

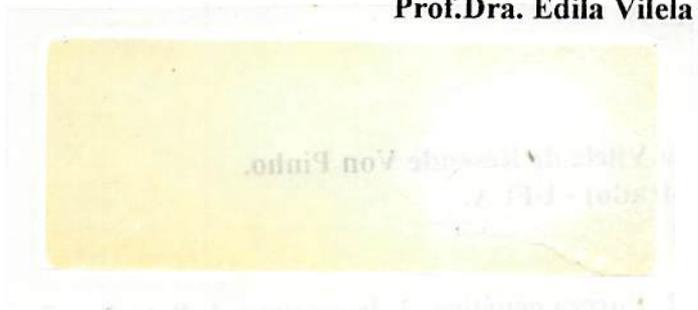
EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

**PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE ISOENZIMAS E PROTEÍNAS
DE SEMENTES E COLEOPTILOS DE MILHO EM ASSOCIAÇÃO
COM MICRORGANISMOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof.Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho



**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
1997**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da
Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleótilos de
milho em associação com microrganismos/Edvaldo Aparecido Amaral da Silva.
— Lavras: UFLA, 1997.
88p. il.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.
Dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Identificação. 2. Pureza genética. 3. Isoenzima. 4. Proteína. 5.
Microrganismo. 6. Milho - Semente. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

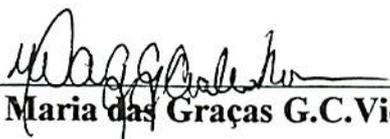
CDD-631.521
-633.1523

EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

**PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE ISOENZIMAS E PROTEÍNAS DE
SEMENTES E COLEOPTILOS DE MILHO EM ASSOCIAÇÃO COM
MICRORGANISMOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 15 de agosto de 1997.



Prof. Dr^a. Maria das Graças G.C. Vieira



Prof. Dr. José da Cruz Machado



**Prof. Dr^a Édila Vilela de Resende Von Pinho
(Orientadora)**

“Diz o mestre:

Se você está percorrendo o caminho de seus sonhos, comprometa-se com ele. Não deixe a porta de saída aberta, através da desculpa: “Ainda não é bem isto que eu queria.” Esta frase guarda dentro dela a semente da derrota.

Assuma o seu caminho. Mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba que pode fazer melhor o que está fazendo. Se você aceitar suas possibilidades no presente, com toda certeza vai melhorar no futuro.

Mas, se negar suas limitações, jamais se verá livre delas. Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros. E, sobretudo, não se deixe paralisar por sua própria crítica. Deus estará com você nas noites insones, e enxugará as lágrimas ocultas com Seu amor.

Deus é o Deus dos valentes”.

(Paulo Coelho)

Aos meus pais, Benedito e Dirce
pelo amor, apoio, incentivo e compreensão
durante toda a minha vida,

Aos meus irmãos Edméia, Eduardo, Alexandre
e Ana Carolina, que sempre estão torcendo por mim,
A minha cunhada Sandra e sobrinhos Gabriel e Gustavo,
Aos meus amigos.

OFEREÇO.

À Claudia, minha esposa,
pelo amor, incentivo e
otimismo, transmitidos
durante a realização deste
curso.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras(UFLA), pela oportunidade de ter acesso a uma boa formação e, em especial o Setor de Sementes do Departamento de Agricultura, pela oportunidade da realização deste curso de mestrado.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora e primeira orientadora Dr^a Maria Laene Moreira de Carvalho, pela paciência, ensinamentos e espírito de amizade transcorrido durante a realização deste trabalho.

À professora e orientadora Dr^a. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela orientação, paciência, disponibilidade, dedicação e amizade demonstrados.

Aos professores Dr^a. Maria das Graças Carvalho Vieira e Dr. José da Cruz Machado, pelas sugestões apresentadas e exemplo de dedicação à pesquisa científica.

Aos professores Dr. Daniel Furtado Ferreira e Antônio Nazareno Guimarães Mendes, pelas sugestões durante a análise estatística.

À Dulcinéia de Carvalho, Renata Silva-Mann e Delacyr da Silva Brandão Junior, pela ajuda, amizade e sugestões apresentadas na realização deste trabalho.

Ao estudante de iniciação científica, Lourenço e Kalinka, pela ajuda e amizade.

Aos amigos do curso de pós-graduação, João Almir, Parede, Renato, Denise, Mary Cleide, Reginaldo, Sebastião, João Custódio, Ademir, Gladyston, Aquiles, e outros, pela amizade e agradável convivência.

Aos amigos e funcionários, Andréia, Ana Lúcia, Elsa, Jairo, Claudine, Cleusa e Therezinha, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

À D. Lelela, ao Márcio, Gina e Deon Rodrigues, pelo respeito e apoio que sempre me deram.

Ao amigo João Geraldo Soares, pelo apoio e amizade demonstrados.

Ao amigo de república Rômulo, pelo apoio, incentivo, paciência, companheirismo e pelos momentos compartilhados.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, pelo atendimento, e correções das citações bibliográficas.

A todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE TABELAS(APÊNDICE).....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO GERAL.....	xiii
GENERAL ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Qualidade de sementes e pureza genética	4
2.2 Identificação de cultivares e certificação da pureza genética.....	5
2.3 Interferência de microrganismos associados às sementes.....	17
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO I – Padrões eletroforéticos de isoenzimas de sementes e coleoptilos de milho em associação com microrganismos.....	28
RESUMO	29
ABSTRACT.....	31
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1 Teste de germinação.....	36
2.2 Teste de tetrazólio.....	36
2.3 Qualidade sanitária das sementes.....	37
2.4 Extração das isoenzimas e análise eletroforética.....	38
2.5 Procedimentos estatísticos.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1 Padrão isoenzimático das sementes.....	40
3.2 Padrão isoenzimático dos coleoptilos.....	47
3.3 Qualidade sanitária.....	52
3.4 Qualidade fisiológica.....	55
3.4.1 Potencial de germinação.....	55
4 CONCLUSÕES.....	59
5 REFERENCIAL TEÓRICO.....	60

CAPÍTULO II – Padrões eletroforéticos de proteínas em sementes de milho em associação com microrganismos.....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
2.1 Teste de germinação.....	69
2.2 Teste de tetrazólio.....	69
2.3 Qualidade sanitária das sementes.....	70
2.4 Extração de zeína e análise eletroforética.....	71
2.5 Procedimentos estatísticos.....	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.1 Padrão eletroforético de zeína.....	73
3.2 Qualidade sanitária.....	75
3.3 Qualidade fisiológica.....	78
3.3.1 Potencial de germinação.....	78
4 CONCLUSÃO.....	81
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÊNDICE.....	88

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela		Página
1	Resultados médios (%) do potencial de germinação obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG, 1997.....	55
2	Resultados médios (%) de germinação em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG, 1997.....	56
3	Resultados médios (%) de vigor obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas para duas épocas-UFLA-MG,1997.....	57

Capítulo II

4	Resultados médios (%) do potencial de germinação obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG, 1997.....	78
5	Resultados médios (%) de germinação em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG, 1997.....	79
6	Resultados médios (%) de vigor obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas para duas épocas-UFLA-MG,1997.....	80

LISTA DE TABELAS(APÊNDICE)

Tabela		Página
1	Resumo da análise de variância para os resultados do teste de germinação, potencial de germinação e tetrazólio da cultivar C-805-UFLA-MG, 1997.....	90

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura		Página
1	<p>Zimogramas isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C-805, durante a primeira época, onde (T1) Testemunha, (A) <i>Aspergillus flavus</i>, (F) <i>Fusarium moniliforme</i>, (P) <i>Penicillium</i> spp, (I) Infectadas com <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Penicillium</i> spp, respectivamente (T) Tratada (T2) Não tratada, das isoenzimas ADH(álcool desidrogenase), MDH(malato desidrogenase), EST(esterase), ACP(fosfatase ácida), PO(peroxidase) e GOT(glutamato-oxalacetato transaminase).....</p>	45
2	<p>Zimogramas isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C-805, durante a segunda época, onde (T1) Testemunha, (A) <i>Aspergillus flavus</i>, (F) <i>Fusarium moniliforme</i>, (P) <i>Penicillium</i> spp, (I) Infectadas com <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Penicillium</i> spp, respectivamente (T) Tratada (T2) Não tratada, das isoenzimas ADH(álcool desidrogenase), MDH(malato desidrogenase), EST(esterase), ACP(fosfatase ácida), PO(peroxidase) e GOT(glutamato-oxalacetato transaminase).....</p>	46
3	<p>Zimogramas isoenzimáticos de coleótilos oriundos da cultivar C-805, durante a primeira época onde (T1) Testemunha, (A) <i>Aspergillus flavus</i>, (F) <i>Fusarium moniliforme</i>, (P) <i>Penicillium</i> spp, (I) Infectadas com <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Penicillium</i> spp, respectivamente (T) Tratada (T2) Não tratada, das isoenzimas ADH (álcool desidrogenase), MDH (malato desidrogenase), EST (esterase), ACP (fosfatase ácida), PO (peroxidase) e GOT(glutamato-oxalacetato transaminase).....</p>	50

- 4 Zimogramas isoenzimáticos de coleótilos oriundos da cultivar C-805, durante a segunda época onde (T1) Testemunha, (A) *Aspergillus flavus*, (F) *Fusarium moniliforme*, (P) *Penicillium* spp, (I) Infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, respectivamente (T) Tratada (T2) Não tratada, das isoenzimas ADH(álcool desidrogenase), MDH(malato desidrogenase), EST(esterase), ACP(fosfatase ácida), PO(peroxidase) e GOT(glutamato-oxalacetato transaminase).. 51
- 5 Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, após a infecção das sementes pelos respectivos fungos aos quinze e aos trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa..... 53
- 6 Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium* spp, obtidos de sementes não submetidas ao tratamento fungicida aos quinze e trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25% de umidade relativa..... 54
- 7 Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, obtidos de sementes tratadas com fungicidas aos quinze e trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C a 95% de umidade relativa..... 54

Capítulo II

- 8 Zimograma protéico de zeína de sementes de milho da cultivar C-805, durante a 1ª época e 2ª época respectivamente, onde (T1) Testemunha, (IA) Infectada com *Aspergillus flavus*, (T) Tratada, (T2) Não tratada, (IF) Infectada com *Fusarium moniliforme* e (IP) infectada com *Penicillium* spp..... 74

9	Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Penicillium</i> spp, após a infecção das sementes pelos respectivos fungos aos quinze e aos trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa.....	76
10	Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> spp, obtidos de sementes não submetidas ao tratamento fungicida aos quinze e trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25% de umidade relativa.....	77
11	Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Penicillium</i> spp, obtidos de sementes tratadas com fungicidas aos quinze e trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C a 95% de umidade relativa.....	77
12	Zimograma protéico de zeína de sementes de milho da cultivar C-805, durante a segunda época, de sementes da cultivar C-805, onde (T1) Testemunha, (IA) Infectada com <i>Aspergillus flavus</i> , (T) Tratada, (T2) Não tratada, (IF) Infectada com <i>Fusarium moniliforme</i> e (IP) Infectada com <i>Penicillium</i> spp.....	82

RESUMO GERAL

SILVA, Edvaldo Aparecido Amaral da. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleótilos de milho em associação com microrganismos.** Lavras:UFLA, 1997. 88p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia)*.

Este trabalho teve como objetivo, verificar a interferência de microrganismos, associados às sementes e coleótilos, nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de milho, os quais são utilizados na identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Para isso, parte das sementes de milho da cultivar C-805, foi infectada com isolados dos fungos, em separado, de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, parte tratada com os fungicidas Benomil® e Thiabendazol e parte não sofreu tratamento (T2). Em seguida as sementes foram acondicionadas em câmara BOD a 25° C e com 95% de umidade relativa, por um período de 30 dias. Amostras das sementes foram tomadas aos 15 dias (1ª época) e aos 30 dias (2ª época), para determinação da qualidade fisiológica, sanitária, análise eletroforética de proteína e dos sistemas isoenzimáticos de álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase.

Para a análise eletroforética foi utilizada uma testemunha (T1), que não permaneceu em câmara BOD para eliminar os possíveis efeitos de câmara. Para análise eletroforética de proteína foram extraídas a fração zeína das sementes com

* Orientadora Prof. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho. Membros da Banca: Prof. Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira e Prof. Dr. José da Cruz Machado.

tampão de extração (12 mM de borato de sódio, pH 10, 1% SDS e 2 β -Mercaptoetanol a 2%).

Para os sistemas isoenzimáticos de álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase as isoenzimas foram extraídas através do tampão (Tris-HCL 0,2 M pH 8,0).

Os resultados obtidos permitiram concluir que a infecção das sementes com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, promove alterações nos padrões eletroforéticos das isoenzimas malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase; a infecção das sementes com *Aspergillus flavus*, promove sensíveis diferenças nos padrões isoenzimáticos da álcool desidrogenase; os padrões isoenzimáticos de coleótilos obtidos de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*, são alterados quanto as isoenzimas fosfatase ácida, esterase, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase; os padrões isoenzimáticos de coleótilos obtidos de sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, são menos alterados em função da presença de microrganismos; os padrões protéicos de zeína não são alterados pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, quando associados às sementes.

GENERAL ABSTRACT

ELECTROPHORETIC PATTERNS OF ISOZYMES AND PROTEINS OF SEEDS AND COLEOPTILES FROM CORN ON ASSOCIATION WITH MICROORGANISMS.

The present work was carried out with the aim to verify the interference of microorganisms associated to the seeds and coleoptiles, in the electrophoretic patterns of protein and isozymes of corn, which are used in the identification of cultivars and certification of genetic purity. For this, seeds of the corn cultivar (C-805) were infected with the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp, treated with the fungicides Benomil® and Thiabendazol and nontreated (T2). The seeds were kept in chamber (BOD) to 25° C and 95% of humidity relative, for thirty days. For the evaluation of physiology, health quality, electrophoretic analysis of proteins and isozymatic systems of alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, esterase, acid phosphatase, peroxidase and glutamate-oxalacetate transaminase, were taken samples to fifteen days (1st time) and to thirty days (2nd time).

For electrophoresis analysis was used one witness (T1) that do not kept in chamber BOD, with aim to solve possible effect from chamber. For electrophoresis analysis the protein, was extracted of zein to the seeds with the buffers (12, mM of sodium borate, pH 10, 1% of SDS and 2-β Mercaptoethanol to 2%).

