

EFEITO DO TRATAMENTO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE MILHO SOBRE O PADRÃO ELETROFORÉTICO ISOENZIMÁTICO

DEUNER, Cristiane¹; **BOHN, Alberto¹**; CASTELLANOS, César Suárez¹;
CASTRO, Maria Alice da Silva de¹; MENEGHELLO, Géri Eduardo¹

¹Universidade Federal de Pelotas, PPG em Ciência e Tecnologia de Sementes-
albertobohn@hotmail.com, geriem@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As isoenzimas são produtos de expressão gênica e são altamente influenciadas pelo ambiente, pois os genes se manifestam em determinados estádios de desenvolvimento em órgãos específicos ou em resposta a determinados estímulos. Desta forma, a análise da atividade isoenzimática constitui-se em uma das técnicas de marcadores bioquímicos muito utilizados desde a década de 1960.

Entre os fatores ambientais que podem provocar variações no metabolismo celular estão a presença de micro-organismos (AGRIOS, 1988), os quais intrinsecamente causam alterações fisiológicas nas sementes com a integridade das membranas celulares, dependendo da variedade das enzimas e proteínas estruturais de cada espécie, que nem sempre podem ser avaliadas através de testes de germinação e vigor (VIEIRA, 1996). Entre outros fatores que podem influenciar os padrões isoenzimáticos pode ser destacado o uso de adubação e fertirrigação (SINGLETERY et al., 1990 apud CHAVES et al. 2011), bem como, o armazenamento ou tratamento de sementes.

A enzima esterase (EST) atua como solvente orgânico, catalisando a quebra e formação de ésteres, com ação restrita para ácidos graxos de cadeia curta solúveis em água (TREVISAN, 2007). A malato-desidrogenase (MDH) é utilizada na quebra de reservas ou biossíntese de tecidos novos envolvidos no processo de respiração celular. Já a peroxidase (PO) está presente nos tecidos das plantas e é responsável pelos processos fisiológicos, incluindo a oxidação de compostos fenólicos e a biossíntese do hormônio vegetal etileno e da lignina (ASADA, 1992).

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a expressão das isoenzimas citadas em plântulas de milho (*Zea mays L.*), provenientes de sementes tratadas com inseticidas e fungicidas, armazenadas por um ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Capão do Leão – RS, em instalações da Universidade Federal de Pelotas, Laboratório Didático de Análise de Sementes do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Foram usadas sementes de milho híbrido comercial, tratadas com os inseticidas K-Obiol[®] (1,4L 15 t⁻¹), Actellic[®] (1,4L 15 t⁻¹), Sumigran[®] (0,02L t⁻¹) e Thiametoxam[®] (0,12L 0,02 t⁻¹) e com o fungicida Maxim XL[®] (0,097L t⁻¹), estabelecendo-se cinco tratamentos pela combinação dos agroquímicos da seguinte forma: T1- Testemunha (ausência de tratamento), T2- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®], T3- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®] + Thiametoxam[®], T4- Thiametoxam[®] e T5- Sumigran[®]. Após o tratamento, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em dois ambientes, um sem

controle de temperatura e umidade e outro em câmara fria (temperatura média de 16°C e 65% de umidade). A atividade isoenzimática foi avaliada a partir da parte aérea e das raízes de plântulas de milho, oriundas de sementes colocadas para germinar durante sete dias, em dois momentos, logo após o tratamento das sementes e após 360 dias de armazenamento. Para cada uma das amostras, 200mg de tecido vegetal oriundo de dez plântulas coletadas aleatoriamente foram macerados sobre gelo e o extrato resultante foi centrifugado e suspenso em uma solução extratora composta por 9 partes de Tris – Citrato 0,2 N – pH: 8,3 (tris 6,2 g; ácido cítrico 1,6 g; água até completar 1 L), uma parte de Borato de Lítio 0,2 N – pH: 8,3 (Hidróxido de lítio 1,2 g; ácido bórico 11,89 g e água até completar 1 L) e 0,15% de 2-mercaptoetanol em proporção 1:2 p/v. A eletroforese foi feita em géis de poli-acrilamida aos 7% (acrilamida 3,325 g; bis-acrilamida 0,175 g; tampão do gel 50 mL; Temed 0,050 mL e persulfato de amônio 0,500 mL), aplicando-se 20 µL de cada amostra. Os padrões enzimáticos foram analisados pelo sistema de tampões, descrito por SCANDALIOS (1969). Os géis foram revelados, para os sistemas enzimáticos esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (PO), sendo a interpretação dos resultados baseada na análise qualitativa, considerando a ausência, presença e a intensidade das bandas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliando-se o perfil eletroforético da enzima (EST), observou-se que a intensidade das bandas foi mais forte nos tecidos das plântulas provenientes de sementes armazenadas por 360 dias comparativamente a imediatamente após o tratamento com fungicidas e inseticidas, o que indica que a atividade dessa enzima é maior em tecidos envelhecidos (Figura 1). Estes resultados concordam com os encontrados por SANTOS et al. (2005), que observaram um aumento na atividade da enzima (EST) em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) durante o armazenamento.

