

I. BIOTECNOLOGIA E FITOQUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE CLONES E SOMACLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR (1)

HAIKO ENOK SAWAZAKI (2,5), MARIA BERNADETE SILVAROLLA (3)
e RAPHAEL ALVAREZ (4)

RESUMO

Foram caracterizados os padrões de isoenzimas de peroxidase e esterase de extrato de folha e raiz de cana-de-açúcar de variedade e somaclones de NA56-79 aos 7 meses de idade e de variedades e somaclones de NA56-79, IAC68-12 e IAC68-144 aos 9 meses. Avaliaram-se também as atividades específicas de peroxidase com relação ao tempo e perfil isoenzimático das três variedades e respectivos somaclones. Os zimogramas de peroxidase e esterase de folhas mostraram diferenças distintas entre as três variedades; a esterase apresentou menor número de bandas em relação à peroxidase, porém de mais fácil caracterização. Os zimogramas de raízes, devido à grande variação de atividade enzimática, em consequência de raízes velhas, não foram conclusivos quanto à identificação das variedades. Não ocorreram diferenças nos zimogramas de peroxidase ou esterase entre somaclones da mesma variedade. NA56-79 apresentou menor número de isoenzimas e menor atividade específica de peroxidase em relação à IAC68-144, sugerindo que a diminuição das isoenzimas seja associada ao decréscimo de atividade enzimática. A atividade específica de peroxidase variou com a maturação, sendo a 9 meses maior do que a 7.

Termos de indexação: cana-de-açúcar, isoenzimas, variedades, somaclones.

-
- (1) Recebido para publicação em 23 de junho de 1988 e aceito em 6 de abril de 1989.
 - (2) Seção de Fitoquímica, Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas, SP.
 - (3) Seção de Genética, IAC.
 - (4) Seção de Cana-de-Açúcar, IAC.
 - (5) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

1. INTRODUÇÃO

Segundo MARKERT & MOLLER (1959), isoenzimas são formas múltiplas de uma enzima com similar ou idêntica especificidade de substrato ocorrendo em um mesmo organismo.

Padrões isoenzimáticos podem ser utilizados para identificação de variedades ou como marcadores genéticos ou para confirmação positiva de cruzamentos ou estudos de relacionamento intergenérico ou interespecífico.

Em cana-de-açúcar, isoenzimas foram utilizadas para identificação de variedades por WALDRON & GLASZIOU (1972); GONÇALVES et al. (1981); RUIZ & MARIBONA (1983), ou em estudos genéticos de material oriundo de cultura de tecidos por HEINZ & MEE (1971); LIU et al. (1974); FERNANDEZ et al. (1975) e MARIBONA et al. (1983).

Neste trabalho, foram estudadas as isoenzimas de peroxidase e esterase. Peroxidases são enzimas monoméricas que utilizam o peróxido de hidrogênio para oxidar ampla variedade de doadores de hidrogênio, tais como substâncias fenólicas (guaiacol), citocromo c; nitrito, indóis, aminas e certos íons inorgânicos (SCANDALIOS, 1974), enquanto esterases são enzimas autodiméricas ou alo-diméricas (SCHWARTZ, 1964). Certas esterases hidrolisam o alfanáftil acetato liberando naftol que, acoplado com sal de diazônio, forma um corante nitrogenado altamente colorido.

Os zimogramas das isoenzimas de peroxidase e esterase de folha e raiz de cana-de-açúcar foram analisados para verificar a variabilidade genética entre variedade e soma clones obtidos por cultura de tecido. Estudou-se também a possibilidade de caracterização de variedades e de soma clones a partir da atividade específica da peroxidase com relação ao tempo e perfil isoenzimático.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, para a caracterização isoenzimática da cana-de-açúcar, extratos de folha e raiz da variedade NA56-79 e 28 soma clones, com sete meses de plantio no campo, e das variedades NA56-79, IAC68-12 e IAC68-144 e seus respectivos 10, 16 e 5 soma clones, com nove meses de campo. Os soma clones foram obtidos conforme método descrito por SONDAHL & CARLUCCI (1983).

Os extratos de folha foram preparados a partir de 20cm da região mediana da folha mais nova inteiramente expandida (+1), segundo nomenclatura de Kuijper (DILLEWJN, 1952), sem a nervura, e congelada por, no mínimo, 24 horas. A homogeneização foi feita utilizando-se 3g de folha e 5g de raiz para 7ml de tampão Tris 0,01M a 10°C, pH 7,4, em homogeneizador modelo Turrattec TE 102.

