

Identificação e Caracterização de Populações de Alfavaca (*Ocimum selloi* Benth.) por meio de Marcadores Isoenzimáticos

Amaral, Cláudio L. F.¹; Casali, Vicente W. D.¹

¹Departamento de Fitotecnia da UFV, Viçosa-MG, Brasil CEP: 36571-000

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a variabilidade isoenzimática de *Ocimum selloi* Benth. Duas populações foram estudadas: População "A", de Nova Friburgo-RJ e População "B", de Tiradentes-MG. Na análise da variabilidade isoenzimática, foram utilizados os sistemas enzimáticos esterase, fosfatase ácida, glutamato desidrogenase, glutamato oxaloacetato transaminase, leucina aminopeptidase, peroxidase e xiquimato desidrogenase, que se mostraram eficientes na identificação, caracterização e diferenciação das populações e de seus indivíduos, por meio de um ou outro sistema enzimático ou, ainda, pelas associações. Foi verificado que a distribuição das isoenzimas das populações de *O. selloi* Benth, nos diversos sistemas enzimáticos estudados, permitiu distingui-las perfeitamente. A eletroforese de isoenzimas mostrou-se de grande utilidade para a identificação e caracterização da variabilidade isoenzimática desta espécie.

Palavras-chave: Lamiaceae, *Ocimum selloi*, marcadores isoenzimáticos, plantas medicinais.

ABSTRACT: Identification and Characterization of two Populations of "Alfavaca" (*Ocimum selloi* Benth.) by Isozyme Markers. The objective of this work was to identify and to characterize the isoenzymatic variability of *Ocimum selloi* Benth. Two populations were studied; (a) the Nova Friburgo-RJ population and (b) the Tiradentes-MG population. The following enzymatic systems were used: esterase, acid phosphatase, glutamate dehydrogenase, glutamate oxaloacetate transaminase, leucine aminopeptidase, peroxidase and shikimate dehydrogenase. They showed efficiency in identifying, characterizing and differentiating both populations, and their respective individuals. The isoenzyme distribution for both populations of *O. selloi* Benth allowed them be distinguished perfectly. The isoenzymes were efficient for identification and characterization of the isoenzymatic variability of this species.

Key words: Lamiaceae, *Ocimum selloi*, isozyme markers, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidade vegetal da Terra, e pelo menos a metade das espécies vegetais pode apresentar alguma propriedade terapêutica útil à população, mas nem uma parte ínfima dessas plantas foi ainda estudada (Martins *et al.*, 1994), principalmente, no que se refere à sua variabilidade genética. Entre as plantas medicinais de grande importância encontra-se a alfavaca (*Ocimum selloi* Benth.), planta da Família Lamiaceae que ocorre nas regiões Sul e Sudeste do país (Schmidt, 1858). Esta espécie tem largo uso na medicina popular. Vulgarmente, é conhecida como elixir-paregórico, nos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo e como anis ou alfavaquinha em Minas gerais. Estes termos populares referem-se às suas propriedades farmacológicas (elixir-paregórico, por ter uso semelhante ao medicamento de mesmo nome comercial), químicas (anis, pela semelhança de odor com os aquênios de *Pimpinella anisum* ou *Foeniculum vulgare*, erva-doce e funcho, respectivamente) e à semelhança com outras espécies do gênero *Ocimum* (alfavaquinha, diminutivo de alfavaca, que é um termo empregado popularmente para designar inúmeras espécies do gênero) (Martins, 1996). Tem sido usada como antidiarréico, antiespasmódico e antiinflamatório, propriedades comprovadas em testes pré-clínicos por Vanderlinde *et al.* (1994). Segundo Martins

(1996), destacam-se, como componentes principais do óleo essencial de alguns de seus acessos, o metilchavicol e o metileugenol. Este estudo teve como principal objetivo identificar e caracterizar a variabilidade isoenzimática de duas populações desta espécie por meio de marcadores isoenzimáticos.

MATERIAL E MÉTODO

Material Vegetal

Foram utilizadas 96 plantas, 48 por população. As plantas da população "A" foram coletadas em Nova Friburgo-RJ e as plantas da população "B" em Tiradentes-MG. Cada planta de ambas as populações foi propagada assexuadamente, por meio de uma estaca colocada em um copo plástico de 200 ml, preenchido por substrato constituído de areia, solo e esterco, na proporção de 1:1:1, e, posteriormente, mantido ao ar livre. As plantas nos copos foram levadas ao laboratório de preparo, onde suas folhas e raízes foram retiradas. A exsiccata encontra-se no Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), identificada pelo número VIC 23642.

