

# Peroxidasas en *Cycas circinalis* L.: II. Estudios en la hoja

Esperanza Peña, Emma Grillo, Maritza Luis y Dalia Pérez, Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

## RESUMEN

Se evaluaron las isoenzimas peroxidasa en hojas de *Cycas circinalis* L. Se utilizaron hojas de distintos grados de desarrollo en plantas jóvenes y adultas de ambos sexos. Se comprobó la existencia de tres formas moleculares de peroxidasa en todos los casos estudiados.

## ABSTRACT

Peroxidase isoenzymes in leaves of *Cycas circinalis* L. were evaluated. Leaves of different developmental stages of young and adult plants of both sexes were used. The existence of three molecular forms of peroxidase in all cases studied was verified.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de los sistemas enzimáticos en relación con aspectos genéticos, fisiológicos, taxonómicos y fitopatológicos ha adquirido gran auge en las últimas décadas. Uno de los sistemas más estudiados ha sido el de las peroxidasas, del que se han encontrado gran cantidad de formas isoenzimáticas. Este hecho permite suponer su participación en reacciones y funciones no determinadas hasta el presente, lo cual ha sido referido con anterioridad (Peña, Grillo y Pérez, 1983)

*Cycas circinalis* L. es una especie dioica en la cual los caracteres morfológicos de los órganos reproductores son los que permiten su diferenciación. Estas plantas producen hijos vegetativos que se desarrollan a partir de yemas laterales originadas en la base del tallo.

Actualmente se conoce la existen-

cia de dos formas moleculares de la enzima peroxidasa (E.C.1.11.7.) en los tegumentos de la semilla de las cuales una está asociada al proceso de su maduración (Peña, Grillo y Pérez, 1983). Sin embargo, aunque existen trabajos en que se reportan variaciones en las formas de peroxidasa asociadas a la maduración de frutos y semillas en esta y otras especies (Ku, Yong y Pratt, 1970; González, 1980; Peña Grillo y Pérez, 1983) no se ha reportado si estas variaciones se presentan en el desarrollo de la hoja. Por otra parte, no se ha reportado la existencia o no de diferencias en el patrón de bandas de peroxidasas en especies dioicas.

En el presente trabajo se estudia el comportamiento de las isoenzimas peroxidasa en hojas de diferente grado de desarrollo de plantas jóvenes y adultas de ambos sexos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Caracteres de las plantas utilizadas.

Se escogieron seis plantas adultas de *Cycas circinalis* L. de sexo conocido (tres masculinas y tres femeninas) y otras 10 plantas adultas, con la diferencia de la presencia

de hijos vegetativos en las mismas (cinco masculinas y cinco femeninas). A todos los ejemplares seleccionados para el estudio se les hizo un ruedo y se les etiquetó, considerando la planta (a,b,c, ....n) y su sexo (A: femeninas y B: masculinas).



Figura 1. Planta femenina sin hijos de *Cycas circinalis* L.

A. Se observan sus caracteres generales



Figura 1b) Detalle de las estructuras reproductoras



Figura 2. Planta masculina sin hijos de *Cycas circinalis* L.  
Se observan sus caracteres generales, en la  
región de la estructura reproductora.

Los ejemplares utilizados, localizados en la zona de Bosque Arcaico del Jardín Botánico Nacional presentaban un buen estado fitosanitario y sus condiciones ecológicas y de desarrollo eran homogéneas.

Se realizaron muestreos mensuales de tres hojas adultas a cada una de las seis plantas sin hijos, desde el mes de diciembre de 1982 hasta abril del año siguiente. El material colectado se colocaba en sobres de polietileno y se trasladaba de inmediato al laboratorio donde se congelaba hasta su procesamiento.

En los meses de octubre y febrero se colectaron tres hojas a un hijo vegetativo de cada una de las diez plantas adultas seleccionadas independientemente del desarrollo que tuvieran los mismos. Se siguió el mismo procesamiento que con las plantas sin hijos vegetativos.