As amostras foram filtradas em gaze, centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e mantidas congeladas, correspondendo em proteína ao redor de 6 a 10mg/ml para folha e 0,3 a 1,8mg/ml para raiz. Aplicaram-se 50 μ l de cada amostra no gel para eletroforese de placa (14 x 11 x 0,2cm) a 4°C, com gel de corrida a 7%, pH 7,5 e gel de sobreposição a 2,4%, pH 6,8. Para a eletroforese de peroxidase, utilizou-se o gel de sobreposição com 5% de sacarose. Para a esterase, o gel de sobreposição e o de corrida contiveram 5% de glicerol. Após a amostragem ser inserida no gel, a eletroforese foi feita a 20mA por cinco horas, com tampão borato de sódio 0,3M, pH 8,2. Para coloração das bandas isoenzimáticas de esterase, utilizou-se 0,025g de Fast Blue RR e 1,0ml de alfa-naftil-acetato (1% em acetona) em 49ml de tampão Tris-HCl pH 7,4 (RUDOLPH & STAHMANN, 1966). Para a peroxidase, 0,012g de o-dianisidina e 0,2ml de H_2O_2 30% em 50ml de tampão fosfato 0,1M, pH 5,8.

Segundo testes preliminares, as condições de reação para determinação das atividades de peroxidase foram: pH 5,8, 31-32°C, com adição de 3,0ml de solução substrato (53,33 mM guaiacol, 294 mM H_2O_2 , 86,67 mM tampão fosfato, pH 5,8) para 0,1ml de solução enzimática (extrato enzimático diluído 1:10) com interrupção de reação cinco minutos depois pela adição de etanol ou metanol absoluto e leitura a 420 nm após 20 minutos. A mudança na absorbância foi convertida em concentração de H_2O_2 pelo uso do coeficiente molar $E = 6,65 \times 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, de acordo com MAÉHLY & CHANCE (1954). A atividade específica foi medida pela correlação da concentração de H_2O_2 (em micrograma) necessária para a reação de peroxidase com a quantidade de proteína (em miligrama) da solução enzimática determinada pelo método de LOWRY et al. (1951).

A atividade específica de peroxidase (média de duas repetições) foi analisada pelo delineamento inteiramente casualizado. O teste de Tukey foi aplicado a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao método de análise da atividade de peroxidase, optou-se pela interrupção de reação com metanol em substituição ao etanol e a leitura da atividade no máximo vinte minutos após término da reação, pois, em alta atividade, a degradação da coloração foi mais lenta e a reta da atividade, mais linear (Fig. 1).

Não foram encontradas diferenças entre o zimograma de peroxidase ou esterase das folhas e raízes da variedade NA56-79 e dos 28 soma clones de cana-soca derivados dela, aos sete meses de idade. A atividade específica média de peroxidase (duas repetições) dos extratos de duas folhas diferentes não variou significativamente (Fig. 2). Já a análise de peroxidase da raiz desses clones resultou em atividade muito diferenciada, 2,7 a 21,5 μ mol de H_2O_2 /mg de proteína, provavelmente devido à presença de raízes velhas, indicando que neste estágio a raiz não é adequada para aferição da atividade enzimática.