Coleta e Extração das Amostras

Na coleta das amostras, foi retirado, pela manhã, com o auxílio de uma tesoura, uma folha

nova de cada planta amostrada. Além das folhas, utilizaram-se ainda raízes, sendo estas lavadas e suas extremidades cortadas e pesadas, de maneira a padronizar a quantidade de amostras usadas nas análises isoenzimáticas. As amostras obtidas das folhas foram destinadas à análise eletroforética dos seguintes sistemas isoenzimáticos: álcool desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, glutamato desidrogenase, glutamato oxaloacetato transaminase, isocitrato desidrogenase, leucina aminopeptidase, malato desidrogenase e xiquimato desidrogenase. Já as amostras obtidas das raízes foram utilizadas para a análise eletroforética de fosfatase ácida, glutamato oxaloacetato transaminase, malato desidrogenase e peroxidase. A solução extratora usada foi a de Alfenas *et al.* (1991).

Com o objetivo de ajustar a metodologia, efetuaram-se vários testes preliminares, procurando determinar, em cada sistema isoenzimático, as combinações adequadas de pH dos tampões do gel e dos eletrodos e os procedimentos apropriados de coloração. Portanto, como sistemas tampão gel-eletródo utilizou-se o sugerido por Shaw & Prasad (1970) para as enzimas: fosfatase ácida, glutamato desidrogenase, glutamato oxaloacetato transaminase, malato desidrogenase e peroxidase e o indicado por Soltis *et al.* (1983) para as enzimas: álcool desidrogenase, esterase, isocitrato desidrogenase, leucina aminopeptidase, e xiquimato desidrogenase. Os protocolos para revelação da atividade enzimática de álcool desidrogenase, fosfatase ácida, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase foram os indicados por Shaw & Prasad (1970) e de esterase, glutamato desidrogenase, glutamato oxaloacetato transaminase, leucina aminopeptidase, peroxidase e xiquimato desidrogenase os protocolos sugeridos por Soltis *et al.* (1983).

Análises isoenzimáticas

Foi utilizado nas análises isoenzimáticas a técnica de eletroforese horizontal em gel de amido. Sendo utilizado amido nacional (amido de milho ou "Maizena") e amido hidrolisado ("Sigma" - S4501), para fins de comparação. Ambos os géis de amido foram preparados, a 12%, com 42 g de amido, adicionados a 350 ml de solução-tampão (Conkle *et al.*, 1982).

Deteção dos sistemas enzimáticos

No sistema enzimático peroxidase, as bandejas refratárias foram colocadas em câmara fria a 4°C até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Já nos sistemas enzimáticos álcool desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, glutamato desidrogenase, glutamato oxaloacetato transaminase, isocitrato desidrogenase, leucina

aminopeptidase, malato desidrogenase e xiquimato desidrogenase, as bandejas refratárias foram colocadas em estufa a 37°C, no escuro, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas.

Secagem dos géis

Após a coloração, o excesso de solução corante (Shaw & Prasad, 1970; Soltis *et al.*, 1983) foi retirado sob água corrente, submetendo-se, posteriormente, cada fatia de gel à fixação (glicerina 50% na peroxidase e 10% nas demais enzimas, por cerca de 12 horas à temperatura de 4°C). Após a fixação, cada fatia de gel pôde ser trabalhada na tomada de dados ou, então, desidratada para posterior catalogação. O gel foi desidratado entre duas folhas de papel-celofane poroso.

Numeração das bandas nos géis

Na interpretação das bandas, os géis foram colocados justapostos sobre a superfície de um diafanoscópio e, mediante o uso de uma régua graduada em milímetros, foi medida a distância percorrida pelas bandas, transcrevendo-as num papel milimetrado, com base nas suas mobilidades relativas. A mobilidade relativa foi calculada pela razão entre a distância de cada banda até a origem (posição de inserção das amostras no gel) e a distância percorrida por uma banda particular, preferencialmente a mais anódica (+), presente em todas as populações. As frequências dos padrões das bandas isoenzimáticas foram obtidas pela relação número de indivíduos por padrão específico de bandas isoenzimáticas/número total de indivíduos por população amostrada.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Álcool Desidrogenase (ADH)

O sistema isoenzimático álcool desidrogenase, apesar de ter apresentado atividade enzimática nos tecidos foliar e radicular, não mostrou boa resolução de separação, sendo, portanto, descartado.