Alterações nos padrões da enzima (EST) evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para redução na germinação das sementes, pois esta é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídeos.

Também se pode observar, que antes do armazenamento das sementes, os Tratamentos 1 e 4 tem maior influência sobre a atividade da (EST) na raiz das plântulas, independentemente das condições de armazenamento. Igualmente, se observou que a atividade dessa enzima é maior nas raízes que na parte aérea de plântulas provenientes de sementes armazenadas por 360 dias, sem importar o tratamento e tipo de armazenamento.

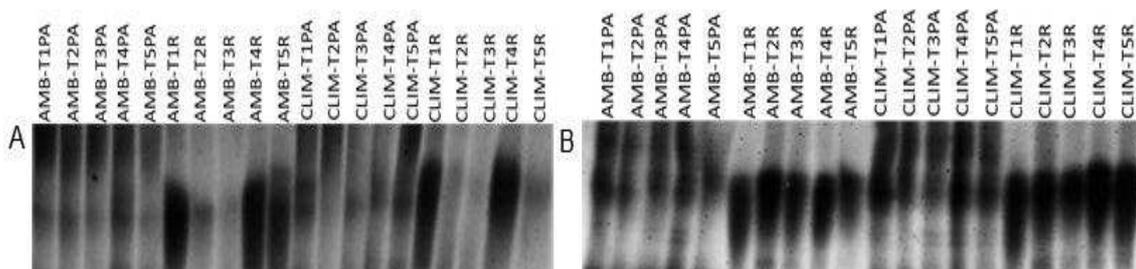


Figura 1. Padrão eletroforético da enzima esterase (EST). A) Plântulas provenientes de sementes de milho (*Zea mays* L.) antes do armazenamento, B) Plântulas provenientes de sementes de milho (*Zea mays* L.) armazenadas por 360 dias. AMB: Armazenamento em temperatura ambiente. CLIM: Armazenamento em câmara fria. PA: Parte aérea. R: Raiz. T1- Ausência de tratamento

(testemunha), T2- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®], T3- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®] + Thiametoxam[®], T4- Thiametoxam[®] e T5- Sumigran[®]. Capão do Leão, RS. 2012

Quanto ao perfil eletroforético da enzima (MDH), observou-se uma intensidade maior nas bandas das plântulas provenientes de sementes logo após o tratamento que nas armazenadas por 360 dias (Figura 2). No entanto, SPINOLA et al. (2000), verificaram que em sementes de milho tratadas com uma mistura de fungicida e inseticida e envelhecidas artificialmente por um período de até 120 horas, o perfil eletroforético dessa enzima não foi alterado. Também, SANTOS et al. (2005), encontraram em sementes de feijão armazenadas em condições não controladas, que a atividade da enzima (MDH) pode estar influenciada pelo vigor da semente, mostrando uma atividade constante em todo o período do armazenamento quando a semente tem alto vigor e decrescendo de forma linear quando a semente possui baixo vigor.

Também se observou que a atividade dessa enzima é maior na parte aérea da plântula que na raiz, independente do tipo de tratamento e condição de armazenamento.

