

## ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS EM SEMENTES DE TRIGO RECOBERTAS COM SILÍCIO

**TAVARES, Lizandro Ciciliano<sup>1</sup>; DÖRR, Caio Sippel<sup>2</sup>; BRUNES, André Pich<sup>1</sup>; BARROS, Antonio Carlos Souza Albuquerque<sup>1</sup>; MENEGHELLO, Géri Eduardo<sup>1</sup>;**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel). <sup>2</sup> Acadêmico de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes (UFPel/FAEM).  
caiodorrcsd@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

A agregação de valor às sementes, utilizando métodos e tecnologias de produção como a de recobrimento de sementes, vem sendo uma exigência do mercado, cada vez mais competitivo. O uso de tecnologias para o aumento da produtividade, a nutrição das plantas, especialmente a utilização de nutrientes como o silício, via tratamento de sementes, vem contribuindo para a sustentabilidade do atual sistema de produção (Marschner, 1995), este nutriente aumenta o crescimento e o desenvolvimento da planta com correspondente acréscimo na produtividade, além de controlar várias enfermidades do arroz (Savant et al, 1997). Segundo Deren et al. (1994), o uso do Si promove melhora na arquitetura da planta e aumento na fotossíntese, resultando em uma menor abertura do ângulo foliar, que torna as folhas mais eretas, diminuindo o auto-sombreamento o que melhora o aproveitamento da energia luminosa.

As isoenzimas são produtos da expressão gênica, os quais são altamente influenciados pelo ambiente, e conseqüentemente, pelo manejo, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos, ou ainda sob um determinado estímulo (Ramírez et al., 1991). De acordo com Malone et al. (2006), a intensidade das bandas da eletroforese e o perfil isoenzimático são específicos para uma determinada parte da planta, tecido e estágio de desenvolvimento. As enzimas relacionadas à qualidade fisiológica das sementes mais pesquisadas são esterase, fosfatase ácida, desidrogenases e peroxidases (Carvalho et al., 2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações enzimáticas de sementes de trigo recobertas com diferentes doses de silício.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório didático de Análise de Sementes e Bio-Sementes do Departamento de Fitotecnia, ambos pertencentes à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel).

A cultivar de trigo utilizada foi a FUNDACEP 52 e os tratamentos constaram de níveis de 0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 gramas de Microton<sup>®</sup> por kg de sementes que representa 26% de silício (teor total). Após as sementes foram recobertas com polímero Sepiret<sup>®</sup> e água na dose de 2,5mL.Kg<sup>-1</sup> de sementes para garantir a aderência do produto à semente. O recobrimento das sementes foi feito manualmente, utilizando 200g de sementes por repetição, sendo a mistura dos produtos realizada em sacos plásticos e em seguida adicionado as sementes. Posteriormente agitaram-se as mesmas até a completa distribuição dos produtos e

cobertura das sementes. Em seguida, as sementes foram colocadas para secar em temperatura ambiente, durante 24 horas.

O estudo da diferenciação isoenzimática foi realizado em canteiro de 6 x 1m, sendo as plântulas de trigo coletadas aos 14 dias após a semeadura. As isoenzimas analisadas foram: esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), glutamato desidrogenase (GTDH), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (PO).

Para isso, dez plântulas (parte aérea) foram coletadas aleatoriamente e maceradas em gral de porcelana, em cada tratamento. De cada uma das amostras, 200mg desse macerado foram colocados em tubo Eppendorf acrescidos de solução extratora (tampão tris- citrato 0,1M pH 8,3 + tampão borato de lítio 0,1M pH 8,3 + 0,15% de 2-mercaptoetanol) 1:2 (p/v). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando 20µl de cada amostra em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Três aplicações (repetições) para cada uma das amostras foram realizadas. Os padrões enzimáticos foram analisados pelo sistema de tampões, descrito por Scandális, 1969. Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas verticais mantidas em temperatura ambiente. As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de  $10V.cm^{-1}$ , até que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel. Os géis foram revelados, para os referidos sistemas enzimáticos conforme Scandális, 1969 e fixados em solução de glicerol 10%.

Para a interpretação dos resultados da eletroforese realizou-se a análise visual dos géis levando-se em consideração a presença ou ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas em cada sistema isoenzimático avaliado.

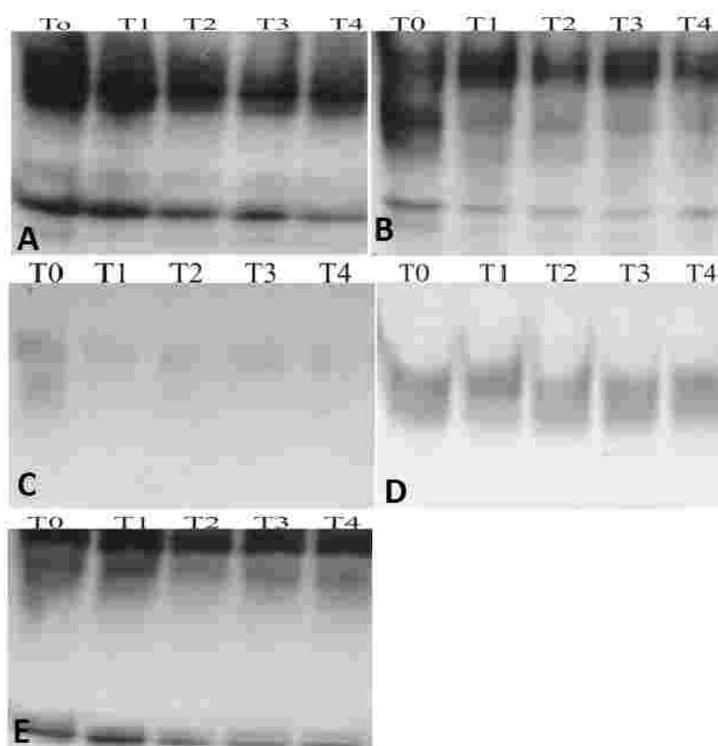
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise dos cinco sistemas enzimáticos utilizados foi possível visualizar que houve variação significativa na intensidade da expressão isoenzimática conforme o aumento da concentração de silício nas sementes. Em função dessa variação, cada sistema foi abordado e analisado individualmente.

A expressão da enzima esterase apresentou bandas menos intensas nas doses mais altas de silício no tratamento de sementes de trigo (Fig. 1 - A). A esterase é uma enzima responsável pelo metabolismo de lipídios de membrana durante a germinação da semente; assim, por esses resultados, observa-se que houve efeito negativo dos produtos aplicados. De acordo com Malone et al. (2007), essa variação também pode ser decorrente de um metabolismo mais acelerado, sugerindo que a maior parte dos materiais de reserva já haviam sido metabolizados aos quatorze dias da germinação. Assim, essa redução pode não ser apenas atribuída ao tratamento de sementes com silício e, sim também ao período em que foi realizada a coleta das amostras para análise.

A expressão da enzima fosfatase ácida (FAC), nos diferentes tratamentos com silício, pode ser observada na Fig. 1 - B. Foram detectadas bandas de FAC em todos os tratamentos avaliados; no entanto, à medida que aumenta a concentração de silício, houve diminuição na sua intensidade. Autores como Vieira (2000) e Brandão Junior et al. (1999) somente verificaram atividade da fosfatase ácida nas sementes de milho e algodão que se apresentavam em avançado grau de deterioração.

Analisando o perfil eletroforético do sistema glutamato desidrogenase (GTDH), fig. 1 - C, não foi observada variação na intensidade de bandas entre as diferentes doses de silício. Esta enzima atua na oxidação de aminoácidos (proteínas de reserva), fornecendo energia para as células (ciclo de Krebs) e/ou na redução do  $\alpha$ -cetoglutarato para síntese de aminoácidos. Ela provavelmente desempenhe um importante papel na germinação de sementes, fornecendo energia para o processo, ou aminoácidos para o desenvolvimento do embrião.



**Figura 1.** Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático esterase (A), fosfatase ácida (B), glutamato desidrogenase (C), malato desidrogenase (D) e peroxidase (E) em sementes de trigo recobertas com crescentes doses de silício.