Esterase (EST)

O sistema esterase apresentou atividade isoenzimática anódica, nos tecidos foliar e radicular; entretanto, a baixa resolução de bandas isoenzimáticas da raiz, inviabilizou sua utilização nas análises fenotípicas. Este sistema foi útil como marcador para diferenciar as duas populações, em decorrência da presença do padrão 2 (Figura 1) apenas na população "A". Intrapopulacionalmente, possibilitou a diferen-

diferenciação entre indivíduos, em razão dos padrões 1 e 3 nas populações "A" e "B" (Figura 1). A partir da análise do padrão 3, pode-se inferir a ocorrência de hibridação, em razão do fato de terem sido encontradas, nos mesmos indivíduos, bandas específicas associadas a grupos particulares de indivíduos de cada uma das duas populações analisadas, o que foi proposto por Tanksley & Rick (1980) para *Lycopersicon* spp.

Fosfatase Ácida (ACP)

O sistema fosfatase ácida apresentou atividade isoenzimática nos tecidos foliar e radicular

e padrões idênticos de bandas nos dois tecidos (Tabelas 1 e 2), significando que, segundo Alfenas (1998), provavelmente, não houve expressão gênica diferencial nesses tecidos. O referido sistema não foi útil como marcador para diferenciar as duas populações, apesar de ter-se mostrado eficaz na separação dos grupos de indivíduos de cada população analisada, pois foi verificada a ocorrência dos padrões 1, 2 e 3 entre os indivíduos das duas populações (Figura 1).

TABELA 1 - Caracterização das populações por meio dos padrões de bandas isoenzimáticas obtidos a partir do tecido foliar de alfavaca (*O. selloi* Benth.) e das respectivas frequências

Sistema Isoenzimático	Padrões Isoenzimáticos /Frequências	
	População "A"	População "B"
Fosfatase Ácida	Padrão 1 (25,0%)	Padrão 1 (37,5%)
	Padrão 2 (35,4%)	Padrão 2 (47,9%)
	Padrão 3 (39,6%)	Padrão 3 (14,6%)
Esterase	Padrão 1 (27,1%)	Padrão 1 (72,9%)
	Padrão 2 (33,3%)	
	Padrão 3 (39,6%)	Padrão 3 (27,1%)
Glutamato Desidrogenase	Padrão 1 (37,5%)	Padrão 1 (20,8%)
		Padrão 2 (18,8%)
	Padrão 3 (23,0%)	Padrão 3 (31,2%)
	Padrão 4 (39,5%)	Padrão 4 (29,2%)
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	Padrão 1 (17,8%)	Padrão 1 (42,6%)
	Padrão 2 (23,5%)	
	Padrão 3 (36,5%)	
	Padrão 4 (22,2%)	Padrão 4 (57,4%)
Isocitrato Desidrogenase	Padrão 1 (100,0%)	Padrão 1 (100,0%)
Leucina Aminopetidase		Padrão 1 (56,2%)
	Padrão 2 (100,0%)	Padrão 2 (43,8%)
Malato Desidrogenase	Padrão 1 (100,0%)	Padrão 1 (100,0%)
Xiquimato Desidrogenase	Padrão 1 (37,8%)	Padrão 1 (61,2%)
	Padrão 2 (62,2%)	Padrão 2 (38,8%)

TABELA 2 - Caracterização das populações por meio dos padrões de bandas isoenzimáticas obtidos a partir do tecido radicular de Alfavaca (*O. selloi* Benth.) e das respectivas frequências