For the isozymatic systems the alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, esterase, acid phosphatase, peroxidase and glutamate-oxalacetate transaminase were extracted with the buffer (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0).

The results obtained allow to conclude that the infection of seeds with the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, promotes alterations in the isozymatic patterns of the isozymes malate desidrogenase, sterase, acid phosphatase, peroxidase and glutamate-oxilacethate transaminase; the infection of seeds by *Aspergillus flavus* promotes sensible alterations in the isozymatic patterns of alchool desidrogenase; the isozymatic patterns of coleoptiles from seeds infected by *Fusarium moniliforme* promotes alterations in the isozymatic patterns of acid phosphatase, sterase, peroxidase and glutamate-oxilacethate transaminase; the isozymatic patterns of coleoptiles obtained from seeds infected with *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp, are less affected due to the presence of those microorganisms; the proteic patterns from zein do not change for the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp, when associated with seeds.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da população mundial e a demanda por alimentos têm exigido a criação de cultivares mais produtivas, resistentes às moléstias e às condições adversas de solo. Cultivares com características específicas, resultantes de uma determinada combinação gênica, são desenvolvidas pelos melhoristas e requerem a manutenção de suas características para que possam expressar todo o seu potencial genético.

A qualidade de sementes é um fator a ser considerado em qualquer programa de produção agrícola, visto que as características agronômicas das cultivares obtidas pela pesquisa, chegam aos agricultores através da semente. Esta pode ser analisada sob os aspectos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos.

No Brasil, dentro dos programas de controle de qualidade das instituições produtoras de sementes, a identificação de cultivares e certificação da pureza genética têm sido realizadas, principalmente através de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e plantas nas fases de florescimento e maturação. Porém o emprego desses marcadores apresenta limitações como, exigência de acuidade visual dos laboratoristas, podendo ser de pouca precisão além de exigir muito tempo para a sua realização.

A certificação da pureza genética garante aos agricultores cultivares com as mesmas características desenvolvidas pelo melhorista e a utilização da técnica de identificação de cultivares pode garantir a proteção legal de todo trabalho voltado ao desenvolvimento de uma nova cultivar.

A utilização de uma legislação que reconheça a propriedade intelectual e estimule o investimento em pesquisas e o desenvolvimento de novas cultivares é imprescindível para o desenvolvimento do setor agrícola de um país.

No Brasil, através de lei 9456, de 28 de abril de 1997, foi instituída a lei de proteção de cultivares, que reconhece a propriedade intelectual, além de vários direitos ao titular do material genético protegido. Sem a adoção de uma metodologia de identificação segura, o produto desta pesquisa, oneroso em todos os aspectos, poderia ser imediatamente usufruído por terceiros sem que a instituição tivesse qualquer controle sobre este (Grattapaglia e Ferreira, 1996).

Para isso, a biotecnologia é uma ferramenta indispensável, por impor maior rapidez e confiabilidade na obtenção das diversas análises requeridas. Uma das aplicações da biotecnologia refere-se a identificação de cultivares e certificação da pureza genética.

Eletroforese de proteínas e isoenzimas podem ser utilizadas por proporcionarem maior precisão e rapidez, porém são pouco utilizadas na rotina em laboratórios de análises de sementes em nosso país.

A certificação da pureza genética de cultivares de milho, através de proteínas como as zeínas, se baseia nas observações dos perfis eletroforéticos obtidos das sementes. Já para isoenzimas, a identificação de cultivares e certificação da pureza genética, tem se baseado, principalmente, nas observações dos perfis isoenzimáticos dos coleótilos. Todavia, a utilização de sementes pode proporcionar maior rapidez na obtenção dos resultados das análises.

Um dos fatores que pode interferir nos resultados dos padrões de proteínas e isoenzimas é a presença de microrganismos associados às sementes, uma vez que estes podem provocar alterações no metabolismo celular, além de possuir seu próprio sistema enzimático e serem capazes de desencadear processos metabólicos em geral (Agrios, 1988).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar a interferência de microrganismos associados às sementes e coleótilos, nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de milho os quais são utilizados na identificação de cultivares e certificação da pureza genética.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Qualidade de sementes e pureza genética

Sabe-se que a qualidade da semente é de fundamental importância para o sucesso do cultivo de qualquer espécie vegetal, uma vez que a semente é responsável por grande parte do rendimento de uma cultura, além de representar um baixo custo em relação ao custo total da produção.

A qualidade de sementes envolve atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a capacidade da semente em originar plantas com alta produtividade.

Para que sejam produzidas sementes com alta qualidade há necessidade de um monitoramento em todas as fases de produção. O controle de qualidade consiste em uma série de funções e atividades cuja proposta é assegurar a qualidade através de padrões estabelecidos, proporcionando benefícios a todos os seguimentos (Andreoli, 1991).

Dentro do sistema de produção de sementes de milho, há preocupação por parte do setor produtivo, em manter as características que conferem qualidade ao produto final, como a pureza genética, que segundo Popinigis (1975), pode interferir na homogeneidade, no potencial de rendimento, na resistência às moléstias e aos insetos, na precocidade e na qualidade final do produto.

A manutenção da pureza genética proporciona o desempenho superior de uma cultivar em relação a sua uniformidade e potencial de produtividade (Tryon, 1995).

Sendo assim, a utilização de sementes geneticamente puras é um fator importantíssimo para o sucesso de culturas de interesse econômico com reflexos diretos na produtividade (Marcos Filho, Cícero e Silva, 1987).

Com a finalidade de manter esse patrimônio genético, são adotadas rigorosas medidas nos sistemas de produção sementes de milho, dos quais o isolamento dos campos de produção, retirada do pendão do parental feminino, limpeza das máquinas e equipamentos, são os mais conhecidos e aplicados.

No Brasil, a produção de sementes híbridas de milho, desenvolveu-se principalmente na região sul, favorecendo a ampliação do número e capacidade produtiva das companhias privadas produtoras de sementes (Von Pinho, 1995).

Segundo Carvalho e Nakagawa (1979), a presença de plantas indesejáveis pode descaracterizar uma cultivar, quanto ao seu patrimônio genético. Isso pode ser observado em um trabalho realizado por Von Pinho (1995), onde lotes de sementes híbridas de milho apresentando mistura com sementes provenientes do parental fêmea autofecundado, mostraram redução na qualidade fisiológica e produção de grãos.

2.2 Certificação da pureza genética e identificação de cultivares

A pureza genética é um dos requisitos para a comercialização de sementes. A presença de plantas “fora de tipo” geralmente resulta em efeitos negativos na produção e uniformidade. Sendo assim, companhias de sementes rotineiramente checam a pureza genética de suas sementes. O teste mais utilizado é o teste de grow-out, que envolve a semeadura de sementes representativas de lotes,

classificando-as, posteriormente, como sendo da cultivar em questão ou contaminante, com base no seu fenótipo (Arús, 1983).

Para a International Seed Testing Association (1996), as características para comparação de cultivares podem ser morfológicas, fisiológicas, citológicas e químicas.

As Regras para Análise de Sementes Brasil (1992), determinam que a verificação de espécies e cultivares pode ser realizada em sementes, plântulas ou plantas desenvolvidas em casa de vegetação, câmara de crescimento ou campo. Sendo as características comparadas de natureza morfológica, fisiológica, citológica, química e bioquímica. Porém, para a cultura do milho, dentro do sistema de produção de sementes, segundo Von Pinho(1995), no Brasil, não existem padrões de tolerância estabelecidos para impurezas genéticas provenientes do parental fêmea autofecundados, provavelmente devido a falta de adequação de metodologias para a identificação destas impurezas.

Payne (1987), afirma que um teste ideal para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética, deve produzir resultados facilmente reproduzíveis não apenas dentro de um laboratório, mas também, entre diferentes laboratórios, não deve ser tecnicamente complexo para treinamento de pessoal, deve ser rápido e de baixo custo.

A certificação da pureza genética, em cultivares de milho através das características morfológicas, pode ser realizada levando-se em consideração as cores do mesocótilo e das raízes, altura da planta, a ocorrência de perfilhos, a data de emissão do estilo-estigma, a cor da antera e partes do pendão, a cor do estilo-estigma, o grau de macho esterilidade, as características da palha da espiga, as características dos grãos e espigas na maturidade (Pauksens, 1975; Pauksens e Dhesi, 1978).

No teste de grow-out, baseado na análise visual das cultivares nos diferentes estádios de desenvolvimento, há necessidade de aguardar semanas e até meses para obtenção dos resultados finais, além de exigir grandes áreas para a sua condução (Cooke, 1984). O mesmo autor cita ainda, que o maior empecilho ao utilizar características morfológicas, deve-se à influência dos fatores ambientais e condições de solo que podem reduzir a precisão dos resultados.

Williams et al. (1993), afirmam que marcadores fenotípicos, tal como cor de flor ou formato da folha são fáceis de se identificar, mas em alguns casos a identificação torna-se difícil, pois esses marcadores são afetados pelo ambiente e controlados por genes modificadores.

* Técnicas eletroforéticas têm sido empregadas com sucesso na identificação de cultivares e certificação da pureza genética, por constituir um teste rápido além de demandar pouco espaço físico. Profissionais de companhias produtoras de sementes já instituíram que a eletroforese pode ajudá-los a economizar no custo de produção, realizar pesquisas e auxiliar nos testes de qualidade de seus produtos desde o campo até a embalagem final (Martinez, 1990).

Smith e Wych (1986), comparam os métodos de eletroforese em gel de amido e características morfológicas, para estimar a porcentagem de sementes provenientes do parental fêmea autofecundado em lotes de sementes híbridas de milho. Os autores concluíram que a técnica de eletroforese é consistentemente mais precisa quando comparada com a avaliação das características morfológicas, além de proporcionar resultados mais rápidos.

* A eletroforese de isoenzimas e proteínas pode ser utilizada, como marcadores na identificação de cultivares e certificação da pureza genética em milho, pois são produtos de expressão gênica, sendo que o controle genético de algumas isoenzimas está bem elucidado.

* O termo isoenzima foi primeiramente introduzido por Market e Moller (1959), para referir-se as múltiplas formas moleculares de uma enzima, com afinidade para substratos idênticos ou similares, que ocorrem em um organismo. Os mesmos autores demonstraram através da análise do padrão isoenzimático de LDH (lactato desidrogenase), em sete diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento em suíno, que as isoenzimas são específicas de tecidos, espécie e estágio de desenvolvimento.

Shaw (1969), citado por Scandalios (1974), classificou as isoenzimas em duas grandes categorias: aquelas que são moléculas distintamente diferentes e são produzidas baseadas em diferentes sítios genéticos e aquelas que resultam em alterações secundárias na estrutura de um polipeptídeo. No último caso ocorre ligação de um polipeptídeo individual de uma molécula de coenzima ou outros grupos prostéticos, através da deleção ou conjugação de moléculas com grupos reativos como amido, carboxil ou grupo hidroxil de um resíduo de aminoácido.

Segundo Goodman e Stuber (1980), várias isoenzimas foram estudadas em milho assim como os genes responsáveis pela expressão das mesmas. Dentre estas a fosfatase ácida, álcool desidrogenase, amilase, catalase, glutamato desidrogenase, glutamato-oxalacetato transaminase, desidrogenase do isocitrato, malato desidrogenase, enzima málica, peptidases, fosfoglicomutase, fosfoglicomutase desidrogenase e fofoexoisomerase. Estas isoenzimas podem ser aplicadas em programas de controle de qualidade na produção de sementes. Os mesmos autores afirmam, que a relativa facilidade de amostrar uma grande quantidade de isoenzimas, a precisão na identificação de genótipos e a estimativa da frequência gênica, são características que fazem as mesmas terem uma grande aplicação para a avaliação de populações de milho.

Em milho algumas isoenzimas tal como fosfatase ácida, álcool desidrogenase, α -amilase e β -amilase, catalase, esterase, malato desidrogenase e

peroxidase, apresentam variação na expressão de seus padrões com o desenvolvimento ou estágio metabólico (Scandalios, 1974).

Segundo McMillin (1983), o complexo padrão de expressão das enzimas pode ser controlado por locos regulatórios, sendo que a regulação pode ocorrer ao nível de transcrição, pós-transcrição e pós tradução.

† A álcool desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1), é uma enzima largamente distribuída entre os animais, plantas e microrganismos e que catalisa a reação $RCH_2OH + NAD \rightleftharpoons RCHO + NAD_2H$, presente no metabolismo fermentativo, quando há falta de oxigênio, na conversão de acetaldeído a etanol (Scandalios, 1974). Trata-se de uma enzima bem definida geneticamente, sendo codificada por 2 genes ligados, onde cada loco tem 2 alelos *Adh1f* e *Adh1s*; *Adh2f* e *Adh2s* (Scandalios, 1974).

Com a formação das sementes a ADH torna-se expressiva no escutelo no cariopse seco e também no processo inicial de germinação (Scandalios, 1974). É comum a ocorrência de duas formas diferentes de ADH chamadas de ADH1 e ADH2, sendo que a ADH1 não é encontrada no endosperma do grão maduro ou durante o processo de germinação (Scandalios, 1974). Segundo o mesmo autor, a ADH é a isoenzima mais comum nos vários estádios de desenvolvimento da planta de milho. Nos últimos estádios da germinação a atividade da ADH diminuí devido a presença de um inibidor gerado neste período (Scandalios, 1974). De acordo com Sachs (1980), a ADH está entre um pequeno grupo de polipeptídeo que é sintetizado em resposta às condições anaeróbicas. Não é claro o mecanismo que faz com que a ADH aumente em condições de anaerobiose, o que se sabe é que sobre essas condições, o ciclo de Krebs é bloqueado, levando ao acúmulo de piruvato. O excesso de piruvato é descarboxilado para acetaldeído o qual atua como substrato induzindo a ADH.

* A enzima malato desidrogenase (MDH-EC 1.1.1.37), está presente em uma variedade de plantas catalisando a reação $\text{MALATO} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{OXALACETATO} + \text{ADH}^+ + \text{H}^+$. Apresenta importantes funções fisiológicas dentro da célula, como enzima do ciclo de Krebs, além de atuar como papel central na maioria das rotas bioquímicas da célula. É também integrante da malato que transfere equivalentes reduzidos sobre as membranas das mitocôndrias, podendo participar da fixação de gás carbônico em plantas superiores.

Segundo Rocha e Ting (1970), a MDH exhibe poucas mudanças qualitativas durante o curso de desenvolvimento de um organismo. Essas isoenzimas são encontradas em associação a uma grande quantidade de organelas subcelulares apresentando diferenças na regulação da atividade em vários sítios (Scandalios, 1974). O total de MDH ativa tende a aumentar durante o estágio inicial de desenvolvimento da planta de milho, sendo que este aumento, é devido a síntese de novo e muito pouco a um mecanismo ativador (Scandalios, 1974).

MDHs específicas têm sido encontradas em associação com glioxissomas (gMDH) e mitocôndrias (mMDH). Em milho ocorre a MDH mitocôndrial sugerindo que essa isoenzima é sintetizada nos ribossomas do citoplasma e posteriormente incorporadas dentro da mitocôndria (Scandalios, 1974).

*As peroxidases (PO-EC 1.11.1.7), são enzimas que podem utilizar o peróxido de hidrogênio para oxidar uma grande quantidade de doadores de hidrogênio, tal como substâncias fenólicas, citocromo C, ácido ascórbico e certos ions inorgânicos (Sauders, Homes-Siedle e Stark, 1964). A peroxidase é uma homoproteína especializada no requerimento de peróxido de hidrogênio dos grupos álcoois combinando-os com peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água. As peroxidases são largamente distribuídas entre as plantas superiores com ocorrência numa variedade de tecidos (Scandalios, 1974) e também de ocorrência no reino animal. O termo peroxidase foi utilizado pela primeira vez no último século,

quando ela foi isolada de rábano silvestre Huystee (1987). Estudos de diferenciação celular têm mostrado que há uma relação paralela entre o aumento da atividade de peroxidase e o conteúdo de lignina formada nos traqueídeos. (Fukuda e Komamine, 1982). As peroxidases têm sido bastante estudadas, apesar de não se ter estudos geneticamente definidos (Scandalios 1974). Do ponto de vista genético existem alguns trabalhos em cevada e em milho. Em cevada o número de peroxidases detectadas alcançam de 8 a 12 dependendo do tecido e estágio de desenvolvimento. De 144 linhagens examinadas, 4 variações isoenzimáticas foram determinadas geneticamente, sendo que cada uma das variações é controlada por genes alélicos de 4 locos distintos (Felder, 1970). Em milho existem 10 zonas eletroforéticamente detectadas de peroxidase ativa, variando sua expressão nos tecidos durante todo o ciclo (Brewbaker e Hamill, 1972).

↳ Esterases (EST-EC 3.1.1.1), são um complexo e heterogêneo grupo de enzimas que hidrolizam ésteres de acordo com a reação: $R-COOR + HOH \rightleftharpoons R-COOH + ROH$. Schwartz (1960) relatou diferenças qualitativas de esterases em milho, trabalhando com α -naftil-acetato como substrato e com Fast blue RR como corante. O autor descreveu três locos distintos para esterase em milho (E1, E2 e E3) e seus trabalhos têm sido enfocados para estudos genéticos do loco E1. Schwartz (1960), mostrou que há 7 alelos no loco E1, sendo que cada alelo apresenta uma esterase com mobilidade eletroforética característica. Schwartz, Fuchsman e McGrath (1965), classificaram esses alelos como E^F , E^L , E^N , E^R , E^S , E^T e E^W , sendo que a maioria dos estudos genéticos tem sido feito usando os alelos E^F , E^N e E^S . Endo e Schwartz (1966), relataram que algumas esterases E1 estão presentes no endosperma do milho em formação, na plúmula e em baixa concentração na radícula das plântulas.

* Glutamato-oxalacetato transaminase (GOT-EC 2.6.1.1), também conhecida como aspartato aminotransferase, catalisa a reação específica de transferência de

um aminogruppo de um aminoácido ao ácido α cetoglutarato para formar o ácido glutâmico e produzir cetoácido (Conn e Stump, 1980). Esta enzima tem um papel importante no metabolismo de aminoácidos. Uma outra função, também atribuída a esta enzima, é na descarboxilação via enzima do ácido málico, na transformação de aspartato em ácido oxalacético e malato, durante a fixação do gás carbônico pelas plantas. Em milho, segundo Scandalios, Sorenson e Ott (1975), a GOT tem sido encontrada em todos os tecidos examinados. Stuber et al. (1988), relataram a ocorrência de três locos para a GOT: Got1, Got2 e Got3. Segundo Newton (1983), a Got 2 e Got 3, estão localizadas no braço menor do cromossoma cinco e a Got1, está localizada no cromossoma três do milho. O mesmo autor, relata que para a linhagem (W64A), algumas isoenzimas GOT foram observadas, sendo a Got 3 a de mais rápida migração, relacionada com as mitocôndrias, a Got 1 a mais lenta, relacionada com os glioxissomas e finalmente a Got 2, de migração intermediária, relacionada com os plastídeos, sendo bastante estimulada pela luz.

A fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2), participa nas reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídeos de membranas, provocando peroxidação destes lipídeos. Stuber et al. (1988), relataram a presença do loco Acp1, como o mais freqüente, além disso, os mesmos autores relataram a ocorrência de um loco Acp 4, de resolução pouco consistente nos géis e de ocorrência em algumas populações de milho. Hendrich-Sobrinho (1982), utilizou as isoenzimas álcool desidrogenase, catalase, peroxidase, esterase e fosfatase ácida, como marcadores genéticos na identificação de nove linhagens de milho; o autor observou que apenas quatro locos em esterase diferenciaram as nove linhagens.

Goodman e Stuber (1980), trabalharam com eletroforese em 13 isoenzimas em milhos exóticos, elite e selvagens dos Estados Unidos, com a finalidade de determinar o potencial das isoenzimas na caracterização de cultivares de milho. Os autores relataram a presença de 200 alelos para esses materiais, concluindo que

“fingerprints” isoenzimáticos obtidos, foram capazes de identificar 86% dos 342 materiais analisados. Tal trabalho demonstrou variabilidade suficiente para a utilização de isoenzimas na identificação de cultivares de milho.

Cardy e Kannerberg (1982), encontraram o mesmo potencial das isoenzimas para identificação de cultivares em 110 linhagens e 155 híbridos comerciais, envolvendo 12 enzimas e 22 locos. Alguns alelos, ocorreram em baixa frequência, apesar de terem se apresentado com “fingerprints” únicos, sendo responsáveis pela identificação de 80% das linhagens e 94% dos híbridos.

Para a certificação da pureza genética Arús (1983), afirma que a utilização de cinquenta sementes de cada parental e do F_1 , é suficiente para estimar com 95% de confiança a proporção de impurezas genética de materiais, até mesmo para locos que estejam segregando. Segundo o mesmo autor, a aplicação desta técnica possibilita a detecção de alguns contaminantes em lotes de sementes tais como: sibs, colheita do parental macho e a presença de pólen estranho no campo de produção de sementes.

Orman et al. (1991), utilizaram a metodologia proposta por Stuber et al. (1988), para verificar a precisão e reprodutibilidade de observações morfológicas e análise isoenzimática na detecção de contaminações genéticas em linhagens de milho em três diferentes laboratórios e três áreas de plantio. Tal estudo demonstrou que as isoenzimas, fosfatase ácida, álcool desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, fosfoglucomutase e fosfohexoisomerase, são uma ferramenta adequada para determinar a pureza genética de cultivares de milho e que deveriam ser utilizadas em conjunto com as características morfológicas.

Contudo, Falkenhagen (1985), afirma que uma desvantagem das isoenzimas, como marcadores moleculares, é que podem ser afetadas pelas condições ambientais e pelos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Além disso, o

número de locos de isoenzimas, que pode ser analisado, é limitado e nem sempre, portanto, é possível, a diferenciação dos genótipos (Adams e Joly, 1980; Eckert, Joly e Neale, 1981). Schimke e Doyle (1970), citados por Scandalios (1974), afirmam que a modificação das proteínas, em organismos superiores, é um processo contínuo e geral, onde diferentes microrganismos, concentrações das enzimas e flutuações isoenzimáticas, podem controlar qualquer taxa constante de síntese ou de degradação.

↳ De acordo com Pinto, Sader e Lemos (1995), alguns fatores afetam o metabolismo das plantas, dentre eles as doenças, que influenciam a atividade das isoenzimas, especialmente as esterases, peroxidases, fosfatases e fenolases, causando o aparecimento de padrões ou atividades diferentes. Segundo Vieira (1996), determinadas isoenzimas apresentam modificações em seus padrões eletroforéticos em função da associação fungo/semente.

↳ Em algodão, determinadas isoenzimas, tais como fosfatase ácida, catecol oxidase, hexoquinase, enzima málica e esterase podem ter os resultados de seus zimogramas alterados em função da presença de microrganismos, devendo, portanto, serem evitadas em programas de identificação de cultivares (Vieira, 1996). Segundo o mesmo autor, as isoenzimas glutamato desidrogenase e glutamato-oxalacetato transaminase mantiveram seus padrões inalterados, podendo ser mais indicadas em programas de identificação de cultivares.

Para Cherry (1983), a presença de microrganismos nas sementes pode causar diminuição da intensidade de algumas proteínas, intensificação de outras e a produção de múltiplas formas moleculares.

A diminuição da intensidade, intensificação e ocorrência de novas formas moleculares para esterase, peroxidase, leucina aminotransferase oxidase e catalase foram observadas em sementes associadas com microrganismos (Cherry, Mayne e Ory, 1974).

*Para Brandão Junior (1996), o uso de marcadores bioquímicos, tais como isoenzimas, permite avaliar sensíveis modificações ocasionadas pela ação de microrganismos, quanto em associação com sementes, durante o processo de deterioração/Segundo Goodmam, Zoltán e Wood (1985), em plantas infectadas por fungos a quantidade de proteínas e nitrogênio, do complexo fungo hospedeiro, geralmente aumentam durante os estádios iniciais da doença. Este aumento pode ser devido a presença do patógeno ou à síntese de novas proteínas pelo hospedeiro. A síntese de proteínas tanto pelo patógeno como pelo hospedeiro tem sido observada. A síntese de algumas proteínas assim como a degradação de outras é estimulada, ocorrendo influência nas reações enzimáticas pelas mudanças na concentração de ativadores, inibidores, coenzimas e substratos. As alterações podem ser semelhantes àquelas que ocorrem devido às injúrias mecânicas ou senescência tais como: aumento na taxa de respiração e atividade de citocromo oxidase, glicose-6-P-desidrogenase, invertase, peroxidase, polifenoxidase, oxidase ascórbica, aumento na atividade de ribonucleases e aumento no número e atividade da mitocôndria. Os mesmos autores, observaram ainda, que todos esses processos são também característicos de tecidos feridos e são conectados com a ativação de síntese de RNA, sendo que as mudanças, que ocorrem nas proteínas, têm um significado biológico de reparar as injúrias que ocorrem nas células.

Também as proteínas presentes no endosperma de sementes de milho, têm sido utilizadas como marcadores na identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Estas podem ser divididas em duas frações distintas: as zeínas, proteínas do grupo das prolaminas, caracterizadas pelo seu teor reduzido de lisina e triptofano (Doll, 1984) e as não zeínas que englobam as albuminas, globulinas e glutelinas, que possuem atividade enzimática e são nutricionalmente, mais balanceadas que as zeínas (Wallace et al., 1990).

A utilização de focalização isoeletrica (IEF) de proteínas solúveis do endosperma, como a zeína, pode também ser utilizada na diferenciação de linhagens e híbridos (Wilson, 1984) e (Brink et al. 1989), bem como na determinação da pureza genética de lotes de sementes (Salamini e Soave, 1979); (ISTA, 1996).

Dentre as vantagens de sua utilização Brink et al. (1989), citam que durante o desenvolvimento das sementes de milho ocorre o acúmulo pronunciado de proteínas de reservas (zeínas), iniciando por volta de quinze dias após a polinização. Os autores ainda ressaltam, que o seu padrão não muda com o desenvolvimento e maturação da planta. Para Righeti e Bossio (1981), o padrão de zeína não é afetado pelos fatores ambientais, pois a presença das zeínas, estão mais diretamente relacionada com as informações genéticas contidas nas células das plantas.

Com base no padrão eletroforético das zeínas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), as mesmas podem ser divididas em quatro grupos: alfa-zeína de 19 e 22 kD, gama-zeína de 16 e 27 kD, beta-zeína de 14 kD e delta zeína de 10 kD Essen (1986), citado por (Guimarães, 1994).

Guimarães (1994), utilizou gel de poliacrilamida contendo SDS, para caracterização de populações indígenas de milho que apresentavam grãos opacos. Segundo o mesmo autor, o nível de não-zeínas no endosperma apresentou uma alta correlação com a qualidade proteica, podendo ser utilizado como mais um parâmetro na seleção de milhos com alta qualidade protéica, em programas de melhoramento. Brink et al. (1989), utilizaram focalização isoeletrica de zeína para a determinação da pureza genética de cultivares comerciais de milho. Os autores concluíram que as zeínas são mais eficientes que as isoenzimas na certificação da pureza genética de cultivares. Os autores observaram ainda, que a focalização isoeletrica de zeína serve de auxílio para a eletroforese de isoenzimas na

certificação da pureza genética de cultivares, quanto ocorre dificuldade de interpretação dos resultados através dos perfis eletroforéticos de isoenzimas.

Segundo Cooke (1994), os profissionais da International Seed Testing Association, vêm trabalhando desde 1978, com técnicas eletroforéticas, com o objetivo de encontrar padrões para a certificação da pureza genética. Atualmente já existem padrões para trigo, cevada, ervilha e centeio através de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio), para milho através de focalização isoelétrica. O grupo tem trabalhado na identificação de ervilha utilizando SDS PAGE ou IEF e avaliação computadorizada dos géis e tem sugerido métodos para a determinação da pureza de híbridos de algodão.

2.3 Interferência de microrganismos associados às sementes

Os efeitos dos microrganismos em sementes ao nível bioquímico e molecular é pouco elucidado, no entanto, existem fungos capazes de invadir as sementes durante seu desenvolvimento ou após a maturação. Quando a infecção é acentuada chega a injuriar a semente, podendo causar descoloração, enrugamento e redução na qualidade fisiológica, bem como, alterações nos perfis eletroforéticos de proteínas e isoenzimas.

