RELAÇÕES ENTRE NÍVEIS DE AÇÚCARES E ATIVIDADES DE INVERTASES
EM TECIDOS DE QUATRO CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* spp) CULTIVADAS À CAMPO

IRENICE MARIA SANTOS VIEIRA

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para ob
tenção do título de Doutor em Agronô
mia. Área de concentração: "Solos e
Nutrição de Plantas"

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1988

RELAÇÕES ENTRE NÍVEIS DE AÇÚCARES E ATIVIDADES DE INVERTASES
EM TECIDOS DE QUATRO CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* spp) CULTIVADAS À CAMPO

IRENICE MARIA SANTOS VIEIRA

Aprovada em 13.10.1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo	ESALQ/USP
Prof. Dr. André Martin Louis Neptune	ESALQ/USP
Prof. Dr. Henrique Paulo Haag	ESALQ/USP
Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da Silveira	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Suzuki	FCA/UNESP

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
-Orientador-

SE não houver frutos,

VALEU pela beleza das flores;

SE não houver flores,

VALEU pela sombra das folhas;

SE não houver folhas,

VALEU pela intenção da semente ...

HENFIL

... OFEREÇO ...

A 'DEUS' e

aos meus *Filhos*

MICHELLA, MICHELL e MARCELO

porque tornam a *VIDA* mais *BONITA!*

... DEDICO ...

Aos meus *pais:*

"CASSIANO & ISABEL"

porque a vida passo a passo

se *ENSINA*

AGRADECIMENTOS

- . Ao Dr Otto Jesu Crocomo, mestre e amigo, co-autor de mi nha formação no campo da pesquisa, pela confiança, apoio e orientação em todas as fases deste trabalho.
- . À ESALQ/USP e à FCAP - Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, nos nomes dos Professores Dr. José Fernando Lucas de Oliveira, Antonio Carlos Albério e colegas do Departamento de Química e Tecnologia, pela oportunidade de fre quentar o curso.
- . Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e ao Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC/ESALQ/USP) pe las facilidades concedidas.
- . Ao IAA-PLANALSUCAR de Araras-SP em nome do Dr. Osny Bac chi e à COPERSUCAR em nome do Dr. Wilson M. da Silva pelo fornecimento do material vegetal.
- . Aos Professores Drs Nilson A. Villa Nova, Oswaldo P. Godoy e Luiz Carlos Basso por terem aceito a indicação para julgar este trabalho.

- . Aos amigos: Wilton Vieira, Ana & Zé Carlos, Albenísio & Elaine, Lúcio & Nazarê, Ronaldo & Carmita, Tarcísio & Silvia, Rissette, Raffaella, Lindaurea e Cidinha, pelo incentivo, apoio e ajuda em todos os momentos.
- . Aos técnicos de laboratório: Sérgio Dorelli e Enio Tiago pela valiosa colaboração na coleta do material no campo e análises químicas.
- . Aos colegas: Leonardo, Helaine, Sandra, João Carlos, Jeanette, Marina, Fernando, Marcílio & Cris, Isaac, Cida, Jorge, Murilo, Maguto, Carlos Dorelli, Solizete, Cris, Ivete, Romeu, Miguel e Celso. Pelo companheirismo do dia-a-dia.
- . Aos meus professores da ESALQ e CENA Drs. Paulo Libardi, E. Malavolta, Francisco Mello, Paulo Haag e em especial ao Dr. Klaus Reichardt, pela amizade com que sempre me distinguiram.

ENFIM

À todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para o bom andamento desse trabalho, oferecendo-me uma 'gôta' de otimismo nos momentos mais difíceis de seu desenvolvimento.

MUITO OBRIGADO ...

Í N D I C E

	PÁGINA
RESUMO.....	<i>xvii</i>
SUMMARY	<i>xx</i>
INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Crescimento Maturação e o Rendimento dos Cultivares.....	6
2.2. Atividade de Invertases na Regulação do Sistema Fonte-Reservatório.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Localização da Área de Estudo.....	26
3.1.1. Solo	26
3.1.2. Clima.....	27
3.2. Cultivar	27
3.3. Instalação dos Ensaios.....	31
3.4. Métodos.....	32
3.4.1. Obtenção das Amostras.....	32
3.4.2. Preparo das Amostras.....	32

	Página
3.4.3. Análises enzimáticas.....	36
3.4.3.1. Extração.....	36
3.4.3.2. Ensaio de Atividades de Invertases.....	44
3.4.4. Análises Químicas.....	45
3.4.4.1. Extrato alcoólico.....	45
3.4.4.2. Determinação dos Açú cares Solúveis Totais..	45
3.4.4.3. Determinação dos Açúca res Redutores.....	45
3.4.4.4. Determinação de Sacaro- se.....	46
3.4.4.5. Proteínas.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. Atividade de Invertases e Características Varietais Durante o Desenvolvimento.....	47
4.2. Armazenamento de Açúcares em Relação as Atividades de Invertases.....	82
5. CONCLUSÕES.....	114
6. BIBLIOGRAFIA.....	117

LISTA DE QUADRO

PÁGINA

QUADRO 1. Valores de precipitação pluvial mensal e temperatura (média, mínima e máxima mensal) registradas em duas localida <u>des</u> do Estado de São Paulo no ano de 1984	28
--	----

LISTA DE TABELA

PÁGINA

TABELA 1.	Conteúdo de sacarose (SAC); Açúcares Redutores (AR); Açúcares Solúveis Totais (AST); Invertase Ácida da Parede Celular (IP); Invertase Ácida (IA) e Invertase Neutra (IN) em diferentes tecidos de quatro cultivares de cana-de-açúcar. (Açúcar= expresso em mg de glucose/100 mg de matéria seca (%)) e atividade de Invertase expressa em μ g de AR/hora/mg de proteína).....	48
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Curvas de maturação para cana-planta dos cultivares NA56-79 e CB41-79.....	30
2	Curvas de maturação para cana-planta dos cultivares SP71-799 e SP70-1143.....	30
3	Esquema demonstrativo das amostras de lâminas das folhas +3 e +4, sem a nervu <u>r</u> a principal utilizadas nas análises enzi <u>m</u> áticas e químicas.....	34
4	Esquema demonstrativo das amostras de bainha foliar e internódios utilizados nas análises enzimáticas e químicas.....	35
5	Etapas do procedimento para a preparação dos extratos para a determinação de inver <u>t</u> ases solúveis IS (ácida e neutra) e in <u>v</u> ertases ligadas às paredes celulares IP	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
6	Atividade de invertases ácida solúvel (IAS) neutra (IN) e invertase ligada à parede celular (IP) de lâminas foliares dos cultivares CB41-76, NA56-79 e SP70-1143 e SP71-799	50
7	Atividade de invertase ácida ligada à parede celular dos tecidos de lâminas foliares (pH 3,8) dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).....	53
8	Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5) nos tecidos de lâminas foliares de plantas dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).....	56
9	Atividade de invertase neutra (pH 7,0) nos tecidos de lâminas foliares dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
10	Atividade de invertase ácida solúvel (IAS), neutra (IN) e invertase ácida ligada à parede celular (IP) da bainha foliar (pH 3,5) dos cultivares CB41-76, NA56-79, SP70-1143, SP71-799.....	62
11	Atividade de invertase ácida ligada às paredes celulares da bainha foliar (pH 3,5) dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).....	64
12	Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5) da bainha foliar dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B)	66
13	Atividade de invertase neutra (pH 7,0) da bainha foliar dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
14	Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5), invertase neutra (pH 7,0) e invertase ácida (pH 2,2) ligada à parede celular dos colmos dos cultivares CB41-76 , NA56-79, SP70-1143 e SP71-799.....	71
15	Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5) no colmo dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B)..	72
16	Atividade de invertase neutra (pH 7,0) no colmo dos cultivares CB41-76 e NA56 - 79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).....	73
17	Atividade de invertase ligada à parede celular do colmo dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B)	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
18	Efeito da temperatura e precipitação <u>so</u> bre a atividade de invertase ácida nos tecidos do colmo dos cultivares CB41-76 e NA56-79.....	79
19	Efeito da temperatura e precipitação <u>so</u> bre a atividade de invertase ácida nos tecidos do colmo dos cultivares SP70-1143 e SP71-799.....	80
20	Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e Conteû- do de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s) nas lâminas foliares dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (B).....	83
21	Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e Conteû- do de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B) durante o desenvolve- mento das lâminas foliares dos cultiva -	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
	res SP70-1143 e SP71-799.....	86
22	Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B), durante o desenvolvimento de bainhas foliares dos cultivares CB41-76 e NA56-79.....	94
23	Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B), durante o desenvolvimento de bainhas foliares dos cultivares SP70-1143 e SP71-799.....	97
24	Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B), durante o desenvolvimento de internódios de colmos de cana-de-açúcar dos cultivares CB41-76 e NA56-79.....	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
25	Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s), durante o desenvolvimento de internódios de colmos de cana-de-açúcar dos cultivares SP70-1143 e SP71-799..... 102
26	Percentagem total de açúcares acumulados nos colmos dos quatro cultivares durante o desenvolvimento..... 108
27	Teores médios totais de açúcares solúveis totais (A), sacarose (SAC) e açúcares redutores (AR) acumulados nos colmos dos cultivares CB41-76 e NA56-79; SP70-1143 e SP71-799 durante o desenvolvimento..... 109

RELAÇÕES ENTRE NÍVEIS DE AÇÚCARES E ATIVIDADES DE INVERTASES
EM TECIDOS DE QUATRO CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR

(*Saccharum* spp) CULTIVADAS À CAMPO

Autora: IRENICE MARIA SANTOS VIEIRA

Orientador: DR. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo estudar as relações entre os níveis de açúcares e atividade de invertases, verificando a influência da característica varietal sobre a relação sacarose-invertase em tecidos fonte-reservatório e as variações fisiológicas nas atividades dessas enzimas durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar. Para tanto foram selecionados quatro cultivares (CB41-76, NA56-79, SP70-1143 e SP71-799) representativos em termos de produção de sacarose.

As amostragens foram realizadas aos 3, 4, 5, 6 e 7 meses após o plantio, no ciclo da cana-planta, determinando-se em cada época e em cada amostra de tecido (lâmina foliar, bainha e colmo) os níveis de açúcares so

lúveis totais, açúcares redutores, sacarose, atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5), invertase neutra (pH 7,0) e invertase ácida da parede celular. Comprovou-se que essas últimas formas isoenzimáticas de invertase, estão firmemente ligadas às paredes celulares dos tecidos de lâmina foliar, bainha e colmo. Elas consistem de enzimas diferentes em cada tecido, sendo distinguíveis com base no pH ótimo, respectivamente 3,8, 3,5 e 2,2.

Em geral, os mais altos níveis de atividade de de invertase foram encontrados nas lâminas foliares de todos os cultivares onde o teor de sacarose foi relativamente mais baixo. Inversamente, os mais baixos níveis de atividade foram detectados na bainha foliar onde se observaram altos teores de sacarose. No tecido do colmo a relação invertase-açúcar variou de acordo com a característica fisiológica, própria de cada cultivar. Dos quatro cultivares estudados a atividade de invertase foi maior no CB41-76 que apresentou o menor conteúdo de sacarose no colmo e os mais altos teores de açúcares redutores. Observou-se que as diferenças entre os cultivares CB41-76 e NA56-79 quanto aos teores de sacarose nas folhas e colmos estão localizados na bainha e não na lâmina foliar. Essa diferença foi atribuída à elevada eficiência de migração da sacarose das lâminas para a bainha e à baixa eficiência de mi

gração desse açúcar da bainha para os internódios no cultivar CB41-76. Uma condição inversa foi observada para plantas dos cultivares NA56-79, SP70-1143 e SP71-799.

A elevada atividade de invertase ácida solúvel nos tecidos de lâmina foliar durante as fases iniciais do crescimento pode ser uma característica de um cultivar com baixo teor de sacarose no colmo. Por outro lado a presença da invertase neutra e invertase de parede celular em níveis elevados no final do ensaio, parece determinar o tamanho do "pool" de hexoses e uma menor eficiência na migração desse açúcar. O cultivar SP71-799, comparado aos demais mostrou-se mais eficiente em termos de teores de sacarose apresentando teores baixos de açúcar redutor nos internódios. Os resultados sugerem que o perfil de atividade das enzimas invertases nos tecidos da folha, bainha e colmo poderão constituir-se em um dos mais importantes parâmetros bioquímicos para a seleção e melhoramento de genótipos de cana-de-açúcar. Comprovou-se ainda que as isoenzimas invertases exercem a função-chave na mobilização, utilização e acúmulo de sacarose na planta cana-de-açúcar.

RELATIONS AMONG SUGAR LEVELS AND INVERTASE ACTIVITY IN TISSUE
OF SUGAR-CANE CULTIVARS

Author: IRENICE MARIA SANTOS VIEIRA

Adviser: DR. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

The present work has as objective the study of the relations between sugar levels and invertases activities, verifying the influence of varietal characteristics on the sucrose-invertase ratio in source-sink tissues and the physiological variations of the activities of these enzymes during sugar-cane development. For this, four cultivars (CB41-76, NA56-79, SP70-1143 e SP71-799) were selected, which are representative in terms of sucrose productivity.

Samplings were made 3, 4, 5, 6 and 7 months after planting, during the cycle of plant cane, to perform in each sampling time and part of plant (leaf blade, sheath and stalks) measurements of the levels of total soluble sugars, reducing sugars, sucrose, soluble acid invertase activities (pH 5.5), neutral invertase (pH 7.0) and cell wall invertases. It was shown that these last isoenzymatic forms of invertase

are strongly bound to cell walls of leaf blade, sheaths and stem tissues. They consist of different enzymes in each tissue, being distinguishable by the optimum pH, 3.8 , 3.5 and 2.2, respectively.

In general the high levels of invertase activity were found in leaf blades of all cultivars in which the sucrose level was relatively lower. On the contrary , the lowest levels of activity were detected in the sheaths of high sucrose levels. In stalk tissue the invertase - sugar ratio varied according to the physiological characteristic of each cultivar. Among the four cultivars studied , CB41-76 showed the highest invertase activity, the lowest sucrose content in the stalk and the highest reducing sugar content. It was observed that the differences between CB41-76 and NA56-79 with respect to sucrose content in leaves stalks are located at the sheaths. This difference was attributed to the high migration efficiency of sucrose from leaves to sheaths and the low efficiency of migration of this sugar from sheaths to internodes, in plants of NA56-79, SP70-1143 and SP71-799.

The high acid invertase activity, soluble in the tissues of the leaf blades during the initial phase of growth, can be a characteristic of a cultivar with low sugar content in the stalk. On the other hand, the presence

of neutral, cell wall invertase at high levels during the last sampling dates seems to define the size of the hexose pool and a lower efficiency of sucrose migration. Cultivar SP71-799, compared to all others, was more efficient with respect to sucrose contents because in presented low contents of reducing sugars at internodes. The results suggest that the enzyme activity profile of invertase in leaf tissue, sheath and stalk could constitute one of the most important biochemical parameters for the selection and breeding of sugar cane genotypes. It was also shown that the isoenzyme invertases exert a key function in the mobilization, utilization and storage of sucrose in the sugarcane plant.

1. INTRODUÇÃO

A concentração de sacarose na cana-de-açúcar em um dado momento, é o resultado da integração de vários mecanismos bioquímicos que envolvem a síntese, a migração e o acúmulo desse açúcar no colmo. A eficiência de cada um desses processos parece estar condicionada a uma complexa via de regulação de fatores endógenos e exógenos que por sua vez são dependentes das relações fonte-reservatório.

Além disso, uma das mais importantes metas da pesquisa no sistema fisiológico de cana-de-açúcar é o entendimento dos processos que culminam no aumento da produção agrícola da cultura. Essa capacidade de prever a produtividade, vem sendo perseguida desde a década de vinte. Entretanto, somente depois de 1963, com os trabalhos das equipes de *HARTT* no Hawai e de *HATCH* na Austrália é que os primeiros resultados positivos começaram a aparecer. E, não obstante a grande quantidade de estudos realizados, diversos aspectos morfogênicos, nutricionais, hormonais e enzimáti

cos relacionados com a regulação da eficiência de produção, ainda continuam desconhecidos.

O estudo da fisiologia da cana-de-açúcar tem revelado aspectos importantes desta cultura, particularmente depois dos trabalhos de *HARTT et alii* (1963), caracterizando-a como um sistema de produção altamente eficiente devido ao perfeito funcionamento de seus componentes, representados pelas relações fonte-reservatório (*ALEXANDER*, 1973; *CROCOMO & SILVEIRA*, 1983). Todo esse sistema compreende uma cadeia unificada de fenômenos bioquímicos interligados, onde o sistema multienzimático das invertases desempenha a função principal como mecanismos que mantêm e regulam a concentração e o movimento de sacarose das folhas para os colmos, ao longo de um gradiente de concentração (*SUZUKI et alii*, 1984; *BATTA & SINGH*, 1986).

A integração dos processos envolvidos em cada compartimento deste sistema é que irá determinar o tamanho do reservatório e a quantidade do produto. *MADAN et alii* (1980), por exemplo, correlacionaram a presença de invertases nas folhas com o rendimento da cana e a recuperação da sacarose nos colmos dos cultivares examinados. Os mais ricos e mais precoces foram aqueles com elevada eficiência de migração de sacarose das folhas para os colmos. *HAWKER* (1985) num de seus mais recentes trabalhos discute

sobre um desafio aos que trabalham com bioquímica de plantas para que forneçam um maior número de informações à engenharia genética cujo objetivo deverá ser a manipulação desses parâmetros para a obtenção de novas variedades que apresentem uma maior produtividade final e menor custo de produção.