Sistema Isoenzimático	Padrões Isoenzimáticos /Frequências	
	População "A"	População "B"
Fosfatase Ácida	Padrão 1 (25,0%)	Padrão 1 (37,5%)
	Padrão 2 (35,4%)	Padrão 2 (47,9%)
	Padrão 3 (39,6%)	Padrão 3 (14,6%)
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	Padrão 1 (100,0%)	Padrão 1 (100,0%)
Malato Desidrogenase	Padrão 1 (100,0%)	Padrão 1 (100,0%)
Peroxidase	Padrão 1 (64,6%)	Padrão 1 (100,0%)
	Padrão 2 (35,4%)	

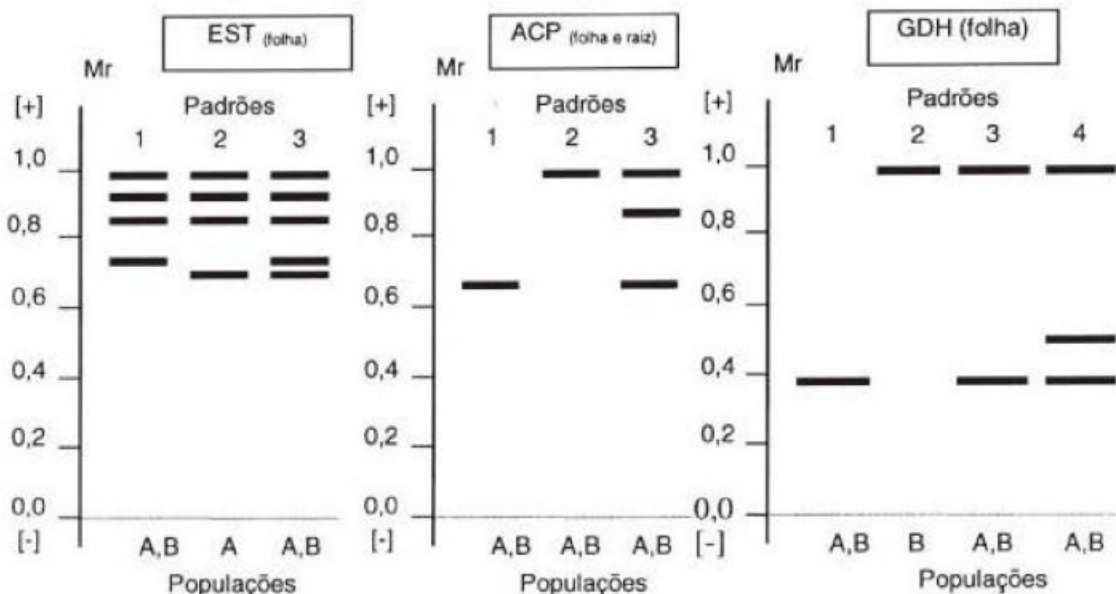


FIGURA 1 – Zimogramas dos sistemas isoenzimáticos: esterase (EST), fosfatase ácida (ACP) e glutamato desidrogenase (GDH) em tecidos radicular e/ou foliar de populações ("A" e "B") de alfavaca (*O. selloi* Benth.), com mobilidade relativa (Mr) e padrões de bandas isoenzimáticas (1, 2, 3, 4).

Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT)

O sistema glutamato oxaloacetato transaminase apresentou atividade anódica para os tecidos foliar e radicular e zimogramas distintos (Tabelas 1 e 2), provavelmente evidenciando a ocorrência de expressão gênica diferencial nesses tecidos. O referido sistema foi útil como marcador para diferenciar grupos de indivíduos tanto inter quanto intrapopulacionalmente, consi-

derando-se apenas o tecido foliar. Neste tecido, a presença dos padrões 1 e 4 nas populações "A" e "B" permitiu diferenciá-las intrapopulacionalmente e a dos padrões 2 e 3 apenas na população "A", interpopulacionalmente. No tecido radicular, a presença apenas do padrão 1 nas populações "A" e "B" não permitiu diferenciá-las (Figura 2).

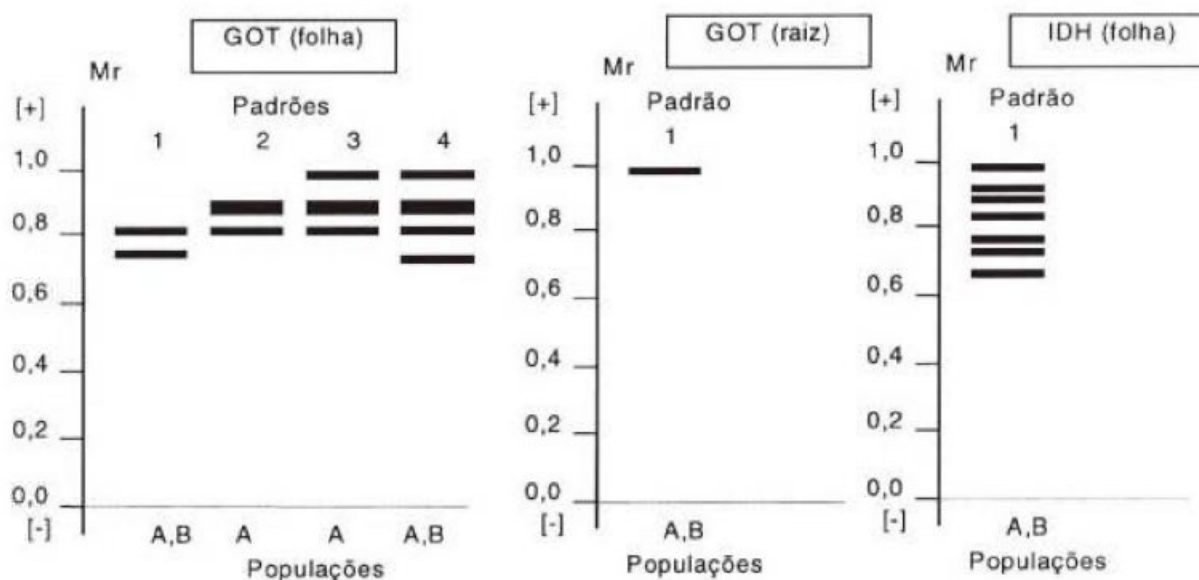


FIGURA 2 - Zimogramas dos sistemas isoenzimáticos: glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e isocitrato desidrogenase (IDH) em tecidos radicular e/ou foliar de populações ("A" e "B") de alfavaca (*O. selloi* Benth.), com mobilidade relativa (Mr) e padrões de bandas isoenzimáticas (1, 2, 3, 4).

Isocitrato Desidrogenase (IDH)

O sistema isocitrato desidrogenase apresentou atividade isoenzimática anódica apenas no tecido foliar sendo monomórfico, não se mostrando útil como marcador para diferenciar a população "A" da população "B", nem para diferenciar os indivíduos de cada população entre si (Figura 2). Os zimogramas desta enzima, mostrando apenas bandas monomórficas em todos os indivíduos analisados (Figura 2), impossibilitam separações, o que evidencia a ausência de polimorfismo isoenzimático (Tabela 1). Isso pode significar, conforme Torggler *et al.* (1995), uma origem comum de todos e, talvez, a fixação casual de alelos, pelo fato de esta espécie não ter sido ainda submetida a nenhum processo de seleção artificial, de caracteres agrônômicos desejáveis, com alto valor adaptativo.

Malato Desidrogenase (MDH)

Este sistema apresentou atividade isoen-

zimática nos tecidos foliar e radicular e padrões idênticos de bandas nos dois tecidos, apresentando ainda o mesmo padrão para todos os indivíduos amostrados (Figura 3), mostrando ausência de polimorfismo enzimático e impossibilitando separações (Tabelas 1 e 2).

O sistema leucina aminopeptidase apresentou atividade isoenzimática anódica apenas no tecido foliar, sendo útil como marcador na identificação dos grupos de indivíduos tanto inter quanto intrapopulacionalmente, pois houve variação nos padrões eletroforéticos observados; interpopulacionalmente, considerando-se as duas populações analisadas e, intrapopulacionalmente, somente a população "B", haja vista essa população ter apresentado os padrões 1 e 2 e a população "A" apenas o padrão 2 (Figura 3). Esse sistema caracteriza-se por apresentar poucas bandas e pequena variação dentro de uma mesma espécie (Tabela 1), o que condiz com o estudo feito por Quiros (1980) com *Medicago sativa* L..

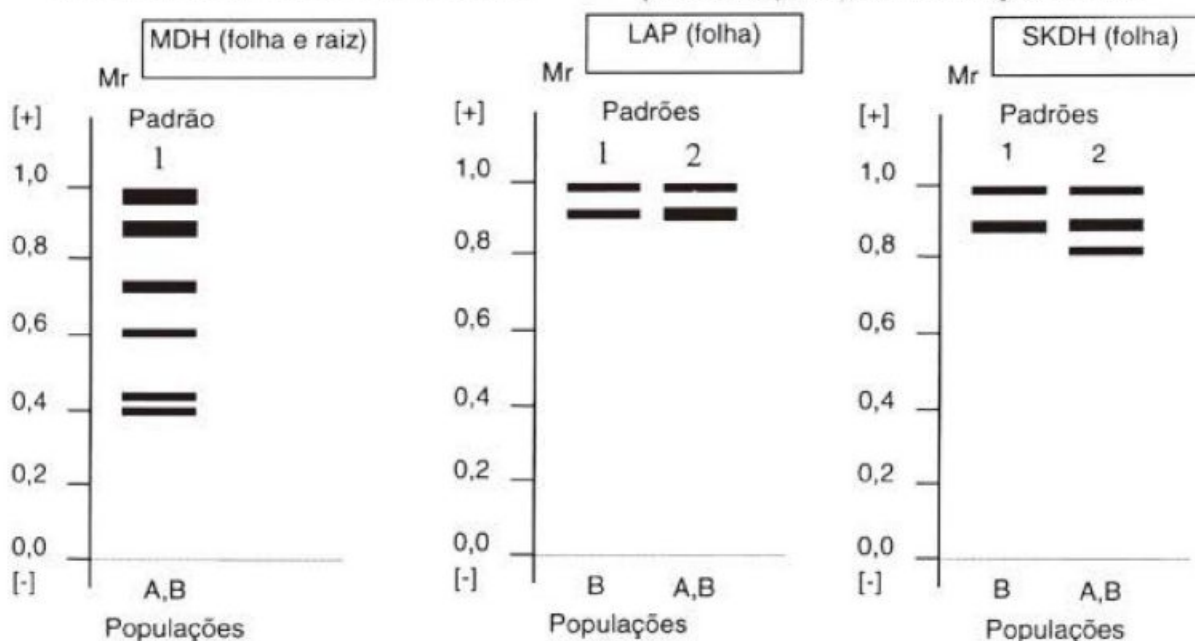


FIGURA 3 - Zimogramas dos sistemas isoenzimáticos: malato desidrogenase (MDH), leucina aminopeptidase (LAP) e xiquimato desidrogenase (SKDH) em tecidos radicular e/ou foliar de populações ("A" e "B") de alfavaca (*O. selloi* Benth.), com mobilidade relativa (Mr) e padrões de bandas isoenzimáticas (1, 2).

Peroxidase (PO)

Foram observadas neste sistema as atividades isoenzimáticas anódica e catódica, apenas no tecido radicular, o que pode, segundo Murphy *et al.* (1990), estar associado à variação de pH dos diversos compartimentos celulares e subcelulares ou dos espaços intercelulares. Isso ocorreu porque a peroxidase é secretada para o exterior da célula, atuando nos processos de lignificação da parede celular e na proteção celular contra doenças e doses excessivas de irradiação, bem como nos processos fotossintéticos.

O sistema isoenzimático estudado foi útil como marcador para diferenciar a população "A" da população "B", permitindo, ainda, diferenciar grupos de indivíduos apenas da população "A", pois o padrão 1 foi obtido de indivíduos das populações "A" e "B", ao passo que o padrão 2 o foi apenas de indivíduos da população "A" (Figura 4). Este sistema, portanto, em razão do baixo polimorfismo isoenzimático apresentado (Tabela 2), contribuiu pouco na separação dos indivíduos de cada população, o que contradiz com o estudo feito por Brewbacker & Hasegawa (1974) com *Zea mays* L.

