

# PADRÕES ISOENZIMÁTICOS DE SUPERÓXIDO-DISMUTASE DE ALGUNS GENÓTIPOS DE PESSEGUEIRO<sup>1</sup>

CARLOS ALBERTO ELY MACHADO<sup>2</sup>, BONIFACIO HIDEYUKI NAKASU<sup>3</sup>,  
ELIANE AUGUSTIN OLIVEIRA e ELIO KERSTEN<sup>4</sup>

**RESUMO** - Foram utilizados 20 diferentes genótipos de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch), com o objetivo de desenvolver a técnica de eletroforese em pessegueiro, identificar alguns genótipos de pessegueiro a nível isoenzimático e relacionar padrões de alguns sistemas enzimáticos com características de interesse agroindustrial. Para a análise das isoenzimas, foram utilizados homogeneizados de folhas da parte mediana dos ramos. Ao analisar os zimogramas da esterase, da peroxidase (anódica e catódica) e da superóxido-dismutase, verificou-se que somente as isoenzimas da peroxidase anódica e da superóxido-dismutase puderam ser utilizadas para a determinação dos padrões isoenzimáticos dos genótipos. Todos os genótipos de pessegueiro exibiram o mesmo padrão de bandamento, tanto para a peroxidase anódica quanto para a superóxido-dismutase, o que impossibilitou a sua utilização na identificação dos genótipos. Na discussão do trabalho é levantada a hipótese de que essa uniformidade pode estar relacionada ao sistema de reprodução do pessegueiro, à uniformidade genética dos genótipos, a uma possível convergência genética e também à metodologia empregada.

Termos para indexação: eletroforese, esterase, padrão de bandamento, *Prunus persica*.

## PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE BANDING PATTERNS OF SOME PEACH GENOTYPES

**ABSTRACT** - Twenty different peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) genotypes were used for the purpose of developing electrophoretic techniques in peach, identify some peach genotypes at the isoenzymatic level and to report patterns of some enzymatic systems with characteristics of agroindustrial interest. For isoenzyme analysis, homogenized leaves from the mid-part of the branches were used. Upon analysis of esterase, peroxidase (anodic and cathodic) and of superoxide dismutase zymograms, it was verified that only the isoenzymes of anodic peroxidase and of superoxide dismutase could be utilized in determining isoenzymatic patterns of the genotypes. All peach genotypes exhibited the same banding patterns both for anodic peroxidase and for superoxide dismutase, which made impossible their use in identification of the genotypes. In the discussion of the study the hypothesis is raised that this uniformity may be related to the system of reproduction in peach, to the genetic uniformity of the genotypes and to a possible genetic convergence and also to the methodology employed.

Index terms: electrophoresis, esterase, *Prunus persica*.

## INTRODUÇÃO

A cultura do pessegueiro apresenta um desenvolvimento expressivo na região da encosta do sudeste do Rio Grande do Sul, e é uma das culturas de importância econômica para a região.

Como suporte a este desenvolvimento, existe um programa de melhoramento genético dessa cultura no Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado - CNPFT/EMBRAPA - que nos últimos dez anos lançou mais de duas dezenas de cultivares.

Atualmente, a obtenção de novas cultivares baseia-se, quase inteiramente, em observações fenotípicas referentes às características morfológicas e fisiológicas, as quais, segundo Bringham et al. (1981), são sujeitas a variações, em decorrência de flutuações ambientais e do julgamento humano.

O uso de isoenzimas, como marcadores da variabilidade genética em plantas, tem apresentado enorme incremento na última década, oferecendo

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 21 de julho de 1986.

Parte da dissertação apresentada no Curso de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas para a obtenção do grau de mestre.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado (CNPFT), Caixa Postal 403, CEP 96100 Pelotas, RS.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/CNPFT.

<sup>4</sup> Eng. - Agr., M.Sc., Prof. - Adjunto do Dep. de Fitot. da Univ. Fed. de Pelotas, Capão do Leão, RS.

inúmeras vantagens sobre os marcadores convencionais (Nakasu 1977). Sua principal vantagem sobre a técnica descritiva clássica é a determinação direta de uma composição genética do organismo, independentemente das influências ambientais (Pontikis et al. 1980).

A eletroforese tem sido aplicada, extensivamente, para a identificação de cultivares em plantas (Pierce & Brewbaker 1973). Em relação à cultura do pessegueiro, poucos trabalhos visando a identificação de cultivares por meios bioquímicos têm sido realizados. Carter Junior & Brock (1980) identificaram cinco cultivares de pessegueiro através da análise de proteína, utilizando a técnica da focalização isoelétrica.

A eletroforese poderá ser um importante método suplementar para a identificação de cultivares, como, por exemplo, em relação ao Registro de Cultivares do Sistema Cooperativo da Pesquisa Agropecuária; poderá, também, acelerar os programas de melhoramento, se as isoenzimas específicas puderem ser relacionadas com características agroindustriais importantes.

O presente trabalho teve como objetivos: a) desenvolver a técnica de eletroforese em pessegueiro, b) identificar alguns genótipos de pessegueiro a nível de isoenzimático e, c) relacionar os padrões de alguns sistemas enzimáticas com características de interesse agroindustrial.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos utilizados fazem parte dos pomares experimentais do Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, localizado no município de Pelotas, RS. Foram usados vinte diferentes genótipos, incluindo cultivares e seleções de pêsego comum (*Prunus persica*, var. *vulgaris*), pêsego chato (*Prunus persica*, var. *platycarpa*) e nectarina (*Prunus persica*, var. *nucipersica*), que se encontram identificados na Tabela 1.

Para as análises enzimáticas foram utilizados homogeneizados de folhas coletadas da região mediana dos ramos. Essas análises foram realizadas nos meses de janeiro e fevereiro, no ciclo vegetativo 82/83. Para cada genótipo utilizaram-se três indivíduos.

A técnica usada para a obtenção dos homogeneizados foi idêntica para todos os sistemas enzimáticos estudados. Utilizaram-se discos de folhas de 0,55 cm de diâmetro. A maceração do tecido foi feita com bastão em placas de acrílico escavadas, adicionando-se 0,002 ml de tampão de gel contendo 0,15% de ácido ascórbico, por disco.

TABELA 1. Genótipos utilizados.

Pêssego comum		Pêssego chato	Nectarinas
Mesa	Conserva		
Anão*	Aldrighi	Chato-1*	Cascata
BR-1	BR-2	Chato-2*	Sunred
BR-4	BR-4		
Coral	BR-6		
Chiripá	Capdebosca		
Premier	Cerrito		
	Convênio		
	Diamante		
	Magno		
	Precocinho		

\* Seleções introduzidas dos Estados Unidos da América.

Na obtenção dos eletroferogramas adotou-se a técnica de eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida.

As análises foram efetuadas utilizando-se o sistema de tampão descontínuo, descrito por Scandalios (1969).

As amostras dos diversos homogeneizados foram absorvidas em retângulos de papel Whatmann 3MM de 4,0 mm x 1,5 mm. Em seguida, os retângulos foram inseridos verticalmente nos géis, em fendas regulares e alinhadas, previamente feitas com o auxílio de um pente de aço inoxidável, provido de dentes de 4,0 mm.

As migrações eletroforéticas efetuaram-se em câmaras frias a uma temperatura de 4°C. A diferença de potencial foi mantida em torno de 10 v/cm, fazendo-se migrar até que o "front", formado pelos tampões e marcado pelo azul de bromofenol, atingisse 9 cm a partir do ponto de aplicação das amostras.

Para a resolução dos sistemas enzimáticos foram adotados os seguintes procedimentos:

**Esterase** - Para o estudo das esterases empregaram-se géis a 7% de "Cyanogum-41". Na resolução das mesmas utilizou-se o método descrito por Scandalios (1969), modificado, no qual os géis são imersos numa solução contendo 2 ml de  $\alpha$ -naftil acetato (1% em 1:1 de acetona e água); 100 mg de "fast blue RR salt"; 50 ml de tampão fosfato pH 4,3; 10 ml de tampão fosfato pH 9,2; e 40 ml de água destilada.