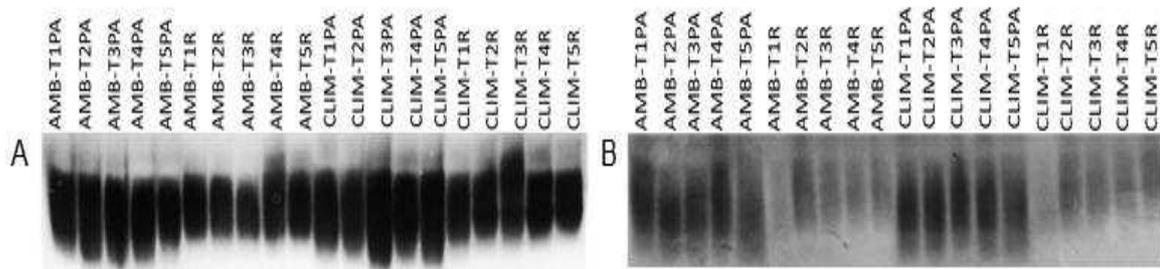


Figura 2. Padrão eletroforético da enzima malato-desidrogenase (MDH). A) Plântulas provenientes de sementes de milho (*Zea mays* L.) antes do armazenamento, B) Plântulas provenientes de sementes de milho (*Zea mays* L.) armazenadas por 360 dias. AMB: Armazenamento em temperatura ambiente. CLIM: Armazenamento em câmara fria. PA: Parte aérea. R: Raiz. T1- Testemunha (ausência de tratamento), T2- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®], T3- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®] + Thiametoxam[®], T4- Thiametoxam[®] e T5- Sumigran[®].

Observando o perfil eletroforético da enzima PO, observa-se que a atividade da enzima difere entre os tecidos da parte aérea e da raiz, no entanto, as condições e o período de armazenamento e os tratamentos não influenciaram seu padrão eletroforético (Figura 3). Porém, SPINOLA et al.(2000), reportam que em sementes de milho tratadas e envelhecidas artificialmente, a intensidade ou quantidade de bandas da enzima PO diminui quando aumenta o tempo de envelhecimento.

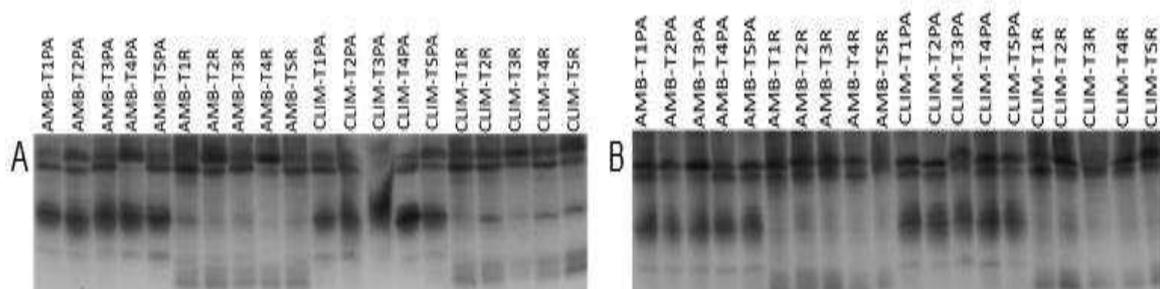


Figura 3. Padrão eletroforético da enzima peroxidase (PO). A) Plântulas provenientes de sementes de milho (*Zea mays* L.) antes do armazenamento, B) Plântulas provenientes de sementes de milho (*Zea mays* L.) armazenadas por 360 dias. AMB: Armazenamento em temperatura ambiente. CLIM: Armazenamento em câmara fria. PA: Parte aérea. R: Raiz. T1- Testemunha (ausência de

tratamento), T2- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®], T3- K-Obiol[®] + Actellic[®] + Maxim XL[®] + Thiametoxam[®], T4- Thiametoxam[®] e T5- Sumigran[®].

4. CONCLUSÕES

A atividade das enzimas (EST) e (MDH) em sementes de milho é influenciada pelo tempo do armazenamento.

O tratamento de sementes de milho com os agroquímicos usados neste experimento, não tem influência sobre a atividade das enzimas (EST), (MDH) e (PO).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, C.N. **Plant pathology**. 2.ed. New York: Academic, 1988. 703p.

ASADA. K.; **The Role of Ascorbate Peroxidase and Monodehydroascorbate Reductase in H₂O₂ Scavenging in Plants**. 1992 (pages 715-735).

CHAVES, A.R.C.S; DA ROSA, S.D.V.F; FREIRE, A.I.; DE MATOS D.P.; SANTOS, F.C; COELHO, L.F.; FREITAS, M.N.; PINTO R.S.R. Atividades das enzimas catalase e esterase em sementes de café produzidas sob diferentes tratamentos de fertirrigação. **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 22 a 25 de Agosto de 2011, Araxá – MG. Acessado em 02 de ago. 2012. Online. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/903870/1/Atividadesdasenzimascatalase.pdf>.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.104-114, 2005.

SCANDÁLIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v.3, n.1, p.37-79, 1969.

SPINOLA, M.C.M.; CÍCERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.263-270, 2000.

TREVISAN, C.H. avaliação da atividade esterase em fungos endofílicos. **XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. UNESP. São Paulo. Brasil. 2007.

VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 114f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras.