixeira Pinto⁴

Introdução

O ambiente apoplástico corresponde a todo meio existente entre as membranas celulares das células vegetais, constituindo-se do espaço entre membranas juntamente com aquele ocupado pelas paredes celulares. O meio apoplástico é, normalmente, rico em proteínas de defesa, como aquelas ricas em resíduos de hidroxiprolina (WOJTASZEK et al., 1997), inibidores de proteinase serínicas (SEGARRA et al., 2003); quitinases e glucanases β -1,3 (CAWOOD et al., 2010), proteínas comumente relacionadas às defesas contra patógenos. O estudo da fisiologia vegetal pode ter grandes contribuições em outros tipos de análises, como exemplo, a relação da variação do íon ferro no meio apoplástico de plantas de *Beta vulgaris* com carência deste elemento (LARBI et al., 2010).

O fluido de lavagem intercelular (FLI), obtido a partir de ambiente intercelular apoplástico de tecidos

vegetais frescos, é considerado uma fonte apropriada para a investigação de proteínas relacionadas com a defesa de plantas contra patógenos invasivos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi efetuar uma adaptação de um método para extração de fluido de lavagem intercelular de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.) a partir da metodologia empregada para a extração de FLI de plantas de trigo (WÄLTI et al., 2002). A adaptação aqui referida foi a inserção dos procedimentos de diálise e liofilização na metodologia original (WÄLTI et al., 2002), o que promoveu a concentração de macromoléculas tais como proteínas, antes diluídas na metodologia inicial, ao mesmo tempo eliminando contaminantes de baixo peso molecular. Tal procedimento possibilitou a caracterização destas moléculas por análise de eletroforese (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) cujos resultados foram apresentados como palestra durante a 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq (PINTO et al., 2004).

¹ Bióloga, D.Sc. em Produção Vegetal, Embrapa Semiárido, BR 428, km 152, Zona Rural, CEP: 56302-970, Petrolina, PE, e-mail: juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br.

² Bolsista BFT FACEPE, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. e-mail: eduardobio@yahoo.com.br.

³ Pesquisadora Bioquímica de Plantas, Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. e-mail: cowpkat@uenf.br.

⁴ Bolsista DCR FACEPE/CNPq, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, e-mail: marciostp@yahoo.com.br.

Procedimento para a extração de fluido intercelular

- 1) Destacar unifoliatos de feijão-de-corda, com nove dias de idade cultivados em casa de vegetação, por meio de corte em seus pecíolos com uma lâmina nunca antes usada (Figura 1a).
- 2) Realizar um novo corte na região próximo à base foliar (Figura 1b).
- 3) Submergir os unifoliatos no tampão de extração (acetato de sódio 0,14 M pH 5,5; 0,5 M NaCl; Tween 20 0,3% e β -mercaptoetanol 0,02% a 0 °C) com o auxílio de tubos de ensaio preenchidos com água, de forma a mantê-los no fundo de um kitassato que deverá ter sua boca superior fechada com uma rolha de borracha.
- 4) Submeter o sistema a um tratamento de baixa pressão (-5 kPa), fazendo uso de uma bomba de vácuo, por um período de 3 a 5 minutos.

5) Após o tratamento de baixa pressão, os unifoliatos devem ser retirados do meio e cuidadosamente transferidos para seringas de 5 mL (Figura 1c), e estas deverão ser introduzidas em tubos de centrifuga de 15 mL. Nesta etapa, ter o cuidado de dobrar a ponta do unifoliato para o espaço entre a seringa e o tubo para que este não deslize para o fundo do tubo durante a centrifugação (Figura 1d).

6) Submeter os tubos à centrifugação (700 x g, 5 min, 4° C) (Figura 1e).

7) Após a centrifugação, o FLI deverá ser coletado do fundo do tubo de centrifuga, fazendo-se uso de micropipeta (Figura 1f).

8) Após a coleta do FLI, este deverá ser dialisado em sacos de diálise de acetato de celulose, em um Becker com 2.000 mL de água destilada. A água destilada deverá ser trocada a cada 12 horas por três vezes e este procedimento deverá ser efetuado dentro de geladeira (4 °C). Após diálise, o FLI deverá ser concentrado por liofilização.

