

LECTINAS DE SEMENTES COMO MARCADORES TAXÔNICOS DA TRIBO DIOCLEAE

José Tadeu Abreu de Oliveira¹
Benildo Sousa Cavada¹
Jorge Luiz Martins²
João André Jarenkow²
Ilka Maria Vasconcelos¹
Renato de Azevedo Moreira¹

RESUMO – Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas solúveis extraídas de sementes de doze espécies da tribo *Diocleae*, apresenta padrão qualitativo semelhante no que diz respeito às bandas correspondentes às lectinas, sugerindo a possibilidade de seu uso como marcadores taxonômicos.

Palavras-chave: Lectinas, taxonomia, *Canavalia*, *Dioclea*.

ABSTRACT – Polyacrylamide gel electrophoresis of the soluble proteins extracted from seeds of twelve species belonging to the tribe *Diocleae* showed substantive qualitative pattern similarities between the bands correspondent to the lectins.

Key words: Lectins, taxonomy, *Canavalia*, *Dioclea*.

Introdução

A tribo Diocleae, da família das Leguminosas, possui oito gêneros englobando mais de 100 espécies (Harborne *et al.*, 1971). Suas sementes têm morfologia diversificada e apresentam dentre suas proteínas uma classe que se distingue por mediar a aglutinação de hemácias de vários animais (Hague, 1975; Moreira e Cavada, 1984; De Oliveira *et al.*, 1990). Esta atividade biológica é inibida pelos açúcares simples como manose, glicose e seus derivados, sendo estas proteínas, portanto, classificadas como lectinas (Kocourek e Horejsi, 1983). Quando purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida na

1 – Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará – Caixa Postal 1065, CEP 60001, Fortaleza, Ceará.

2 – Departamento de Química Analítica e de Botânica – Universidade Federal de Pelotas – Campus da UFPel, CEP 96100, Pelotas, Rio Grande do Sul.

presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), apresentam três bandas características de pesos moleculares aparentes de 12, 18 e 26 KDaltons, respectivamente (Hague, 1975; Moreira e Cavada, 1984; De Oliveira *et al.*, 1990).

Embora a função fisiológica destas proteínas seja desconhecida, estudos acerca do seu metabolismo durante a germinação das sementes têm sugerido que elas desempenham papel importante durante o estabelecimento da planta (Kocourek e Horejsi., 1983) e testes imunoquímicos têm demonstrado uma grande semelhança entre elas. Analisados conjuntamente, estes dados acima indicam que durante a evolução das espécies pertencentes à tribo *Diocleae* poucas modificações a nível molecular ocorreram com estas lectinas. A lectina extraída de sementes de *Dioclea grandiflora*, por exemplo, apresenta cerca de 78% de homologia no que diz respeito a sua estrutura primária comparada com a Con A, a lectina extraída de sementes de *Canavalia ensiformis* (Richardson *et al.*, 1984). No presente trabalho o padrão eletroforético apresentado pelas lectinas de várias espécies da tribo *Diocleae* foi examinado com a finalidade de se verificar se as lectinas presentes nessas sementes podem ser usadas como marcadores taxonômicos.

Material e Métodos

Sementes foram coletadas em várias regiões do Estado do Ceará, Brasil e classificadas pelo setor de taxonomia vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Preparação das amostras. As farinhas foram preparadas triturando-se as sementes, desprovidas de seus tegumentos, em moinho de café marca Krups 50. Amostras de farinha (10 mg) de 7 espécies do gênero *Canavalia* e de 5 espécies do gênero *Dioclea*, ou das lectinas (2 mg) de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea grandiflora* purificadas como já descrito anteriormente (Moreira e Cavada, 1984; Moreira *et al.*, 1983) foram tratadas com 1,0 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, contendo 1% de SDS e 1% de betamercaptoetanol e incubadas a 100°C por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 5000 x g, a 4°C por 20 minutos e os sobrenadantes, após adição de sacarose (10%) e azul de bromofenol (1%) foram usados para a eletroforese das proteínas.