Os tampões e corante ("fast blue RR salt") foram misturados e filtrados antes da adição do substrato ( $\alpha$ -naftil acetato), para a obtenção de melhores resultados.

Os géis foram incubados em estufa a 37°C por um período aproximado de três horas, até o surgimento das bandas.

Após a revelação, os géis foram lavados em água corrente e fixados em uma solução de metanol, água destilada e ácido acético glacial na proporção de 5:5:1. Em seguida foram fotografados.

**Peroxidase** - Para o estudo desta enzima utilizaram-se géis a 6% de "Cyanogum-41". As bandas de peroxidases foram reveladas utilizando-se o método descrito por Scandalios (1969), modificado.

Os géis foram imersos em 20 ml de uma solução que continha na proporção de 1:1, benzidina dihidroclorato (0,5 g em 9 ml de ácido acético glacial aquecido a 50°C, acrescentando, após, 36 ml de água destilada) e peróxido de hidrogênio a 0,075%.

A revelação das zonas de atividade se processou em três minutos, aproximadamente. Após a revelação, os géis foram lavados em água corrente e imediatamente fotografados. Em seguida, fixados em uma solução de etanol e água destilada, na proporção de 1:1.

**Superóxido-dismutase** - No estudo da superóxido-dismutase utilizaram-se géis a 6% de "Cyanogum-41". Para a revelação do sistema, a técnica utilizada foi a descrita por Oliveira (1976), modificada, que consiste na imersão dos géis em uma solução contendo 100 ml de tampão tris-HCl pH 8,6; 0,006 g de fenazina metassulfato (PMS) e 0,02 g de nitroazul de tetrazólio (NBT).

Os géis foram colocados sob luz fluorescente produzida por uma lâmpada de 25 w, durante toda noite, à temperatura ambiente, para sua revelação. Após a revelação utilizou-se o mesmo procedimento adotado na esterase.

Para o registro dos dados, cada banda foi identificada por sua mobilidade relativa (Mr), que é calculada dividindo-se a distância migrada pela molécula enzimática pela distância migrada pelo "front".

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sistema enzimático da esterase, não se obtiveram zonas de atividade estáveis e nítidas. Isso impossibilitou a sua utilização na identificação dos genótipos, pois, segundo Pontikis et al. (1980), é necessário que os sistemas enzimáticos sejam estáveis.

Segundo Kuhns & Fretz (1978), a preparação das amostras para a eletroforese torna-se complicada pelas interações que podem ocorrer entre as proteínas e os outros constituintes celulares, que estão rigidamente compartimentalizados "in vivo", mas são misturados durante a maceração dos tecidos. A formação de agregados complexos com substâncias não protéicas pode ser uma das causas da falta de instabilidade do sistema enzimático da esterase, visto que essas substâncias são produtos de uma série de reações biossintéticas, que as tornam mais influenciáveis pelo ambiente do que as proteínas.

No sistema enzimático da peroxidase foram observadas zonas de migração anódicas e catódicas. Entretanto, só se consideraram, para efeito de análise, as primeiras, pelo fato de as zonas de migração catódicas apresentarem bandas instáveis. Nesse sistema, onze bandas foram observadas em todos os genótipos estudados; essas bandas apresentaram movimento relativo de 0,25; 0,31; 0,49; 0,60; 0,63; 0,66; 0,69; 0,71; 0,81; 0,85 e 0,88 (Fig. 1).

No sistema enzimático da superóxido-dismutase, dez bandas foram observadas em todos os genótipos, as quais apresentaram mobilidade relativas de 0,31; 0,39; 0,48; 0,57; 0,64; 0,72; 0,75; 0,81; 0,85 e 0,88 (Fig. 2).

