

## MÉTODOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE VIDEIRA ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

J. E. J. EIRAS-DIAS <sup>(1)</sup>, F. CABRAL <sup>(2)</sup>, B. SOUSA <sup>(2)</sup>  
e I. CARVALHO <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Estação Vitivinícola Nacional. Dois Portos, 2575 RUNA.

<sup>(2)</sup> Instituto Superior de Agronomia. 1399 LISBOA CODEX.

### RESUMO

A descrição morfológica e a ampelometria são os métodos usualmente utilizados na caracterização ampelográfica das cultivares de videira.

A caracterização isoenzimática, método já testado na identificação de outros géneros, oferece também potencialidades interessantes para a caracterização das castas.

Em 1987 iniciou-se um estudo de caracterização isoenzimática de algumas cultivares portuguesas de *Vitis vinifera* L.

O estudo incidiu sobre 3 complexos enzimáticos: as fosfatases ácidas, as esterases carboxílicas  $\alpha$  e  $\beta$ , e a GOT.

Os ensaios bioquímicos foram levados a efeito ao longo do ciclo vegetativo da videira, em folhas jovens perfeitamente caracterizadas.

As esterases foram as enzimas que apresentaram os melhores resultados, no estado fenológico botões florais separados.

### INTRODUÇÃO

A identificação de uma cultivar numa cultura como a da vinha, tem grande importância técnica e económica.

Neste trabalho, indicamos quais os métodos actualmente utilizados para descrever e identificar castas, assim como informamos sobre um ensaio realizado com a finalidade de testar a aplicabilidade da caracterização isoenzimática na identificação de cultivares de videira.

Tradicionalmente, a identificação de castas é feita por especialistas que as distinguem através de métodos empíricos baseados nas suas características morfológicas. Estes métodos

como facilmente se depreende, são extremamente subjectivos e de difícil transmissão.

Daí, o grande interesse em idealizar e estudar metodologia que permita uma identificação tão objectiva quanto possível das cultivares de videira.

Ao longo dos anos, diversos autores criaram descritores padronizados onde são indicadas as características a observar para se conhecer e identificar uma casta. Actualmente, o conjunto de descritores mais divulgado e aceite internacionalmente foi elaborado pelo OIV (Office Internacional de la Vigne et du Vin), em 1983, e contribuiu de modo decisivo para a uniformização das descrições morfológicas. Porém, estes descritores não têm permitido a distinção de castas, continuando a ser imprescindível o recurso ao especialista.

Face a esta situação vários autores desenvolveram métodos ampelométricos baseados em medições efectuadas sobre órgãos vegetativos da videira. Estes são mais objectivos já que sujeitos a análise matemática.

Do conjunto de métodos ampelométricos existentes merece especial realce o Método Filométrico de Acúrcio Rodrigues (1952). Este baseia-se nas coordenadas da folha de videira, e apesar de idealizado na década de 50, permite, ainda hoje, a análise dos seus dados pelas técnicas matemáticas mais modernas, nomeadamente por taxonomia numérica.

A caracterização ampelográfica de castas portuguesas tem sido executada com recurso aos dois métodos acima referidos, i. e.:

1. A caracterização morfológica utilizando o conjunto de descritores do OIV;
2. A caracterização ampelométrica com recurso ao método filométrico de Acúrcio Rodrigues.

No entanto, estes métodos não têm permitido, per si, a distinção das cultivares de videira, limitando-se a criar grupos de castas semelhantes.

Numa tentativa de ultrapassar as desvantagens acima mencionadas, hoje em dia começa a ser utilizado para a videira um método já testado na identificação de outros géneros — a caracterização isoenzimática.

O que torna a utilização das isoenzimas aliciante é a sua estabilidade aos factores ambientais.

Os métodos morfológicos e os ampelométricos utilizam fenótipos relativamente distantes da informação genética e influenciáveis pelo meio e pelo estado de desenvolvimento da planta. Por outro lado, uma análise genética requer equipamento sofisticado, inexistente na maioria dos laboratórios. As enzimas, produtos quase directos dos genes, não são, em princípio, afectadas pelas condições ambientais. Estas não parecem intervir na composição e na sequência dos aminoácidos enzimáticos, e, consequentemente, na posição das bandas dos perfis isoenzimáticos.

Para este método ter aplicabilidade na videira é necessário encontrar enzimas que garantam as condições enunciadas por Singt *et al.* (1983), citado por Castro (1988).

1. Que cada casta tenha os seus perfis enzimáticos característicos, ao menos num locus, e, portanto, distintos dos revelados pelas outras castas;
2. Que os perfis isoenzimáticos dos indivíduos pertencentes à mesma casta apresentem variação mínima, ou mesmo nula;
3. Que não haja influência ambiental na expressão dos perfis;
4. Que haja reprodutibilidade dos resultados tratando-se, como é o caso, de um processo laboratorial.

Paralelamente, a actividade enzimática não é a mesma em todos os órgãos da videira. Algumas enzimas poderão ser activas em dado tecido e estar ausentes noutra tecido do mesmo indivíduo.