A medida da atividade de invertase em cana tem sido mostrada como um parâmetro essencialmente bioquímico. As mudanças em seus padrões de atividade, influenciadas pelas condições de clima, nutrição e de solo, podem influenciar a fisiologia da planta cana-de-açúcar, resultando em um crescimento desordenado, redução do teor de açúcar acumulado e maturação retardada. Diante desse quadro, as plantas apresentam diferentes respostas em termos de produção. A questão pertinente portanto é verificar: (a) de que maneira esses fatores estariam influenciando a redução do teor de sacarose acumulada nos colmos de alguns cultivares e (b) se os mesmos guardam alguma relação com as enzimas que sintetizam e hidrolisam a sacarose e afetam, desse modo, a formação e movimento desse açúcar da folha para o colmo e sua posterior acumulação.

Em vista do exposto e baseando no fato de que as invertases interferem em todos os ciclos do desenvolvimento da cana, julgou-se necessário a caracterização desse parâmetro bioquímico para a manipulação das plantas

dentro do ambiente, como parte de um programa para a obtenção de cultivares geneticamente melhorados. O presente trabalho é parte de uma série de estudos que estão sendo realizados por pesquisadores do grupo de Bioquímica do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) do Departamento de Química da ESALQ/USP, bem como pela Seção de Bioquímica de Plantas do CENA/USP, com o objetivo de precisar como e em que estágio do desenvolvimento as invertases afetam as características produtoras de açúcar da planta. Os resultados obtidos tem revelado importantes aspectos da atividade dessas enzimas durante o crescimento e a maturidade da cana, sendo utilizado principalmente o cultivar NA56-79.

Outros cultivares como CB41-79, SP70-1143 , SP71-799 além de NA56-79 foram escolhidos entre os vinte cultivares mais plantados no Brasil (*DIB NUNES JR, 1987*), na tentativa de elucidar se algumas características agrônomicas e industriais próprias de cada cultivar têm relação com as diferentes formas isoenzimáticas de invertase. Os objetivos do trabalho são:

1. Avaliar algumas relações entre as atividades de invertases e os diferentes componentes de açúcar visando a compreensão das diferenças varietais relativas à função dessas enzimas no controle da distribuição e utilização de sacarose, e

2. estudar as variações fisiológicas nos níveis das diferentes formas isoenzimáticas de invertase (ácida solúvel neutra e de parede celular) durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Crescimento Maturação e o Rendimento dos Cultivares

O crescimento da cana-de-açúcar, a exemplo do que ocorre com todas as plantas superiores e frequentemente expresso em termos de alongamento (VAN DELLEWINJ, 1952) é fortemente influenciado pela distribuição de fotossintetatos entre os centros de produção tais como folhas e o centro de acúmulo, os internódios do colmo (IRVINE, 1980). Durante essa fase inicial GLASZIOU & BULL (1971) por exemplo, correlacionaram a taxa de crescimento de certos cultivares de cana, com o crescimento da folha e área foliar. Outros pesquisadores tem demonstrado que o crescimento da área foliar nos períodos iniciais é o fator mais importante na taxa de crescimento e substâncias acumuladas (BULL, 1971; IRVINE, 1980).

IRVINE (1980) relatou que o crescimento da cana-de-açúcar tem sido determinado como uma função do alongamento dos internódios que permanece no mínimo de 1 a 3 meses. Para os ciclos de 12 a 18 meses, o crescimento da cana-de-açúcar, caracterizado pela matéria seca acumulada, é representado por uma curva sigmóide (*IRVINE, 1980*) que pode ser separada (a) numa fase inicial de crescimento lento (b) outra fase de crescimento rápido e (c) uma fase final de crescimento lento (maturação). A duração de cada fase depende principalmente dos fatores ambientais como temperatura, umidade do solo e radiação incidente (*MAGALHÃES et alii 1982*).

Na fase inicial de desenvolvimento dos internódios existem pelo menos dois estádios de desenvolvimento celular (divisão e alongamento) que ocorrem no meristema intercalar e contêm diferentes sistemas de invertases. Durante esse estágio de divisão, as células mais jovens, contêm grandes quantidades de uma invertase ácida vacuolar, que começa a desaparecer logo que termina o alongamento celular (*HATCH & GLASZIOU, 1963; SLACK, 1965*); enquanto que as células mais maduras, possuem uma invertase neutra e uma invertase ácida insolúvel da parede celular (*HATCH & GLASZIOU, 1963; HAWKER & HATCH, 1965*).

De acordo com *BULL (1971)* o aumento da taxa

de matéria seca está altamente correlacionado com crescimento em extensão que corresponde a segunda fase de crescimento rápido citado por *MAGALHÃES et alii* (1982). E desde que grande parte da matéria seca é derivada da sacarose que é hidrolisada por uma invertase antes de entrar no metabolismo, alguma relação entre invertase a taxa de aumento de matéria seca e a extensão do crescimento pode ser esperada de acordo com *GAYLER & GLASZIOU* (1972). Ao longo desse processo, o nível de invertase ácida solúvel total está estreitamente correlacionado com a taxa de crescimento estando a maior parte da enzima localizada no vacúolo (*SACHER et alii*, 1963) e a menor proporção localizada no espaço externo que inclui a parede celular (*HATCH et alii*, 1963; *SLACK*, 1965).

Para explicar a correlação entre o alongamento do internódio e o nível de invertase ácida total *GLASZIOU & WALDRON* (1964) postularam que a invertase ácida do espaço externo com a invertase ácida vacuolar em células ligeiramente em expansão, trabalham juntas para manter alto e constante, o nível de hexoses disponíveis no citoplasma. A função reguladora depende grandemente do fato de que a sacarose pode ser hidrolisada antes de entrar nas vias metabólicas nas células do parênquima armazenador (*SACHER et alii*, 1963). Enquanto que a enzima do espaço externo hidrolisa a sacarose proveniente dos tecidos condutores, a enzima vacuolar permite que a sacarose armazenada se torne dis

ponível para ser utilizada nos processos metabólicos quando o fornecimento pela fotossíntese for inadequado (GLASZIOU & WALDRON, 1964).

SACHER & GLASZIOU (1962) já haviam fornecido evidências para mostrar que a invertase ácida total dos tecidos internodais de cana-de-açúcar imatura exerce uma função regulatória sobre o movimento e utilização de sacarose. Num trabalho posterior, GLASZIOU & BULL (1967) relataram que o crescimento de expansão do internódio poderia depender mais da quantidade de invertase do espaço externo do que do nível de invertase total do tecido. Para esses autores a enzima do espaço externo controla a velocidade total de entrada da sacarose na célula enquanto que a invertase vacuolar meramente redireciona o armazenamento de sacarose. Por mais que a invertase ácida do espaço externo esteja usualmente presente em excesso considerável, é a invertase ácida vacuolar que responde rapidamente, através do controle do "pol" de hexoses no citoplasma (GAYLER & GLASZIOU, 1972).

GLASZIOU & BULL (1971) tem demonstrado que uma característica comum a todos os cultivares de cana é a sua habilidade para armazenar altos níveis de sacarose nos colmos. Durante os primeiros meses do desenvolvimento e fase de crescimento da cana, o armazenamento de açúcar se processa nos tecidos armazenadores imaturos e paulatinamente

nos internódios completamente desenvolvidos próximos à base do colmo (ALEXANDER, 1973).

O ponto de maturação é atingido quando a sacarose chega ao seu maior nível de concentração nos tecidos de armazenamento do colmo (HUMBERT, 1968).

De acordo com GAYLER & GLASZIOU (1972) a maturação ou amadurecimento dos colmos de cana-de-açúcar envolve o declínio a um nível baixo (aproximadamente 0,05% do peso fresco) de duas hexoses, glucose e frutose e um aumento simultâneo de cerca de 20% do peso fresco em conteúdo de sacarose. Evidências experimentais indicam que a aacumulação máxima de sacarose não se verifica até que a planta encontre condições restritivas ao seu crescimento. A cana poderá estar com alto teor de açúcar com apenas alguns meses de idade, bastando para isso ausência de água, nutrientes e outros fatores necessários ao seu desenvolvimento. Isto não significa que ela está fisiologicamente madura isto é, no ponto de colheita, nem que a idade adulta signifique maturação total (ALEXANDER, 1973).

Concordantemente VAN DILLEWIJN (1952) afirmou que somente os internódios imaturos das folhas verdes e os internódios superamadurecidos da base (com alto conteúdo de fibra) não retêm quantidade apreciável de açúcar. Cada internódio acumula seu próprio açúcar e completa o seu

próprio ciclo vegetativo, (ALEXANDER, 1973). Os valores de sacarose, são mais elevados na direção do centro do colmo e declinam no sentido das pontas. Essas diferenças se acentuam mais nos internódios mais jovens, refletindo provavelmente uma ação de diferentes invertases onde o meristema intercalar (anel de crescimento) muito mais do que os tecidos centrais do internódio (SACHER *et alii*, 1963).

Trabalhos conduzidos por HARTT (1963) no Hawai, incluindo análise de enzimas, numa das primeiras tentativas para definir o mecanismo de controle da água sobre o nível de carboidratos, mostraram que plantas com adequado suprimento de água e iluminadas, continham mais sacarose nas folhas e menos sacarose armazenada no colmo, como que aquelas cultivadas em deficiência hídrica.

GLASZIOU *et alii* (1965) estudaram os efeitos da interação da temperatura durante 24 horas e mostraram que os efeitos adicionais da temperatura diurna e noturna foram obtidas durante 3 meses com interações complexas evidentes aos 6 meses de idade da cana. Eles também observaram que a produção máxima de matéria seca, a máxima produção de açúcar por planta e alta concentração de açúcar no colmo foram obtidas a 30°C.

Muitos fatores contribuem para a obtenção de altas produtividades da cana-de-açúcar. Mas como ocorre na

maioria das culturas agrícolas, a utilização de cultivares geneticamente melhorados é o sistema mais eficiente para se obter maiores rendimentos. Naturalmente, cada cultivar exige um manejo diferenciado, o que torna necessário a adoção de tecnologia específica. O binômio tecnologia- variedades representa a receita do Centro de Tecnologia Copersucar para tornar a cultura da cana-de-açúcar mais efetiva no desenvolvimento agrícola do País (SILVA, 1984).

Em meados da década de setenta o cultivar argentino NA56-79 passou a ser cultivado no interior de São Paulo. Em poucos anos tornou-se a variedade mais cultivada no Estado, superando a CB41-76, até então ocupando mais de 50% da área canavieira. Este crescimento da área de NA56-79 foi devido a sua melhor produtividade agrícola nos diversos tipos de solos e altos teores de sacarose, aliados à uma certa rusticidade necessária para cultivo em larga escala (PLANALSUCAR, 1983).

Apesar disso outros pesquisadores aventam a existência provável de uma relação inversa entre a capacidade de armazenamento de açúcar no colmo e o desenvolvimento vegetativo da planta, o que torna problemático obter-se variedades de altas produtividades de colmo e açúcar sem grandes exigências nutricionais (COPERSUCAR, 1983).

Nesse aspecto, a elevada produtividade de colmo sempre foi o ponto alto do cultivar CB41-76 (*DIB NUNES JR. 1987*) embora apresenta baixos teores de sacarose no colmo e pouca adaptabilidade a solos de baixa fertilidade (*PLANALSUCAR, 1983*).

A SP70-1143 é reconhecidamente o cultivar que produz os melhores resultados em produção de colmos, em solos de baixa fertilidade natural, superando neste aspecto, qualquer um dos cultivares atualmente em cultivo comercial. O florescimento e a maturação que varia de média para tardia constituem as principais limitações deste cultivar, que apresenta excelentes brotações de soqueira mesmo em condições climáticas adversas, característica responsável pela maior longevidade dos canaviais (*COPERSUCAR, 1983; DIB NUNES JR. 1987*). Dados experimentais comprovaram que a SP70-1143 pode ser considerada de alto teor de açúcar, pois apresenta teores de sacarose semelhantes ou superiores à NA56-79 uma variedade comercial consagrada em termos de teor de açúcar (*COPERSUCAR, 1983*).

Apesar da constante superioridade da SP71 - 799 em termos de importância como cultivar comercial, por enquanto é apenas potencial, pois foi liberada em 1983. A sua melhor característica é a elevada precocidade, com teores muito altos de sacarose, sendo ainda um cultivar bem

classificado quanto a produtividade de colmos o que a coloca em primeiro lugar em relação aos outros cultivares em cultivo quanto ao rendimento de açúcar por hectare (COPER SUCAR, 1983; DIB NUNES JR. 1987) .

Uma das características comuns a todos os cultivares de cana-de-açúcar é sua habilidade para armazenar altos níveis de açúcar no colmo. Os níveis de sacarose nos internódios maduros podem exceder normalmente 20% do peso fresco e durante o amadurecimento os níveis de açúcares nas folhas podem atingir cerca de 1 a 2% e nos tecidos do ápice do colmo aumentam de 1 a 5% (GLASZIOU & BULL, 1971) .

Diferentes cultivares de uma mesma espécie podem apresentar grandes variações em sua capacidade de acumulação de açúcar mais acentuadas quanto maior for a diversidade genética (IRVINE, 1980). Vários pesquisadores como SACHER et alii (1963), ALEXANDER (1965); RIZK & NORMAND (1968), MADAN et alii (1980, 1981), SUZUKI (1982), VIEIRA (1983), OLIVEIRA (1965), já estudaram essas diferenças, tentando estabelecer em muitos casos, as causas morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas.

Numa tentativa de correlacionar atividade enzimática com as características específicas dos cultivares, (ALEXANDER, 1965), selecionou 12 cultivares de cana-de-açúcar tomando como referência a tonelagem da cana, o percento

tual de açúcar na cana e o açúcar por acre. Verificou ainda que as enzimas do meristema mostraram melhor correlação com as características varietais do que as enzimas foliares onde não foi detectada atividade de invertase. Esse dado não está de acordo com os de *SAMPIETRO et alii (1980)* que encontraram atividade de invertase tanto na lâmina como na bainha foliar de cana-de-açúcar.

MADAN et alii (1980), publicaram um trabalho no qual estudaram as atividades de invertase ácida e neutra nas folhas de 12 genótipos de cana-de-açúcar e o possível significado desta observação para a recuperação de açúcar nos tecidos do colmo. Eles demonstraram que tanto a invertase ácida como a invertase neutra estavam presentes nas folhas de todas os cultivares e concluíram que, suas atividades parecem estar relacionadas ao rendimento da cana e conteúdo de sacarose característica de cada cultivar analisado.

Num trabalho posterior *MADAN et alii (1981)* num estudo comparativo sobre invertases (ácida e neutra) das folhas de quatro cultivares de cana-de-açúcar mostraram que o desaparecimento das enzimas durante a maturação estava associada com um alto conteúdo de açúcar, enquanto que a persistência das enzimas se relacionava com um baixo conteúdo de açúcar. Eles ainda sugeriram que as mudanças no conteúdo das enzimas podem ser um parâmetro útil, para o melhora

mento da cana-de-açúcar.

RIZK & NORMAND (1968), estudaram a relação entre as formas de invertase e o conteúdo de açúcar em três cultivares da 'Louisiana', com referência especial a diferentes porções do colmo. Eles mostraram que o nível de invertases (ácida e neutra) dependia do cultivar e que existia uma certa relação entre os componentes de açúcar (açúcares redutores, açúcares totais e sacarose) e cada tipo de invertase. Dos três cultivares estudados por esses dois autores o conteúdo de invertase foi maior naquele cultivar que apresentou menor percentagem de pureza e de sacarose. Os valores de açúcar e de enzimas foram relativamente iguais entre a metade e a porção basal do colmo. Além disso, relatam os autores, a evidência sugere que o potencial para o amadurecimento e controle enzimático é maior na porção inferior do colmo embora os estádios de amadurecimento já estivessem completados.

2.2. Atividade de Invertases na Regulação do Sistema Fonte-Reservatório

A relação entre a eficiência fotossintética e a produção final de uma cultura, embora estreita, é muito complexa, pois a produção econômica é o resultado de acumulação de sacarose (cerca de 80 a 90% da massa de matéria seca) no órgão colhido, durante todo o tempo em que este está fisiologicamente ativo (BULL, 1971; GAYLER & GLASZIOU, 1972).

Além disso, quando o material necessita ser translocado para os tecidos armazenadores, acrescenta-se os fatores de equilíbrio do balanço no transporte de fotossintetados da fonte para o reservatório. A compreensão do papel de cada fator sobre a taxa fotossintética e de como a modificação do mesmo afetará a produção leva ao estabelecimento de parâmetros fisiológicos para o melhoramento genético (ALEXANDER, 1973).

Entre muitos fatores que alteram o conteúdo de sacarose na cana-de-açúcar, a invertase é atribuída inegavelmente a principal responsabilidade. Essa enzima pode ser considerada tanto benéfica quanto prejudicial, dependendo do ponto de vista do técnico ou do produtor, cujo objeti

vo é obter plantas que armazenem o máximo de sacarose no colmo. Pode-se dizer que, a quantidade de sacarose armazenada pelas plantas, depende em grande parte de invertases. Não obstante, ao fato de que sua atividade diminui o teor de sacarose na cana-de-açúcar, essa enzima, do ponto de vista do crescimento, um "mal necessário". No entanto, partindo-se do princípio de que o "combustível" para as atividades da planta, que as levam a crescer, é a glicose e não a sacarose, a inversão, é desse modo, também benéfica (RIZK & NORMAND, 1968).