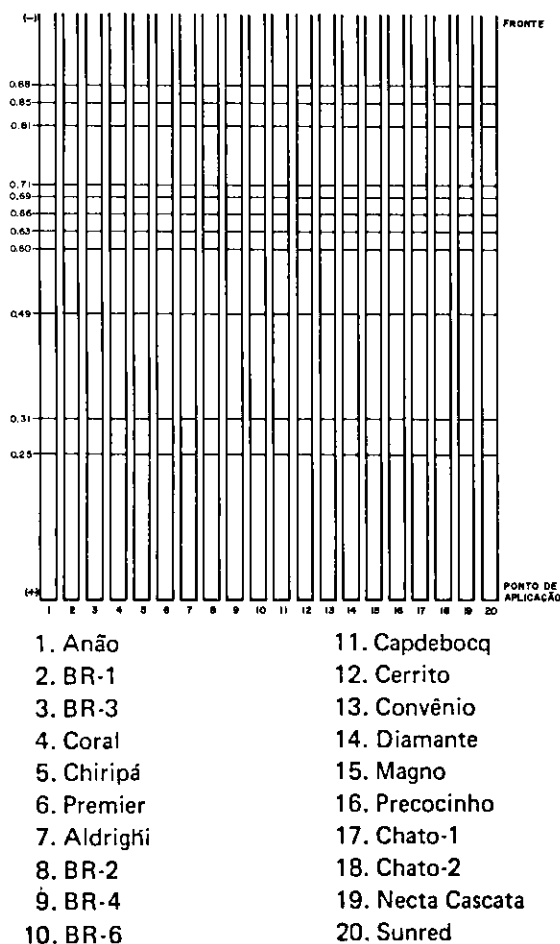


FIG. 1. Padrão isoenzimático da peroxidase obtido em folhas de 20 genótipos de pessegueiro.

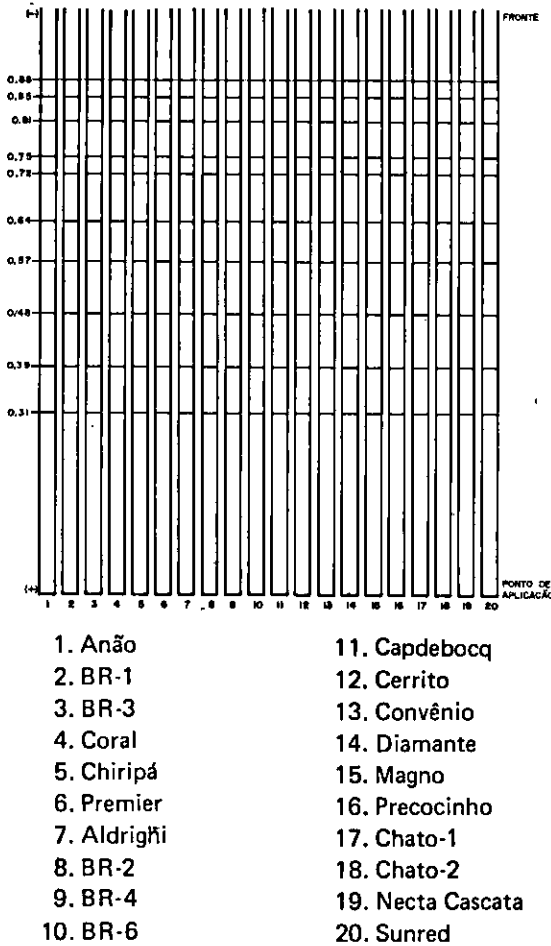


FIG. 2. Padrão isoenzimático da superóxido-dismutase obtido em folhas de 20 genótipos de pessegueiro.

A uniformidade dos padrões isoenzimáticos encontrados após as análises qualitativas entre os genótipos pode estar relacionada ao sistema de reprodução do pessegueiro, à uniformidade genética dos genótipos, a uma possível convergência genética e também à metodologia empregada.

As populações de plantas autógamas geralmente constituem-se de mistura de muitas linhagens homozigotas, estreitamente aparentadas, as quais, embora existindo lado a lado, permanecem mais ou menos independentes na reprodução. Em tais populações há a tendência em diminuir o número de heterozigotos, conduzindo a uma fixação de alelos e, portanto, a uma maior uniformidade genética. O pessegueiro, segundo Chandler (1942), é

autofértil, para quase todas as cultivares, e a tendência das flores é autopolinizar-se.