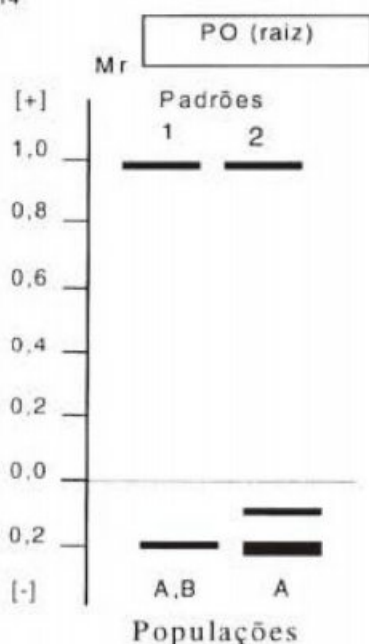


FIGURA 4 - Zimograma do sistema isoenzimático: Peroxidase (PO) em tecido radicular de populações ("A" e "B") de alfavaca (*O. selloi* Benth.), com mobilidade relativa (Mr) e padrões de bandas isoenzimáticas (1, 2).

Xiquimato Desidrogenase (SKDH)

Neste sistema foi detectada somente a atividade isoenzimática anódica, apenas no tecido foliar. O sistema xiquimato desidrogenase foi útil como marcador para diferenciar indivíduos de ambas as populações consideradas, apenas intrapopulacionalmente, pois a ocorrência dos padrões 1 e 2 foi verificada em ambas as populações analisadas (Figura 3). Este sistema, portanto, em razão do baixo polimorfismo isoenzimático apresentado (Tabela 1), contribuiu pouco na separação dos grupos de indivíduos de cada população.

Conclui-se que na diferenciação das duas populações de *O. selloi* e de seus indivíduos constituintes podem ser usados os sistemas isoenzimáticos esterase, fosfatase ácida, glutamato desidrogenase, glutamato oxaloacetato transaminase, leucina aminopeptidase, peroxidase e xiquimato desidrogenase. O sistema isoenzimático álcool desidrogenase foi descartado por apresentar baixa resolução de bandas, considerando-se ambos os tecidos analisados. Os sistemas isoenzimáticos isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase não contribuíram na separação do germoplasma em estudo, em razão da ausência de polimorfismo isoenzimático. Apesar do baixo número de bandas e do polimorfismo de padrões isoenzimáticos, o método de análise de padrões eletroforéticos de isoenzimas mostrou-se suficientemente efeti-

vo na identificação, caracterização e diferenciação das duas populações e de seus indivíduos constituintes. Portanto, o método de análise de isoenzimas, via eletroforese, tem grande utilidade na identificação e caracterização da variabilidade isoenzimática desta espécie.

AGRADECIMENTO

Ao Departamento de Fitotecnia (DFT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo apoio na execução deste projeto, ao Grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais por ter fornecido o material vegetal utilizado neste trabalho e ao CNPq pela bolsa de pesquisa.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- BREWBAKER, J.L., HASEGAWA, Y. Polymorphism of the major peroxidases of maize. In: MARKET, C. L. (Ed.) **Isozymes: developmental biology**. New York: Academic Press, 1974. p. 659-73.
- CONKLE, M.T., HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B., HUNTER, S.C. **Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual**. Berkeley: USDA, Forest Service, 1982. 18p. (Genetics technical reports, PSW-64)
- MARTINS, E.R. **Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** Viçosa: UFV, 1996. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220p.
- MURPHY, R.W., SITES, J.W.; BUTH, D.G. HAUFLER, C.H. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D.M., MORITZ, C. (Eds.). **Molecular systematics**. Massachusetts: Sinauer, 1990. p.45-126.
- QUIROS, F.C. Identification of alfafa plants by enzyme electrophoresis. **Crop Science**, v.20, p.262-4, 1980.
- SCHMIDT, J.A. Labiatae. In: MARTIUS, K.F.P (Ed.). **Flora Brasiliensis: enumerato plantarum in Brasilia**. New York, Wheldon & Wesley, 1858. p.117-388.
- SHAW, C.R., PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, v.4, p.297-320, 1970.

- SOLTIS, D.E., HAUFLE, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. **American Fern Journal**, v.73, p.9-27, 1983.
- TANKSLEY, S.D., RICK, C.M. Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v.57, p.161-70, 1980.
- TORGGLER, M.G.F., CONTEL, P.B., TORGGLER, S.P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186p (Série Monografias, 1).
- VANDERLINDE, F.A., COSTA, E.A., D'ANGELO, L.C.A. Atividades farmacológicas gerais e atividade antiespasmódica do extrato etanólico de *Ocimum selloi* Benth. (elixir-paregórico). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, **Anais...** Fortaleza, 1994. Fortaleza: UFCE, 1994. n. p.