A inversão da sacarose por uma invertase localizada na membrana externa do citoplasma é considerada tanto como um pré-requisito como um processo limitante para absorção e acúmulo de sacarose na cana de açúcar (HATCH, 1965) e, conseqüentemente, indispensável ao crescimento e desenvolvimento normal da planta.

Os fatos acima relatados tornam evidente que se o controle da atividade de invertase em plantas em desenvolvimento for possível, tanto a tonelagem da cana (potencial de produção agrícola) como teor de açúcar na cana (potencial de produção industrial) poderão ser manipuladas pelos pesquisadores. Enquanto tais objetivos não puderem ser atingidos a exploração das relações entre conteúdos de açúcares deverão ser enfatizadas como um começo dos estudos ao longo dessas linhas. ALEXANDER (1965, 1967) por exemplo es

tudando a relação sacarose-enzima, demonstrou que a atividade enzimática total era inversamente relacionada ao teor de sacarose do meristema e que, uma alta atividade de invertase estava relacionada com um baixo teor de sacarose e com uma baixa tonelagem. Ele também observou que uma baixa atividade de invertase estava associada com uma alta tonelagem e sacarose alta.

Durante as duas últimas décadas, muitas informações tem sido reunidas a respeito do número e funções das várias formas isoenzimáticas de invertases, durante os diferentes estágios do desenvolvimento da cana-de-açúcar. GLASZIOU e seus colaboradores tem relatado evidências de que existe mais de uma enzima invertase e que cada uma dessas requer diferentes condições para atuar em seu pico de eficiência. As invertases ácidas ocorrem nas plantas superiores como enzimas solúveis e como enzimas ligadas à parede celular (GLASZIOU & GAYLER, 1972).

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , através do Grupo de Bioquímica e Biotecnologia de Plantas do Departamento de Química, vem há alguns anos desenvolvendo trabalhos de pesquisa em tecidos de plantas de cana-de-açúcar, visando elucidar se a presença de padrões enzimáticos tanto na planta intacta como em regiões destacadas da fonte (folhas verdes), ao longo da trajetória

de translocação (folhas jovens e bainhas foliares) e nos tecidos dos reservatórios de armazenamento (colmos), têm alguma relação com o rendimento da cana e a recuperação de sacarose, tal como foi estabelecido por *ALEXANDER (1973)* e *GIAQUINTA (1977)* respectivamente, para os sistemas de cana-de-açúcar e beterraba açucareira.

Estudos enzimáticos comparativos em diferentes órgãos da cana-de-açúcar tem revelado diferenças significativas nas atividades de invertases e sacarose sintetase. Entretanto, de modo geral, a maioria desses estudos foi realizado com cultivares diferentes de cana-de-açúcar e alguns tecidos nunca foram examinados. Ressente-se de uma falta de estudo global dentro de um cultivar e no mesmo período de crescimento. Consequentemente, o estudo das invertases, sobretudo, as de parede celular deve ser prosseguido na tentativa de se determinar o papel dessa enzima nas regiões da fonte, da trajetória e do armazenamento de açúcares na planta de cana-de-açúcar.

CROCOMO & SILVEIRA (1983) relataram que a planta de cana-de-açúcar apresenta um sistema de produção altamente eficiente devido ao perfeito funcionamento de seus componentes, representados geneticamente pelas relações fonte/reservatório. Do ponto de vista operacional, a planta de cana-de-açúcar como um sistema produtivo, e é ba

sicamente constituído, por um centro de produção, representado pelas folhas fotossinteticamente ativas a um sistema de escoamento e distribuição do produto fotossintetizado (nervuras, vasos e bainhas foliares) vários centros de consumo (raízes, folhas jovens, tecidos meristemáticos e órgãos reprodutores) um centro de armazenamento e acúmulo representado respectivamente pelos internódios imaturos e maduros do colmo (HARTT *et alii*, 1963; GLASZIOU & GAYLER, 1972; CROCOMO & SILVEIRA, 1983; SUZUKI *et alii*, 1984).

Resultados de trabalhos sobre a fisiologia da cana-de-açúcar tem revelado que a produção final da cultura é determinada pela integração de uma série de processos bioquímicos como a fotossíntese, migração e acúmulo de açúcares envolvidos em cada compartimento do sistema fonte/reservatório, estando cada um deles sujeitos à regulação de fatores endógenos (fisiológicos e genéticos) e ambientais, (ALEXANDER, 1973) sendo os fatores nutricionais aqueles dos mais comumente modificáveis pelo homem em condições de cultivo (CROCOMO & SILVEIRA, 1983).

Conforme relatos de SUZUKI (1983) à luz dos conhecimentos atuais na cana-de-açúcar a sacarose é produzida nas folhas a partir dos fotossintetados primários (glicose e frutose) com a participação das enzimas sintetase de sacarose (FRYDMAN & HASSID, 1963) a sintetase de sacarose e

fosfato (HAQ & HASSID, 1965), que catalizam respectivamente as reações de síntese de UDP glucose e frutose e a reação de síntese de sacarose.

Graças aos estudos realizados por HARTT *et alii* (1963) é hoje bem estabelecido que a sacarose após a sua biossíntese nas folhas adultas segue rapidamente para o sistema condutor (nervuras secundárias), passando para nervura central e seguindo através da bainha alcança o colmo onde é distribuída para outras partes da planta. Parte dessa sacarose segue para as raízes, outra parte vai para cima ou seja, para o ápice, folhas e internódios jovens.

A sacarose que chega às raízes, folhas e internódios jovens é convertida em glucose e frutose que é, utilizada para o crescimento de paredes celulares de protoplasma (SUZUKI, 1983). Ressalta-se nessa etapa a importância das enzimas invertases na distribuição dos fotossintetizados para os requerimentos do crescimento e armazenamento. Nas células de armazenamento do colmo, a sacarose que deixa o sistema de vasos condutores para o espaço externo onde sofre uma série de transformações no tecido do colmo antes de se acumular nos vacúolos armazenadores (HATCH & GLASZIOU, 1963; SACHER *et alii*, 1963 e HAWKER & HATCH, 1965).

No citoplasma, a glucose e frutose resultante da ação das invertases são fosforiladas e utilizadas na

síntese da sacarose-fosfato, cujo processo requer a presença de enzimas específicas tais como, hexoquinases, fosfohexoismerases, UDPG-frutose-6-fosfato transglicosidase, uma sacarose-fosfato fosfatase específica e numerosas . fosfatases não específicas (ALEXANDER, 1973), para assegurar a quantidade de hexoses fosforiladas, UDGP, frutose e frutose 6-fosfato para a produção de sacarose-fosfato (SUZUKI, 1983).

Esse composto por sua vez é transferido através do tonoplasto para o interior do vacúolo num processo, que requer energia, que é fornecido pela quebra da ligação de fosfato (HATCH, 1964) que é presumivelmente mediada pela sacarose-fosfato fosfatase (HAWKER & HATCH, 1965). Nos vacúolos das células dos tecidos em crescimento a sacarose sofre a ação da invertase ácida vacuolar, fornecendo hexoses que retornam livremente ao citoplasma e espaço externo do parênquima, onde são utilizadas nos processos de síntese protéica e respiração (HATCH, 1964, GLASZIOU & GAYLER, 1972)

Durante o desenvolvimento do colmo a atividade da invertase ácida vacuolar começa a diminuir com o aumento simultâneo da atividade de invertase neutra (GAYLER & GLASZIOU, 1972). Esta troca de invertase ácida por invertase neutra foi comprovada pelos estudos com inibidores, tendo sido demonstrado que a frutose é um inibidor competitivo de invertase ácida e que uma elevada concentração de sacarose pode eliminar parcial ou completamente a função regu

ladora da invertase ácida, cuja função passa a ser realizada gradativamente, pela invertase neutra, indicando a maturidade do tecido para a acumulação de sacarose (SAMPJETRO *et alii*, 1980).

Baseados em dados da literatura e resultados obtidos em ensaios com cana-de-açúcar com o cultivar NA56 - 79, SUZUKI *et alii* (1983) relataram que nos tecidos adultos dos colmos o mecanismo de acúmulo se evidencia ocorrendo alterações na atividade de invertase alcalinas nesses tecidos. De acordo com a literatura, os tecidos de internódios maduros possuem uma invertase neutra localizada no citoplasma com atividade ótima em pH 7,0 (SACHER *et alii*, 1963; HAWKER & HATCH, 1965) e uma invertase ácida, fortemente ligada à parede celular com atividade ótima em pH 3,8 (HAWKER & HATCH, 1965; PRADO *et alii*, 1982).

A visão do controle bioquímico do sistema fonte/reservatório foi estudada por SUZUKI (1982) e VIEIRA (1983) utilizando principalmente o cultivar NA56-79. As observações desses autores evidenciaram que o aumento na concentração de sacarose e diminuição na concentração de açúcares redutores com o decorrer da idade da planta, está relacionado com a diminuição na atividade das invertases ácidas e alcalinas no caldo e tecidos da planta. A atividade de invertases na lâmina foliar é pouco alterada. Na bai

nha essa atividade é maior nos estádios mais jovens, diminuindo a seguir. A atividade de sacarose sintetase na lâmina foliar apresenta, em função da idade da planta, um padrão cíclico com sucessivos aumentos e diminuições. Conforme demonstrado por *SUZUKI (1983)*.

As plantas não só produzem sacarose como também se alimentam de sacarose! Mesmo as células foto-autotróficas que vivem diretamente dos produtos da fotossíntese crescem e se multiplicam em presença de sacarose. Na verdade, a sacarose serve como fonte nutricional de esqueletos de carbono que é translocável em plantas superiores. Quando esse açúcar atinge as células armazenadoras, forma a matéria prima (esqueletos de carbono) para todos os processos metabólicos que ocorrem nas células (*SUNGH et alii, 1988*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização da Área de Estudo

3.1.1. Solo

O presente trabalho foi realizado em condições de campo, em área de um Latossolo Vermelho Escuro- ortto (LE), pertencentes à Estação Experimental do PLANALSUCAR, situada no município de Araras (Latitude: $22^{\circ}18'S$; Longitude: $47^{\circ}23'W$ e Altitude: 617 m) e de uma área com solo classificado como Podzólico Vermelho Amarelo localizado na Estação Experimental da COPERSUCAR, município de Piracicaba (Latitude: $22^{\circ}43'S$; Longitude: $47^{\circ}38'W$ e Altitude: 580m) ambas no Estado de São Paulo.

3.1.2. *Clima*

Os dados de temperatura (média, mínima e máxima) e precipitação pluvial mensal, das duas localidades de Araras e Piracicaba, apresentados no Quadro 1, permitem identificar, segundo o sistema Köppen, um clima do tipo C_{Wa}, ou seja, mesotérmico de inverno seco (que se estende de abril a setembro) e de verão chuvoso (de outubro a março), típico das zonas tropicais de baixa altitude. O regime térmico do ar acompanha de perto essas duas estações, apresentando temperaturas médias mensais elevadas no verão e mais baixas no inverno.

3.2. *Cultivar*

No presente estudo foram selecionados os cultivares NA56-79, CB41-76, SP70-1143 e SP71-199, mais representativos nas regiões canavieiras do Estado de São Paulo e especialmente nas diferentes regiões do Brasil em termos de potencial em sacarose de cada cultivar (COPERSUCAR, 1983; SILVA, 1984; DIB NUNES JR. 1987).

QUADRO 1. Valores de precipitação pluvial mensal e temperatura (Média, Mínima e Máxima) mensal registradas em duas localidades do Estado de São Paulo no ano de 1984.

Araras: 22°18'S - 47°23' W e latitude de 617 m
 Piracicaba: 22°43' 47°38' W e latitude de 580 m

mês	Precipitação		Temperatura (°C)					
	(mm)		Mínima		Máxima		Média	
	1	2	1	2	1	2	1	2
JAN	101,8	209,0	18,7	18,2	31,4	31,3	25,1	24,8
FEV	34,0	37,0	19,4	17,0	33,1	33,4	26,2	25,2
MAR	70,2	71,0	17,0	16,8	29,9	30,8	23,4	23,8
ABR	92,0	51,0	16,2	14,7	27,9	27,9	22,5	21,4
MAI	26,8	37,0	14,9	12,1	27,8	28,2	21,3	20,2
JUN	0	0	11,7	8,2	26,9	28,3	19,3	18,3
JUL	3,0	5,0	11,9	9,5	27,0	27,6	19,4	18,5
AGO	161,2	123,0	12,5	10,9	25,3	25,8	18,9	18,4
SET	77,0	71,0	13,2	10,7	26,2	27,0	19,8	19,8
OUT	24,4	24,0	16,2	14,5	30,6	31,2	23,4	22,9
NOV	152,8	129,0	17,1	16,1	29,1	30,5	23,1	23,4
DEZ	187,6	156,0	18,0	16,8	28,2	28,6	23,1	22,7
ANO	930,8	913,0	15,6	13,8	28,6	29,2	22,1	21,6

Dados fornecidos pela Seção de Irrigação e Climatologia do IAA-PLANALSUCAR de Araras, São Paulo e pelo Centro de Tecnologia COPERSUCAR, Piracicaba, São Paulo.

1 = Araras

2 = Piracicaba

Para a seleção dos cultivares adotou-se como critérios:

- a. As curvas de maturação dos cultivares em estudo, obtidas de ensaios conduzidos no campo e fornecidas pelo *PLANAL SUCAR (1983)* e *COPERSUCAR (1983)*, mostradas nas (Figuras 1 e 2) e,
- b. a hipótese de que, é possível que o declínio de certos cultivares como o CB41-76 esteja relacionado com uma baixa eficiência de mobilização de sacarose da fonte para o reservatório o que resulta em teores relativamente altos deste açúcar nas folhas e teores baixos no colmo. Uma relação inversa pode ser encontrada em cultivares como o NA56-79, padrão em riqueza de sacarose no colmo.

Com base nas informações obtidas de ensaios de campo, publicados pela *COPERSUCAR (1983)*, *PLANALSUCAR (1983)* e *DIB NUNES JR. (1987)* os cultivares CB41-76 e SP70-1143 foram arbitrariamente classificados como de "baxo-açúcar" em relação aos seus concorrentes de "alto-açúcar" respectivamente, o NA56-79 e SP71-799.

FIGURA 1. Curvas de maturação para cana-planta dos cultivares NA56-79 e CB41-79. Fonte: PLANALSUCAR (1983).

FIGURA 2. Curvas de maturação para cana-planta dos cultivares SP71-799 e SP70-1143. Fonte: COPERSUCAR (1983)

3.3. Instalação dos Ensaíos

O preparo dos solos e de mudas , o plantio e as adubações foram realizadas de forma convencional ao ro_tineiramente utilizado pelo PLANALSUCAR e pela COPERSUCAR limitando-se o presente ensaio apenas à coleta das amostras no campo, dentro de talhões sob controle de raquitismo. Na escolha dos talhões para as referidas coletas, foram leva_das em consideração as épocas de plantio, homogeneidades do solo e população do canavial . Em cada talhão foi demarca_da uma sub-área útil constituída por seis linhas de cana ca_da uma com 50 m de comprimento e 1,5 m de espaçamento entre as linhas. Destas 6 linhas úteis, cada grupo de 3 linhas constituia o que foi chamado de repetições 1 e 2.

Os cultivares CB41-76 e NA56-79 foram plan_tados em janeiro de 1984 num Latossolo Vermelho Amarelo- or_to enquanto que o plantio dos cultivares SP70-1143 e SP71 - 799 ocorreu em fevereiro de 1984 numa área de solo classifi_cado como Podzólico Vermelho Amarelo barro. O delineamen_to estatístico utilizado foi de blocos inteiramente casuali_zados.

3.4. Métodos

3.4.1. Obtenção das Amostras

Durante o período de abril a agosto do ano agrícola de 1984, plantas de cana-de-açúcar dos cultivares CB41-76 e NA56-79 foram obtidas na Estação Experimental do PLANALSUCAR. Entre maio e setembro do mesmo ano, colheram-se plantas dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 na Estação Experimental da COPERSUCAR, no ciclo da cana-planta (cana de ano e meio) a partir de aproximadamente três meses de idade.

O material componente da amostra, consistia de folhas (lâmina + bainha) das posições +3 e +4, numeradas segundo Kùijper citado por VAN DILLEWIJN (1952) e dos internódios 3º e 4º contados a partir da base do colmo, conforme descrição de SUZUKI (1982). As amostras de lâminas e bainhas foliares foram coletadas aos 3, 4, 5, 6 e 7 meses e as de internódios aos 5, 6 e 7 meses. A amostragem aos 3 e 4 meses para internódios do cultivar NA56-79 foi realizada porém os dados analisados foram abandonados, em virtude da ausência de internódios nos outros 3 cultivares nesse período.

Em cada amostragem, foram colhidas ao acaso

e em zigue-zague, 2 grupos de dez plantas, ou seja um para cada 3, das 6 linhas úteis de cana dentro do talhão formando 2 repetições. Cada planta amostrada foi imediatamente após o plantio separada em folhas e colmos, sendo destacadas as folhas +3 e +4 que foram por sua vez divididas em lâminas e bainhas (Figura 3). Em seguida, as lâminas e bainhas foram acondicionadas em sacos plásticos, que foram colocados em gelo seco e conduzidos ao laboratório.