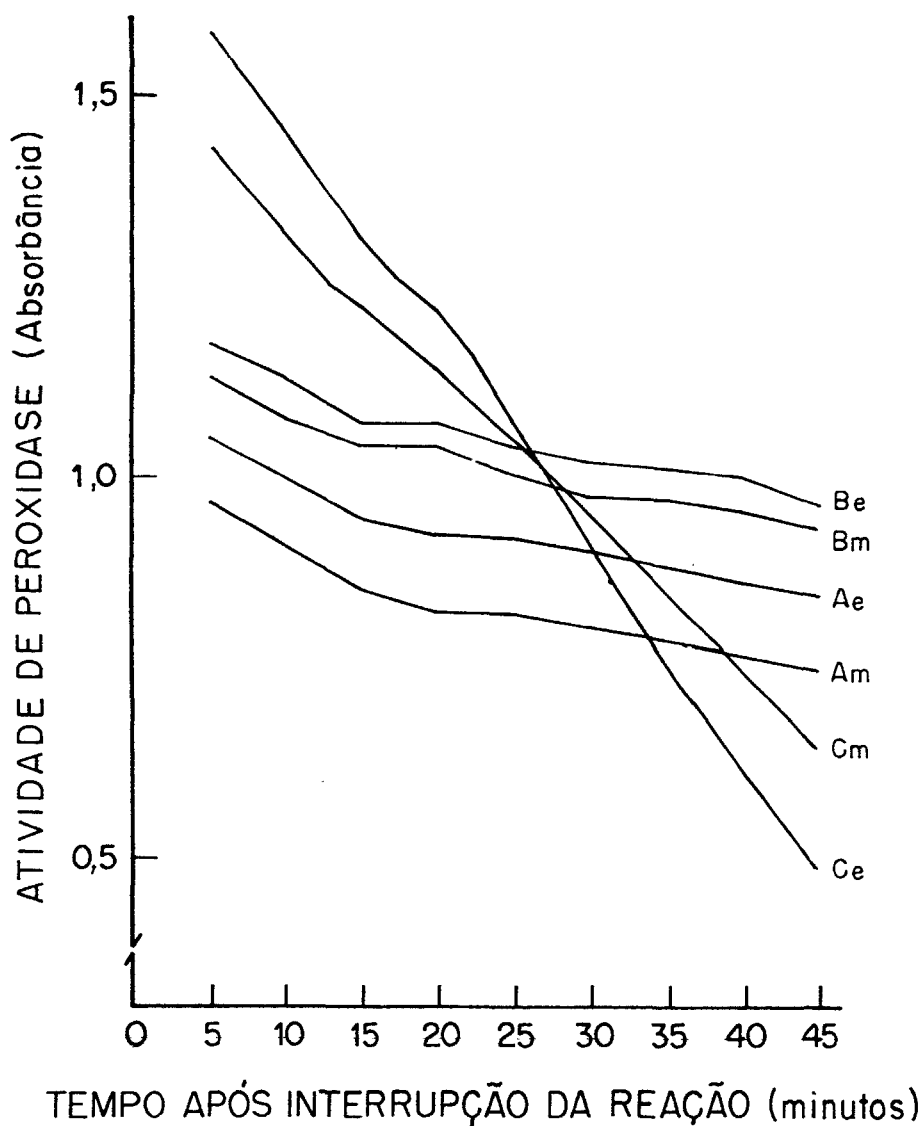


FIGURA 1. Atividade de peroxidase das variedades de cana-de-açúcar NA56-79 (A); IAC68-12 (B) e IAC68-144 (C) aos 9 meses de idade em relação ao tempo após interrupção de reação com metanol (m) ou etanol (e).

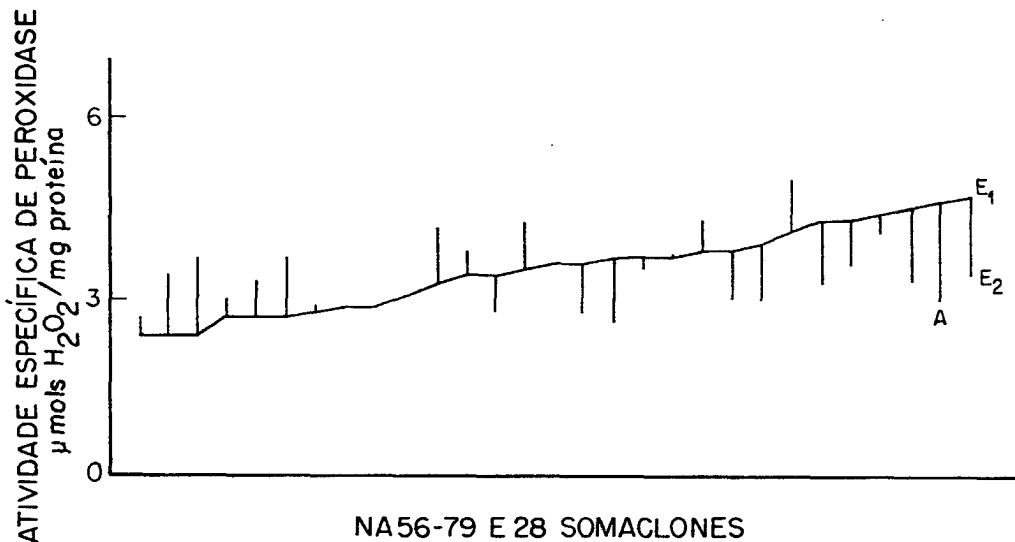


FIGURA 2. Atividade específica média de peroxidase da variedade NA56-79 (A) e 28 somaclones com 7 meses de idade em duas folhas diferentes: 1^a folha: E₁; 2^a folha: E₂.