Outra desidrogenase estudada foi a malato desidrogenase (Fig. 1 - D), que é uma enzima que catalisa a última reação do ciclo de Krebs, oxidando malato a oxaloacetato e produzindo conversão de malato a oxaloacetato, tendo uma importante função de produção de NADH para o Ciclo de Krebs e geração de oxaloacetato para biossínteses de aminoácidos. Sua expressão não apresentou diferença entre as doses testadas de silício em sementes de trigo.

Na fig. 1 - E está apresentado o sistema isoenzimático peroxidase (PO). A expressão da enzima não foi alterada pela utilização de diferentes doses de silício no tratamento de sementes, em relação à testemunha. No entanto, na pesquisa de Gomes et al. (2008) as sementes que foram recobertas com silício apresentaram uma maior atividade da peroxidase, sendo o mesmo resultado encontrado por Gomes et al (2005) em sementes de trigo atacadas por pulgões. Segundo estes autores o silício possui função importante na expressão das enzimas quando é acionada uma situação de estresse, age como um sinalizador e barreira contra o ataque biótico ou abiótico.

A mobilidade eletroforética da peroxidase pode ser alterada consideravelmente pela temperatura e pH. A atividade dessa enzima varia como tipo de tecido e o estágio de desenvolvimento da planta, sendo sua expressão

inversamente proporcional ao crescimento do indivíduo, dessa forma, sua presença poderia ser observada em outra fase de desenvolvimento do material vegetal analisado decorrente de sementes tratadas.

#### 4 CONCLUSÃO

As enzimas esterase (EST) e fosfatase ácida (FAC), revelaram-se como promissores marcadores bioquímicos para avaliação de qualidade de sementes de trigo em ocasiões do tratamento com silício. Foram detectadas alterações no perfil eletroforético das plântulas que, submetidas às diferentes doses de silício, evidenciaram variações no grau de qualidade.

Dependendo do sistema enzimático utilizado, existe uma diferenciação de proteínas. Em função disso, a análise conjunta de vários sistemas isoenzimáticos é recomendável por permitir verificar modificações que ocorrem no interior das sementes quando submetidas a algum tipo de tratamento que influenciam na sua qualidade.

#### 5 REFERÊNCIAS

- BRANDÃO-JUNIOR, D. S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, RS, v. 21, n.1, p. 114-121, 1999.
- CARVALHO, M.L.M., VIEIRA, M.G.G.C., PINHO, E.R.V. Técnicas moleculares em sementes. *Biociência*. **Ciência & Desenvolvimento**, v.17, p. 44-47, 2000.
- DEREN, C.W.; DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; MARTIN, F.G. Silicon concentration, disease response, and yield components of rice genotypes grown on flooded organic histosols. **Crop Science**, v. 34, p. 733-737, 1994.
- GOMES, F.B.; J.C. MORAES, C.D.; SANTOS, M.M. Goussain. Resistance induction in wheat plants by silicon and aphids. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 547-551, 2005.
- GOMES, F.B.; MORAES, J.C.; CUSTÓDIO, D.S.; ANTUNES, C.S. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n.2, p. 180-190, 2008.
- MALONE, G., ZIMMER, P.D., CASTRO, M.A.S. de, CARVALHO, I., MENEGHELLO, G.E., PESKE, S.T. Identificação do estágio adequado para realização de análises isoenzimáticas na caracterização de cultivares de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p. 193-200, 2006.
- MALONE, G.; ZIMMER P. D.; MENEGHELLO G. E.; CASTRO M. A. da S. de; PESKE, S. T. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n. 1, p.61-67, 2007.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic. 889p., 1995.
- RAMÍREZ, H., CALDERON, A., ROCCA, W. **Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal**. In: ROCCA, W.; MROGINSKI, L. (Ed). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y plicaciones. Cali: CIAT. p.825-856. 1991.
- SAVANT, N.K.; SNYDER, G.H.; DATNOFF, L.E. Silicon management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 58, p. 151-199, 1997.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v. 3, p.37-39, 1969.
- VIEIRA, E. H. N.; YOKOYAMA, M. Colheita, processamento e armazenamento. In: VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. p. 233-248, 2000.