Os internódios 3º e 4º a contar do colo da raiz foram destacados do colmo (Figura 4) descascados, triturados em um desintegrador tipo forrageira, acondicionados em sacos plásticos e conduzidos ao laboratório de Bioquímica de Plantas do CENA em grandes caixas de isopor contendo gelo seco.

3.4.2. Preparo das Amostras

No laboratório o material componente de cada amostra obtida no campo, representado pelas lâminas foliares, bainhas e colmos, foi preparado em duplicata obedecendo os seguintes critérios: das folhas destacaram-se apenas os 20 cm centrais da lâmina foliar sem a nervura princi

FIGURA 3. Esquema demonstrativo das amostras de lâminas das folhas +3 e +4, sem a nervura principal utilizada nas análises enzimáticas e químicas.

FIGURA 4. Esquema demonstrativo das amostras da bainha foliar e internódios utilizados nas análises enzimáticas e químicas.

pal e o terço médio da bainha (Figuras 3 e 4) desprezando-se os 2 cm laterais. Em seguida essas amostras foram lavadas com água destilada, enxugadas com papel absorvente e grosseiramente picadas.

Devido ao grande volume de material, sub amostras de cerca de 100 g de lâminas, bainhas e colmos picados e triturados, foram transferidas para sacos de alumínio, perfurados e colocados no liofilizador, para secagem à baixa temperatura. Após liofilização todas as amostras foram imediatamente pesadas e moídas. O pó resultante foi colocado em pequenos frascos de vidro hermeticamente fechados e depois guardados em frascos dessecadores sob vácuo, onde permaneceram à temperatura de aproximadamente 5°C da câmara fria, até o momento das análises.

3.4.3. *Análises Enzimáticas*

3.4.3.1. Extração

Para preparação dos extratos de enzimas solúveis (ácida e neutra) e da invertase de parede celular dos tecidos de lâmina foliar, bainha e colmo baseou-se em uma adaptação feita às metodologias descritas por HATCH et

alii (1963); RICARDO & AP REES (1970) e VATTUONE *et alii* (1981), considerando as condições mais favoráveis para a avaliação das atividades enzimáticas determinadas nos ensaios preliminares. Como existem evidências de que o meio de extração pode afetar a atividade da enzima (PRADO *et alii*, 1978), testes complementares foram realizados e comprovaram a necessidade de um meio de homogeneização específico para cada tecido.

Amostras de 500 mg de lâminas e bainhas foliares liofilizadas e moídas, foram suspensas e homogeneizadas em meio constituído pelo Tampão Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,5) contendo 2-Mercaptoetanol 1 mM; $MnSO_4$ e 5 μM e 750 mg de Na_2SO_3 conforme indicação de FLEISCHMACHER *et alii* (1980); SAMPIETRO *et alii* (1980) e VIEIRA (1983).

O meio de homogeneização utilizado para 500 mg de tecidos do colmo foi descrito por QUIROGA (1977) e possuía a seguinte composição (a) água destilada; (b) tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,5) contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 1 mM; tampão fosfato de sôdio 20 mM (pH 7,5) contendo 2-Mercaptoetanol 1 mM e (d) tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,5) contendo 2-Mercaptoetanol 1 mM e $MnSO_4$ 5 μM .

As etapas do procedimento para a preparação

ção dos extratos de invertases solúveis e invertases de parede celular são apresentadas esquematicamente na Figura 5.

O homogenado foi logo em seguida filtrado sob pressão manual em duas camadas de nylon e centrifugado a 720Xg durante 10 minutos de 0 a 2°C. O sobrenadante e o precipitado obtidos foram utilizados como fonte das diferentes formas de invertase.

a. Para a extração das invertases solúveis (ácida e neutra) o sobrenadante foi centrifugado a 27.100Xg por 20 minutos com 1 ml da solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ previamente neutralizada, com o objetivo de precipitar a clorofila. O sobrenadante obtido foi então saturado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido a 0°C, vagarosamente e com agitação até 60% de saturação. Após 12 horas a 0°C esta suspensão foi centrifugada a 27.100Xg por 20 minutos. O precipitado foi resuspenso em 4 ml de água deionizada, para posterior análise da atividade enzimática.

b. A extração das invertases da parede celular foi realizada a partir da fração de resíduos celulares (precipitado que foi suspenso em 10 ml do tampão acetato de sódio pH 5,5 , contendo 2-Mercaptoetanol 1 mM (=tampão A). Essa suspensão foi congelada, descongelada e homogeneizada em

FIGURA 5. Etapas do procedimento para a preparação dos extra-
tos para a determinação de invertases solúveis IS
(ácida e neutra) e invertases ligadas às paredes celu-
lares IP.

homogeneizador 'Potter' de vidro, 3 vezes para quebrar as células. O passo final serviu para aumentar a fluidez da preparação. A suspensão resultante foi centrifugada a 720 Xg por 10 minutos. O precipitado foi resuspenso em 10 ml do tampão "A" e depois centrifugado a 3020 Xg durante 10 minutos. Este passo foi repetido 3 vezes e o precipitado resultante foi retomado em 4 ml do tampão "A" obtendo-se assim o extrato de parede celular.

c. Tentativas para solubilizar as invertases da Parede Celular.

Os extratos de parede celular dos tecidos de lâmina, bainha e colmo foram tratados sucessivamente com as seguintes soluções preparadas segundo *PRADO et alii (1982)*.

1. Tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,5) contendo NaCl 1 M e 2-Mercaptoetanol 1 mM;
2. Tampão citrato-fosfato de sódio 0,2 M (pH 8,5) contendo 2-Mercaptoetanol 1 mM;
3. Tampão citrato-fosfato de sódio 0,2 M (pH 8,5) contendo NaCl 1 M, 2-Mercaptoetanol 1 mM e EDTA 30 mM;

4. Tampão borato de sódio 0,2 M (pH 8,5) contendo 2-Mercaptoetanol 1 mM.

Cada suspensão de parede celular obtida pelo processo de extração dos diferentes tecidos, foi centrifugada a 3020 Xg por 10 minutos e o precipitado foi lavado e resuspenso por 30 minutos em 5 ml do Tampão "1". As susensões seguintes foram então centrifugadas e os precipitados foram lavados e resuspenso por 30 minutos em 5 ml do tampão correspondente (2, 3 e 4). O precipitado obtido pela centrifugação com o Tampão "4" foi lavado e resuspenso por 30 minutos em 5 ml do Tampão "Acetato de Sódio 10 mM" (pH 5,5) contendo 2-Mercaptoetanol 1 mM. O precipitado resultante foi finalmente resuspenso em 4 ml do Tampão Acetato ("A"), obtendo-se o extrato, que serviu como fonte para a determinação da atividade de invertase da parede celular.

3.4.3.2. Ensaios de Atividades de Invertases

Para a incubação, das diferentes formas enzimáticas de invertases utilizou-se uma mistura padrão baseada em *VATTUONE et alii (1981)* e *VIEIRA (1983)* com al

gumas modificações, tendo levado em consideração as condições adequadas para atividade das enzimas.

Em ensaios preliminares foram experimentadas: (a) uma variedade de tampões, (b) condições de temperatura do meio da incubação, (c) melhores condições de pH, (d) tempo da reação, (e) melhor concentração de sacarose e (f) alíquotas do extrato, com o objetivo de determinar as condições apropriadas para atuação das enzimas.

O efeito do pH sobre a atividade da invertase foi cuidadosamente examinado e as misturas de reação foram preparadas com: Tampão KCl-HCl 0,2 M pH de 1,5 a 2,2 ; Tampão Glicina-HCl, 0,2M (pH 2,0-3,0), Tampão Acetato de Sódio 0,2M (pH entre 3,56 a 5,95) e Tampão Fosfato de Sódio 0,2M pH (6,5 a 9,0) como indicado por VATTUONE *et alii* (1981). A melhor temperatura de incubação ficou ao redor dos 37°C e as alíquotas de 200 µl para a determinação da atividade enzimática foram coletadas a partir de 10 a 90 minutos, de reação, sendo que as melhores leituras foram obtidas a 60 minutos.

As atividades de invertases foram determinadas em meio de reação padrão (1000 µl) constituído basicamente de 200 µl de extrato enzimático, 100 µl de sacarose e 700 µl tampão, na concentração e no pH indicado para cada

forma isoenzimática de invertase, ficando cada mistura de reação assim constituída.

a. Meio para a invertase ácida solúvel dos tecidos estudados

200 μ l de extrato enzimático

100 μ l de sacarose 0,2 M

700 μ l de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5

b. Meio para a invertase neutra dos tecidos estudados

200 μ l de extrato enzimático

100 μ l de sacarose 0,2 M

700 μ l de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0

c. Meio para a invertase da parede da lâmina foliar

200 μ l de extrato enzimático

100 μ l de sacarose 0,6 M

700 μ l de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 3,8

d. Meio para invertase da parede da bainha foliar

200 μ l de extrato enzimático

100 μ l sacarose 0,6 M

700 μ l tampão acetato de sódio 0,2 M pH 3,5

e. meio para invertase da parede celular do colmo

200 μl de extrato enzimático

100 μl sacarose 0,2 M

700 μl tampão glicina-HCl 0,2 M pH 2,2

Essas misturas foram então incubadas a 37°C e paralisadas aos 60 minutos, pela adição de 1 ml do reagente cupro-alcálico de Somogyi. Os açúcares redutores produzidos pela hidrólise da sacarose, foram determinados pelo Método arseno-molibdídico de NELSON (1944).

Para cada amostra do extrato enzimático contidas em 2 tubos de ensaio, foi preparado um teste (ou tubo) testemunha contendo o extrato enzimático previamente desnaturado por aquecimento, até a ebulição.

A leitura foi feita a 530 nm em espectrofotômetro "Coleman" contra um branco onde o volume da amostra foi substituída por água deionizada.

Em uma alíquota do extrato enzimático determinou-se ainda as proteínas de acordo com o método de LOWRY *et alii* (1951).

Os valores de atividade específica de invertase foram expressos em μg de açúcares redutores produzidos hora/mg de proteínas.

3.4.4. Análises Químicas

3.4.4.1. Extrato Alcoólico

A extração dos açúcares redutores e açúcares solúveis totais foi feita com etanol a 80% e a temperatura de 85°C, a partir do material vegetal liofilizado e moído pelo método de NELSON (1944) detalhado por OCHOA-ALEJO (1980) e VIEIRA (1983).

3.4.4.2. Determinação dos Açúcares Solúveis Totais

Os açúcares solúveis totais foram determinados no extrato alcoólico pelo método do fenol sulfúrico, descrito por DUBOIS *et alii* (1956). As leituras foram efetuadas a 490nm utilizando-se glicose p.a. como padrão.

3.4.4.3. Determinação de Açúcares Redutores

A dosagem de açúcares redutores foi feita

espectrofotometricamente através do método de *NELSON (1984)* detalhado em *VIEIRA (1983)*.

As leituras foram efetuadas a 530 nm utilizando-se a glicose p.a. como padrão.

3.4.4.4. Determinação da Sacarose

O teor de sacarose (expresso em percentagem) foi estimado pela diferença entre os teores de Açúcares Solúveis Totais e de Açúcares Redutores multiplicado pelo fator 0.95 que corresponde à molécula de água (% sacarose = AST-AR.095).

3.4.4.5. Proteínas

A dosagem de proteína foi feita espectrofotometricamente através do método de *LOWRY et alii (1951)* a partir do extrato enzimático previamente diluído utilizando Albumina Bovina (BSA) como padrão e leituras a 660 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade de Invertases e Características Varietais Durante o Desenvolvimento

As atividades de invertases medidas por suas atividades em condições ácidas e neutras, variaram muito com a idade da planta com o tipo de tecido e com o cultivar de cana-de-açúcar estudado. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram a ocorrência e distribuição de diferentes formas de invertases em cada tecido da cana e em cada cultivar.

Os resultados estão de acordo com os obtidos por alguns pesquisadores e sugerem que as invertases podem ser diferentes em cada tecido da planta cana-de-açúcar (PRADO *et alii*, 1978; FLEISCHMACHER *et alii*, 1980; VATTUONE *et alii*, 1981; PRADO *et alii*, 1982). Essas diferenças refletem em termos bioquímicos, a existência de vias metabólicas

TABELA 1. Conteúdo de sacarose (SAC); Açúcares Redutores (AR); Açúcares Solúveis Totais (AST); Invertase Ácida da Parede Celular (IP); Invertase Ácida (IA) e Invertase Neutra (IN) em diferentes tecidos de quatro cultivares de cana-de-açúcar. (Açúcar= expresso em mg de glucose/100 mg de matéria seca (%)) e Atividade de Invertase expressa em mg de AR/hora/mg de proteína).

CULTIVARES	I-DA-DE	LAMINA FOLIAR						BAINHA FOLIAR						COLMO					
		AÇÚCARES			INVERTASES			AÇÚCARES			INVERTASES			AÇÚCARES			INVERTASES		
		SAC	AR	AST	IP	IA	IN	SAC	AR	AST	IP	IA	IN	SAC	AR	AST	IP	IA	IN
NA56-79	3	214	389	615	302	219	287	352	500	871	207	124	173	-	-	-	-	-	-
	4	328	180	526	203	174	235	266	750	1330	168	077	077	-	-	-	-	-	-
	5	416	125	553	161	179	131	304	769	1089	062	110	052	22.41	13.46	37.50	1.05	1.12	1.27
	6	335	195	548	076	245	137	316	345	679	046	129	059	26.90	18.03	45.35	0.71	1.01	2.05
	7	624	173	830	106	088	662	200	644	856	040	061	053	25.53	12.98	39.86	1.23	1.47	2.09
	MEDIA	383	212	616	172	181	295	288	601	905	105	100	083	24.96	14.82	41.09	0.99	1.20	1.80
CB41-76	3	378	128	526	228	186	225	765	345	1151	208	185	118	-	-	-	-	-	-
	4	369	144	533	231	128	124	1003	310	1366	217	139	139	-	-	-	-	-	-
	5	368	178	565	218	175	195	508	365	919	077	118	051	11.52	11.78	23.92	0.92	4.17	2.60
	6	42	173	616	152	342	320	871	264	1181	073	133	061	12.06	29.81	42.50	0.92	4.35	2.48
	7	431	351	805	165	176	543	750	471	1262	031	058	075	3.78	38.46	42.44	1.60	1.68	1.11
	MEDIA	393	195	609	199	201	281	779	355	1176	121	107	089	9.13	26.68	36.29	1.15	3.40	2.60
SP70-1143	3	38	262	662	307	204	269	1349	345	1765	360	125	069	-	-	-	-	-	-
	4	392	170	583	166	119	098	1642	169	1897	227	153	153	-	-	-	-	-	-
	5	348	147	513	219	197	407	483	207	712	092	102	055	13.06	17.55	31.29	1.70	2.77	3.12
	6	414	166	602	072	339	494	977	197	1225	133	203	207	35.68	13.94	51.50	1.52	1.45	4.36
	7	538	168	734	157	146	468	1399	144	1617	072	072	134	23.21	21.15	45.58	1.77	1.11	2.33
	MEDIA	414	183	619	184	201	347	1169	212	1443	177	131	124	23.98	17.54	42.78	1.66	1.78	3.27
SP71-799	3	531	327	886	246	149	099	1461	750	2288	264	133	047	-	-	-	-	-	-
	4	459	212	696	116	157	129	2180	176	2471	221	112	112	-	-	-	-	-	-
	5	417	142	581	287	273	271	375	269	664	070	104	061	14.71	20.67	36.15	0.87	2.44	5.44
	6	474	132	631	119	232	730	1053	264	1373	072	233	182	40.25	10.58	52.92	1.84	1.63	5.00
	7	624	148	805	125	181	478	1536	149	1765	042	064	146	40.49	4.09	46.72	1.48	2.04	2.35
	MEDIA	485	209	719	178	198	341	1321	322	1712	134	129	109	31.81	11.78	45.26	1.39	2.04	4.26

distintas e uma diferente expressão do genoma de cada tecido (PRADO *et alii*, 1982).

Observa-se pelos dados da Tabela 1 que de uma maneira geral a atividade das invertases solúveis (ácida pH 5,5 e neutra pH 7,0) foi mais baixa na bainha do que nas lâminas foliares, sendo mais baixa nesses tecidos do que nos internódios. As atividades das invertases ácidas ligadas às paredes celulares dos tecidos foi mais baixa nos internódios do que na bainha e nas lâminas foliares, estando de acordo com HATCH & HAWKER. Eles demonstraram que apesar da preferência dessa forma de invertase por valores baixos de pH, não é comum encontrar um alto nível de sua atividade no colmo.

Os dados de atividade de invertases nas lâminas foliares discordam dos resultados obtidos por ALEXANDER em muitos de seus trabalhos com cana-de-açúcar (ALEXANDER, 1965; ALEXANDER & MONTALVO-ZAPATA 1973). Esse autor tem relatado que as invertases não são virtualmente encontradas nas folhas. Entretanto outros pesquisadores HARTT, 1934; SAMPIETRO *et alii*, 1980; PRADO *et alii*, 1982; SUZUKI, 1982; VIEIRA, 1983; OLIVEIRA, 1985), detectaram atividade das enzimas nesses tecidos.