Segundo Christensen (1973), existem duas categorias de fungos que são associados às sementes: fungos de campo e fungos de armazenamento. Os fungos de campo têm potencial para invadir as sementes na planta mãe e são principalmente representantes do gênero *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* e *Fusarium*; esses fungos geralmente finalizam suas atividades durante o armazenamento. Os fungos de armazenamento, os quais incluem diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, podem tolerar baixo grau de umidade e desenvolvem-se, portanto, em sementes armazenadas.

Lucca Filho (1987), afirma que um dos meios mais eficientes de disseminação de doenças é a semente, considerando que através das sementes os patógenos podem ser transportados e introduzidos em novas áreas.

De acordo com Agrios (1988), a maioria dos patógenos vive em associação ou dentro de protoplastos celulares. Esses patógenos obtém nutrientes do protoplasto, como açúcares e aminoácidos, que são moléculas pequenas, sendo absorvidas diretamente; outros constituintes celulares, como proteínas e ácidos graxos podem ser utilizados apenas após a degradação por enzimas secretadas pelo patógeno.

Os principais danos causados por fungo de campo e armazenamento são o decréscimo na germinação, descoloração de parte ou de todo o grão, aquecimento e mofo, transformações bioquímicas, produção de toxinas, modificações celulares e outros (Wetzel, 1987).

Fusarium moniliforme, pode sobreviver no interior das sementes de milho causando podridões e morte das plântulas. Os sintomas observados são a podridão de sementes devido a destruição do embrião antes da ocorrência da germinação, como também a morte das plântulas antes ou após a emergência (Balmer, 1978).

Cordeiro, Raventos e Segundo (1992), observaram o acúmulo de dois grandes grupos de proteínas chamadas de PR proteínas (pathogenesis-related proteins), em resposta a infecção de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho.

Na mesma linha de pesquisa, Raventos, Cordeiro e Segundo (1994), observaram a síntese de PR proteínas de peso molecular de 23 e 24 kD em embriões de milho germinando, infectados com *Fusarium moniliforme*, bem como, o acúmulo dessas proteínas nos tecidos do embrião infectado.

Doehlert; Knutson e Vesper (1994), estudaram a presença de Fumonisin B1, toxina produzida por *Fusarium moniliforme*, durante a germinação de sementes de milho. Os autores observaram que houve uma inibição da elongação da radícula

e na produção de amilase, concluindo que a presença dessa toxina pode provocar efeitos deletéricos na emergência das plântulas.

Os chamados fungos de armazenamento podem causar grandes prejuízos à qualidade de sementes armazenadas Christensen e Lopez (1963), estes compreendem principalmente espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Esporos e micélios destes fungos, normalmente já estão presentes na superfície das sementes, quando estas são colocadas para germinar (Popinigis, 1977). Sendo assim, as condições de armazenamento exercem grande influência no desenvolvimento destes fungos. *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, são adaptados a ambientes com baixa umidade, podendo se desenvolver em materiais cujo conteúdo de umidade estejam em equilíbrio com a umidade relativa de 65-90%. Em condições de 90 a 95% de umidade relativa e 25°C, Mycock, Lloyd e Berjak (1988) demonstraram microscopicamente que *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, foi capaz de invadir o cariopse do milho através de lesões no funículo, penetrando pela região do escutelo após três semanas e após um mês de armazenamento o eixo embrionário foi totalmente invadido. Hifas desse fungo invadiram os tecidos internos de plântulas em germinação através de lesões nos estômatos. (Mycock, Rijkenberg e Berjak, 1990); estes autores também demonstraram que *Aspergillus flavus*, var. *columnaris*, persiste nas plantas jovens de milho por um período de 6 semanas.

Apesar das espécies de *Aspergillus*, serem associadas ao armazenamento de sementes e geralmente consideradas saprófitas, várias investigações têm sugerido que certas espécies são hábeis para invadir e infectar plantas em crescimento, como *Aspergillus flavus*, em algodão (Klich, Lee e Huizar, 1986) e *Aspergillus parasiticus* em plantas de amendoim (Cole, Blankenship e Sanders, 1986). Os referidos fungos causam enfraquecimento, morte, descoloração do embrião e das sementes, bolor, aquecimento e apodrecimento total (Dhingra, 1985).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS W.T; JOLY R.J. Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization. **Silvae Genetics**, Frankfurt, v. 29, p.1-4, 1980.
- AGRIOS,C.N. **Plant pathology**. 2. ed. New York: Academic, 1988. 703p.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e florestais**. Viçosa:UFV, 1991. 242p.
- ANDREOLI, C. Controle da qualidade da semente-conceito e estratégia. **Informativo Abrates**, Brasília, v.1, n.3, p.54-56, 1991.
- ARÚS, P. Genetic purity of commercial seeds lots. In:TANKSLEY, S. D; ORTON, T.J. **Isoenzymes in plant genetics and breeding (Part A)** Amsterdam: Elsevier 1983. p.415-423.
- BALMER, E. Doenças do milho. In: PATERNIANI E; VIEGAS G.P. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1978. p.450-504.
- BRANDÃO JUNIOR, D.E. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. Lavras: UFLA, 1996.110p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**.Brasília: DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial**. (da República Federativa do Brasil), Brasília, n.79, p.8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.

- BREWBAKER, J.L; HAMILL, D.E. **Mayze Genetics Newsletter**. Bloomington, v.44, p. 48-49, 1972.
- BRINK D.E; PRICE, S.C; NGUYEN, H; FUERST, G; MARTINEZ, C. Genetic purity assessment of commercial single cross maize hybrids: Isoelectric focusing of zeins. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.17, p.91-98, 1989.
- CARDY, B.J; KANNENBERG L.W. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification. **Crop Science**, Madison, v. 22, p. 1016-1020, Sept./Oct. 1982.
- CARVALHO, N.M; NAKAGAWA J. **Semente: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1979. 424p.
- CHERRY, J.P. Protein degradation during seed deterioration. **Phytopathology**, Sant Paul, v.73, n. 2, p.317-321, Feb. 1983.
- CHERRY, J.P; MAYNE, R.Y; ORY, R.L. Proteins and enzymes from seeds of *Arachis hypogae* L. IX. Electrophoretically detected changes in 15 peanuts cultivars grown in different areas after inoculation with *Aspergillus parasiticus*. **Physiology Plant Pathology**, Londres, v.4, p. 425-434, 1974.
- CHRISTENSEN, C.M. Loss of viability in storage: microflora. **Seed Science Technology**, Zurich, v.1, p.547-562, 1973.
- CHRISTENSEN, C.M; LOPEZ, L.C. Pathology of stored seeds. **Proceeding Intenational Seed Testing Association**, Wageningen, v.28, n. 4, p. 701-711, 1963.
- COLE, R.J; HILL, R.A; BLANKENSHIP, P.D; SANDERS, T.H. Color mutants of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a study of preharvest invasion of peanuts. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.52, p.1128-1131, 1986.
- CONN, E.C; STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: E. Blicher, 1980. 415p.
- COOKE, R.J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 5, p. 59-72, 1984.

- COOKE, R.J. The work of the ISTA biochemical working group. In: TECHNOLOGICAL ADVANCES IN VARIETY AND SEED RESEARCH, Wageningen, 1994. **Anais ...Wageningen:ISTA/ISHS**, 1994. p. 16-17.
- CORDEIRO, M.J; RAVENTOS, D; SEGUNDO, B.S. Induction of PR proteins in germinating maize seeds infected with the fungus *Fusarium moniliforme*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 41, n. 3, p. 189-200, 1992.
- DHINGRA, O.D. Prejuizos causados por microrganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 139-145, 1985.
- DOEHLERT, D. C; KNUTSON C.A; VESONDER, R.F. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. **Mycopathologia**, Dodrech, v.127, n. 2, p 117-121, 1994.
- DOLL, H. Nutritional aspects of cereal proteins and approaches to overcome their deficiencies. **Philosophical Transactions Royal Society**. London v. 304, p.373-380, 1984.
- ECKERT R, T; JOLY R.T; NEALE D.B. Genetics of isozyme variants and linkage relationships among allozyme loci in 35 eastern white pine clone. **Canadian Journal Forest Research**. Ottawa, v.11, p. 573-579, 1981.
- ENDO, T; SCHWARTZ, D. Tissue specific variations in the urea sensitivity of the E1, esterase im mayze. **Genetics**, Princeton, v.54, p.233-238, 1966.
- FALKENNHAGEN, E.R. Isoenzyme studies in provenance research of forest trees. **Theoretical and Applied Genetics**, Springer-Verlag, v.69, p.335-347, 1985.
- FELDER, M.R. **A comparative genetic, developmental, and biochemical study of peroxidases in barley**. Davis: Universidade da California, 1970. 143p. (Tese-PhD)
- FUKUDA, H; KOMAMINE, A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element from the mesophyll of *Zinnia elegans*. **Planta**, Berlin, v.155, p.423-430, 1982.

- GOODMAM, R.N; ZOLTÁN K; WOOD K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri, 1985. 433p.
- GOODMAN, M.M; STUBER C.W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 35, 1980. **Proceedings...** [S.l.]: American Seed Trade Association, 1980. P.10-31.
- GRATAPAGLIA, D; FERREIRA, M.E. Proteção de cultivares por análise de DNA. **Anuário ABRASEM**, Brasília, p. 44-50, 1996.
- GUIMARÃES C.T. **Caracterização de populações indígenas de milho (*Zea mays* L.) que apresentam grãos opacos**. Viçosa: UFV, 1994. 69p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos na Identificação de nove linhagens de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17 n. 2, p. 281-286, Feb. 1982.
- HUYSTEE van, R.B. Some molecular aspects of plant peroxidase byosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 205-219, 1987.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 44p.
- KLICH, M.A; LEE, L.S; HUIZAR, H.E. The occurrence of *Aspergillus flavus* in the vegetative tissue of cotton plants and its relation to seed infection. **Mycopathologia**, Dordrech, v. 95, p.171-174, 1986.
- LUCCA FILHO, O. A. Teste de sanidade de sementes de milho. In: WETZEL M.M.V.S; SOAVE J. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 430-440.
- MARCOS FILHO, F; CICERO, S.M; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.
- MARKERT, C.L; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes; tissue; antogenetic, and species specific patters. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, Washington, v. 45, p.453-463, 1959.

- MARTINEZ; C. Using electrophoresis to test purity during the cleaning process may save money and time. **Seed World**, Illinois, v. 128, p. 8-10, Dec. 1990.
- MCMILLIN, D.E. Plant isoenzymes: a historical perspective. In: TANKSLEY, S.D; ORTON, T.J. **Isoenzymes in Plant Genetics and Breeding-Part A**. Amsterdam: Elsevier 1983. p.3-13.
- MYCOCK, H.L; LLOYD H.L; BERJAK, P. Mycopylar infection of post-harvest caryopses of *Zea mays* by *Aspergillus flavus* var. *columnaris* var. nov. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, p. 647-653, 1988.
- MYCOCK, D.J; RIJKENBERG, F.H.J; BERJAK, P. Infection of maize seedlings by *Aspergillus flavus* var. *columnaris* var. nov. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, p. 683-701, 1990.
- NEWTON, J.K. Genetics of mitochondrial isoenzymes. In: TANKSLEY, S.D; ORTON, T.J. **Isoenzymes in Plant Genetics and Breeding (Part A)**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 157-174.
- ORMAN, B.A; LAWRENCE, G.D; DOWNES, P.M; PHILLIPS, D.S; RIPBERGER, C. J. Assessment of maize inbred genetic purity by isozyme electrophoresis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.19, p.527-535, 1991.
- PAUKSENS, J. Methods for determination of cultivar trueness and purity in maize. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 3, p. 176-181, 1975.
- PAUKSENS J. Determination of cultivars. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.6, p. 579-583, 1978.
- PAYNE, R.C. Seed and cultivar identification. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 15, p. 641-644, 1987.
- PINTO, L.R; SADER, R; LEMOS, E.G.M. Variações nos perfis eletroforéticos de isoenzimas: aplicação na identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n.1, p. 52-56, 1995.
- POPINIGS, F. Aspectos da qualidade de sementes. In: CENTRO DE TREINAMENTO DO SUL. **Curso para técnicos reponsáveis por lavouras de produção de sementes**. Pelotas, 1975. v. 2, p. 354-370.

- POPINIGIS, F. Preservação da qualidade fisiológica durante o armazenamento. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE ARMAZENAGEM, 2, Brasília, 1977. **Anais...** Brasília: Agiplan, p.151-171.
- RAVENTOS, D; CORDEIRO, M.J; SEGUNDO, B.S. Fungal-induced synthesis of pathogenesis-related proteins in germinating maize embryos. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Londres, v.45, n. 5, p.349-358, 1994.
- RIGHETTI, P.G; BOSSIO A. B. Applications of isoelectric focusing to the analysis of plant and food proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v.2, p. 65-75, 1981.
- ROCHA, V; TING, I.P. Tissue distribution of microbody, mitochondrial and soluble malate dehydrogenase isoenzymes. **Plant Physiology**, Maryland, v. 46, p.754-756, June 1970.
- SACHS, M.M; FREELING, M; OKINOTO, R. The anaerobic protein of maize. **Cell**, Cambridge, v. 20, p. 761-767, 1980.
- SALAMINI, M.M; SOAVE; R.R. Evaluation of genetic purity in hybrid corn (*Zea mays* L.) seed production through zein isoelectrophoretic patterns. **Maydica**, Bergamo, v. 24, p. 223-233, Sept. 1979.
- SAUDERS, B.C; HOMES-SIEDLE, A.G; STARK, B.P. **Peroxidase**: the properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. London: Butterworths, 1964. 271p.
- SCANDALIOS, J.G. Isoenzymes in development and differentiation. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.225-258, 1974.
- SCANDALIOS, J.G; SORENSON, J.C; OTT, L.A. Genetic control and intracellular localization of glutamate oxalacetic transaminase in maize. **Biochemical Genetics**, New York, v.13,p.759-769, 1975.
- SCHWARTZ, D. Genetic studies on mutant enzymes in maize: synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v.46, p.1210-1216, 1960.
- SCHWARTZ, D; FUCHSMAN, L; MCGRATH, K.H. Allelic isozyme of the pH 7,5 esterase in maize. **Genetics**, Princeton, v. 52, p. 1265-1269, 1965.

- SMITH, J.S.C; WYCH, R.D. The identification of female selfs in hibrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, p.1-8, July 1986.
- STEEL, R.G.D; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statiscs – a biochemical aproach**.2.ed. New York: McGraw-Hill, 1990.633p.
- STUBER, C.W; WENDEL, J.F; GODMAN, M.M; SMITH, J.S.C. **Techniques and scoring procedures for starch gel eletrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.)**. Raleigh: North Caroline State University, 1988. 87p. (Techinal Bulletin, 286).
- TAIZ, L; ZEIGER, E. **Plant physiology**: Redwood: The Benjamin/Comings, 1991. 565p.
- TRYON, T. Assuring genetic purity. **Seed World**, Illinois, v. 133, n.9, p. 18-19, Aug. 1995.
- 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.)**. Lavras: UFLA, 1996. 114p.(Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- VON-PINHO, E.V.R. **Conseqüências da autofecundação indesejável na produção de sementes híbridas de milho**. Piracicaba: ESALQ, 1995. 130p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- WALLACE, J.C; LOPES, M.A; PAIVA, E; LARKINS, B.A. New method for extration and quantification of zeins reveal a high content of gamma-zein in modified opaque-2 maize. **Plant Physiology**. Maryland, v. 92, p. 191-196, 1990.
- WETZEL, M.M.V.S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J. WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.260-274.
- WILLIAMS, J.G.K; REITER, R.S; YOUNG, R.M; SCOLNIK, P.A. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, n. 11, p. 2697-2702, Apr. 1993.

WILSON, C.M. Isoelectric focusing of zein in agarose. **Cereal Chemistry**, Sant Joseph v.16, p. 198-200, 1984.

4 CAPÍTULO I

**Padrões eletroforéticos de isoenzimas de sementes e coleótilos de milho
em associação com microrganismos.**

RESUMO

Padrões eletroforéticos de isoenzimas de sementes e coleótilos de milho em associação com microrganismos.

Este trabalho teve como objetivo, verificar a interferência de microrganismos, associados às sementes e coleótilos de milho, nos padrões eletroforéticos de isoenzimas, os quais são utilizados na identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Para isso, parte das sementes de milho da cultivar C-805, foi infectada com isolados dos fungos, em separado, de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, parte tratada com os fungicidas Benomil® e Thiabendazol e parte não sofreu tratamento (T2). Em seguida as sementes foram acondicionadas em câmara BOD a 25° C e a 95% de umidade relativa, por um período de 30 dias. Amostras das sementes foram tomadas aos 15 (1ª época) e aos 30 dias (2ª época), para determinação da qualidade fisiológica, sanitária e dos sistemas isoenzimáticos de álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase.

Para a análise eletroforética foi utilizada uma testemunha (T1), que não permaneceu em câmara BOD, para eliminar os possíveis efeitos de câmara. Para os sistemas isoenzimáticos de álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase as isoenzimas foram extraídas através do tampão (Tris-HCL 0,2 M pH 8,0).

Os resultados obtidos permitiram concluir que a infecção das sementes com os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, promove alterações nos padrões eletroforéticos das isoenzimas malato desidrogenase,

esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase; a infecção das sementes com *Aspergillus flavus* promove sensíveis diferenças nos padrões isoenzimáticos da álcool desidrogenase; os padrões isoenzimáticos de coleótilos obtidos de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*, são alterados quanto as isoenzimas fosfatase ácida, esterase, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase; os padrões isoenzimáticos de coleótilos obtidos de sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, são menos alterados em função da presença de microrganismos.

ABSTRACT

Eletroforetic patterns of isozymes of seeds and coleoptiles from corn on association with microorganisms.

The present work was carried out with the aim to verify the interference of microorganisms associated to the seeds and coleoptiles, in the electrophoretic patterns of isozymes of corn, which are used in the identification of cultivars and certification of genetic purity. For this, seeds of the corn cultivar (C-805) were infected with the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp, treated with the fungicides Benomil® and Thiabendazol and nontreated (T2). The seeds was kept in chamber (BOD) to 25^o C and 95% of humidits relative, for thirty days. For the evaluation of physiology, health quality and of isozymatic systems of alchool desidrogenase, malate desidrogenase, sterase, acid phosphatase, peroxidase and glutamate-oxilacethate transaminase, was taken samples to fifteen days (1st time) and to thirty days (2nd time).

For electrophoresis analysis was used one witness (T1), that do not kept in chamber BOD, with aim to solve possibles effect from chamber. For the isozymatic systems the alchool desidrogenase, malate desidrogenase, sterase, acid phosphatase, peroxidase and glutamate-oxilacethate transaminase were extrated with the buffer (Tris-HCl 0,2M pH 8,0).

The results obtained allow to conclude that the infeccion of seeds with the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, promotes alterations in the isozymatic patterns of the isozymes malate desidrogenase,

sterase, acid phosphatase, peroxidase and glutamate-oxilacethate transaminase; the infection of seeds by *Aspergillus flavus* promotes sensible alterations in the isoenzymatic patterns of alcohol desidrogenase; the infection of seeds by *Fusarium moniliforme* promotes alterations in the isozymatic patterns of coleoptiles of acid phosphatase, sterase, peroxidase and glutamate-oxilacethate transaminase; the isozymatic patterns of coleoptiles obtained from seeds infected with *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp, are less affected due to the presence of those microorganisms.

4.1 INTRODUÇÃO

A qualidade de sementes é um fator a ser considerado em qualquer programa de produção agrícola, visto que as características agronômicas das cultivares obtidas pela pesquisa chegam aos agricultores através da semente. Esta pode ser analisada sob os aspectos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos.

A certificação da pureza genética garante aos agricultores cultivares com as mesmas características desenvolvidas pelo melhorista e a identificação de cultivares pode garantir a proteção legal do trabalho voltado ao desenvolvimento de uma nova cultivar.

A identificação de cultivares e certificação da pureza genética de sementes de milho são realizadas pelas instituições produtoras de sementes dentro dos programas de controle de qualidade, principalmente, através de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e planta. Porém o emprego desses marcadores apresenta algumas limitações como a influência de fatores ambientais e condições do solo (Cooke, 1984; Williams et al. 1993).

Para superar estas limitações, técnicas eletroforéticas têm sido empregadas com sucesso na identificação de cultivares e certificação da pureza genética (Martinez, 1990; Smith e Wych, 1986; Goodman e Stuber 1980; Stuber et al. 1988; Arús, 1983 e Cardy Kannenberg, 1982).

A metodologia proposta por Stuber et al. (1988) baseia-se nas observações dos perfis eletroforéticos dos coleótilos de milho. No entanto, a utilização de sementes pode proporcionar maior rapidez na obtenção dos resultados das análises.

Um dos fatores que pode interferir nos resultados dos padrões eletroforéticos é a presença de microrganismos associados às sementes, uma vez que estes podem provocar alterações no metabolismo celular, além de possuírem seu próprio sistema enzimático (Agrios, 1988).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar a interferência de microrganismos associados às sementes e coleótilos de milho, nos padrões eletroforéticos de isoenzimas, os quais são utilizadas na identificação de cultivares e certificação da pureza genética.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Sanidade e Biotecnologia de Sementes, dos Departamentos de Fitopatologia e Agricultura respectivamente, da Universidade Federal de Lavras em 1997.

Foram utilizadas sementes de milho da cultivar C-805, safra 94/95. Para se conhecer o nível de alteração provocado pelos microrganismos nos padrões eletroforéticos de isoenzimas, parte das sementes foi infectada com isolados dos fungos em separado de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, parte tratada com os fungicidas Benomil[®] e Thiabendazol, parte não sofreu tratamento(T2). Para a análise eletroforética foi utilizada uma testemunha (T1), que não permaneceu em câmara BOD, para eliminar os possíveis efeitos de câmara. Para os sistemas isoenzimáticos de álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase as isoenzimas foram extraídas através do tampão (Tris-HCL 0,2M pH 8,0).

As sementes infectadas, tratadas e não tratadas foram mantidas em câmara BOD a 25° C com 95% de umidade relativa durante trinta dias, de acordo com recomendações de Mycock, Rijkenberg e Berjak(1992). Aos quinze dias (1ª Época) e aos trinta dias (2ª Época), foram retiradas amostras para a realização das análises isoenzimáticas, fisiológica e sanitária.

A qualidade fisiológica foi determinada pelos testes de germinação e tetrazólio.

Os fungos utilizados na inoculação foram isolados de sementes de milho submetidas ao “blotter” test conforme descrição na literatura.

O inóculo conjunto de uma mistura de Caolim, foram obtidos segundo a metodologia descrita por Vieira (1996).

A concentração de esporos na formulação de pó foi ajustada para 10×10^6 esporos/g do produto com auxílio de uma câmara de Neubayer. As sementes foram infectadas com o pó contendo os esporos dos fungos considerados, na dosagem de 200g/100Kg de sementes.

Os fungicidas utilizados no tratamento das sementes, foram Benomil® na dosagem de 200 g do produto comercial em 100 Kg de sementes e a partir do 14º dia as sementes foram tratadas com Thiabendazol na dosagem de 60 g do produto comercial em 100 Kg de sementes.

4.2.1 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado em 8 repetições de 25 sementes por amostra. A semeadura foi realizada em papel toalha na forma de rolo, umedecido em água na quantidade equivalente a 2,5 o peso do papel. As sementes foram colocadas para germinar em aparelho previamente regulado a temperatura de 30° C. As avaliações foram feitas aos 7 dias após a semeadura, segundo as prescrições contidas na Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

4.2.2 Teste de tetrazólio

Quatro subamostras de 25 sementes foram pré-acondicionadas em recipiente com água por um período de 18 horas a temperatura de 25° C. Posteriormente as sementes foram seccionadas no sentido longitudinal e imersas em solução de

cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio a 0,1% por um período de 6 horas à temperatura de 30° C na ausência de luz para coloração. Após este período as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas de acordo com as recomendações de Dias e Barros (1995), sendo que os resultados foram expressos em porcentagem.

4.2.3. Qualidade sanitária das sementes

A sanidade das sementes foi determinada pelo teste de incubação em papel de filtro (“Blotter test”) em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. As sementes foram distribuídas sobre dois discos de papel de filtro previamente esterilizados e umedecidos com água destilada e esterilizada.

Foram distribuídas 25 sementes por placa, em 8 repetições, perfazendo um total de 200 sementes por tratamento. A seguir, as placas contendo as sementes foram incubadas em ambiente controlado a uma temperatura de 20° C \pm 2° C sob regime de alternância de luz negra e escuro. Após as primeiras 24 horas de incubação, as sementes foram mantidas em freezer a temperatura de -20° C por 24 horas. Em seguida as placas foram retornadas para a sala de incubação à 20° C \pm 2° C sobre regime alternado de 12 horas de luz negra e 12 horas no escuro, durante 7 dias. Após este período, foi feita avaliação dos patógenos com o auxílio de um microscópio esterioscópico, de acordo com as características morfológicas de seu crescimento sobre as sementes, sendo que os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas.

Antes de submeter as sementes ao teste de sanidade, as mesmas foram tratadas com Hipoclorito a 1% durante um minuto.

4.2.4 Extração das isoenzimas e análise eletroforética

Para a análise eletroforética de isoenzimas foram utilizadas amostras de cinquenta sementes (Arús, 1983) e cinquenta coleótilos de plântulas provenientes de sementes germinadas no escuro, em rolo de papel a temperatura de 30° C, por um período de cinco dias após a semeadura de acordo com recomendações de (Stuber et al., 1988). As sementes e coleótilos foram liofilizadas e trituradas a frio, em moinho refrigerado. O produto obtido foi armazenado em freezer a -84° C.

Após obtida a cultura pura dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, em BDA, o micélio foi transferido para meio líquido de glicose e extrato de levedura de acordo com recomendações de (Millis, Sreenivasaprasad e Brown 1994), citados por Vieira (1996), a 25° C sob agitação no escuro. A curva de crescimento micelial dos isolados cultivados no meio foi determinada de acordo com procedimentos descritos por (Alfenas, 1991).

Após esta fase de inoculação os micélios foram coletados à vácuo, liofilizados e macerados em nitrogênio líquido, sendo que o pó micelial foi armazenado em freezer a -84° C.

As isoenzimas foram extraídas utilizando-se 100 mg de sementes moídas e coleótilos macerados e 0,015 mg de pó micelial também macerado, aos quais foram adicionados 200 µl do tampão de extração Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 e em seguida mantidos por 24 horas em geladeira. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm a 4° C por 30 minutos. Em seguida foram aplicados 40 µl do sobrenadante nos géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador.

Após a eletroforese, os géis foram revelados e corados para os sistemas isoenzimáticos: álcool desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1) esterase (EST-EC 3.1.1.1),

fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2), glutamato-oxalacetato transaminase (GOT-EC 2.6.1.1), malato desidrogenase (MDH-EC 1.1.1.37) e peroxidase (PO-EC 1.11.1.7), de acordo com (Alfenas, 1991).

4.2.5 Procedimentos estatísticos

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, em parcela subdividida no tempo, de acordo com Steel e Torrie (1980). Foram avaliados os tratamentos, sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, infectadas com *Fusarium moniliforme* e infectadas com *Penicillium* spp, tratadas com fungicidas e não tratadas em duas épocas de avaliação: aos 15 (1^a época), e aos 30 dias (2^a época). Foi verificado a normalidade dos dados pelo teste de Lilliefors. Na comparação das médias foi utilizado o teste de Duncan ao nível de 5%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Padrão isoenzimático das sementes

Com relação a análise eletroforética, pode ser observado em geral, pelos zimogramas (Figuras 1 e 2), que dentre as enzimas avaliadas a álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), peroxidase (PO), esterase (EST) e glutamato-oxalacetato transaminase (GOT), apresentaram diminuição da intensidade e ou número de bandas devido a presença de microrganismos. No padrão eletroforético de fosfatase ácida (ACP), foi detectado aumento da intensidade de bandas com a presença de microrganismos. As isoenzimas que apresentaram atividade para os fungos estudados foram: álcool desidrogenase apenas na 2^a época (30 dias), esterase, fosfatase ácida, glutamato-oxalacetato transaminase e peroxidase. Dentre estas as que apresentaram atividade para todos os fungos foram as hidrolases (esterase e fosfatase ácida). A glutamato-oxalacetato transaminase apresentou atividade para *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp, e a peroxidase apenas para *Penicillium* spp.