Uma uniformidade genética pode levar, também, a uma homogeneidade nos padrões enzimáticos. Tal fato foi levantado por Wener & Sink Junior (1977), que, analisando proteínas solúveis e peroxidase em dezoito cultivares de pionsétia (*Euphorbia pulcherrima*, Willd), observaram que todas as cultivares exibiram o mesmo padrão protéico e quatro padrões de bandeamento diferentes para peroxidase.

Nas cultivares de indústria (Fig. 3), excetuando-se a cultivar Convênio, todas possuem, na sua constituição genética, a cultivar Aldrighi. A seleção Intermediária é uma seleção de pessegueiro da colônia de Pelotas, provavelmente de Aldrighi.

As cultivares de mesa (Fig. 4) Chiripá, BR-1, Coral e BR-3 apresentam a cultivar Delicioso como ancestral comum, enquanto as cultivares Premier, Coral e BR-3 apresentam, em sua constituição genética, a cultivar Jewel.

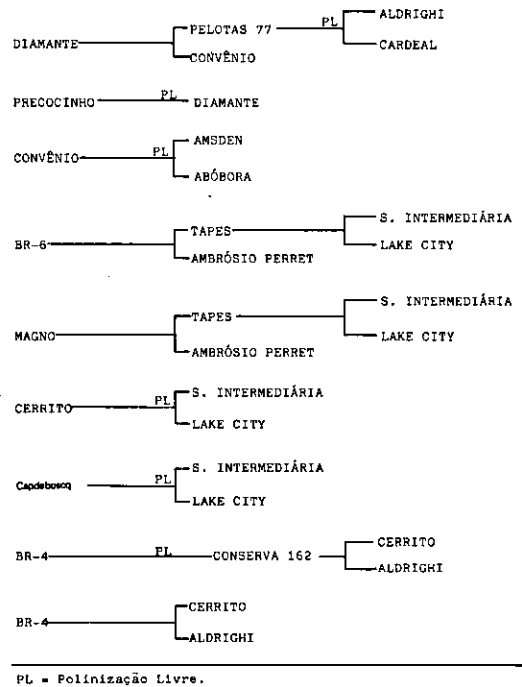


FIG. 3. Genealogia das cultivares de pêssego para indústria. Fonte: Bassols 1979, Bassols et al. 1981, Nakasu et al. 1980.

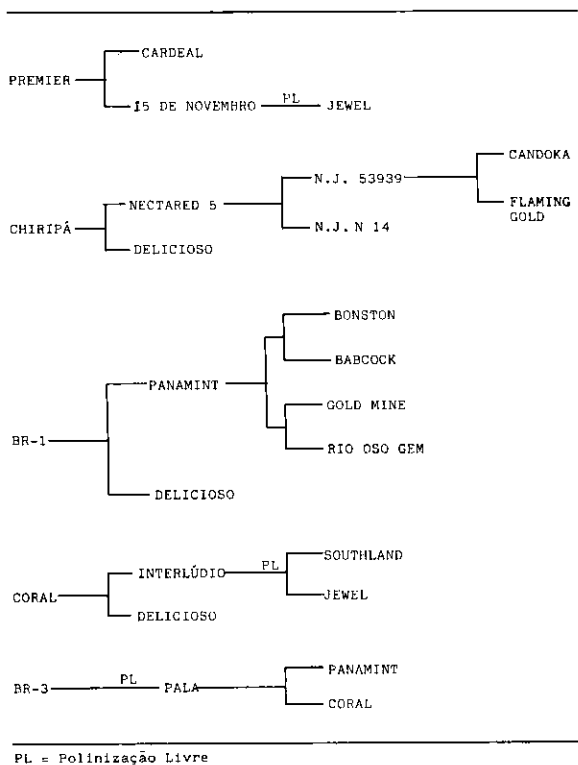


FIG. 4. Genealogia das cultivares de pêsego para mesa. Fonte: Bassols 1979, Nakasu et al. 1979.

As duas cultivares de nectarinas estudadas (Fig. 5), Cascata e Sunred, apresentam a cultivar J.H. Hale como ancestral comum.