A Figura 6 ilustra as variações das atividades das diferentes formas de invertases nos tecidos de lâmina foliar dos 4 cultivares de cana-de-açúcar. Observa-se que

FIGURA 6. Atividade de invertases "solúvel (IAS), neutra (IN) e Invertase ligada a parede celular (IP) de lâminas foliares dos cultivares CB41-76, NA56-79 e SP70-1143 e SP71-799.

até o quarto mês as invertases (ácida e neutra), mostraram um padrão quase que constante com uma tendência de decrescer com a idade da planta. Depois desse período a atividade das enzimas do cultivar NA56-79 continuou a decrescer gradualmente com o avanço do crescimento até o sexto mês quando a invertase neutra apresentou a tendência de aumentar e a invertase ácida de decrescer .

Nos outros três cultivares (CB41-76, SP70-1143 e SP71-799) a tendência da atividade das invertases ácida e neutra a partir do quarto mês após o plantio foi a de aumentar até o sexto mês. A partir daí, em todos os casos, a tendência da isoenzima ácida foi a de decrescer e invariavelmente desaparecer com a maturidade do tecido enquanto que a isoenzima neutra variou bastante em relação aos cultivares.

A atividade da invertase ligada à parede celular das lâminas foliares (pH 3,8) mostrou-se bastante variável do terceiro ao sexto mês do desencilamento com a tendência de aumentar com a maturidade da planta. Resultado semelhante foi observado por *BATTA & SINGH (1986)* os quais relataram que na parte superior da cana a atividade desta enzima foi muito mais elevada durante o período do desenvolvimento da cana.

Embora já esteja bem estabelecido que a sacarose após sua biossíntese nas folhas seja o principal

composto que é mobilizado como tal da folha para o colmo (*HARTT et alii*, 1963) relativamente muito pouco é conhecido sobre os mecanismos bioquímicos que regulam o processo de migração. Parece entretanto plausível que as invertases presentes nas lâminas foliares, hidrolisem a sacarose recém formada em suas hexoses constituintes as quais entrarão subsequentemente nas vias metabólicas da própria folha, e parte serão migradas para os reservatórios de armazenamento do colmo, possivelmente através das bainhas.

A atividade da invertase ácida ligada à parede celular das lâminas foliares de plantas dos cultivares CB41-76 e NA56-79 é mostrada na Figura 7-A. Os resultados mostram claramente que níveis relativamente altos desta enzima, foram detectados nas fases iniciais do crescimento das plantas de ambos os cultivares entre os 3º e 4º primeiros meses. Durante a fase seguinte, a tendência da atividade da enzima ligada foi a de declinar até a aproximadamente o quinto mês, quando então começou a aumentar novamente.

Os dados da Figura 7-B mostram que a atividade da enzima ligada à parede celular das lâminas das folhas das plantas dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 não apresentou nenhuma tendência definida durante o desenvolvimento, no período considerado (de três a sete meses). Seus

FIGURA 7. Atividade de invertase ácida ligada à parede celular dos tecidos de lâminas foliares (pH 3,8) dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).

níveis de atividade, apresentaram-se alternados, com elevações e quedas até que, voltaram a aumentar depois do sexto mês após o plantio.

A evidência sugere que essa alternância de pontos, parece eliminar qualquer tendência que possa definir se o cultivar contém um baixo ou alto teor de açúcar. Em consequência disso, considera-se atualmente, que a invertase encontrada ligada à parede celular das lâminas não mostra nenhuma tendência de relacionar-se com as características varietais embora não se encontre respaldo na literatura, para sustentar essa afirmativa. Essa mesma tendência foi observada por *SUZUKI (1982)* com relação à atividade de sintetase de sacarose em folhas de cana-de-açúcar.

Apesar disso, os resultados de alguns ensaios de atividade enzimática com plantas de cana-de-açúcar cultivadas a campo, sugerem que a invertase ácida, que está confinada à parede ou superfície celular, exerce uma função no controle do fluxo de sacarose dos tecidos condutores para as células jovens em crescimento (*SACHER et alii, 1963*).

Os resultados indicam que altos níveis de invertase ligada à parede celular das lâminas foliares, podem estar associados com o crescimento das plantas. Quando a planta alcançou um estágio fisiológico mais diferenciado,

a atividade começou a se elevar novamente. Nota-se de fato que a quantidade de atividade da invertase ligada à parede celular destes tecidos é consideravelmente menor nas folhas de plantas mais maduras (mais de 50%) do que nos tecidos de plantas em crescimento.

Quando se examinam os dados de invertase âcida solúvel (pH 5,5) nas lâminas foliares de plantas dos cultivares em estudo (Figura 8 A e B) observa-se que, ao contrário da isoenzima ligada à parede celular, a atividade da invertase âcida solúvel foi maior entre o quinto e o sexto mês em todos os quatro cultivares. Observa-se por outro lado, que depois desse período ocorreu uma queda brusca na atividade enzimática indicando o início da fase de maturidade, semelhante ao observado por *SUZUKI (1982)*. Comparativamente nota-se que parece existir uma predominância da atividade dessa isoenzima nas folhas de plantas dos cultivares CB41-76 e SP70-1143 em relação as suas concorrentes, respectivamente a NA56-79 e SP71-799.

Esses resultados concordam com os de *MADAN et alii (1981)* que, trabalhando também com quatro cultivares de cana, observaram que os cultivares de alto açúcar tinham menor atividade enzimática do que aqueles de baixo açúcar. Isso também está de acordo com as características

FIGURA 8. Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5) nos tecidos de lâminas foliares de plantas dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71 - 799 (B).

agronômicas e tecnológicas dos cultivares de "alto açúcar" estudados nesse trabalho, no caso o NA56-79 e SP71-799.

Observa-se por outro lado, que a atividade da invertase ácida nas folhas do CB41-76 mostrou o mesmo padrão de comportamento observado para as enzimas nos tecidos foliares do SP70-1143, ou seja, foi alta na fase de maior crescimento, acentuadamente na fase seguinte (4-5 meses) voltando a aumentar a partir do quinto mês para depois decrescer a partir do sexto mês após o plantio. Tendências semelhantes tem sido observadas em diferentes cultivares de cana por vários pesquisadores (*HATCH et alii*, 1963; *ALEXANDER*, 1967; *RIZK & NORMAND*, 1968; *FLEISCHMACHER et alii*, 1980 e *MADAN et alii*, 1981) variando apenas a duração de cada fase, que por sua vez, depende das condições climáticas. Tem sido demonstrado que a atividade da invertase é influenciada por fatores varietais, climáticos e nutricionais entre outros, que igualmente influenciam todas as fases do ciclo da planta (*HATCH et alii*, 1963; *HATCH & GLASZIOU*, 1963; *GLASZIOU & GAYLER*, 1972 e *FLEISCHMACHER et alii*, 1980).

Na tentativa de encontrar padrões de atividade enzimática que pudessem indicar a capacidade de um cultivar de cana, em produzir açúcar o mais cedo possível, *ALEXANDER* (1967) sugeriu que as invertases podem ser utili

zadas como um indicador para comprovar o rendimento de açúcar em cultivares de cana-de-açúcar.

A atividade de invertase neutra (pH 7,0) da lâmina foliar de plantas dos cultivares estudados é apresentado na Figura 9 A e B. Observa-se pelos dados que decrêscimos acentuados na atividade da enzima acompanharam a fase inicial do crescimento de todas as plantas, o que está de acordo com os resultados de *MADAN et alii* (1983). A partir deste período, a tendência da atividade da enzima foi a de aumentar rapidamente com a idade das plantas, embora a distribuição dessa atividade tenha variado de maneira aparentemente não relacionada com as características varietais o que vai de encontro com as observações de *MADAN et alii* (1983) e concorda com *HATCH & GLASZIOU* (1963).

Nos tecidos foliares de plantas fisiologicamente mais velhas dos cultivares CB41-76 e NA56-79 a atividade da enzima neutra mostrou uma tendência de permanecer alta depois dos 6 meses. Essa tendência sugere o envolvimento desta enzima no controle de acumulação de sacarose no vacúolo em conjunto com a invertase ácida da parede celular (*ALEXANDER, 1973*). Em termos comparativos observa-se que essa elevação na atividade da invertase neutra a partir do quinto mês do desenvolvimento (Figura 9 A)

FIGURA 9. Atividade de invertase neutra (pH 7,0) nos tecidos de lâminas foliares dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).

está inversamente relacionado com a queda na atividade de invertase ácida solúvel que ocorreu no mesmo período.

Mudanças dessa natureza tem sido observadas por muitos pesquisadores os quais relataram que a invertase ácida não está presente (*SACHER et alii*, 1965) ou ocorre em nível mais baixo (*SUZUKI*, 1982) em tecidos maduros de variedades de cana com elevada capacidade para armazenar sacarose. Nesses tecidos ocorre em altas concentrações uma invertase neutra com atividade ótima ao pH 7,0 (*SACHER et alii*, 1963).

Pela Figura 9-B observa-se que nas folhas de plantas dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 a atividade da invertase neutra aumentou com o crescimento, mostrando o SP71-799 uma tendência de decrescer após o sexto mês enquanto que no SP70-1143 a enzima se estabilizou em altos níveis. A atividade da invertase ácida foliar também mostrou essa mesma tendência (Figura 8). Esses resultados estão de acordo com *HATCH & GLASZIOU* (1963) os quais observaram que tanto a atividade de invertase ácida como de invertase neutra aumentam ou decrescem prontamente pelas mudanças de temperatura ou deficiência de água. Dessa maneira, as condições adversas de temperaturas baixas e déficit hídrico no período de 6 a 7 meses devem ter contribuído para a dimi

nuição na atividade das invertases e migração de açúcar.

Comparando as invertases ácida e neutra das folhas de diferentes cultivares de cana, cultivados sob condições de campo *MADAN et alii* (1981) sugeriram que essas variações da atividade das enzimas podem ser um dos mais importantes parâmetros bioquímicos úteis na seleção e melhoramento de cultivares de cana-de-açúcar. Desta forma, através de estudos com invertases de cana principalmente em tecidos foliares, pode-se viabilizar a utilização desse parâmetro bioquímico com a finalidade de caracterizar, avaliar e em fim melhorar a médio e longo prazo o material genético dos cultivares.

As invertases dos tecidos da bainha, conforme a Figura 10, mostraram, de uma maneira geral, um decréscimo na atividade específica, relacionado com a idade. No final do período a invertase ácida de parede celular e a invertase neutra tendem a permanecer em níveis baixos, enquanto que a invertase ácida solúvel tende invariavelmente, a desaparecer. Resultados de experimentos com cana-de-açúcar cultivada à campo e em condições controladas também confirmaram esses decréscimos da atividade enzimática e sugeriram que os resultados obtidos para as isoenzimas de parede celular, podem ser devido a inibição pela sacarose (PRA

FIGURA 10. Atividade de invertase ácida solúvel (IAS), neutra (IN) e invertase ácida ligada à parede celular (IP) da bainha foliar (pH 3,5) dos cultivos CB41-76, NA56-79, SP70-1143 e SP71-799.

DO et alii, 1978 e SAMPIETRO et alii, 1980).

Comparativamente, observa-se pela Figura 10 que nos meses iniciais havia uma predominância da isoenzima ácida da parede celular sobre as invertases ácida e neutra. Entretanto, observou-se que, à medida que os tecidos tornaram-se fisiologicamente mais diferenciados, as enzimas intracelulares mostraram uma tendência de aumentar e logo decrescer em níveis bem próximos até o final do experimento. No entanto, a atividade da invertase ligada a parede celular da bainha repetiu a mesma tendência da invertase ligada à parede celular das lâminas foliares, qual seja, a de declinar com o desenvolvimento da planta, conforme mostram os dados da Figura 11 A e B.

Essa tendência, pode estar relacionada com a proposição de *PRADO et alii (1978)* de que existe alguma analogia entre a bainha foliar e as invertases de tecidos maduros e em crescimento. Essa analogia depende provavelmente da compartimentalização extracelular das enzimas, o que é comprovado pelas diferenças de pH de invertases ligadas às paredes celulares dos tecidos analisados. O conjunto dessas ações, é responsável pela inversão da sacarose no espaço intercelular e provável absorção das hexoses resultantes pela célula, para atingir, entre outros, o objetivo último que é o acúmulo de sacarose no vacúolo.

FIGURA 11. Atividades de invertase ácida ligada as paredes celulares da bainha foliar (pH 3,5) dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).

De acordo com *PRADO et alii* (1978) a cana-de-açúcar tem uma alta concentração de sacarose no espaço intercelular que deve estar disponível para a hidrólise pelas invertases ligadas às paredes celulares. Em termos fisiológicos, isso significa que um aumento da sacarose intercelular produzirá um aumento correspondente nos níveis de glucose e frutose. Entretanto, nas bainhas foliares que não compõe os tecidos armazenadores pode existir um consumo celular máximo, e qualquer inversão de sacarose além desse consumo, se constituirá em gasto energético, que pode ser evitado através da inibição pelo excesso de sacarose.

Conclui-se dessas observações que as invertases ligadas à parede celular das lâminas e bainhas foliares parecem estar relacionadas com o processo de alimentação dos tecidos da bainha e lâminas, enquanto que a invertase ligada à parede celular do colmo com o sistema de recuperação da sacarose intercelular, isto é, a invertase ligada do colmo pode estar envolvida com o mecanismo de migração de sacarose conforme *PRADO et alii* (1978) *SAMPIETRO et alii* (1980).

As atividades das invertases ácida e neutra da bainha foliar (Figuras 12 e 13 A e B) diferiram con

FIGURA 12. Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5) da bainha foliar dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).

sideravelmente no período de três a cinco meses mas depois disso apresentaram tendências semelhantes em níveis bem próximos. Verifica-se pelos resultados que a invertase âcida solúvel nos cultivares CB41-76 e SP70-1143 apresentaram inicialmente uma tendência de aumentar, diminuir na fase seguinte e finalmente elevar e cair bruscamente. Tendência oposta foi apresentada pela invertase âcida da bainha de folhas dos cultivares NA56-79 e SP71-799. Entre os três e quatro meses a atividade da enzima mostrou uma tendência a decrescer, elevando-se na fase seguinte e decrescendo após o sexto mês. A magnitude desses aumentos no sexto mês foi maior para os cultivares SP70-1143 e SP71 - 799, do que para a CB41-76 e NA56-79.

Apesar dos quatro cultivares não serem cultivados sob as mesmas condições (o que acarreta na desvantagem de não se poder definir ao certo a natureza da correlação) os resultados sugerem que cultivares com características semelhantes apresentam padrões de atividade de invertase âcida semelhantes. Tal observação pode estar ligada à função da enzima no metabolismo da sacarose.

Com relação a atividade da invertase neutra nos tecidos das bainhas foliares, nota-se pela Figura 13 (A e B) que as variações de sua atividade foram muito maiores do que para invertase âcida. De uma maneira ge

FIGURA 13. Atividade de invertase neutra (pH 7,0) da bainha foliar dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) SP70-1143 e SP71-799 (B).

ral as bainhas foliares continham aos três meses níveis de atividade de invertase neutra que variaram de 0,48 a 1,73 μ g de AR/hora/mg de proteína. Nesse período, a atividade da invertase neutra, que foi maior na NA56-79, apresentou uma tendência de decrescer com a idade da planta.

No cultivar CB41-76, a atividade da enzima tendeu a aumentar, mas depois do quarto mês decresceu bruscamente até o quinto mês com a tendência de aumentar a partir dessa idade. Nas bainhas foliares das plantas dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 a atividade da invertase neutra apresentou ao longo do período, acentuadas elevações, seguidas de quedas bruscas de atividade para finalmente declinar com a idade da planta.

As mudanças na atividade de invertase ácida e neutra com a maturidade podem ser explicadas com base nas observações feitas por *SAMPIETRO et alii* (1980), de que existe um paralelismo entre os eventos celulares que ocorrem nos tecidos da bainha foliar e nos tecidos do colmo em crescimento. Eles observaram que as bainhas assim como os colmos possuem uma invertase solúvel de pH 5,0 a 5,5, uma invertase ácida ligada à parede celular além de uma invertase neutra (pH 7,0) que predomina nas células mais maduras (*HATCH & GLASZIOU, 1963; HAWKER & HATCH, 1965*). Os resultados

obtidos no presente trabalho confirmam as observações relacionadas por esses autores.

Embora seja difícil tirar conclusões definitivas devido a escassez com resultados de trabalhos anteriores sobre as invertases, dos tecidos de bainhas foliares de cana-de-açúcar, parece evidente que os complementos isoenzímicos de invertase sejam alterados durante a maturação da célula. Sugere-se além disso, possíveis semelhanças nas funções fisiológicas das invertases ácidas e neutra durante o desenvolvimento da bainha e do internódio de cana-de-açúcar. Essas observações são reforçadas pelos resultados de SAMPIETRO *et alii* (1980) mostrando que a invertase ácida está de certa maneira relacionada com a invertase vacuolar do colmo em crescimento, assumindo a mesma localização vacuolar para a enzima da bainha.