Eletroforese. A eletroforese foi desenvolvida em gel de poliacrilamida de acordo com método já descrito (Laemmli, 1970). O gel de aplicação continha acrilamida a 3,95% e o gel de corrida a 17,6%. A corrente aplicada foi de 25 mA durante 5 horas. As bandas de proteínas foram evidenciadas por coloração com "Coomassie Brilliant Blue R-250" (Laemmli, 1970).

Resultados e Discussão

Os resultados das eletroforeses das proteínas extraídas das farinhas das sete espécies do gênero *Canavalia* (*C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *C. gladia-*

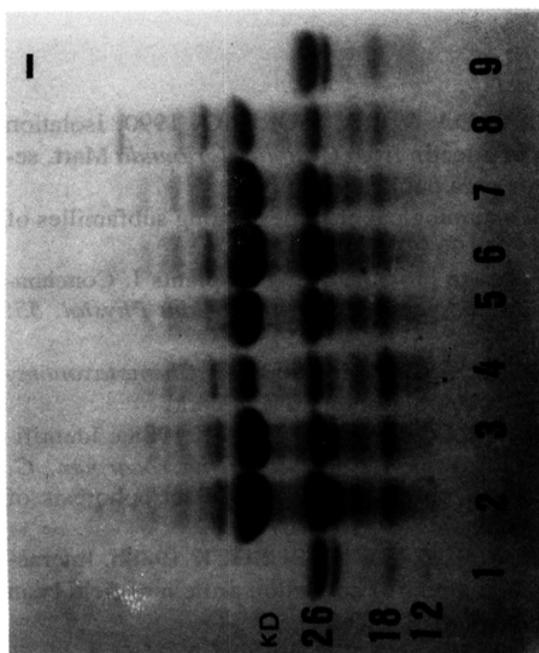


Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas solúveis de sete espécies do gênero *Canavalia*. Amostras: 1 e 9, lectina de *Canavalia brasiliensis*; 2 a 8, proteínas de farinha de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *C. gladiata*, *C. gladiata* var. *gladiata*, *C. dictyota*, *C. plagioperma* e *C. bicarinata*, respectivamente.

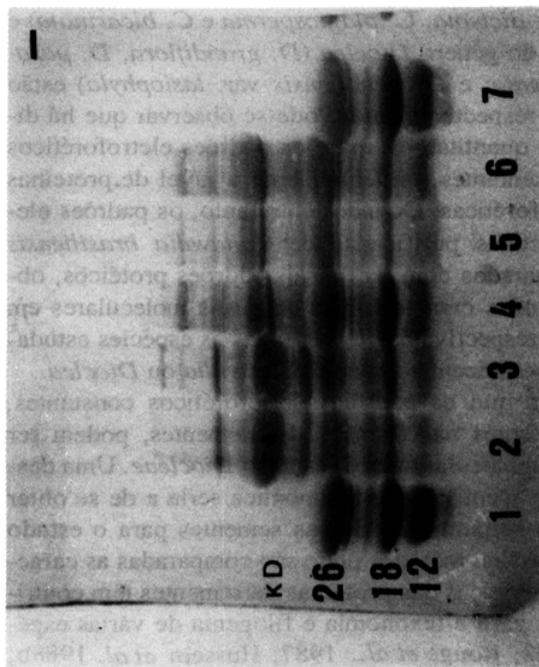


Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas solúveis de cinco espécies do gênero *Dioclea*. 1 e 7, lectina de *Dioclea grandiflora*; 2 a 6, proteínas de farinha de *D. grandiflora*, *D. paraguariensis*, *D. rotata*, *D. virgata* e *D. guianensis* var. *lasyophylla*, respectivamente.