Deve-se salientar, também, que, segundo Hesse (1975), a maioria das cultivares norte-americanas são derivadas de uma base limitada e, portanto, são geneticamente restritas. Entre as cultivares de maior êxito, cultivadas hoje, muitas, se não a maior parte, conduzem à J.H. Hale, e dali, mediante Elberta ou Bele, a Chinesa Cling. Poucas cultivares não relacionadas foram também usadas extensivamente no estágio inicial do programa de melhoramento.

A homogeneidade entre os padrões estudados talvez pudesse ser explicada de modo semelhante à hipótese levantada por Endo et al. (1971), quando estudaram peroxidase e fosfatase ácida em cultivares de *Oryza sativa* L. (espécie selvagem). As últimas mostraram polimorfismo para essas enzimas, enquanto as cultivares da primeira, apesar de mostrarem variações morfológicas, apresentaram pouca variação nos zimogramas. Frequentemente, na "domesticação", alguns genótipos particulares são rapidamente selecionados, enquanto outros são perdidos. Em outras palavras, quando genótipos de forma primitivas de arroz foram moldados por cul-

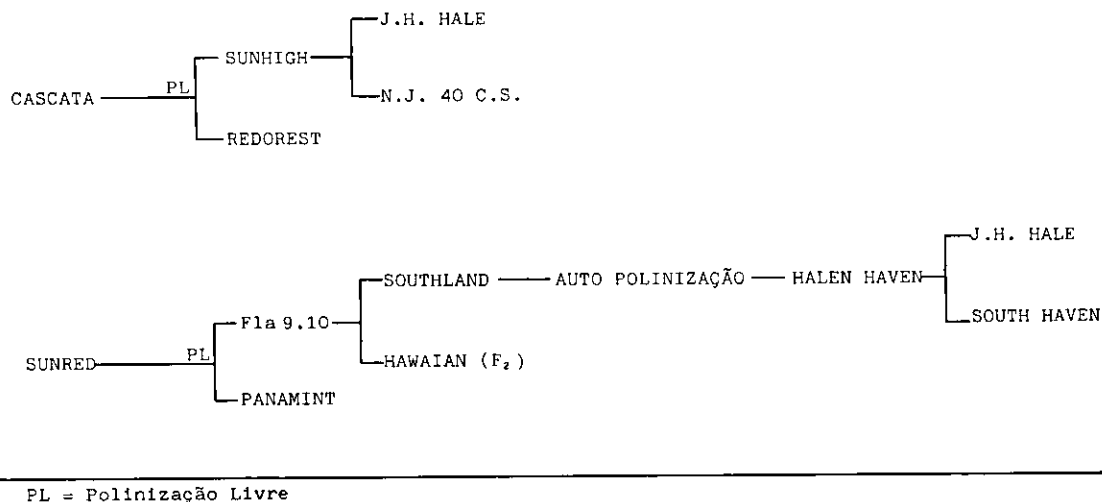


FIG. 5. Genealogia das cultivares de nectarina. Fonte: Bassols 1979, Brooks & Olmo 1972, Nakasu et al. 1979.

tivo, pode ter ocorrido convergência genética dos mesmos a um certo nível isoenzimático.

A técnica de eletroforese empregada para análise de proteínas ou de isoenzimas de um indivíduo pode influenciar a sua resolução. O sucesso obtido por Carter Junior & Brock (1980) na identificação de cinco cultivares de pessegueiro - Coronet, Lovell, Redglobe, Redhaven e Elberta - pode estar ligada a esse fato. Para a caracterização destas cultivares, foi usada a técnica de focalização isoeletrica, a qual, segundo Timberg & Olsman, Dattilo & Congiu e Kaiser et al., citados por King & Kurth (1982), dentre os métodos eletroforéticos, é a técnica que melhor resolução apresenta. Também deve-se salientar que os referidos autores, Carter Junior & Brock (1980), analisaram proteínas, e utilizaram como material experimental tecidos do lenho terminal do ramo do ano, pois, como é claramente mostrado, os padrões e intensidade das isoenzimas são específicos ao sistema enzimático e à parte da planta (Giannopolitis & Reis 1977).