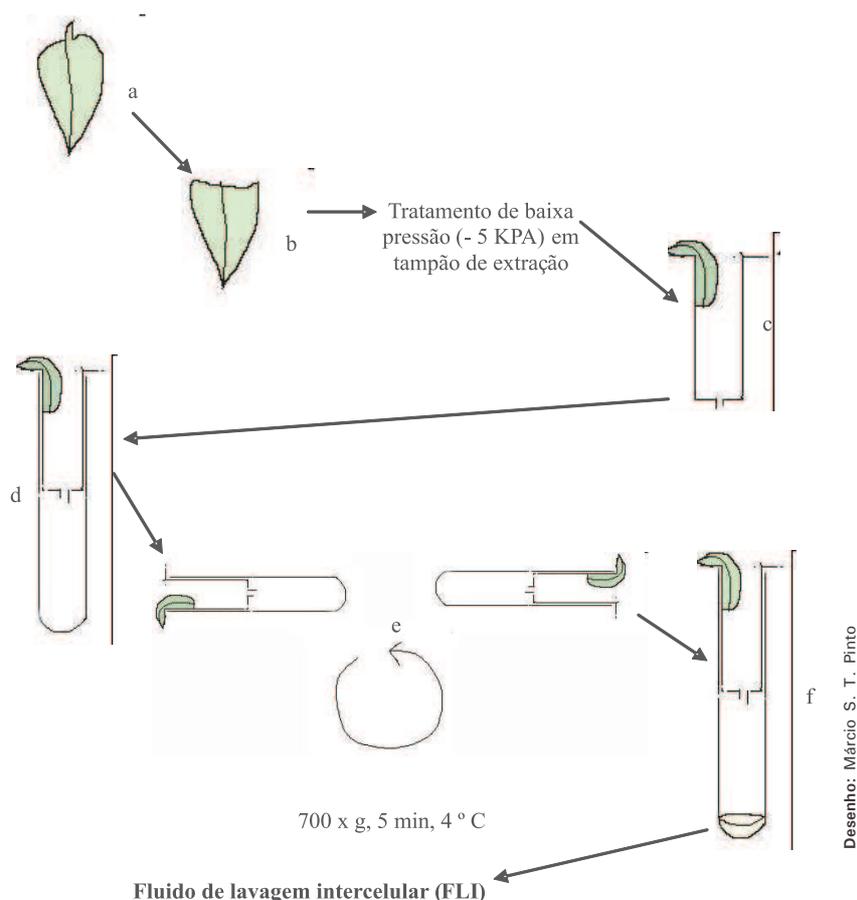


Figura 1. Processo de extração de fluido de lavagem intercelular (FLI). a) Unifoliato de feijão-de-corda; b) unifoliato de feijão-de-corda com corte basal; c) unifoliato acoplado a parte superior de uma seringa; d) seringas do item c dentro de um tubo de centrifuga; e) Centrifugação em baixa rotação; f) FLI obtido no fundo do tubo.

Observações importantes para o procedimento descrito no protocolo de extração do fluido de lavagem intercelular (FLI)

- Após o corte do unifoliato com uma lâmina nova, a parte ferida deve ser lavada exaustivamente com água destilada, de maneira a remover todo material celular presente na área ferida.
- Medidas que minimizem a ruptura do tecido vegetal deverão ser adotadas, evitando-se assim, a contaminação com proteínas do meio intracelular, sendo elas:
 - a) Cautela com a manipulação das partes destacadas, evitando dobramento muito fechado do material e, conseqüentemente, ruptura de tecido.
 - b) Nunca congelar o tecido vegetal antes da extração de FLI. Isso acarreta a ruptura de células e da parede celular através dos cristais de gelo formados, além de alterações do meio apoplástico.
 - c) Manter o material em gelo durante o período de preparação, para minimizar as degradações por autólise.
 - d) Durante o tratamento de baixa pressão, não submeter o material a tempos prolongados ou grandes diferenças de pressões, pois, o tempo e a pressão podem variar em função da rigidez do tecido. Tecidos mais delgados e frágeis, como folhas, exigem menores pressão e tempo de procedimento. Embora não haja uma tabela relacionando os valores de pressão usados para cada espécie vegetal, é possível monitorar o procedimento por meio da ocorrência de substâncias existentes somente no meio intracelular como, por exemplo, a RUBISCO em folhas. A detecção desta enzima em FLI significa que houve ruptura de tecido e um valor menor de pressão deverá ser adotado.
- Durante o tratamento com baixa pressão, a parte abaxial das folhas ou unifoliosos destacados devem ficar, preferencialmente, voltados para cima, permitindo, assim, a saída de ar do tecido. Para folhas que apresentem uma distribuição estomática similar nos dois lados, este procedimento é desnecessário.
- Os unifoliosos devem ser secos com papel toalha limpo antes de serem colocados no topo da seringa.