Para a álcool desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1), nas duas épocas de avaliação foram observadas sensíveis diferenças nos padrões isoenzimáticos das sementes infectadas com *Aspergillus flavus* (Figuras 1 e 2). Na segunda época (30 dias) foi observado diminuição na intensidade e número de bandas em sementes tratadas com fungicidas e não tratadas. A ausência do oxigênio promove o início do metabolismo fermentativo, através da indução da álcool desidrogenase onde o

acetaldeído é reduzido a etanol pelo NADH. Os produtos finais desse metabolismo fermentativo são tóxicos para as células e segundo Taiz e Zeiger (1991), o etanol parece ser o produto do metabolismo fermentativo menos deletérico comparado ao lactato, pois a acumulação deste último promove a acidificação do citossol. No presente trabalho, as modificações ocorridas na atividade dessa enzima, parecem ter sido mais em função da ação dos microrganismos sobre o metabolismo das sementes. Aos 30 dias (2ª época), onde houve maior nível de infecção das sementes (Figura 5), parece ter havido maior alteração no metabolismo das sementes com conseqüente redução na qualidade fisiológica (Tabelas 1, 2 e 3) e maior alteração nos padrões isoenzimáticos (Figura 2). A diferença detectada e relatada anteriormente, pode contribuir para a ocorrência de enganos durante as análises de identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Vale ressaltar, que o número de sementes infectadas por *Aspergillus flavus*, foi superior aos outros dois fungos considerados no presente estudo (Figuras 5 e 6). Esse microrganismos parece ser o que mais contribuiu para o efeito negativo sobre o metabolismo das sementes com subsequente alteração no padrão eletroforético das enzimas em questão (Tabelas 1, 2 e 3) e (Figuras 1 e 2).

Já a malato desidrogenase (MDH-EC 1.1.1.37), apresentou diminuição na intensidade e número de bandas em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, nas duas épocas em estudo. As maiores alterações, tanto em intensidade como no número de bandas, foram observadas em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, fato que coincide com a alta porcentagem de sementes infectadas (77%), na primeira época de avaliação (Figura 5). Vieira (1996), encontrou resultados diferentes em sementes de algodão e inoculadas com fungos do gênero *Aspergillus* e envelhecidas. Possivelmente, a presença do microrganismo nas sementes, nos níveis do presente trabalho, levou a diminuição da intensidade e número de bandas em função do aumento da atividade

respiratória, uma vez que a malato desidrogenase atua no ciclo de Krebs catalisando a reação de malato a oxalacetato. Estas alterações no perfil eletroforético, estão de acordo com as considerações feitas por Cherry (1983).

Foi observado, nos padrões isoenzimáticos de esterase (EST-EC 3.1.1.1), diminuição no número e intensidade de bandas em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp, assim como em sementes tratadas com fungicidas nas duas épocas de avaliação (Figuras 1 e 2). Possivelmente, trata-se de uma enzima bastante sensível, sendo o perfil eletroforético muito alterado, principalmente devido a presença de fatores externos. Resultado semelhante foram observados por Vieira (1996), onde o autor relata que o perfil eletroforético de esterase é bastante alterado pela ação de microrganismo e que a mesma deve ser usada com restrições em análises de identificação de cultivares. Cherry, Mayne e Ory (1974), relataram diminuição da intensidade, intensificação e ocorrência de novas formas moleculares de esterase em sementes de amendoim infectadas com *Aspergillus parasiticus*.

Quanto a fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2), foi observado aumento na intensidade de bandas em sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*, nas duas épocas de avaliação e em sementes infectadas com *Penicillium* spp apenas na segunda época de avaliação. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Vieira (1996), onde as sementes apresentaram alterações nos seus padrões isoenzimáticos em função da associação fungo/semente. A fosfatase ácida está envolvida na hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídeos de membrana, tendo como consequência a peroxidação de lipídeos. Diversos autores relatam o aumento da peroxidação de lipídeos com o envelhecimento das sementes. Neste estudo, foram observadas que a intensidade de bandas para as sementes infectadas foi maior, sugerindo que a presença dos microrganismos, considerados neste estudo, tem papel importante na peroxidação

de lipídeos. Agrios (1988) relata que cercosporin, toxina produzida por *Cercospora* spp, atua na peroxidação de lipídeos de membrana.

Intensidade de bandas para peroxidase (PO-EC 1.11.1.7), foi reduzida, nas duas épocas de avaliação em sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* comparada às sementes não acondicionadas em BOD (T1). Esta diminuição pode estar relacionada com a intensa atividade celular, dessa enzima, na eliminação dos peróxidos formados. A peroxidase é uma oxiredutase especializada na remoção de peróxidos. Stuber et al. (1988), não a considerou em seus estudos, de obtenção de marcadores isoenzimáticos, com a possibilidade de utilizá-la na identificação de cultivares e certificação da pureza genética, possivelmente devido ao fato que as peroxidases não estão muito bem definidas geneticamente, faltando informações sobre o seu controle genético (Scandalios, 1974).

Os padrões isoenzimáticos de glutamato-oxalacetato transaminase, (GOT-EC 2.6.1.1), apresentaram diminuição na intensidade de bandas com a presença de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, durante a primeira época de avaliação. Na segunda época, tanto em sementes infectadas com os referidos fungos, como em sementes não tratadas foi observado diminuição da intensidade de bandas comparada com as sementes tratadas com fungicida. A banda que apresentou diminuição de intensidade foi Got 2, relatada por Newton (1983), como pertencente aos cloroplastos. Brandão Junior (1996), relatou a perda de banda de Got 2, com o envelhecimento das sementes, e que isto está relacionada com a redução na qualidade fisiológica das sementes. Situação contrária foi observada por Vieira (1996), onde a GOT manteve o padrão de bandas inalterado com o aumento do período de envelhecimento artificial em sementes de algodão. Devido ao envolvimento desta enzima no metabolismo de nitrogênio,

possivelmente, sensíveis diferenças na síntese de aminoácidos poderão ocorrer, contribuindo para a redução na qualidade fisiológica das sementes.

De uma maneira geral, os padrões eletroforéticos obtidos a partir de sementes apresentaram-se bastante alterados, principalmente, em função da presença de microrganismos, devendo ser utilizado com restrições nos testes de identificação de cultivares e certificação da pureza genética, apesar da rapidez na obtenção dos resultados impostos pelas sementes.

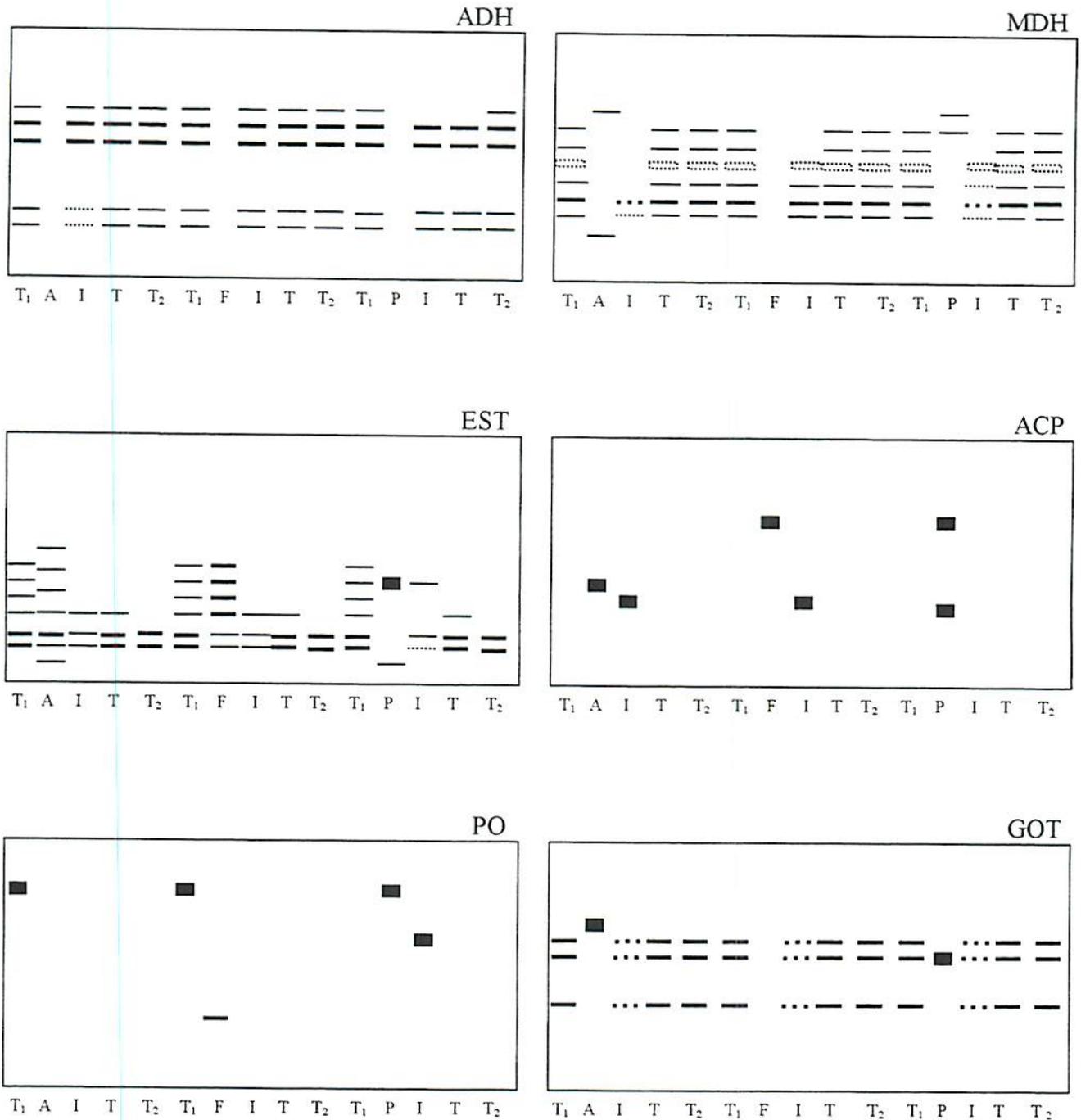


FIGURA 1. Zimogramas isoenzimático de sementes de milho da cultivar C-805 durante a primeira época de avaliação, onde (T₁) Testemunha, (A) *Aspergillus flavus* (F), *Fusarium moniliforme*, (P) *Penicillium* spp (I), Infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, respectivamente, (T) Tratada, (T₂) Não tratada das isoenzimas ADH (álcool desidrogenase), MDH (malato desidrogenase), EST(esterase), ACP(fosfatase ácida), PO (peroxidase) e GOT (glutamato-oxalacetato transaminase).

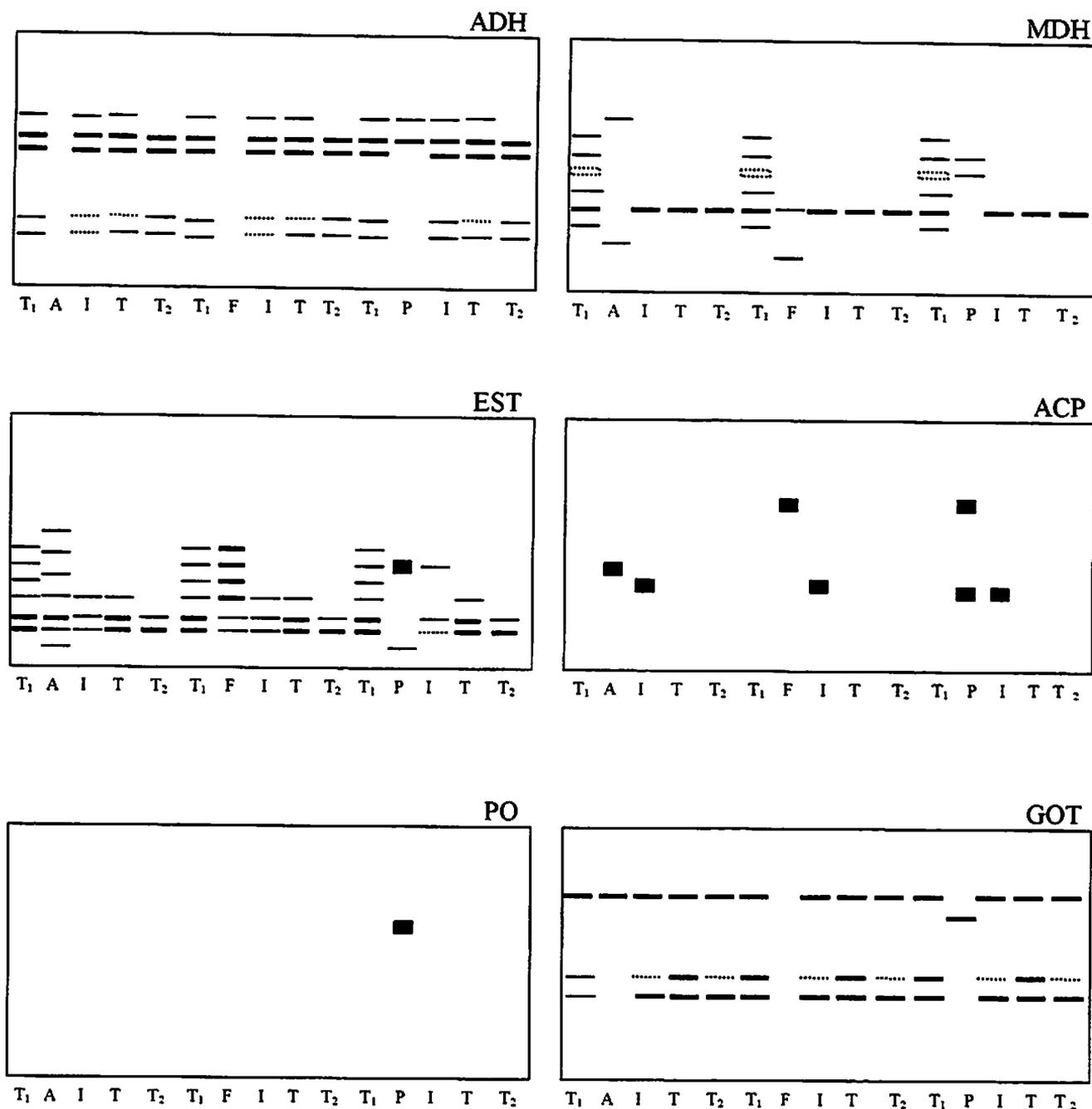


FIGURA 2. Zimogramas isoenzimático de sementes de milho da cultivar C-805, durante a segunda época de avaliação, onde (T₁) Testemunha, (A) *Aspergillus flavus* (F), *Fusarium moniliforme*, (P) *Penicillium* spp (I), Infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, respectivamente, (T) Tratada, (T₂) Não tratada das isoenzimas ADH (álcool desidrogenase), MDH (malato desidrogenase), EST(esterase), ACP(fosfatase ácida), PO (peroxidase) e GOT (glutamato-oxalacetato transaminase).