#### CONCLUSÕES

1. A identificação a nível isoenzimático dos genótipos de pessegueiro estudados, utilizando-se os sistemas enzimáticos da peroxidase e da superóxido-dismutase, não foi possível, em decorrência da uniformidade encontrada entre os genótipos.

2. O sistema enzimático da esterase não se mostrou favorável na identificação dos genótipos nas condições avaliadas, uma vez que as bandas são instáveis e de baixa nitidez.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração da laboratorista Ema Gladis S. Correa, ao Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, na pessoa de seu Chefe, Eng. - Agr., Edy de Araújo Fernandes, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, que tornaram possível a realização deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- BASSOLS, M. do C. Genealogia de algumas variedades de pessegueiro. Pelotas, EMBRAPA-UEPAE Cascata, 1979. n.p.
- BASSOLS, M. do C.; NAKASU, B.H.; FELICIANO, A.J. 'Precocinho'; uma nova cultivar de pêssego para indústria. Pelotas, EMBRAPA-UEPAE Cascata, 1981. 10p. (EMBRAPA-UEPAE Cascata. Documentos, 4)
- BRINGHURST, R.S.; ARULSEKAR, S.; HANCOCK JUNIOR, J.F.; VOTH, V. Electrophoretic characterization of strawberry cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 106(5):684-7, 1981.
- BROOKS, R.M. & OLMO, H.P. Register of new fruit & nut varieties. Berkeley, Univ. of California Press, 1972. 708p.
- CARTER JUNIOR, G.E. & BROCK, M.M. Identification of peach cultivars through protein analysis. *Hort. Science*, 15(3):292-3, 1980.
- CHANDLER, W.H. Deciduous orchards. Philadelphia, Lea & Febiger, 1942. 438p.
- ENDO, T.; SHARI, B.B.; PAI, C. Genetic convergence of specific acid phosphatase zymograms in *Oryza sativa*. *Jap. J. Genet.*, 46(3):147-52, 1971.
- GIANNOPOLITIS, C.N. & REIS, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 59:309-14, 1977.
- HESSE, C.D. Peaches. In: JANICK, J. & MOORE, J.N., ed. *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Purdue Univ. Press, 1975. p.285-335.
- KING, N.L. & KURTH, L. Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme-staining of isoelectric focusing gels. *J. Food Sci.*, 47(5):1608-12, 1982.
- KUHNS, L.J. & FRETZ, T.A. Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. I. Extraction and storage of protein and active enzymes from rose leaves. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 103(4):503-8, 1978.
- NAKASU, B.H. The variability and segregation of peroxidase, acid, phosphatase and esterase in selected genotypes of *Fragaria*. New Brunswick, Rutgers Univ., 1977. 85p. Tese Doutorado.
- NAKASU, B.H.; FELICIANO, A.J.; BASSOLS, M. do C. Cultivares de pêssego para indústria. Pelotas, EMBRAPA-UEPAE Cascata, 1980. 35p. (EMBRAPA-UEPAE Cascata. Circular técnica, 2)
- NAKASU, B.H.; FELICIANO, A.J.; BASSOLS, M. do C.; NUNES, E.C. Pêssego para mesa e nectarina; cultivares. Pelotas, EMBRAPA-UEPAE Cascata, 1979. 32p. (EMBRAPA-UEPAE Cascata. Circular técnica, 1)
- OLIVEIRA, H.A. Padrões eletroforéticos e genética de isoenzimas na identificação de cultivares e linhagem de *Pisum sativum* L. e sua utilização no melhoramento genético. Porto Alegre, UFRS, 1976. 136p. Tese Doutorado.

- PIERCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme in horticultural science. *HortScience*, 8(1): 17-22, 1973.
- PONTIKIS, C.A.; LOUKAS, M.; KOUSOUNIS, G. The use of biochemical marks to distinguish olive cultivars. *J. Hortic. Sci.*, 55(4):333-43, 1980.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants; a review. *Biochem. Genet.*, 3:37-79, 1969.
- WENER, D.J. & SINK JUNIOR, K.C. Identification of poinsettia cultivars by electrophoretic analysis of proteins and peroxidase. *J. Hered.*, 68:35-40, 1977.