A Figura 14 mostra as curvas de atividades das enzimas invertases nos tecidos de colmo (3º e 4º internódios) dos cultivares estudados. Conforme esses resultados observa-se que comparativamente o cultivar CB41-76 diferiu consideravelmente do NA56-79 quanto aos níveis de invertase ácida e invertase neutra. Nota-se pela Figura 15-A, que no colmo do cultivar CB41-76, ocorreu uma predominância da atividade de invertase ácida sobre a neutra ambas com

FIGURA 14. Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5), invertase neutra (pH 7,0) e invertase ácida (pH 2,2) ligada à parede celular dos colmos dos cultivares CB41-76, NA56-79, SP70-1143 e SP71-799.

FIGURA 15. Atividade de invertase ácida solúvel (pH 5,5) no colmo dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).

uma tendência de declinar com a idade da planta. No colmo do NA56-79 observou-se uma tendência oposta onde o nível de atividade da isoenzima neutra predominou sobre a ácida. As diferenças entre os níveis de invertases neutras nos colmos dos cultivares CB41-76 e NA56-79 são mostradas na Figura 16-A.

Na Figura 15-B são apresentados os dados de atividades das invertases ácidas nos colmos dos cultivares SP70-1143 e SP71-799. Observa-se que o padrão de variação da invertase ácida nesses dois cultivares foi semelhante ao da NA56-79, ou seja, com baixos níveis de atividade dessa forma isoenzimática durante a fase de crescimento ativo. As invertases neutras detectadas nos colmos dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 (Figuras 14 e 16-B) apresentaram padrões semelhantes de comportamento embora geralmente, não pareçam estar relacionadas com as características varietais. Nota-se que a atividade dessa enzima no cultivar SP71-799 (de alto açúcar) parece guardar melhor correlação com o CB41-76 (de baixo açúcar).

No que se refere a elevada atividade de invertase ácida solúvel durante os primeiros meses do desenvolvimento do colmo do cultivar CB51-76, essa elevação pode estar ligada à função dessa enzima na regulação do crescimento.

FIGURA 16. Atividade de invertase neutra (pH 7,0) no colmo dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).

mento em tecidos imaturos depois que termina o alongamento celular. Esse fato está de acordo com *HAWKER (1985)* o qual demonstrou que variedades de cana que retêm esta forma de invertase não armazenam altos níveis de sacarose.

Embora a elevada atividade de invertase âcida, que caracteriza os estádios iniciais do desenvolvimento dos internódios (*GAYLER & GLASZIOU, 1972*) possa ser um pré-requisito para a efetivação da grande demanda de hexoses exigidas para um rápido crescimento (*ALEXANDER, 1965*) a incapacidade do tecido em acumular sacarose parece estar associada com a presença dessa isoenzima. Contrariamente, a presença de altos níveis de atividade de invertase neutra em tecidos com baixa atividade de invertase âcida, parece guardar uma estreita relação com a capacidade do cultivar em acumular sacarose (*HATCH & GLASZIOU, 1963; RICARDO & SOVIA, 1974*).

Conforme a Figura 17 observa-se que durante os meses de maior crescimento a atividade da invertase âcida ligada à parede celular apresentou a tendência de aumentar à medida que o tecido do colmo tornou-se fisiologicamente mais maduro. Essa tendência contraria as afirmações de *SAMPIETRO et alii (1980)* de que existe uma analogia entre as invertases do colmo e das bainhas foliares ,

FIGURA 17. Atividade de invertase ligada à parede celular do colmo dos cultivares CB41-76 e NA56-79 (A) e SP70-1143 e SP71-799 (B).

embora esses autores não tenham se referido, no caso, às invertases ligadas às paredes celulares. Concordam, entretanto, com os resultados de *JONES & KAUFMAN (1975)* para internódios de aveia em desenvolvimento, cuja atividade da invertase ligada à parede celular aumentou rapidamente durante a fase de crescimento de tecidos imaturos. Aumentos semelhantes não foram observados em tecidos de colmos maduros.

Semelhantes padrões de distribuição tem sido descritos para invertases em várias partes de raízes em desenvolvimento como é o caso de ervilha (*SEXTON & SUTCHIFFE, 1963*), fava (*BROWN et alii, 1952*) e milho (*HELLEBUST & FORWARD, 1972*).

Conforme *JONES & KAUFMAN (1975)* tais observações sugerem que a invertase associada com a parede celular pode estar ligada somente durante os períodos iniciais ou de rápido alongamento celular. A evidência também sugere que a enzima ligada a parede celular do colmo é inativada e não substituída durante a maturação. Assim, a forma pela qual a sacarose é migrada pode ser feita preferencialmente, em células de cana crescendo ativamente. Infere-se dos resultados que a hidrólise da sacarose na superfície da célula por uma invertase ácida ligada à parede celular é um pré-requisito para a sua absorção o que está de acordo com

os resultados de (*SACHER et alii*, 1963). Observa-se que , a partir dos seis meses a tendência das atividades da invertase ácida ligada à parede celular do colmo nos cultivares CB41-76, NA56-79 e SP70-1143, foi a de aumentar com a maturação do colmo. No cultivar SP71-799, entretanto, o que se observa é a tendência na atividade dessa isoenzima de parede celular em decrescer a partir dos seis meses. Os resultados poderiam estar relacionados com as características dos próprios cultivares. No entanto, partindo-se do princípio de que os pares (CB41-76 vs SP70-1143) e (NA56 - 79 vs SP71-799) foram cultivados em localidades diferentes é possível que essas variações na atividade das isoenzimas ácidas (sobretudo da invertase solúvel) podem ter sido influenciadas por outros fatores tais como temperatura, precipitação, tipo de solo, nutrição, etc., que como se sabe, guardam uma boa correlação com as invertases ácidas (*HATCH & GLASZIOU*, 1963; *GLASZIOU et alii*, 1965). Uma explicação dos mecanismos pelos quais esses fatores induzem a atividade de invertases não é entretanto, encontrada na literatura.

As Figuras 18 e 19 mostram o comportamento da invertase ácida nos internódios do colmo de plantas dos quatro cultivares, em função das condições de precipitação e temperatura prevaescentes no período em que durou

FIGURA 18. Efeito da temperatura e precipitação sobre a atividade de invertase ácida nos tecidos do colmo dos cultivares CB41-76 e NA56-79.

FIGURA 19. Efeito da temperatura e precipitação sobre a atividade de invertase ácida nos tecidos do colmo dos cultivares SP70-1143 e SP71-799.

o experimento. As diferenças nítidas no padrão sazonal da enzima sugerem que sua atividade guarda alguma relação com esses fatores. Mecanismos reguladores muito diferentes podem estar se processando em cada caso como é sustentado pelos estudos de correlação de invertase com o crescimento , (FLEISCHMACHER *et alii*, 1980).

Os resultados estão de acordo com os obtidos por alguns pesquisadores (HATCH *et alii*, 1963; RIZK & NORMAND, 1968; FLEISCHMACHER *et alii*, 1980 e BATTA & SINGH 1986), que observaram uma grande variação da atividade enzimática em função das mudanças do clima durante o crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar cultivada à campo. O consenso geral é de que as variações de temperatura podem influenciar o metabolismo da sacarose na cana-de-açúcar (GLASZIOU *et alii*, 1965 e ALEXANDER & MONTALVO-ZAPATA, 1973).

A questão pertinente é como essas mudanças com referência especial à temperatura, influenciam nas atividades das enzimas que sintetizam e hidrolisam a sacarose afetando consequentemente o movimento de sacarose dos tecidos da fonte para o reservatório e sua posterior acumulação (BATTA & SINGH, 1986). É no entanto de interesse elucidar se a presença de invertases nas folhas é um fator genética

mente determinado ou se é um fenômeno resultante da indução de fatores ecológicos e ambientais, conforme já mencionados por (MADAN *et alii*, 1980 e HAWKER, 1985).

4.2. Armazenamento de Açúcares em Relação as Atividades de Invertases

Os dados da Tabela 1 mostram os teores de sacarose, açúcares redutores e açúcares solúveis totais detectados nos tecidos da folha (fonte), bainha foliar e colmo (reservatório) de quatro cultivares de cana-de-açúcar durante o período de três a sete meses do desenvolvimento.

Nas lâminas foliares de plantas do cultivar CB41-76 a tendência dos conteúdos de todos os componentes de açúcar com exceção da sacarose foi de aumentar com a idade. Em termos de sacarose observa-se pelos dados da Figura 20-B, que durante o período inicial do crescimento das folhas o CB41-76 e NA56-79 apresentaram teores relativamente iguais. Entretanto, com o passar do tempo o teor de sacarose nas folhas do NA56-79 apresentou uma tendência de aumentar enquanto que na lâmina do CB41-76 foi a de se manter constante em níveis relativamente altos.

FIGURA 20 (A) e (B). Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p)

(A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s)

(B) durante o desenvolvimento de lâminas foliares dos cultivares CB41 -

De acordo com a Figura 20 A, as atividades de invertases mantiveram-se constantes durante o crescimento das folhas de plantas desses dois cultivares, sempre em níveis muito próximos, tendo no NA56-79 se diferenciado no final do período, aproximadamente aos seis meses.

Enquanto que a atividade da invertase ácida mostrou uma tendência a aumentar e decrescer em níveis acentuados, a atividade de invertase neutra se elevou bruscamente com a idade da planta. É possível que as atividades de invertases ácidas sejam as responsáveis pelas mudanças nos teores de açúcares durante o crescimento, pois parecem estar estreita e inversamente relacionadas com o conteúdo de sacarose e açúcares totais. Nesse período, os efeitos da atividade de invertase neutra foram provavelmente mascarados pela atividade de invertase ácida. Essas observações estão de acordo com aquelas relatadas por GAYLER & GLASZIOU (1972) e GLASZIOU (1960).

Nas lâminas foliares de plantas dos cultivares SP70-1143 e SP71-799, as mudanças nos teores de açúcares Figura 21-B parecem ter seguido a tendência normal do desenvolvimento de um cultivar com alto teor de açúcar, ou seja, a exemplo do NA56-79, padrão em riqueza de açúcar (COPERSUCAR, 1983). De acordo com essa tendência é obser

FIGURA 21 (A) e (B). Atividades de invertases: ácida (a), neutra(n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B) durante o desenvolvimento das lâminas foliares dos cultivares SP70-1143 e SP71-799.

vado pelos resultados que quando os teores de açúcares redutores (glucose e frutose) decrescem, os componentes dos açúcares dos quais eles derivam (sacarose e açúcares totais) aumentam, o que ficou bastante evidenciado para os cultivares CB41-76 e NA56-79.

Observa-se por outro lado, que os valores dos aumentos dos teores de sacarose e açúcares totais nas lâminas foliares dos tecidos de todos os cultivares foram compatíveis com a ausência parcial da atividade de armazenamento, talvez pela própria condição do tecido que é caracteristicamente um centro de produção de açúcares e não de acúmulo. E desde que não houve acúmulo de quantidades significativas de sacarose e açúcares totais nas folhas é possível que a sacarose após a sua biossíntese nas folhas, seja o principal açúcar migrado para o colmo através da mediação da bainha, conforme já havia sido estabelecido por *HARTT et alii* (1963).

Parece no entanto provável que as invertases presentes nas folhas, hidrolisem parte da sacarose em suas hexoses constituintes e como consequência a concentração líquida de sacarose a ser migrada da fonte para o reservatório ser eventualmente diminuída. Essas observações estão também de acordo com estudos realizados por *MADAN et*

alii (1980) sobre a atividade de invertase em folhas de plantas de alguns cultivares de cana-de-açúcar cultivadas no campo.

Uma possível explicação para os aumentos dos teores de açúcares totais pode por um lado, estar ligada à presença de outras hidrolases na folha, no caso, as amilases, cuja função primária é a de não permitir o acúmulo de amido nos tecidos de lâminas e bainhas foliares e evitar as perdas de glucose das vias do metabolismo ativo ou de formação de sacarose (ALEXANDER, 1965). Os aumentos de açúcares totais pode ser o resultado de uma elevada atividade hidrolítica da amilase das folhas de cana sobre a molécula de amido.

Por outro lado, esses resultados podem estar relacionados com a função metabólica da folha, qual seja, a de produzir o fotossintetado sacarose a partir de seus produtos primários e utilizar parte desses compostos, para o metabolismo de manutenção e crescimento da própria folha, cujos passos requerem a ação de invertases, e de exportar a outra parte para os demais órgãos em crescimento, (ALEXANDER, 1973; BATTA & SINGH, 1986).

Com relação à participação das invertases observa-se que nos cultivares CB41-76 e NA56-79, os aumento

tos nos conteúdos de açúcares totais parecem estar diretamente relacionados com os elevados níveis de atividade de invertase neutra. Na lâmina foliar nos cultivares SP70 - 1143 e SP71-799 essa correlação parece ser de maneira inversa, a qual pode resultar em efeitos benéficos para a manutenção dos processos de crescimento, uma vez que, devido à baixa concentração de sacarose nas folhas, as células exigirão uma grande demanda energética que será fornecida, pela oxidação das hexoses. Possivelmente a cana-de-açúcar mais do que qualquer outra planta (ALEXANDER, 1965), tenha necessidade de metabolizar glicose durante os meses iniciais do crescimento e desenvolvimento. Para tanto utilizaria o "pool de glicose, sendo esta a segunda forma de armazenamento de açúcar na cana.

Como era esperado, nos tecidos de folhas dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 os decréscimos no conteúdo de açúcares redutores (glicose e frutose) foram acompanhados pelos aumentos de sacarose e dos açúcares solúveis totais. Essa condição de baixa atividade de invertase ácida, baixo açúcares redutores e alto teor de açúcares totais, é considerada característica de cultivares com maiores rendimentos de açúcar no colmo. Esses resultados foram também observados para o cultivar NA56-79 mas não o foram para o CB41-76.

A presença de altos níveis de invertase neutra nos tecidos de lâminas foliares depois dos seis meses após o plantio, pode estar ligada a participação dessa enzima na regulação do nível de hexoses nos tecidos maduros, tendo ainda níveis apreciáveis de atividade de invertase ácida. Segundo alguns autores, citados por RICARDO (1974), a invertase neutra pode também exercer importantes funções nos tecidos condutores. Para entender tal função é necessário ter um melhor conhecimento da compartimentalização dos açúcares e invertases.

A invertase neutra parece ser uma enzima citoplasmática como tem sido indicado pelos valores de pH ótimo e sua distribuição nos homogenados de células, preparados: (a) segundo as condições do presente ensaio e (b) de acordo com SACHER et alii (1963); RICARDO & AP REES (1970) e LINE & AP REES (1971). A invertase ácida frequentemente é considerada como estando localizada do lado externo da célula ou na superfície celular (SACHER et alii, 1963; HELLEBUST & FORWARD, 1962; RICARDO & AP REES, 1970; HATCH & GLASZIOU, 1963). A presença de uma segunda invertase ácida localizada no tonoplasto tem sido proposta por (SACHER et alii, 1963 e RICARDO & AP REES, 1970) e os decréscimos observados em sua atividade são considerados como um pré-requisito para o armazenamento de sacarose pelos tecidos.

dos.

Conforme foi mencionado *RICARDO (1974)*, parece razoável supor que a invertase ácida pode ter um papel fundamental na regulação da quantidade de açúcares dentro da célula através de uma função dual, ou seja, diretamente hidrolisando uma grande proporção de sacarose para as funções celulares e indiretamente através do controle exercido pelas hexoses sobre a atividade da invertase neutra.

As plantas do cultivar CB41-76 parecem diferir dos outros três cultivares, uma vez que armazenaram nas folhas quantidades apreciáveis de açúcares redutores e apresentaram níveis relativamente altos de atividade de invertases. Não se detectou na literatura nenhuma evidência experimental que pudesse explicar esta observação. Uma possível explicação poderia ser a presença de alguma espécie de inibidor de invertase ácida nas folhas não detectável *in vitro*. A presença de vários inibidores específicos de atividade de invertase tem sido demonstrada por vários autores citados por *ALEXANDER (1973)* como uma das possíveis causas das diferenças varietais.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por *HARTT (1934)* que encontrou elevados teores nos limbos e bainhas foliares e menos açúcar redutor no colmo

de plantas com deficiência hídrica. Na tentativa de encontrar possíveis explicações para o diferencial de açúcar, essa autora concluiu que a água aumenta a fotossíntese e o transporte de açúcar, além do crescimento. Por outro lado, embora menos açúcar seja produzido, mais açúcar é acumulado no colmo em virtude dos baixos requerimentos de utilização.

Mais recentemente alguns pesquisadores demonstraram que as condições de alta atividade de invertase ácida foliar durante o período de maior crescimento, associada com alta atividade de invertase neutra na maturidade, alto teor de açúcar redutor e açúcares totais, pode ser talvez uma indicação de genótipo de cana-de-açúcar de baixo teor de sacarose (*MADAN et alii*, 1980 e 1981).

Esses contrastes entre os cultivares ilustram a importância de se interpretar os resultados de açúcares e atividade dessas enzimas dentro do contexto do complexo sistema fonte-reservatório que é a própria planta da cana-de-açúcar do ponto de vista fisiológico. Por outro lado, tais suposições são baseadas no fato de que a pesquisa sobre as invertases foliares e seus padrões de variação sazonal indicam a possibilidade de que esses estudos possam ser utilizados como um dos mais importantes parâmetros bio

químicos na seleção e melhoramento de genótipos de cana-de-açúcar (*MADAN et alii*, 1982).

Vale ressaltar a importância que trabalhos dessa natureza, possam servir como um marco para o melhoramento de plantas com bases fisiológicas, que aparecem cada vez mais com possibilidade de sucesso especialmente em relação a eficiência fotossintética que é de certo modo o reflexo das interações fisiológicas básicas da planta.

As bainhas foliares de plantas de cana-de-açúcar mantidas em condições de campo, em duas localidades diferentes, chegaram a acumular quantidades apreciáveis de açúcares, cerca de 22% de sacarose e aproximadamente 25% de açúcares totais (Tabela 1). Comparada com a lâmina foliar observa-se pelos dados que o conteúdo de sacarose, glucose e frutose (açúcares redutores) e açúcares totais foram muito maior nas bainhas em todos os estádios do crescimento está de acordo com os resultados obtidos por *BATTA & SINGH* (1986). *HARTT et alii* (1963) demonstraram que o armazenamento de açúcares na bainha é temporário, pois logo eles são migrados para os internódios amadurecidos do colmo.

Os resultados de acúmulo de açúcares na bainha podem estar relacionados com a recuperação da sacarose, como consequência das perdas desse açúcar das folhas que

ocorrem pela inversão, em função da alta demanda destes, para suprir os requerimentos dos processos de crescimento e maturação, como foi estabelecido por *ALEXANDER (1967)*.

Sugerem os dados que o sítio metabólico de controle do complexo mecanismo regulador do sistema fonte reservatório pode estar localizado na bainha foliar de plantas de cana-de-açúcar. Esses resultados são concordantes com *SAMPIETRO et alii (1980)*, cujos relatos sugerem que as bainhas podem ter invertases adaptadas as características funcionais do limbo (ou lâmina) foliar e também, invertases do tecido armazenador.

Além disso, uma invertase ligada à parede celular foi detectada na fração insolúvel do homogenado de bainhas (Figura 22-A). Observa-se que em todos os casos a atividade da enzima decresceu com a idade das plantas tendendo a se estabilizar em níveis baixos na maturidade. Esse decréscimo pode ser devido provavelmente à inibição que a atividade dessa isoenzima ligada sofre pelo excesso de sacarose, o que concorda plenamente com os resultados de *PRA DO et alii (1978)*.

Esses autores demonstraram que a atividade da invertase ligada à parede celular das bainhas, ao contrário das outras invertases da cana-de-açúcar, é inibida pelo

FIGURA 22 A e B. Atividade de invertases ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B) durante o desenvolvimento de bainhas foliares dos cultivares CB41-76 e NA56-79.

excesso de sacarose. Esse fato pode representar uma espe
cialização da bainha foliar para evitar o desdobramento ex
cessivo da sacarose, a exemplo do que possivelmente ocorreu
nas folhas.

Conforme ainda foi observado, os níveis de
atividade e conteúdo de açúcares da bainha foliar das plan
tas variaram muito em função dos cultivares. Os dados da
Figura 22-B mostram que as bainhas do CB41-76 acumularam
muito mais sacarose do que o NA56-79, durante o período do
experimento. Quando se examinam os resultados de açúcares
solúveis totais observa-se que essa tendência foi repetida.
No entanto, em relação ao conteúdo de açúcares redutores a
bainha foliar das plantas do cultivar NA56-79 acumulou mui
to mais do que a do CB41-76.

Examinando os dados de atividade de invertase
Figura 22-A observa-se que o contrário do que ocorreu
nas folhas dos cultivares CB41-76 e NA56-79, durante o cres
cimento destas, a atividade de invertase ácida foi sempre
maior do que a invertase neutra, embora ambas as enzimas
mostrassem, com o conteúdo de sacarose e açúcares totais ,
uma correlação linear. A mesma tendência foi seguida pela
invertase ácida ligada a parede celular da bainha durante a
fase de maior crescimento.

A Figura 23-B, mostra as mudanças ocorridas nos conteúdos de açúcares durante o crescimento e fase de maturação da bainha foliar de plantas de cana-de-açúcar, dos cultivares SP70-1143 e SP71-799. Os tecidos da bainha continham no início do ensaio os maiores teores de sacarose e açúcares solúveis totais. No decorrer do período experimental estes cultivares demonstraram possuir maior tendência de variação nos teores de açúcares das bainhas, parecendo não ter havido influência do fator varietal.

De acordo com as mudanças nas atividades das diferentes formas enzimáticas verificadas nas bainhas foliares desses cultivares (Figura 23-A). Observa-se uma predominância das atividades das invertases ácidas (solúvel e de parede celular) sobre a invertase neutra durante o período de crescimento. No final do período, entretanto, observou-se uma queda na atividade das invertases ácidas enquanto que a invertase neutra passou a predominar sem contudo, elevar-se a níveis significantes.

Esses resultados discordam de *SLACK (1965)*, que não detectou acúmulo de açúcares solúveis nem dos tecidos de folhas nem de bainha, quando as plantas foram cultivadas sob condições controladas, nem sob condições de campo. Entretanto, concordam com *PRADO et alii (1978)* os quais,

FIGURA 23 A e B. Atividade de invertases ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B) durante o desenvolvimento de bainhas foliares dos cultivares SP70-1143 e SP71-799.

trabalhando com canas cultivadas a campo, demonstraram que essas plantas possuem elevada concentração de sacarose no espaço intercelular que deve estar disponível para a inversão pelas invertases.

Isso significa que um aumento fisiológico da sacarose intercelular poderá produzir um aumento correspondente nos níveis de glicose e frutose. Por outro lado, nas bainhas foliares, as quais não compõe os tecidos armazenadores, um consumo máximo de sacarose e a hidrólise desse dissacarídeo além de uma certa quantidade, poderá representar um gasto energético. Este gasto poderá ser evitado através da inibição das invertases pelo excesso de sacarose que, na bainha, parece ter limites inibitórios (PRADO *et alii*, 1978; SAMPIETRO *et alii*, 1980).

No estudo das mudanças dos conteúdos de açúcares nos colmos dos cultivares CB41-76 e NA56-79 em relação as atividades de invertases, os resultados apresentados na Figura 24-A e B apontam para o fato de que enquanto no NA56-79 a atividade de invertase neutra parece guardar uma relação com o teor de sacarose, no colmo do cultivar CB41-79 não se verificou tal relação.

Como era esperado, os internódios de colmos do NA56-79, acumularam quantidades apreciáveis de saca

FIGURA 24 (A) e (B). Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p)

(A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s)

(B) de internódios de colmos de cana-de-açúcar dos cultivares CB41-76 e

rose e açúcares totais desde o quinto mês de idade. Conforme os dados nota-se que, na fase inicial de crescimento, os internódios dos colmos desse cultivar continham teores aproximadamente iguais de açúcares redutores, que aumentaram rapidamente com o crescimento do colmo, sendo a taxa desse aumento muito maior para o CB41-76 do que para o NA56-79. Após seis meses, na maturidade, a tendência da quantidade de açúcares redutores no NA56-79 foi a de decrescer, alcançando valores semelhantes aos iniciais ou seja, aos cinco meses. Observa-se por exemplo que nessa idade os internódios dos colmos desse cultivar continham 13,5% desses que aumentaram até os seis meses e começaram a decrescer no período seguinte. Observa-se por outro lado que o aumento inicial foi acompanhado da queda na atividade da invertase ácida e um aumento dos açúcares redutores (ou invertidos). Essa relação inversa entre os teores de invertase ácida, açúcares redutores no colmo é uma indicação de uma rápida hidrólise durante o desenvolvimento do internódio (BATTI & SINGH, 1986).

Os valores de açúcares redutores dos internódios dos colmos de plantas do cultivar CB41-76 em crescimento dos cinco aos sete meses aumentaram linearmente com a idade da planta indicando que esses componentes foram acumulados numa quantidade muito maior do que a sacarose. Em termos de açúcares solúveis totais, dos internódios, a ten

dência foi a de acompanhar os aumentos dos teores de açúcares redutores, ocorrendo no final do ensaio uma queda no cultivar NA56-79 e um acúmulo no cultivar CB41-76.

Quando se examinam os dados de açúcares e invertase durante o desenvolvimento dos internódios dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 (Figura 25-A e B) observa-se que ambos os cultivares acumularam quantidades significantes de sacarose e açúcares solúveis totais sendo o SP71-799 muito mais ativo em termos de acúmulo de sacarose. Paralelamente aos aumentos de sacarose ocorreu uma diminuição dos teores de açúcares redutores e esse aumento pode ser devido a uma redução no crescimento da planta, que deixando de mobilizar a sacarose produzida, favorece o aumento no colmo (BATTI & SINGH, 1986).

Uma observação interessante, prende-se a tendência que no cultivar SP70-1143 os açúcares redutores apresentaram aumentos à medida que os colmos se tornaram amadurecidos. Os acréscimos de açúcares redutores foram observados nos internódios dos cultivares CB41-76 e SP70-1143. Esses resultados, principalmente no que diz respeito à cultivar CB41-76 parecem ter alguma ligação com os altos níveis de atividade de invertase ácida durante o crescimento do internódio como está evidenciado na Figura 24-A. Associação

FIGURA 25 (A) e (B). Atividades de invertases: ácida (a), neutra (n) e de parede celular (p) (A) e conteúdo de açúcares: totais (t), redutores (r) e sacarose (s) (B) durante o desenvolvimento de internódios de colmos de cana-de-açúcar dos cultivares SP70-1143 e SP71-799.

do com a presença de altas atividades dessa isoenzima pare
ce estar a incapacidade do tecido em acumular sacarose.

Analisando os resultados de atividade de invertase ácida ligada à parede celular (Figura 24-A) observase que a tendência da atividade foi a de decrescer com a idade e manter-se em um nível baixo, aproximadamente constante na maturação. Infelizmente os dados da literatura que poderiam dar suporte à justificativa desses padrões enzimáticos de comportamento, são bastante escassos. Com exceção dos trabalhos de *HATCH & GLASZIOU (1963)* e *RICARDO & SOVIA (1974)* não foi encontrado nenhum outro trabalho enfatizando a relação açúcar-invertases solúveis durante o desenvolvimento. A situação na literatura sobre os trabalhos de igual natureza relacionados com a invertase ácida da parede celular parece ser ainda mais dramático, pois na da foi encontrado.

Observa-se entretanto, pela (Figura 24-A) que com exceção do CB41-76, parece existir um certo paralelismo entre a atividade da invertase ácida ligada à parede celular com a da invertase ácida solúvel pH 5,5. Assumindo que a invertase de parede é parte da atividade da invertase do espaço externo, sugere-se que a quantidade de carboidrato disponível para as células armazenadoras durante fa

se do crescimento é pré-determinada pela quantidade de invertase do espaço externo, secretada previamente na zona do meristema intercalar, como descreveram *GAYLER & GLASZIOU* (1972).

Embora não se tenha dados quantitativos do fator de correção, observa-se que nos cultivares NA56-79 (Figura 24) e SP71-799 (Figura 25) a taxa de armazenamento de sacarose aumenta ou diminui em função do nível de atividade de invertase neutra. Esses resultados estão de acordo com os de *HATCH & GLASZIOU* (1963) os quais sugeriram que essa isoenzima parece ser a mesma invertase neutra que é ativa em tecidos armazenadores imaturos e que sobreviveu ao processo de maturação do tecido.

Correlações significantes também foram relatadas por *VIEIRA* (1983) que encontrou uma distribuição relativa de açúcares e invertases no terço inferior, médio e superior do colmo de cana-de-açúcar, cultivar NA56-79 com aproximadamente três meses de idade. Os dados foram coletados de um ensaio relacionado com os efeitos do potássio sobre a inversão de sacarose e compostos nitrogenados à três porções do colmo. A autora concluiu que devido a variações de sacarose entre as diferentes seções da parte aérea da planta pode existir uma relação de causa-e-efeito.

Tais interpretações são interessantes, mas como relata *ALEXANDER (1973)* o acúmulo de açúcares em tecidos imaturos envolve mecanismos essencialmente diferentes e a utilização exige mais sacarose armazenada, o que varia grandemente com a maturidade do tecido armazenador.

Além disso existe evidência de que o potencial para o amadurecimento e controle enzimático é consideravelmente maior no ápice do colmo onde tanto os estádios primários como secundários do amadurecimento não foram completados. *RIZK & NORMAND (1968)* também notaram que as condições de alto nível de invertase, alto açúcar redutor e baixo teor de sacarose são características de variedades menos produtivas bem como de áreas menos maduras do colmo. Nota-se pelas Figuras 24 e 25 que os cultivares CB41-76 e SP70-1143 não apresentaram a mesma tendência de seus concorrentes.

Existem também a possibilidade de que esses acréscimos de açúcares redutores sobre os teores de sacarose no colmo, sejam devidos a incapacidade do tecido armazenador (reservatório) em absorver a sacarose. Como é sabido, a sacarose é ocasionalmente o único produto da acumulação no espaço interno e que os açúcares redutores aumentam como consequência de sua inversão no espaço externo. Pa

ra conciliar esses resultados, parece que não existe outra alternativa que não seja a de invocar a compartimentalização das enzimas invertases nas células dos internódios onde a ação conjunta de suas formas isoenzímicas, resulta na produção das duas hexoses a partir da inversão da sacarose.

Observa-se que no estágio inicial do crescimento do colmo a atividade da invertase ácida solúvel nos cultivares NA56-79, SP70-1143 e SP71-799 decresceu consideravelmente com o tempo, enquanto que a invertase neutra aumentou. Tendência inversa foi apresentada pelas atividades dessas duas isoenzimas nos estádios iniciais do crescimento dos colmos (cinco a seis meses) das plantas do cultivar CB41-76. No estágio subsequente, entretanto, quando os internódios alcançaram a maturidade, a atividade das duas enzimas nos cultivares CB41-76 e SP70-1143 começou a declinar, enquanto que nos cultivares NA56-79 e SP71-799 a tendência da atividade de ambas as isoenzimas foi a de aumentar sugerindo uma estreita influência do fator varietal. Essa observação concorda com a de vários autores que tem sugerido a existência de uma estreita relação entre o crescimento do tecido e a atividade de invertase ácida (ROBINSON & BROWN, 1952; HELLEBUST & FORWARD, 1963; HATCH & GLASZIOU, 1963).

Os resultados apresentados no diagrama da

Figura 26 mostram que durante o período em que durou o ensaio, os internódios acumularam teores variáveis de açúcares, evidenciando-se a superioridade do NA56-79 sobre o CB41-76 e do SP71-799 sobre o SP70-1143. Observa-se pelos dados que o cultivar NA56-79 apresentou em todas as épocas de amostragens do colmo, teores médios de açúcares solúveis totais (AST), sacarose (SAC) e açúcares redutores (AR) consideravelmente maiores do que o cultivar CB41-76.

Os valores médios totais desses açúcares (AST, SAC e AR) acumulados nos colmos dos quatro cultivares, durante todo o período são apresentados no diagrama da Figura 27. Os dados mostrados na Figura 27-A evidenciam a superioridade do NA56-79 sobre o CB41-76 em termos de sacarose acumulada. Observa-se por outro lado que o potencial em açúcar do cultivar CB41-76 está diretamente relacionado com o acúmulo de açúcares redutores e açúcares solúveis totais no colmo.

Essas considerações são corroboradas pelos resultados de teores médios totais de açúcares acumulados nos colmos dos cultivares SP70-1143 e SP71-799 conforme se observa na Figura 27-B.

Uma possível explicação para a presença

FIGURA 26. Percentagem total de açúcares acumulados nos colmos dos quatro cultivares durante o desenvolvimento.

FIGURA 27. Teores médios totais de açúcares solúveis totais (AST), sacarose (sac) e açúcares redutores (AR) acumulados nos colmos dos cultivares CB41-76 e NA56-79; SP70-1143 e SP71-799 durante o desenvolvimento.

dos açúcares redutores (glicose e frutose) em níveis relativamente altos nos tecidos imaturos, seria a de que esses açúcares são armazenados quando a concentração de fotossintetizados que se movem das folhas excede a capacidade do tecido para armazenar açúcar como a sacarose. Entre as possibilidades alternativas, poderia ser a inversão da sacarose no espaço interno (vacúolo) atuando provavelmente como um fator de controle (GLASZIOU, 1961).

SILVEIRA & CROCOMO (não publicado) observaram um pronunciado decréscimo de níveis de sacarose e açúcares redutores de colmos imaturos entre o período de dois a quatro meses, coincidindo com as maiores taxas de crescimento de folhas e planta integral. No período seguinte (quatro a seis meses) os autores observaram um grande acúmulo de sacarose nos colmos. Esses dados evidenciam que as relações entre os níveis de sacarose e o crescimento nos estádios iniciais da cana-de-açúcar são muito complexos.

Quando se analisa os dados de enzima verifica-se que as maiores atividades de invertases nas folhas e menores níveis de sacarose no colmo poderiam estar relacionados com os maiores custos energéticos para manutenção e crescimento de folhas, o que acarretaria uma menor "eficiência" de utilização de carbono reduzido neste cultivar.

Além disso, nas células do parênquima celular armazenador de colmos imaturos há uma invertase ácida localizada nos vacúolos e outro no espaço externo que inclui a parede celular. As propriedades físicas da enzima em ambos os locais são idênticas. Medidas da taxa de alongamento do internódio e atividade de invertase ácida total mostram que esses dois parâmetros estão linearmente correlacionados (GAYLER & GLASZIOU, 1972).