*Preparación de las muestras para electroforesis.*

Se prepararon 10 g. de las pinnas de cada hoja y se realizó un macerado con 6 ml. de sacarosa al 2% en batidora. El macerado se filtró por gasa doble y se congeló hasta el momento de la corrida.

*C. Evaluación de isoenzimas peroxidasa.*

En las muestras procesadas se evaluaron las isoenzimas peroxidasa mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (Raymond, 1964) utilizando un aparato de electroforesis vertical simplificado (Chapel y Cols., 1974).

Las corridas se realizaron en gel de 8,5% utilizando buffer de tris-glicina 0,04 M de pH 8,3. Para identificar el frente de corrida se utilizó una solución de azul de bromofenol. Todas las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una temperatura de 15°C; se utilizó una intensidad de corriente de 50 mA; y el tiempo de corrida se determinó por el desplazamiento de la banda de Kohlrausch. El revelado de los geles se realizó con bencidina dihidroclórica en ácido acético al 14% mezclados antes de su utilización con peróxido de hidrógeno, durante 1 min. Después de lavados los geles con agua destilada y mantenidos en ácido acético al 7% se realizaron los zimogramas.

RESULTADOS

Se determinó el patrón de banda de isoenzimas peroxidasa a las tres hojas seleccionadas de cada planta en todos los ejemplares sin hijos vegetativos durante el período del ciclo de vida muestreado. Las figuras 3 y 4 ilustran los resultados del patrón de bandas obtenido en uno de los muestreos. En la figura 3 están representados los patrones de banda de las hojas en todas las plantas femeninas. Se evidencia la presencia de tres bandas que coinciden en posición para las hojas de una misma planta y en todas las plantas de un mismo sexo. En los cinco muestreos realizados no se presentaron variaciones en el patrón de banda. En la figura 4 están representados los patrones de bandas de las hojas en todas las plantas masculinas. En estas plantas también se evidenció la presencia de tres bandas que coinciden en posición para las hojas de una misma planta y para las plantas de un mismo sexo. En los cinco muestreos realizados tampoco se presentaron variaciones en el patrón de bandas.

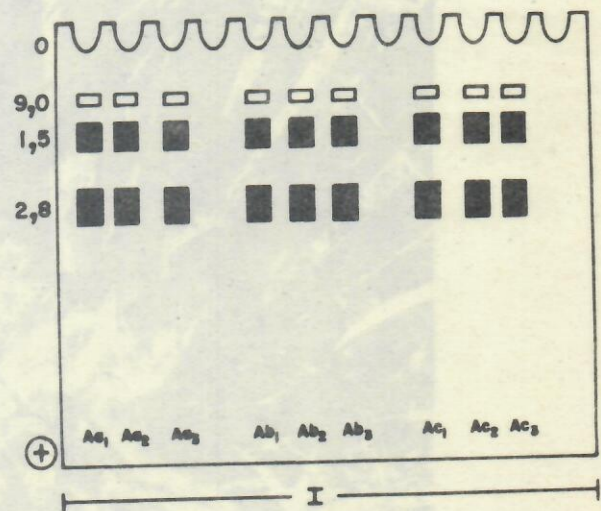


Figura 3. Zimograma de una corrida electroforética para isoenzimas peroxidasa en que se presenta el patrón de bandas de las hojas muestreadas al azar de las plantas femeninas utilizadas en el muestreo I. A, sexo femenino; a, b y c distintas plantas; 1, 2 y 3, distintas hojas.

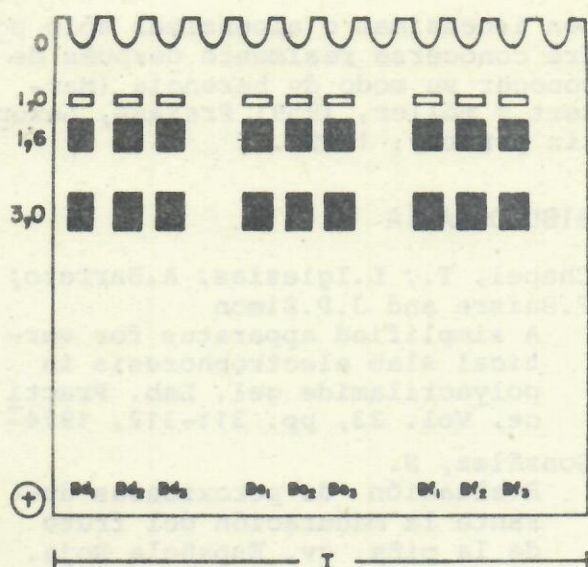


Figura 4. Zimograma de una corrida electroforética para isoenzimas peroxidasa en que se presenta el patrón de bandas de las hojas muestreadas al azar de las plantas masculinas utilizadas en el muestreo I. B, sexo masculino; d, e y f, distintas plantas; 1, 2 y 3, distintas hojas.

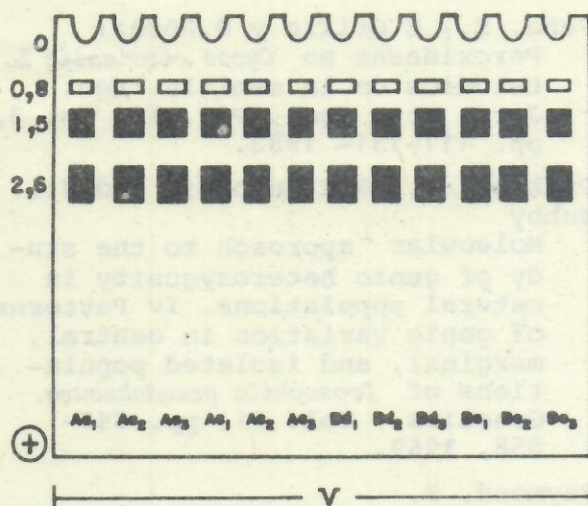


Figura 5. Zimograma de una corrida electroforética para isoenzimas peroxidasa en que se presenta el patrón de bandas de las hojas muestreadas al azar de plantas masculinas y femeninas utilizadas en el muestreo V. A, sexo femenino; B, sexo masculino; a, c, d y e, distintas plantas; 1, 2 y 3, distintas hojas.

Se realizó una comparación entre las hojas de plantas de ambos sexos cuyos resultados se reflejan en la figura 5. Se evidencia que no existen diferencias en el patrón de bandas de peroxidasa entre las plantas masculinas y femeninas. Se comprobó que no existían diferencias en ninguno de los muestreos comprendidos en la fase del ciclo estudiado.

Se realizó un análisis del contenido de isoenzimas peroxidasa a tres hojas de 10 hijos de plantas adultas de sexo conocido en distintas fases de desarrollo en dos oportunidades. Los resultados del análisis de una hoja de cada hijo, en plantas de ambos sexos se presentan en la figura 6. También en este caso se evidencia que el patrón de bandas de peroxidasa consta de tres bandas, de manera homogénea, independientemente del grado de desarrollo de las hojas, del desarrollo de los hijos y del sexo del progenitor. En ninguno de los dos muestreos se observó diferencia alguna.