ta, *C. gladiata* var. *gladiata*, *C. dictyota*, *C. plagiosperma* e *C. bicarinata*) e das farinhas das cinco espécies do gênero *Dioclea* (*D. grandiflora*, *D. paraguariensis*, *D. rostrata*, *D. virgata*, e *D. Guianensis* var. *lasiophyla*) estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Pode-se observar que há diferenças tanto qualitativas como quantitativas entre os padrões eletroforéticos apresentados pelos vários representantes, principalmente a nível de proteínas com menores mobilidades eletroforéticas. Quando, entretanto, os padrões eletroforéticos obtidos para as lectinas purificadas de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea grandiflora* são comparados com os demais padrões protéicos, observa-se a presença das três bandas características de pesos moleculares em torno de 12, 18 e 26 KDaltons, respectivamente, em todas as espécies estudadas, independentemente se elas pertencem ao gênero *Canavalia* ou *Dioclea*.

Estas observações sugerem que os padrões eletroforéticos constantes, apresentados pelas lectinas presentes nas farinhas das sementes, podem ser usados como uma característica molecular dentro da tribo *Diocleae*. Uma desvantagem deste procedimento de identificação taxonômica seria a de se obter plantas já frutificando, de onde seriam coletadas as sementes para o estudo (Hussain et al., 1988a). Mesmo assim, métodos onde são comparadas as características físico-químicas e imunológicas das proteínas de sementes têm contribuído com valiosas informações para a taxonomia e filogenia de várias espécies (Jensen e Fairbrothers, 1983; Rouge et al., 1987; Hussein et al. 1988b; Esen e Hilu, 1989).

Referências Bibliográficas

- DE OLIVEIRA, J.T.A., B.S. CAVADA & R.A. MOREIRA 1990. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. *Rev. Brasil. Bot.*, (aceita para publicação).
- ESEN, A. & K.W. HILU 1989. Immunological affinities among subfamilies of the *Poaceae*. *Amer. J. Bot.* 76: 196-203.
- HAGUE, D.R. 1975. Studies of storage proteins of higher plants I. Concavalin A from three species of the genus *Canavalia*. *Plant Physiol.* 55: 636-642.
- HARBORNE, J.B., D. BOULTER & B.L. TURNER 1971. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press, London, New York.
- HUSSAIN, A., H. RAMIREZ, W.M. ROCA, & W. BUSHUK 1988a. Identification of cultivars of pasture legumes (*Centrosema macrocarpum*, *C. pubescens* and *C. sp.n*) by acid polyacrylamide gel electrophoresis of cotyledon storage proteins. *Euphytica* 39: 105-107.
- HUSSAIN, A., H. RAMIREZ, W.M. ROCA & W. BUSHUK 1988b. Interaccession variation of electrophoregrams of cotyledon protein of field bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Euphytica* 39: 109-111.
- JENSEN, U. & D.E. FAIRBROTHERS 1983. *Protein and Nucleic Acids in*

Plant Systematics. Spring-Verlag, New York.

- KOCOUREK, J. & V. HOREJSI 1983. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". In T.C. Bog-Hansen & G.A. Splengler, eds. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 3, pp 3-6, Walter de Gruyter, Berlin.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t4. *Nature* 227: 680-685.
- MOREIRA, R.A. & B.S. CAVADA 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behaviour during germination. *Biol. Plant.* 26: 113-120
- MOREIRA, R.A., A.C.H. BARROS, J.C. STEWART & A. PUSZTAI 1983. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. *Planta* 158: 63-70.
- RICHARDSON, M., F.A.P. CAMPOS, R.A. MOREIRA, I.L. AINOUZ, R. BEGBIE, W. WATT & A. PUSZTAI 1984. The complete amino acid sequence of the major alpha-subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Eur. J. Biochem.*, 144:101-111.
- ROUGE, P., M. RICHARDSON, A. YARWOOD, & B.S. CAVADA 1987. Single and two chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation., *Biochem. System. Ecol.*, 15: 341-348.