4.3.2 Padrão isoenzimático dos coleóptilos

Com relação análise eletroforética em coleóptilos, pode ser observado em geral pelos zimogramas (Figura 3), que entre as enzimas avaliadas nesse estudo nenhuma delas sofreu alteração devido a presença de microrganismos durante a primeira época de avaliação. Deve-se ressaltar, que não foi observado atividade da álcool desidrogenase, mostrada nas Figuras 3 e 4, nas duas épocas de avaliação. Possivelmente, isto ocorreu porque não estava presente o gene responsável pela expressão do loco ADH1, que é relatado ser bastante ativo, estando presente apenas o gene responsável pela expressão do loco ADH2, que segundo Stuber et al. (1988), não é muito ativo no coleóptilo. Este fato evidencia a baixa atividade do loco ADH2 nas cultivares e linhagens de clima temperado e tropical. Porém estudos com outras cultivares e linhagens devem ser realizados para se conhecer o comportamento desta enzima para as nossas condições. Uma outra situação, que pode ter ocorrido é a baixa concentração dessa enzima nos coleóptilos. Pode ser observado em geral pelos zimogramas apresentados na (Figura 4), que os perfis eletroforéticos de malato desidrogenase, não apresentaram alterações na segunda época de avaliação. Para a álcool desidrogenase, foi observado presença de bandas apenas no tratamento onde as sementes foram tratadas com fungicidas. Foi observado aumento na intensidade de bandas das enzimas fosfatase ácida e esterase para os coleóptilos obtidos de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*. Para peroxidase, foi observado aumento na intensidade e no número de bandas em coleóptilos oriundos de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*. Para glutamato-oxalacetato transaminase, foi observado apenas aumento no número de bandas nos padrões eletroforéticos dos coleóptilos obtidos de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*.

Fosfatase ácida é uma enzima que pode atuar na peroxidação de lipídeos. Desta forma, a presença de *Fusarium moniliforme*, pode ter contribuído para o aumento da intensidade de bandas desta enzima, podendo estar relacionada com a peroxidação de lipídeos.

Para esterase foi observado diminuição da intensidade de bandas em coleótilos obtidos de sementes infectadas com os fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. No entanto, foi observado aumento na intensidade de bandas para a mesma enzima em coleótilos provenientes de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*. Vale ressaltar, que Mycock, Lloyd e Berjak (1988), relataram a presença de *Aspergillus flavus* em plantas jovens de milho com 6 semanas. Todavia, estas alterações nos perfis eletroforéticos, provocados pela presença desses fungos, possivelmente, não comprometem a utilização desta enzima na identificação de cultivares e certificação da pureza genética.

Neste estudo, para a glutamato-oxalacetato transaminase foi observado a ocorrência de mais uma banda nos padrões eletroforéticos dos coleótilos provenientes de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*.

Possivelmente, a infecção de *Fusarium moniliforme*, pode ter provocado alterações nos perfis eletroforéticos para fosfatase ácida, esterase, glutamato-oxalacetato transaminase e peroxidase, apesar de não ser visível a presença do fungo nos coleótilos. Foley (1962), relata que *Fusarium moniliforme*, após infectar a semente é capaz de ramificar-se pelos tecidos da planta, sendo a infecção não revelada por sintomas claros. Estas alterações nos perfis eletroforéticos também foram relatadas por Cherry, Mayne e Ory (1974) e Cherry (1983).

De uma maneira geral, os perfis eletroforéticos dos coleótilos obtidos de sementes infectadas com microrganismos apresentaram-se menos alterados, principalmente na primeira época de avaliação. Com relação a segunda época de

avaliação, as alterações observadas parecem estar associadas com o aumento na porcentagem de sementes infectadas, com *Fusarium moniliforme* e *Penicillium*.

O coleoptilo é a parte da planta considerada por Stuber et al. (1988) e pela AOSA (1991), em seus procedimentos. Os resultados obtidos no presente trabalho permitem afirmar que os perfis eletroforéticos de coleoptilos, obtidos de sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, são menos alterados. Portanto, os resultados obtidos estão em concordância com a metodologia proposta por Stuber et al. (1988).

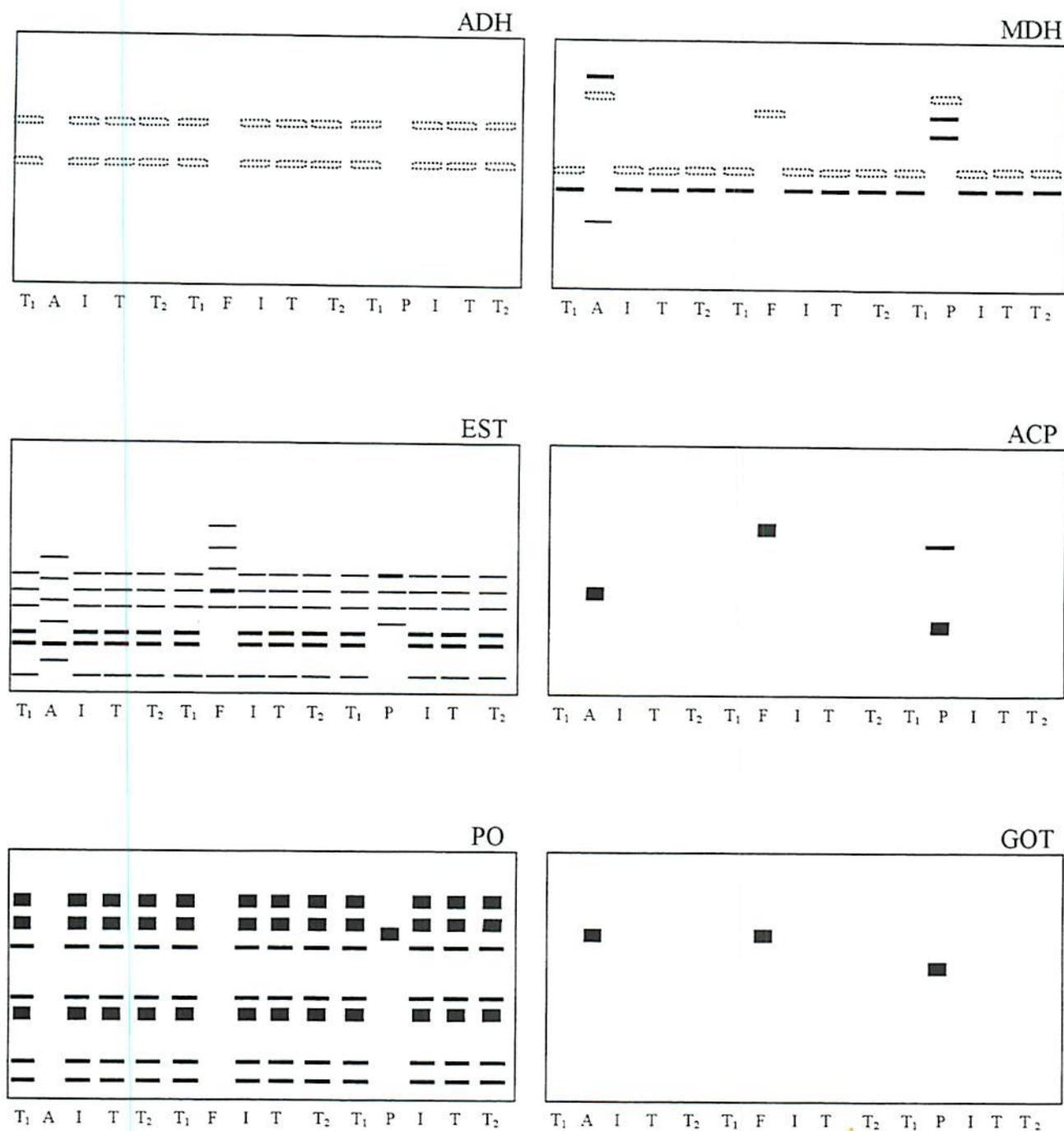


FIGURA 3. Zimogramas isoenzimático de coleótilos oriundos da cultivar C-805, durante a primeira época onde, (T1) Testemunha, (A) *Aspergillus flavus*, (F) *Fusarium moniliforme*, (P) *Penicillium* spp, (I) Infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, respectivamente, (T) Tratada, (T2) Não tratada, das isoenzimas ADH (álcool desidrogenase), MDH (malato desidrogenase), EST(esterase), ACP(fosfatase ácida), PO (peroxidase) e GOT (glutamato-oxalacetato transaminase).

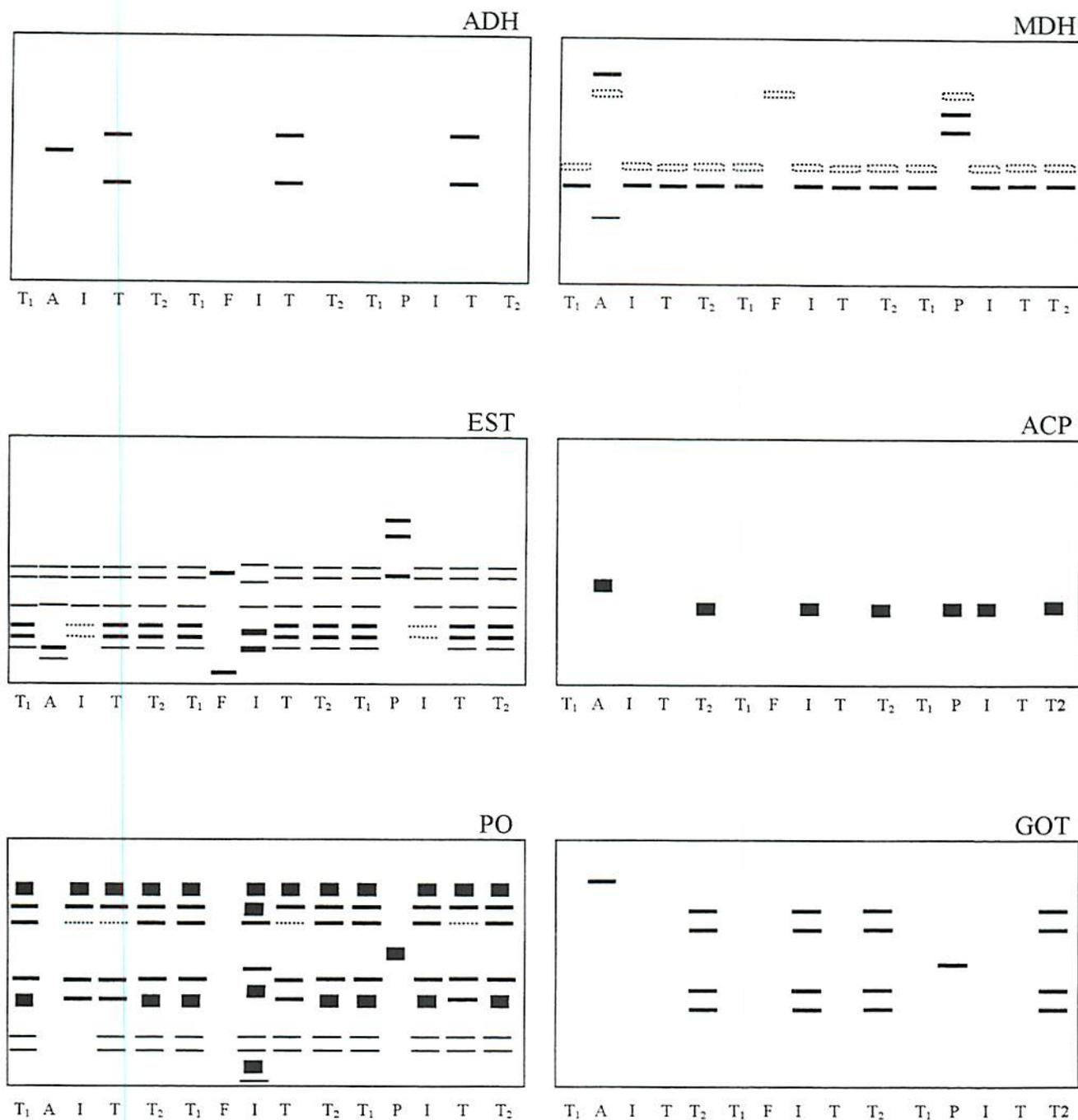


FIGURA 4. Zimogramas isoenzimático de coleótipos oriundos da cultivar C-805, durante a segunda época onde (T1) Testemunha, (A) *Aspergillus flavus*, (F) *Fusarium moniliforme*, (P) *Penicillium* spp, (I) Infectada com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, respectivamente, (T) Tratada, (T2) Não tratada, das isoenzimas ADH (álcool desidrogenase), MDH (malato desidrogenase), EST(esterase), ACP(fosfatase ácida), PO (peroxidase) e GOT (glutamato-oxalacetato transaminase).

4.3.3. Qualidade sanitária

Os resultados obtidos na análise sanitária das sementes de milho, revelaram maior incidência dos fungos: *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. Nas sementes infectadas com o fungo *Aspergillus flavus* foi observado um aumento de 60% na porcentagem de sementes infectadas aos 15 dias de exposição em câmara. Após este período houve uma redução da ordem de 20% de sementes infectadas pelo respectivo patógeno até o período de 30 dias nas mesmas condições (Figura 5). Esses resultados sugerem que o período de 15 dias de exposição das sementes, nas condições do presente trabalho, permite é possível obter infecções significativas pelo referido fungo. Resultado semelhante foi observado em sementes de milho que não receberam o tratamento fungicida para o mesmo fungo (Figura 6).