Os zimogramas das isoenzimas de peroxidase e esterase de folhas com nove meses de campo das variedades de cana NA56-79, IAC68-12 e IAC68-144 (Figuras 3 e 4), evidenciados pelas fotografias das bandas (Figuras 5 e 6), mostraram diferenças distintas entre as três variedades, porém não entre elas e seus respectivos somaclones.

Verifica-se que, no zimograma de peroxidase da folha (Figura 3), o cultivar IAC68-12 apresentou como banda característica a número sete e a IAC68-144, a número cinco, sendo as demais (em número de onze), semelhantes às da NA56-79, que apresentou, portanto, uma banda a menos. O zimograma de peroxidase da raiz não evidenciou diferenças entre os cultivares, apresentando menor número de bandas em relação às folhas (Figuras 3 e 5).

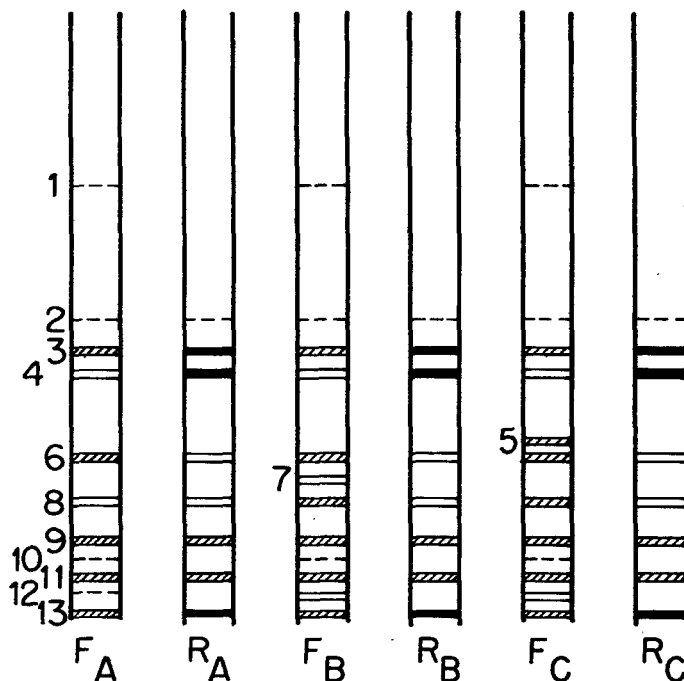


FIGURA 3. Zimograma das isoenzimas (números 1 a 13), de peroxidase de folhas (F) e raízes (R) de cana-de-açúcar das variedades NA56-79 (A), IAC68-12 (B) e IAC68-144 (C) com 9 meses de idade. Intensidade relativa: banda fraquíssima —; banda fraca □; banda média ▨; banda forte ■.

A esterase apresentou menor número de bandas em relação à peroxidase, tanto em folhas quanto em raízes, porém bem distintas e de mais fácil caracterização (Figura 4).

A variedade IAC68-12 apresentou no zimograma de esterase de folhas (Figura 4) como banda característica e mais forte a número cinco, enquanto a mais forte da IAC68-144 foi a número quatro e a da NA56-79 foi a número seis. Verificou-se que a NA56-79 apresentou menor número de bandas em relação às demais para os dois sistemas isoenzimáticos. O menor número ou ausência de repetibilidade de bandas das raízes em relação às folhas (Figuras 4 e 6) provavelmente tenha decorrido da grande variação da atividade absoluta da esterase, visto que a quantidade de proteína nas raízes foi cerca de cinco a vinte vezes inferior à das folhas.