A identificação de cultivares de videira por métodos bioquímicos nomeadamente a electroforese de isoenzimas, utilizando vários tecidos, já foi ensaiada por vários autores. Wolfe (1976) e Schwennesen *et al.* (1982) utilizaram bagos maduros, Dal Belin Peruffo *et al.* (1981) folhas, Stavrakakis e Loukas (1983), e Cargnello *et al.* (1988) utilizaram pólen, e, finalmente, Bachmann e Blaich (1988) o floema dos entre-nós.

Em 1987, iniciámos o estudo de identificação de castas portuguesas por electroforese de isoenzimas foliares em gel de poliacrilamida.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo incidiu sobre 5 castas (Jampal B, Boal Vencedor B, Rabo de Ovelha B, Trincadeira das Pratas B e Tinta Miúda T) e 3 clones da mesma casta (Jampal).

A colheita de material biológico realizou-se ao longo do ciclo vegetativo da videira e foi controlada em função dos estados fenológicos «cachos separados», «botões florais separados» e «floração».

O material biológico utilizado foi a folha jovem devido a estudos prévios terem determinado que ela permite obter boas separações isoenzimáticas e que devido ao seu baixo teor em substâncias fenólicas estas não interferem no processo de extração e análise das enzimas.

A folha jovem também permite um período relativamente dilatado na colheita das amostras — de Maio a Julho. Consideramos folha jovem a que possui a nervura principal aproximadamente igual a 1 cm de comprimento, correspondendo à 2.<sup>a</sup> folha expandida da extremidade do lançamento.

As enzimas estudadas foram as fosfatadas ácidas (AP), as esterases carboxílicas  $\alpha$  e  $\beta$  (E), e a glutamato oxaloacetato transaminase (GOT). A separação das enzimas foi feita de acordo com Davis e Ornstein (1961), num gel a 8% de acrilamida, e a revelação processou-se de acordo com a metodologia descrita por Schwartz *et al.* (1963), Markert e Hunter (1959), e Scandalios (1969), respectivamente para a GOT, AP e E.

O estudo incidiu sobre estas enzimas uma vez que quando iniciámos este trabalho, elas estavam a ser usadas com sucesso na identificação de outros géneros nomeadamente *lupinus*, *triticum* e *triticale*. Paralelamente, outros autores haviam testado com bons resultados na caracterização isoenzimática de algumas espécies e cultivares de *Vitis*, a fosfatase do bago (Wolffe, 1976; Schwennesen *et al.*, 1982), e as esterases do pólen (Stavrakakis e Loukas, 1983) e da folha (Dal Belin Peruffo *et al.*, 1981).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis enzimáticos das 3 enzimas estudadas apresentaram variações ao longo do ciclo vegetativo da videira, como por exemplo se pode observar no Quadro I, referente às bandas isoenzimáticas da fosfatase na casta Jampal (clone T<sub>1</sub>).

QUADRO I

Variação ao longo do ciclo vegetativo da videira das bandas isoenzimáticas da fosfatase no clone T<sub>1</sub> de Jampal

*Variation pendant le cycle vegetatif des cépages des bands isoenzymatiques des fosfatases dans le clone T<sub>1</sub> de Jampal*

Rf.	15 dias antes bot. fl. sed.	bot. fl. sep.	floração	15 dias após floração	30 dias após floração
0,00 —	—	—	—	—	—
0,10 —	—	—	—	—	—
0,20 —	—	—	—	—	—
0,30 —	—	—	—	—	—
0,40 —	—	—	—	—	—
0,50 —	—	—	—	—	—
0,60 —	—	—	—	—	—
0,70 —	—	—	—	—	—

QUADRO II

Bandas isoenzimáticas das esterases no estado fenológico  
«botões florais separados»

*Bands isoenzymatiques des esterases dans l'état phenologique  
«boutons floraux séparés»*

Rf.	Jampal Cl T <sub>1</sub>	Jampal Cl 12 a I	Jampal Cl 1116	Boal Vencedor	Trinc. Pratas	Rabo de Ovelha	Tinta Miúda
0,00 —	—	—	—	—	—	—	—
0,10 —	—	—	—	—	—	—	—
0,20 —	—	—	—	—	—	—	—
0,30 —	—	—	—	—	—	—	—
0,40 —	—	—	—	—	—	—	—
0,50 —	—	—	—	—	—	—	—
0,60 —	—	—	—	—	—	—	—
0,70 —	—	—	—	—	—	—	—

Para obtermos uma comparabilidade entre castas somos, assim, obrigados a determinar uma época de amostragem bem determinada.

No estado fenológico «botões florais separados» os zimogramas das esterases apresentaram bandas iguais nos 3 clones de Jampal e variáveis de casta para casta, como se pode observar no Quadro II, tornando possível a distinção das castas em estudo. Nas restantes fases do ciclo vegetativo e para as restantes enzimas os zimogramas são iguais em castas diferentes, não as permitindo distinguir, ou são diferentes nos clones da mesma casta.