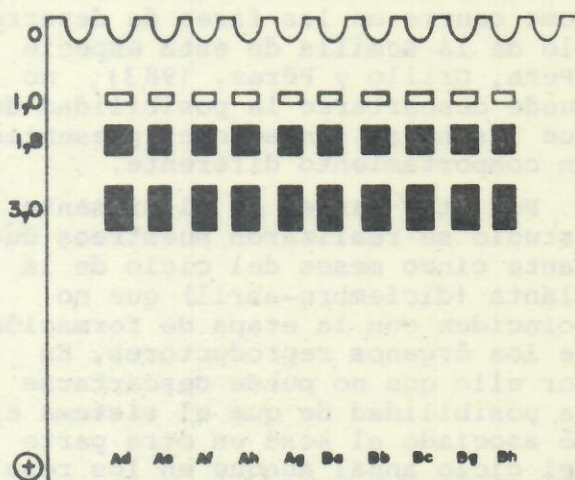


Figura 6. Zimograma de una corrida electroforética para isoenzimas peroxidasa en que se presenta el patrón de bandas de una hoja de cada uno de los hijos de las 10 plantas adultas de sexo conocido muestreadas en octubre. 1, 2, 3, 4 y 5, hojas de hijos vegetativos de plantas femeninas; 6, 7, 8, 9 y 10, hojas de hijos vegetativos de plantas masculinas.

## DISCUSIÓN

Los estudios isoenzimáticos en plantas de la familia *Cycadaceae* han sido muy escasos. Resulta interesante conocer la presencia y características de un sistema tan ampliamente distribuido como el sistema peroxidasa en plantas primitivas, especies dioicas, brotes vegetativos y semillas protospermas, lo que se reúne en la especie objeto de estudio.

Los estudios realizados en parte de la semilla de *Cycas circinalis* L. revelaron la existencia del sistema en estudio en los tegumentos de la semilla protosperma así como su relación con el proceso de maduración (Peña, Grillo y Pérez, 1983).

En este trabajo se comprueba que las hojas contienen el sistema peroxidasa y que el patrón consta de tres formas moleculares diferentes. Estas isoenzimas se presentan independientemente del grado de desarrollo de la planta, de la hoja que se muestree y del sexo de la planta que se utilice.

Aunque en hojas juveniles se presentan los mismos resultados, tal y como ocurre en las fases de desarrollo de la semilla de esta especie (Peña, Grillo y Pérez, 1983), no puede descartarse la posibilidad de que las hojas senescentes presenten un comportamiento diferente.

Por otra parte, en el presente estudio se realizaron muestreos durante cinco meses del ciclo de la planta (diciembre-abril) que no coinciden con la etapa de formación de los órganos reproductores. Es por ello que no puede descartarse la posibilidad de que el sistema esté asociado al sexo en otra parte del ciclo anual aunque en los resultados obtenidos por nosotros estas no se manifiestan.

Finalmente, si las formas moleculares de peroxidasa encontradas por este método en cualquier planta

son isoenzimas o aloenzimas sólo podrá conocerse realmente después de conocer su modo de herencia (Markert y Moller, 1959; Prakash, Lewontin y Hubby, 1969).

## BIBLIOGRAFÍA

- Chapel, T.; L.Iglesias; A.Barreto; F.Baisre and J.P.Simon  
A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrilamide gel. Lab. Practice, Vol. 23, pp. 311-312, 1974-
- González, S.  
Evaluación de peroxidases durante la maduración del fruto de la piña, cv. Española Roja. Rev. Jard. Bot. Nac., Vol.I, No. 2-3 pp. 115-123, 1980.
- Ku, H.S.; S.P.Yang and H.K.Pratt  
Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening. Plant Cell Physiol., Vol. 11, pp. 241-246, 1970.
- Markert, C.L. and F.Moller  
Multiple forms of enzymes; tissue ontogenetic and species-specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 45, pp. 753-763, 1959.
- Peña, E.; E.Grillo y D.Pérez:  
Peroxidasas en *Cycas circinalis* L. Estudios de la semilla. Rev. Jard. Bot. Nac., Vol. IV, No. 3, pp. 117-131- 1983.
- Prakash, S.; R.C.Lewontin and J.L. Hubby  
Molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV Patterns of genic variation in central, marginal, and isolated populations of *Drosophila pseudobscura*. Genetics, Vol. 61, pp. 841-858, 1969.
- Raymond, S.  
Acrylamide gel electrophoresis. Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 121, pp.350-365, 1964.

Recibido: 11 de junio de 1985.