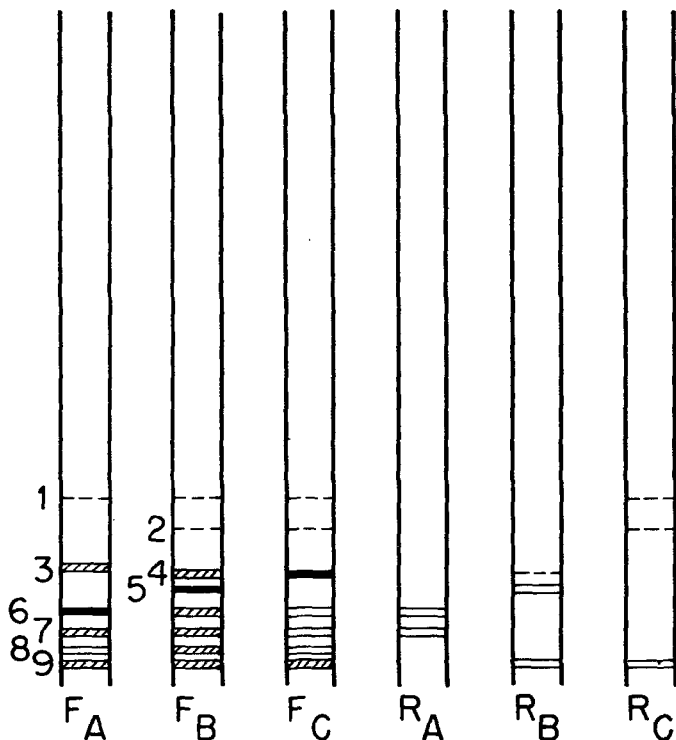


FIGURA 4. Zimograma das isoenzimas (números 1 a 9) de esterase de folhas (F) e raízes (R) de cana-de-açúcar das variedades NA56-79 (A), IAC68-12 (B) e IAC68-144 (C) com 9 meses de idade. Intensidade relativa: banda fraquíssima ----; banda fraca □; banda média ▨; banda forte ■.

Com relação à atividade específica de peroxidase das folhas das três variedades e dos somaclones, a menor correspondeu à média da variedade NA56-79 e dez somaclones, $3,6\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína, significativamente diferente da maior, correspondente à média da IAC68-144, e cinco somaclones, $4,9\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína. A média da IAC68-12 e dezesseis somaclones, $4,0\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína, de valor intermediário, não diferiu significativamente das demais (Figura 7), indicando que a atividade específica de peroxidase não identificou a variedade.

Esses resultados mostram que o zimograma para peroxidase e esterase da NA56-79 apresenta menor número de bandas e que a diminuição das isoenzimas está associada ao decréscimo da atividade enzimática.

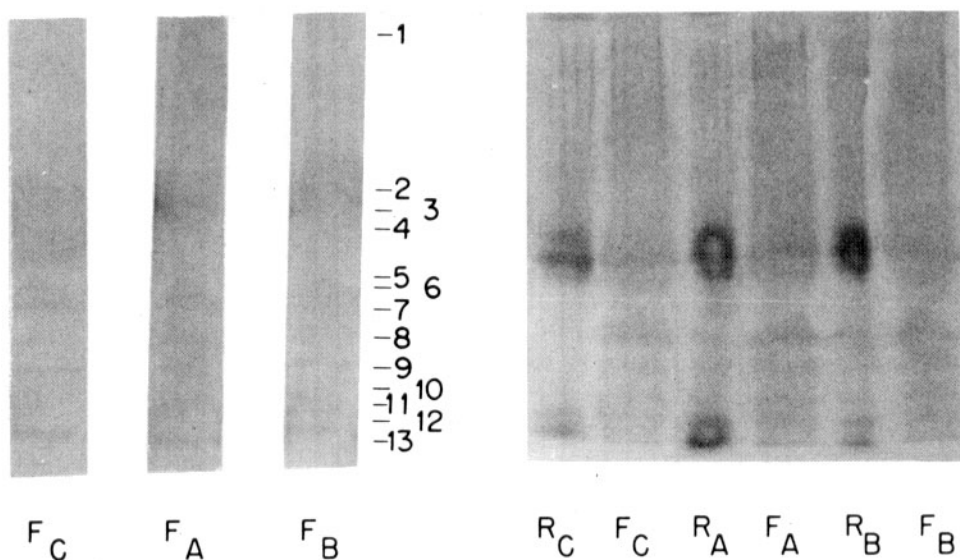


FIGURA 5. Isoenzimas (números 1 a 13) de peroxidase de folhas (F) e raízes (R) de cana-de-açúcar das variedades NA56-79 (A), IAC68-12 (B) e IAC68-144 (C) com 9 meses de idade.