Verificou-se ainda que, a actividade enzimática nas folhas jovens cessou com a paragem do seu crescimento.

### CONCLUSÕES

A variação da actividade enzimática ao longo do ciclo vegetativo e o bom poder discriminante das esterases no estado fenológico «botões florais separados», levam-nos a prosseguir os estudos segundo duas linhas de orientação:

1. Escolha do estado fenológico «botões florais separados» para fazer a colheita do material biológico, evitando-se a variação da actividade enzimática ao longo do ciclo vegetativo;
2. Continuação da pesquisa de enzimas que possuam actividade estável.

Estas duas linhas de orientação são tanto mais importantes quanto é nossa opinião que este método só será verdadeiramente discriminante, possibilitando a distinção de cultivares, se forem utilizados vários sistemas de bandas enzimáticas polimórficas.

### RÉSUMÉ

#### **Méthodes utilisées pour la caractérisation des cépages. Essayage de caractérisation isoenzymatique**

La description morphologique et la ampélogétrie sont les méthodes qui on utilise, en général, pour la caractérisation ampélographique des cépages.

La caractérisation isoenzymatique, méthode déjà étudiée pour la identification d'autres genres, peut avoir un role également très important dans la caractérisation des cépages.

Dans l'année 1987 nous avons commencé une étude sur la caractérisation isoenzymatique de quelques cépages portugaises.

On a étudié trois complexes enzymatiques: les phosphatases acides, les carboxyls estérases  $\alpha$  et  $\beta$ , et la GOT.

Les essais biochimiques ont été faits en jeunes feuilles parfaitement identifiées, pendant le cycle végétatif des cépages.

Les estérases ont furent étées les enzymes qui ont présenté les meilleurs resultats dans l'état phenologique «boutons floraux séparés».

### SUMMARY

#### Methods used for the characterization of *Vitis vinifera* L. cultivars. A study on enzymatic characterization

The morphological description and the ampelometry are the methods that have generally been used for the ampelographic characterization of *Vitis vinifera* varieties.

The isoenzymatic characterization, another method already tested to identify other species, also offers rather interesting potentialities to characterize vine varieties.

In 1987 we began a study aiming to do the isoenzymatic characterization of some Portuguese vine varieties of *Vitis vinifera*.

We have considered three enzymes in our study: the acid phosphatase,  $\alpha$  and  $\beta$  esterases and GOT.

The biochemical experiments were carried out throughout the growing cycle of the vine, in perfectly defined young leaves.

The esterases were among the studied enzymes the ones that have displayed better results in the phenological state: separated flower-buds.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bachmann, O. e R. Blaich  
1988 Isoelectric focusing of grape vine peroxidases as a tool for ampelography. *Vitis* 27: 147-155.
- Cargnello, G.; E. Gianazza; G. Tedesco; M. Cappella e F. M. Gerola  
1988 Wall proteins of *Vitis vinifera* pollen. I. Constancy of the phenotype. *Vitis* 27: 47-55.
- Castro, L. F. T.  
1988 Identificação de variedades em espécies vegetais através das isoenzimas. *Anais UTAD* 1: 41-50.
- Dal Belin Peruffo, A.; Z. Varanini e A. Maggioni  
1981 Caratterizzazione di specie, varietà e cloni di vite mediante elettrofocalizzazione di estratti enzimatici fogliari. 3.º *Simp. Intern. Seleção Clonal Videira*, Veneza.
- Davis, B. Y. e L. Ornstein  
1961 *Disc Electrophoresis* Distillation Products Industries, Rochester, USA.

- Market, C. e R. Hunter  
1959 The distribution of esterases in mouse tissues. *J. Histochem Cytochem.* **7**.
- Schwartz, M. K.; J. S. Nisselbaum e O. Bodansky  
1963 Procedure for staining zones of activity of glutamic oxaloacetic transaminase following electrophoresis with starch gel. *Am. J. Clin. Pathol.* **40**: 103-106.
- Office International de la Vigne et du Vin (OIV)  
1983 *Code des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis*. A. Dedon. Paris.
- Rodrigues, A.  
1952 *Um Método Filométrico de Caracterização Ampelográfica*. D.G.S.A. Lisboa.
- Scandalios, J. G.  
1969 Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genetics* **3**: 37-79.
- Schwennesen, J.; E. A. Mielke e W. H. Wolfe  
1982 Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. *Hort. Science* **17** (3): 366-368.
- Singh, R. S.; S. K. Jain e C. O. Qualset  
1973 Protein electrophoresis as an aid to oat variety identification. *Euphytica* **22**: 98-105 (Cit. in Castro, 1988).
- Stavarakakis, M. e M. Loukas  
1983 The between and within grape cultivars genetic variation. *Scientia Horticulturae* **19**: 321-334.
- Wolfe, W. H.  
1976 Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Am. J. Enol. Viticult.* **27** (2): 68-73.