Para explicar a correlação entre alongamento do internódio e o nível de invertase ácida GLASZIOU & WALDRON (1964) postularam que a invertase ácida vacuolar, e a invertase do espaço externo de células jovens em crescimento, trabalham conjuntamente para manter o nível de hexose disponível no citoplasma. A função regulatória desta enzima depende sobretudo do fato de que a sacarose pode ser hidrolisada antes de entrar nas vias metabólicas das células armazenadoras do parênquima celular. A enzima do espaço externo hidrolisa a sacarose proveniente dos tecidos condutores. A enzima vacuolar torna a sacarose armazenada disponível para o uso dos processos metabólicos quando o fornecimento pela fotossíntese é inadequado.

O conceito de que a persistência da invertase ácida vacuolar poderia evitar que altos níveis de sa

carose sejam armazenados tem, como consequência, o fato de que ela é a responsável pelos altos níveis de hexoses (açúcares redutores). Por outro lado, a persistência dessa enzima pode ser uma característica de determinadas espécies de cana (GAYLER & GLASZIOU, 1972). Esses autores observaram que populações F_1 de híbridos de *S.officinorum* x *S.spontaneum* continham de 0,9 a 4,9% de hexoses nos internódios basais de colmos maduros.

Uma hipótese alternativa, que poderia explicar níveis tão altos de hexoses em tecidos de colmos maduros, foi lançada por GAYLER & GLASZIOU (1972) que atribuem esse fato ao menor efeito da invertase ácida vacuolar devido à sua persistência por um período maior do que o normal. Os resultados obtidos no presente ensaio e apresentados na Figura 25 estão de acordo com os de GAYLER & GLASZIOU (1972).

Os resultados encontrados neste trabalho para os níveis de invertase neutra e conteúdo de açúcares redutores, indicam que, nos tecidos de colmos dos cultivares NA56-79 e SP71-799, essa relação foi positiva e nos de CB41-76 e SP70-1143 a relação foi negativa. Sugerem, por outro lado, que a relação positiva é uma característica de cultivares com alto açúcar, enquanto que a relação inversa

seria uma característica dos cultivares com baixo açúcar. Essas observações discordam dos relatados por *GAYLER & GLASZIOU (1972)* os quais estabeleceram que o tamanho do "pool" de hexoses das células armazenadoras maduras podem ter uma relação positiva com o nível de invertase neutra, sendo essa relação independente do cultivar.

Dos resultados obtidos neste trabalho, parece evidente que a atividade das enzimas invertases é parte integrante do sistema de regulação do fluxo do açúcar nos tecidos de cana-de-açúcar, embora esse mecanismo ainda não tenha sido esclarecido. Ressalta-se, portanto, a importância de se conduzir experimento de longa duração que permi- tam o acompanhamento das mudanças nas atividades dessas enzimas, todo ciclo do seu desenvolvimento, particularmente sob condições de campo.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e considerando as limitações impostas pela elevada complexidade dos sistemas biológicos, fatores genéticos, climáticos, nutricionais e edáficos que estiveram presentes neste trabalho, conclui-se que:

- . Os tecidos de lâmina foliar, bainha e colmo dos cultivares CB41-76, NA56-79, SP70-1143 e SP71-799 estudados, possuem um conjunto de invertases sendo duas solúveis (uma ácida pH 5,5 e outra neutra pH 7,0) e uma ácida ligada à parede celular com um ótimo de pH para cada caso.
- . Os cultivares reagem diferentemente tanto em relação aos níveis de atividade de invertases como em relação aos teores de açúcares. O CB41-76 contém os mais baixos níveis de sacarose no colmo e alta atividade de invertase ácida nas folhas, sendo considerado de "baixo-açúcar".

- . O NA56-79 e SP71-799 são considerados de alto-açúcar pois apresentam teores elevados de sacarose no colmo e altos níveis de invertase neutra. O SP70-1143 embora apresente teores relativamente altos de sacarose no colmo possui um padrão de comportamento semelhante ao CB41-76 com alta atividade de invertase ácida nas folhas.
- . A diferença entre os cultivares CB41-76 e NA56-79 quanto ao potencial de sacarose na planta concentra-se na bainha foliar, evidenciando uma baixa eficiência de migração de açúcares desse tecido para o colmo.
- . Os cultivares que contêm altos níveis de invertase ácida solúvel nas folhas não acumulam teores elevados de sacarose nos colmos.
- . Altos níveis de atividade de invertase neutra no colmo está relacionada aos cultivares que acumulam grandes quantidades de sacarose no colmo e possuem teores baixos de açúcares redutores.
- . Os níveis de atividade de invertase ácida ligada à parede celular refletem mais a hidrólise da sacarose "in situ" do que o potencial de produção dos cultivares, merecendo, portanto, serem melhor avaliados.

- . As invertases exercem o controle-chave nos mecanismos de mobilização, utilização e acúmulo de sacarose na cana-de-açúcar.

6. BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, A.G. Sucrose-enzyme relationships in immature sugar-cane as affected by variable nitrate and potassium supplied in sand culture. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. Rio Piedras 48(3):165-231.1964.

ALEXANDER, A.G. The biosynthesis of sucrose. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. Rio Piedras . 48(4):265-283. 1965.

ALEXANDER, A.G. Evaluation of sugar-enzyme relationships among twelve Puerto Rico sugarcane varieties. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. Rio Piedras 51(1):29-38. 1967.

ALEXANDER, A.G. Sugarcane physiology. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1973. 753p.

- ALEXANDER, A.G. & MONTALVO-ZAPATA, R. Evaluation of chemical ripeners for sugarcane having constant nitrogen and water regimes. I. Growth, quality and enzymic responses ripeners. Tropical Agriculture (Treinidad) 50(1):35-44, 1973.
- BATTA, S.K. & SINGH R. Sucrose metabolism in sugarcane grown under varying climatic conditions: Synthesis and storage of sucrose in relation to the activities of sucrose synthase, sucrose-phosphate synthase and invertase. Phytochemistry. New York, 11:2431-2437, 1986.
- BROWN, R.; REITH, W.S. ; ROBINSON, N.E. The mechanism of plant cell growth. Society Experimental Biological Symposium. 6:329-347, 1952.
- BULL, T.A. The C₄ pathway related to growth rates in sugarcane. Photosynthesis and Photorespiration (Eds. M. D. Hatch, C.B. Osmond and R.O. Slatyer) John Wiley, C. Sons. Inc., p.68-75, 1971.
- COPERSUCAR. Novas variedades Copersucar. São Paulo. Copersucar, 1983, p.1-59 (Boletim Técnico Copersucar), Edição Especial, 1983.

- CROCOMO, O.J. & SILVEIRA, J.A.G. da. O sistema fonte-reservatório e a produtividade da cana-de-açúcar. Agricultura Boletim nº 1/2 da Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 12p. 1983.
- DIB NUNES, JR., M.S. Variedades de cana-de-açúcar. In: Paranhos, S.B., Cana-de-Açúcar, Cultivo e Utilização. Fundação Cargill, Campinas, SP, Brasil, 1:187-259, 1987.
- DILLEWIJN, C. van. Botany of sugarcane. W althan, Mass. USA. The chronica Botanica, 1952. 37lp.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, Washington 28:350-356, 1956.
- FLEISCHMACHER, P.L.; PRADO, F.E.; SAMPIETRO, A.R. Cell wall invertases from apex and callus tissues of sugarcane . Plant and Cell Physiology, Kyoto, 21:1273-1281, 1980.
- FRYDMAN, R.B. & HASSID, W.Z. Biosynthesis of sucrose with sugarcane leaf preparations. Nature, London, 199:382-83, 1963.

GAYLER, K.R. & GLASZIOU, K.T. Physiological functions of acid and neutral invertases in growth and sugar storage in sugar-cane. Physiologia Plantarum, Kobenhaun, 27: 25-31, 1972.

GLASZIOU, K.T. Accumulation and transformations of sugars in sugar-cane stalks. Plant Physiology, Washington, 35(6):895-905, 1960.

GLASZIOU, K.T. Accumulation and transformations of sugars in stalks of sugar-cane. Origin of glucose and fructose in the inner space. Plant Physiology, Washington, 36: 175-179, 1961.

GLASZIOU, K.T. & GAYLER, K.R. The role of cell walls in sucrose transport in sugarcane. Plant Physiology. Washington, 49:912-913, 1972.

GLASZIOU, K.T.; BULL, T.A.; HATCH, M.D.; WHITEMAN, P.C. Physiology of sugarcane. VII. Effects of temperature, photoperiod duration, and diurnal and seasonal temperature changes on growth and ripening. Australian Journal Biological Science, Melbourne, 18:53-66, 1965.

GLASZIOU, K.T. & BULL, T.A. The relation between total invertase activity and internode expansion in sugar-cane stalks. Proceeding International Society Sugarcane Technologists, 12th Congress, 12:575-581, 1967.

GLASZIOU, K.T. & BULL, T.A. Feedback control of Photosynthesis and photorespiration (Eds. M.D. Hatch, C.B. Osmond and R.O. Slatyer). John Wiley C. Sons, Inc. Pag 82-88, 1971.

GLASZIOU, K.T. & WALDRON, J.C. The regulation of invertase synthesis in sugar-cane. Effects of sugars, derivatives and polyhydric alcohols. Australian Journal Biological Science, Melbourne, 17:609-618, 1964.

GIAQUINTA, R. Sucrose hydrolisis in relation to photo in translocation in Beta vulgaris. Plant Physiology, Washington, 60:339-343, 1977.

HAQ, S. & HASSID, W.Z. Biosynthesis of sucrose phosphate with of sucrose phosphate with sugarcane leaf chloroplasts. Plant Physiology. Washington, 40:591-594, 1965.

HARTT, C.E. Some effects of potassium upon the amounts of protein and amino forms of nitrogen, sugars and enzyme activity of sugarcane. Plant Physiology, Washington, 9: 453-490, 1934.

HARTT, C.E. Translocation of sugar in the cane plant. Hawaiian Planters' Record, Honolulu, pp.151-167, 1963.

HARTT, C.E.; KORTSCHAK, H.P.; FORBES, A.J.; BULL, G.O. Translocation of ^{14}C in sugarcane. Plant Physiology, Washington, 38:305-318, 1963.

HATCH, M.D. & GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugarcane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plant grown in controlled environments. Plant Physiology, Washington, 38:344-348, 1963.

HATCH, M.D.; SACHER, J.A.; GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugarcane. I. Studies on enzymes of the cycle. Plant Physiology. Washington, 38:338-343, 1963.

HAWKER, J.S. Sucrose. In: Dey, P.M. and Dixon, R.A. Eds. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. Academic Press, London, 1985, pag. 1-48.

HAWKER, J.S. & HATCH, M.D. Mechanism of sugar storage by mature stem tissue of sugarcane. Physiologia Plantarum, Kobenhaun, 18:444-543, 1965.

HELLEBUST, J.A. & FORWARD, D.F. The invertase of the corn radicle and its activity in sucessive stages of growth, Canadain Journal of Botany, Ottawa, 40:113-126, 1962.

HUMBERT, R.H. Potassium builds sugarcane quality. Better Crops with Plant Food. Washington, 1:28-29, 1968.

IRVINE, A.S. Growth and yield of sugarcane. Symposium on Potential Productivity of field crops under different environments, 22-26 september, 1980.

JONES, R.A. & KAUFMAN, P.B. Multiples forms of invertase in developing oat internodes. Plant Physiology. Washington, 55:114-119, 1975.

LYNE, R.L. & APREES, T. Invertase and sugar content during differentiation of roots of *Pisum satiyum*. Phytochemistry, New York, 10:2593-2599, 1971.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, Baltimore, 193:265-275, 1951.

MADAN, V.K.; SINGH, K.; SHIVAPURI, S.; PANDE, H.P.; SAXENA, Y.R. Activity of invertase (s) in sugar-cane leaves. International Sugar Journal, Lucknow, 82:55, 1980.

MADAN, V.K.; SINGH, K.; PANDE, H.P.; SAXENA, Y.R. Foliar enzymes of sugarcane, Parte I. Seasonal variation of invertases. International Sugar Journal, Lucknow, 83 (990):163, 1981.

MAGALHÃES, A.C.; PETERS, D.B.; HAGEMAN, R.H. Influence of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion soy bean (Glycine max L. Merrill) seedlings. Plant Physiology, Washington, 58:12-16, 19

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. Journal Biological Chemistry, Baltimore, 153:375-380, 1944.

OCHOA-ALEJO, N. Efeito do nitrogênio nítrico, amoniacal e de uréia sobre o crescimento, carboidratos e compostos nitrogenados em cana-de-açúcar (Saccharum spp) cv. NA56-79 cultivada em solução nutritiva. Piracicaba , 1980. 116p. (Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

OLIVEIRA, L.E.M. Comportamento fisiológico de plantas de cana-de-açúcar (Saccharum spp) sob condições de deficiência hídrica: alterações na assimilação do nitrato e mobilização de açúcares. Campinas, UNICAMP, 126p , 1985 (Tese de Doutorado).

PRADO, F.E.; VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. Sugarcane glycosidases. A new bound invertase from leaf sheaths. In: International Society of Sugarcane Technologists , Proceedings of the XVII Congress, São Paulo, SP, Brasil, 16:1683-1691, 1978.

PRADO, F.E.; FLEISCHMACHER, O.L.; VATTUONE, M.A.; SAMPIETRO, A.R. Cell wall invertases of sugarcane. Phytochemistry, New York, 21(12):2825-2828, 1982.

PLANALSUCAR, SUPER. Relatório Anual, 1983. Piracicaba. IAA/PLANALSUCAR, 1983. 163p.

QUIROGA, E.N.; DE MAXUD, R.R.; VATTUONE, M.A.; PRADO, F.E.; SAMPIETRO, A.R. Sugarcane glycosidases. A general view of the glycosidases from stalk. Plant Science Letters , Amsterdam, 8:135-140, 1977.

RICARDO, C.P.P. & AP REES, T. Invertase activity during the development of carrot roots. Phytochemistry, New York 9:239-247, 1970.

RICARDO, C.P.P. Alkaline β -fructofuranosidases of tuberous roots: possible physiological function. Planta, Berlin, 118:333-343, 1974.

RICARDO, C.P.P. & SOVIA, D. Development of tuberous roots and sugar accumulation as related to invertase activity and mineral nutrition. Planta, Berlin, 118:43-55, 1974.

RIZK, T.Y. & NORMAND, W.C. Effect of sugarcane maturity on invertase activity. Sugar Journal, Louisiana 31(3):11 - 12, 1968.

ROBINSON, E. & BROWN, R. The development of the enzyme complement in growing root cells. Journal of Experimental Botany, Oxford, 3(9):356-374, 1952.

SACHER, J.A.; HATCH, M.D.; GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugarcane. III. Physical and metabolic aspects of cycle in immature storage tissue. Plant Physiology, Washington, 38:348-354, 1963.

SACHER, J.A. & GLASZIOU, K.T. Regulation of invertase levels in sugarcane by auxin carbohydrate mediated control system. Biochemical and Biophysical Research Communication, New York, 8:280-282, 1962.

SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A.; PRADO, F.E. A regulatory invertase from sugarcane leaf-sheaths. Phytochemistry, New York, 19:1637-1642, 1980.

SEXTON, H.R. & SUTCLIFFE, J.F. The distribution of β -glycerophosphatase in young roots of Pisum sativum L. Annals of Botany, Oxford, 33:407-419, 1969.

SILVA, W.M. Perspectivas da cultura da cana-de-açúcar no Brasil. In: Seminário de Biotecnologia Agrícola. Anais. Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", 1984.

- SILVEIRA, J.A.G. da. Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento de cana-de-açúcar (Saccharum spp) cultivada em condições de campo. Piracicaba, 1985, 152p. (Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SLACK, C.R. The physiology of sugarcane. VIII. Diurnal fluctuations in the activity of soluble invertase in elongating internodes. Australian Journal of Biological Sciences. Melbourne, 18:781-788, 1965.
- STUPIELLO, J.P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: Paranhos, S.B. 1987. Cana-de-açúcar cultivo e utilização Fundação Cargill, Campinas, SP, 2:261-856, 1987.
- SUNG, S.J.; SU, D.P.; GALLOWAY, C.M.; BLACK JR., C.C. A reassemblment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. Physiologia Plantarum, Kobenhavn, 72:650-654 , 1988.
- SUZUKI, J. Biossíntese e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar (Saccharum spp): Influência do íon potássio durante diferentes estádios do crescimento em solução nutritiva . Piracicaba, 1982, 96p. (Tese de Doutorado - E.S.A."Luiz de Queiroz"/USP).

SUZUKI, J.; SANTOS VIEIRA, I.M.; SILVEIRA, J.A.G. da; CROCO MO, O.J. Mecanismos reguladores do sistema fonte-reservatório de cana-de-açúcar. In: Seminário de Biotecnologia Agrícola. Anais. Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", 1984.

VATTUONE, M.A.; PRADO, F.E.; SAMPIETRO, A.P. Cell wall in vertases from sugarcane. Phytochemistry, New York, 20: 189-1981, 1981a.

VATTUONE, M.A.; FLEISCHMACHER, O.C.; PRADO, F.E.; VINALS , A.C.; SAMPIETRO, A.R. Localization of invertase activities in Ricinus communis leaves. Phytochemistry, New York, 22:1361-1365, 1981b.

VIEIRA, I.M.S. Efeito do potássio sobre a atividade de invertases, teores de açúcares e compostos nitrogenados em cana-de-açúcar (Saccharum spp var. NA56-79) cultivada em solução nutritiva. Piracicaba, 198 , 97p. (Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).