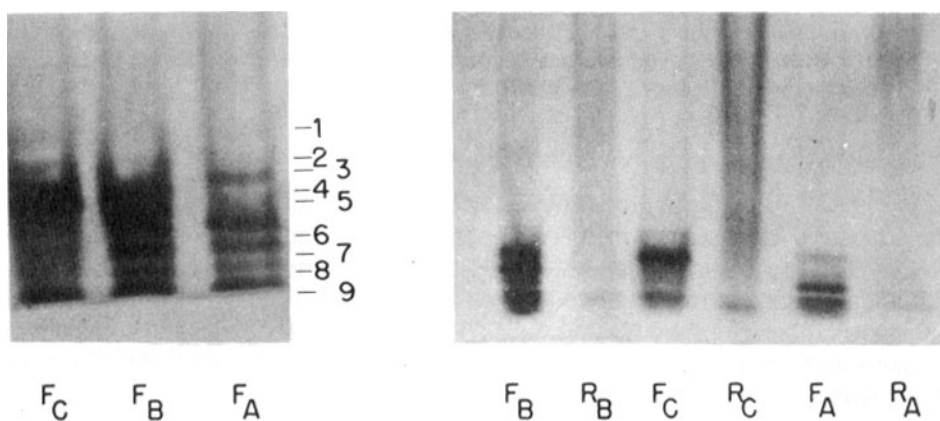


FIGURA 6. Isoenzimas (números 1 a 9) de esterase em folhas (F) e raízes (R) de cana-de-açúcar das variedades NA56-79 (A), IAC68-12 (B) e IAC68-144 (C) com 9 meses de idade.

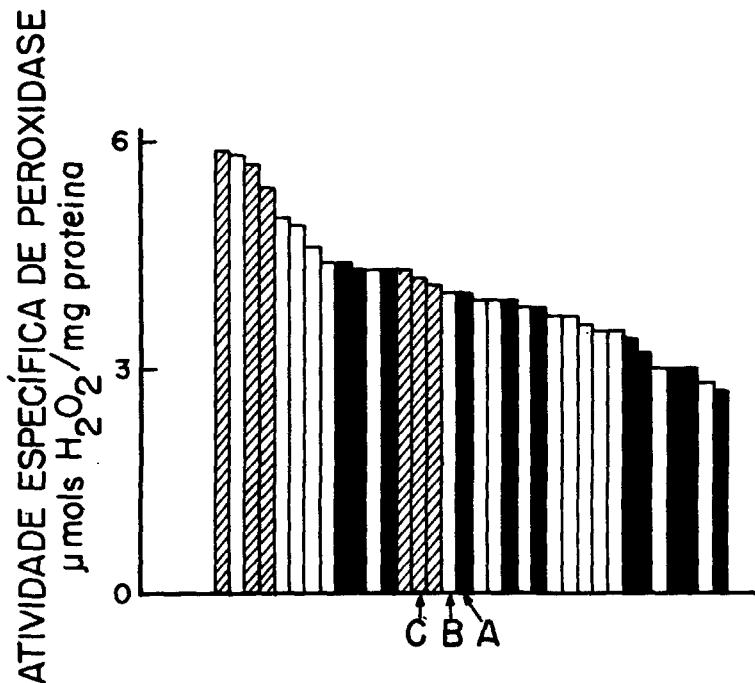


FIGURA 7. Atividade específica de peroxidase de folhas de cana-de-açúcar das variedades NA56-79 (A) e 10 somaclones ■, IAC68-12 (B) e 16 somaclones e IAC68-144 (C) e 5 somaclones aos 9 meses de idade.

Verificou-se que a atividade específica de peroxidase em geral variou com a idade da planta na época da coleta, sendo maior aos nove meses do que aos sete. Como aos nove meses a planta de cana está mais próxima da maturação, o aumento da atividade de peroxidase pode estar indicando maior formação de lignina, com ocorrência de grande quantidade de alcoóis hidroxicinâmicos para serem polimerizados pela peroxidase.

4. CONCLUSÕES

1. Os somaclones testados não apresentaram diferenças em relação às variedades que lhes deram origem, no que diz respeito à peroxidase e esterase.
2. As isoenzimas de peroxidase ou esterase de extrato de folha de cana-de-açúcar caracterizaram as variedades NA56-79, IAC68-12 e IAC68-144, enquanto a atividade específica não foi conclusiva.

3. Os zimogramas de raízes, devido à grande variação da atividade enzimática no estágio de sete ou nove meses, não foram conclusivos quanto à identificação das variedades.