- Todo o procedimento descrito acima deve ser executado usando-se luvas de látex, para evitar contaminações pelo manuseio.
- Apesar de o material modelo citado ser unifoliato de feijão-de-corda, este procedimento de extração pode ser realizado em diferentes partes da planta, bem como em outras espécies vegetais, desde que sejam feitas adaptações necessárias em função da anatomia destas.
- Análises de micromoléculas presentes em fluido intercelular deverão ser feitas com o extrato obtido diretamente, sem a necessidade de realização de diálise.

Durante o processo de diálise, todas as substâncias contidas no FLI com massas moleculares inferiores a 10.000 Da, tendem a difundir por todo meio aquoso, somente as moléculas de massas moleculares maiores que este valor permanecem no interior do saco de diálise.

Referências

- CAWOOD, M. E.; PRETORIUS, J. C.; WESTHUIZEN, A. J. van der; PRETORIUS, Z. A. Disease development and PR-protein activity in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings treated with plant extracts prior to leaf rust (*Puccinia triticina*) infection. **Crop Protection**, [Amsterdam], v. 29, p. 1.311-1.319, 2010.
- LAEMMLI, L. I. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARBI, A.; MORALES, F.; ABADÍA, F. A.; ABADÍA, J. Changes in iron and organic acid concentrations in xylem sap and apoplastic fluid of iron-deficient *Beta vulgaris* plants in response to iron resupply. **Journal of Plant Physiology**, [London], v. 167, p. 255-260, 2010.
- LOPEZ-MILLAN, A. F.; MORALES F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Iron deficiency associated changes in the composition of the leaf apoplastic fluid from field pear (*Pyrus communis* L.) trees. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 52, p. 1.489-1.498, 2001.
- PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; GOMES, V. M.; MACHADO, O. L. T.; XAVIER FILHO, J.; FERNANDES, K. V. S. Protein from cowpea plants (*Vigna unguiculata*-EPACE-10) is immunorelated to 2s albumins from castor bean (*Ricinus comunis*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 33., 2004, Caxambu. **Programa e resumos...** Caxambu: SBBq, 2004. 1 CD-ROM.

SEGARRA, C.; CASALONGUÉ, C.; PINEDO, M; RONCHI, V.; CONDE R.D. A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. **Journal Experimental Botany**, London, v. 54, p. 1.335-1.341, 2003.

WÄLTI, M.; ROULIN, S.; FELLER, U. Effects of pH, light and temperature on (1->3,1->4)- β -glucanase stability in wheat leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 363-371, 2002.

WOJTASZEK, P.; TRETOWAN, J.; BOLWELL, G. P. Reconstitution *in vitro* of the components and conditions required for the oxidative cross-linking of extracellular proteins in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 405, p. 95-98, 1997.

Comunicado Técnico, 141

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<http://www.cpsata.embrapa.br>
 Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:
 Embrapa Semiárido
 Endereço: C.P. 23, 56302-970, Petrolina, PE
 Fone: (87) 3862-1711
 Fax: (87) 3862-1744
sac@cpsata.embrapa.br

1ª edição (2010): Formato digital

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Comitê de publicações

Presidente: *Maria Auxiliadora Coêlho de Lima.*
Secretário-Executivo: *Josir Laine Aparecida Veschi.*
Membros: *Daniel Terao.*

Tony Jarbas Ferreira Cunha.
Magna Soelma Bezerra de Moura.
Lúcia Helena Piedade Kiill.
Marcos Brandão Braga.
Gislene Feitosa Brito Gama.
Mizael Félix da Silva Neto.

Expediente

Supervisor editorial: *Sidinei Anunciação Silva.*
Revisão de texto: *Sidinei Anunciação Silva.*
Tratamento das ilustrações: *Nivaldo Torres dos Santos.*
Editoração eletrônica: *Nivaldo Torres dos Santos.*