4. A menor atividade específica média de peroxidase foi associada com o menor número de isoenzimas, tendo a atividade específica aumentado com a maturação.

SUMMARY

ISOENZYMATIC CHARACTERIZATION OF SUGARCANE CLONES AND SOMACLONES

Extracts from leaves and roots of three sugarcane varieties and their somaclones: NA56-79 (at seven and nine month old plants), IAC68-12 and IAC68-144 (both at nine month old plants) were obtained. The peroxidase and esterase isoenzyme contents of the extracts were determined to verify the genetic variability of tissue culture somaclones. The peroxidase specific activity was studied in relation to the time and isoenzymatic pattern. The peroxidase and esterase zymograms showed distinct differences among varieties, and the esterase presented less bands but easier to characterize than the peroxidase bands. The root zymograms exhibited great enzymatic variation due to the presence of old roots thus not allowing to characterize the varieties. No differences in peroxidase or esterase zymograms among somaclones of the same variety were noticed. The NA56-79 presented lower specific activity of peroxidase and number of isoenzymes than IAC68-144, suggesting that the decrease of isoenzyme bands is associated to the reduction of enzymatic activity. The specific activity of peroxidase changed with maturity and was higher at nine than at seven month old plants.

Index terms: sugarcane, isoenzymes, varieties, somaclones.

AGRADECIMENTO

À Srta. Katsuko Oshiro, pela colaboração nas análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DILLEWIJN, C. van. *Botany of sugarcane*. Waltham, Mass., Chronica Botanica, 1952. 371p.
- FERNANDEZ, A.M.F.; ANTONI, H.J. & CANELADA, M.E.L. Estudios sobre variabilidad genetica de isoperoxidasas y caracteres morfológicos en subclones de caña de azucar obtenidos mediante cultivos "in vitro". *Revista Agronomica del Noroeste Argentino*, 12:79-91, 1975.

- GONÇALVES, C.H.R.P.; CURY, J.A. & CROCOMO, O.J. Isoenzimas na identificação e seleção de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DE TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2., Rio de Janeiro, 1981. *Anais*. Rio de Janeiro, STAB, 1981. p.329-340.
- HEINZ, D.J. & MEE, G.W.P. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *American Journal Botany*, **58**(3):237-262, 1971.
- LIU, Y.T.; CHEN, S.S.; LEE, S. & LEE, H.C. Detection of isoenzymes in sugarcane leaves by disc electrophoresis. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. *Proceedings*. p.1048-1057.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *Journal Biological of the Chemistry*, **193**:265, 1951.
- MAEHLY, A.C. & CHANCE, B. *The assay of catalase and peroxidases: methods of biochemical analysis*. New York, Interscience Publishers, 1954. 357p.
- MARIBONA, R.H.; KORNEVA, S.B.; RUIZ, A. & GONZALEZ, S. Obtention of sugarcane plants by tissue culture from different plant organs. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 18., Havana, 1983. *Proceedings*. Havana, Executive Committee of the ISSCT, 1983. p.610-621.
- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **45**:753-763, 1959.
- RUIZ, A. & MARIBONA, R.H. Peroxidase isoenzymes analysis: a massive method for the identification of sugarcane varieties. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 18., Havana, 1983. *Proceedings*. Havana, Executive Committee of the ISSCT, 1983. p.437-442.
- RUDOLPH, K. & STAHMANN, M.A. Multiple hydrolases in bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) and the effect of the halo blight disease caused by *Pseudomonas phaseolicola* (Burk) Dowson. *Plant Physiology*, **44**:389-394, 1966.
- SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. *Annual Review of Plant Physiology*, **25**:225-258, 1974.
- SCHWARTZ, D. Genetic studies on mutant enzymes in maize. V. In vitro interconversion of allelic isozymes. *Proceedings of the National Academy of Science*, **52**:222-226, 1964.
- SONDAHL, M.R. & CARLUCCI, M.V. Variabilidade somaclonal em cultura de tecidos de cana-de-açúcar. *Ciência e Cultura*, **35**(7):689, 1983. (Suplemento)
- WALDRON, J.C. & GLASZIOU, K.T. Isoenzymes as a method of varietal identification in sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 14., New Orleans, 1971. *Proceedings*. Baton Rouge, Executive Committee of the ISSCT, 1972. p.249-256.