Para *Fusarium moniliforme*, foi observado aumento na porcentagem de sementes infectadas aos quinze e trinta dias, 1^a e 2^a épocas respectivamente, de exposição em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa (Figura 5). O aumento na porcentagem de sementes infectadas da primeira época para a segunda foi de 6% (Figura 5). Sementes que não receberam o tratamento fungicida apresentaram aumento de 4% de infecção pelo fungo *Fusarium moniliforme* da primeira época para a segunda. Sementes não tratadas com fungicidas apresentaram porcentagem superior de sementes infectadas, com o referido fungo, nas duas épocas de avaliação (Figuras 5 e 6). Estes resultados sugerem que a utilização desse método de infecção para *Fusarium moniliforme*, não contribui para um aumento significativo na porcentagem de sementes infectadas.

Foi observado redução na porcentagem de sementes infectadas com *Penicillium* spp, aos quinze dias de exposição em câmara e após este período houve um aumento da ordem de 27%. Resultados diferentes foram observados para as

sementes que não receberam o tratamento fungicida, uma vez que ocorreu aumento na porcentagem de sementes com *Penicillium* spp, após quinze dias de exposição em câmara e posterior redução da ordem de 1,5%, após a exposição das mesmas em câmara por um período de 15 dias (Figura 6). Com relação às sementes tratadas com fungicidas houve redução na infecção destas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, após exposição das mesmas em câmara por um período de 15 dias. Após este período, ocorreu aumento na porcentagem de sementes infectadas com os fungos de armazenamento. Esse comportamento não foi observado para *Fusarium moniliforme* cuja porcentagem de sementes infectadas permaneceu em zero, até o período de exposição das sementes por trinta dias em câmara (Figura 7).

Comparando os resultados obtidos para as sementes infectadas (Figura 5) e para aquelas que receberam o tratamento fungicida (Figura 7), foi observado que os fungicidas utilizados foram capazes de manter em níveis bastante reduzidos a porcentagem de sementes infectadas.

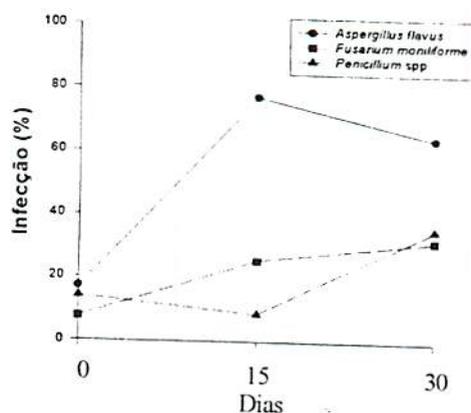


FIGURA 5. Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, após a infecção das mesmas pelos respectivos fungos aos quinze e aos trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa.

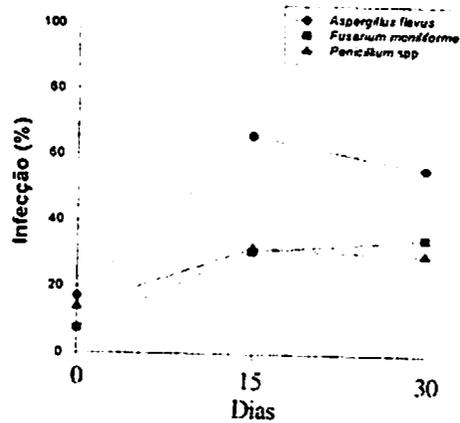


FIGURA 6. Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, obtidos de sementes não submetidas ao tratamento fungicida aos quinze e trinta de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa.

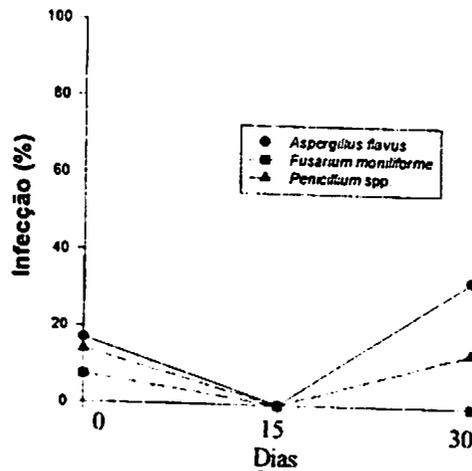


FIGURA 7. Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, obtidos de sementes tratadas com fungicidas aos quinze e trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C a 95% de umidade relativa.

4.3.4 Qualidade fisiológica

A análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação e tetrazólio (potencial de germinação e vigor) (Tabela 1 A), revelou efeito significativo para tratamento, época e para a interação tratamento x época.

4.3.4.1 Potencial de germinação

TABELA 1. Resultados médios (%) do potencial de germinação obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG, 1997.

TRATAMENTO	ÉPOCAS		MÉDIAS
	ÉPOCA 1	ÉPOCA2	
Infectada <i>Aspergillus flavus</i>	38c	41b	40b
Infectada <i>Fusarium moniliforme</i>	58b	41b	50ab
Infectada <i>Penicillium spp</i>	80a	51ab	66a
Tratada	74a	61a	68a
Não tratada	63bc	48ab	56ab
MÉDIAS	63	48	

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Os dados do potencial de germinação, obtidos pelo teste de tetrazólio, indicam diferença estatística entre os tratamentos nas duas épocas de avaliação (Tabela 1). Na 1^a época as sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, apresentaram o menor potencial de germinação, seguidas pelas sementes infectadas com *Fusarium moniliforme* e não tratadas. Maior potencial de germinação foi observado em sementes infectadas com *Penicillium spp* e naquelas tratadas com fungicidas. Durante a 2^a época as sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* não diferiram estatisticamente, seguidas pelas sementes infectadas com *Penicillium spp* e não tratadas com fungicidas as quais não diferiram daquelas tratadas com fungicidas.

TABELA 2. Resultados médios (%) de germinação de sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG,1997.

TRATAMENTOS	ÉPOCAS		MÉDIAS
	ÉPOCA 1	ÉPOCA 2	
Infectada <i>Aspergillus flavus</i>	37b	01b	19c
Infectada <i>Fusarium moniliforme</i>	44b	12ab	28bc
Infectada <i>Penicillium spp</i>	64a	07ab	35b
Tratada	63a	27a	45a
Não tratada	41b	15b	28bc
MÉDIAS	50	12	

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

De acordo com a Tabela 2, durante a 1^a época, as sementes infectadas com *Penicillium spp* e tratadas com fungicidas apresentaram maior porcentagem de germinação, seguidos pelas sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*, que não diferiram estatisticamente entre si. Na 2^a época, as sementes infectadas com *Aspergillus flavus* foram as que apresentaram a menor germinação, porém não diferiram estatisticamente das sementes infectadas com *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, que por sua vez, não diferiram das sementes não tratadas. As sementes tratadas com fungicidas apresentaram maior porcentagem de germinação quando comparadas com àquelas infectadas com *Aspergillus flavus* e não tratadas. A exposição das sementes em câmara BOD a 25° C a 95% de umidade relativa, por um período de trinta dias (2^a época), reduziu significativamente a germinação destas (Tabela 2)

De uma maneira geral, sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, e *Fusarium moniliforme*, apresentaram menor potencial de germinação obtido pelo teste de tetrazólio e porcentagem de germinação. A redução na qualidade fisiológica de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme* pode estar relacionada com a capacidade rápida desse fungo em diminuir a qualidade das

sementes quando comparadas com os fungos de armazenamento. As sementes submetidas ao tratamento fungicida apresentaram maior germinação e potencial de germinação, obtido através do tetrazólio, quando comparadas com as sementes não tratadas e infectadas com os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp.

Foi detectado pelo teste de germinação redução mais acentuada na qualidade fisiológica das sementes infectadas e não tratadas, quando comparada com a obtida no potencial de germinação, através do teste de tetrazólio. Essa diferença deve-se, provavelmente, ao fato de que o resultado obtido no teste de germinação sofre a influência da presença de fungos de armazenamento, os quais impedem a germinação de sementes viáveis, fato que não ocorre no teste de tetrazólio.

TABELA 3. Resultados médios (%) de vigor obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas para duas épocas-UFLA-MG, 1997.

TRATAMENTOS	ÉPOCAS		MÉDIAS
	ÉPOCA 1	ÉPOCA2	
Infectada <i>Aspergillus flavus</i>	38c	38b	38b
Infectada <i>Fusarium moniliforme</i>	55b	39b	47ab
Infectada <i>Penicillium</i> spp	75a	49ab	62a
Tratada	70ab	60a	65a
Não tratada	63ab	45a	54ab
MÉDIAS	60	46	

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Durante a 1ª época de avaliação, as sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* apresentaram-se com menor vigor quando comparado com as sementes tratadas com fungicida e não tratadas as quais não diferiram estatisticamente das sementes infectadas com *Penicillium* spp (Tabela 3).

Os resultados de vigor obtidos em sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* não diferiram entre si e foram estatisticamente iguais àqueles obtidos em sementes infectadas com *Penicillium* spp (Tabela 3).

O teste de sanidade, revelou menor porcentagem de sementes infectadas com o fungo *Penicillium* spp, sugerindo que o maior vigor pode ser atribuído à menor incidência desse microrganismo (Figura 5). O teste de sanidade revelou maior porcentagem de sementes infectadas para os fungos *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus* (Figura 5) os quais podem ter contribuído para a redução do vigor (Tabela 3).

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, no presente trabalho, permitiram concluir que:

- 1- A infecção das sementes com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, promovem alterações nos padrões eletroforéticos das isoenzimas malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase;
- 2- A infecção das sementes com *Aspergillus flavus* promove sensíveis diferenças nos padrões isoenzimáticos da álcool desidrogenase;
- 3- Os padrões isoenzimáticos de coleótilos obtidos de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme*, são alterados quanto as isoenzimas fosfatase ácida, esterase, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase;
- 4- Os padrões isoenzimáticos de coleótilos obtidos de sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, são menos alterados em função da presença de microrganismos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, C.N. **Plant pathology**. 2 ed. New York: Academic, 1988. 703p.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e florestais**. Viçosa:UFV, 1991. 242p.
- ARÚS, P. Genetic purity of commercial seeds lots. In: TANKSLEY, S. D; ORTON, T.J. **Isoenzymes in plant genetics and breeding-Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.415-423.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1991.371p.
- BRANDÃO JUNIOR, D.E. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. Lavras: UFLA, 1996.110p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CARDY, B.J; KANNENBERG L.W. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification. **Crop Science**, Madison, v. 22, p. 1016-1020, Sept./Oct. 1982.
- CHERRY, J.P. Protein degradation during seed deterioration. **Phytopathology**, Sant Paul, v.73, n. 2, p.317-321, Feb. 1983.
- CHERRY, J.P; MAYNE, R.Y; ORY, R.L. Proteins and enzymes from seeds of *Arachis hypogae* L. IX. Eletrophoretically detected changes in 15 peanuts cultivars grown in different areas after inoculation with *Aspergillus parasiticus*. **Physiology Plant Pathology**, Londres, v. 4, p. 425-434, 1974.

- COOKE, R.J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 5, p. 59-72, 1984.
- DIAS, M.C.L. L; BARROS, A.S.R. Avaliação da qualidade de sementes de milho. Londrina: IAPAR, 1995. 43p. (Circular Técnica, 88).
- FOLEY, D. C. Sistemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Sant Paul, v.52, p.870-872, Jan. 1962.
- GOODMAN, M.M; STUBER C.W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 35, 1980. **Proceedings...** [S.l.]: American Seed Trade Association, 1980. P.10-31.
- MARTINEZ, C. Using electrophoresis to test purity during the cleaning process may save money and time. **Seed World**, Illinois, v. 128, p. 8-10, Dec. 1990.
- MYCOCK, H.L; LLOYD H.L; BERJAK, P. Mycropyilar infection of post-harvest caryopses of *Zea mays* by *Aspergillus flavus* var. *columnaris* var. nov. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, p. 647-653, 1988.
- MYCOCK, D.J; RIJKENBERG, F.H.J; BERJAK, P. Infection of maize seedlings by *Aspergillus flavus* var. *columnaris* var. nov. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, p. 683-701, 1992.
- NEWTON, J.K. Genetics of mitochondrial isoenzymes. In: TANKSLEY, S.D; ORTON, T.J. **Isoenzymes in plant genetics and breeding**-(Part A.) Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 157-174.
- SCANDALIOS, J.G. Isoenzymes en development and differentiation. **Annual Review Plant Physiology**. Palo Alto, v.25, p.225-258, 1974.
- SMITH, J.S.C; WYCH, R.D. The identification of female selfs in hibrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, p.1-8, July 1986.
- STEEL, R.G.D; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistcs** – A biochemical aproach. 2 ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.

- STUBER, C.W; WENDEL, J.F; GODMAN, M.M; SMITH, J.S.C. **Techniques and scoring procedures for starch gel eletrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.)**. Raleigh: North Caroline State University, 1988. 87p. (Techinal Bulletin, 286).
- TAIZ, L; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood: The Benjamin/Commings, 1991.565p.
- 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.)**. Lavras: UFLA, 1996. 114p.(Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- WILLIAMS, J.G.K; REITER, R.S; YOUNG, R.M; SCOLNIK, P. A. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, n. 11, p. 2697-2702, Apr. 1993.

5 CAPÍTULO II

Padrões eletroforéticos de proteínas em sementes de milho em associação com microrganismos.

RESUMO

Padrões eletroforéticos de proteínas em sementes de milho em associação com microrganismos.

Este trabalho teve como objetivo, verificar a interferência de microrganismos, associados às sementes de milho, nos padrões eletroforéticos de proteínas, os quais são utilizados na certificação da pureza genética de cultivares de milho. Para isso, parte das sementes de milho da cultivar C-805, foi infectada com isolados dos fungos, em separado, de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, parte tratada com os fungicidas Benomil® e Thiabendazol e parte não sofreu tratamento (T2). Em seguida as sementes foram acondicionadas em câmara BOD a 25° C com 95% de umidade relativa, por um período de 30 dias. Amostras das sementes foram tomadas aos 15 (1ª época) e aos 30 dias (2ª época), para determinação da qualidade fisiológica, sanitária e padrão proteico de zeína.

Para a análise eletroforética foi utilizada uma testemunha (T1), que não permaneceu em câmara BOD, para eliminar os possíveis efeitos de câmara. Para análise eletroforética de proteína foram extraídas a fração zeína das sementes com tampão de extração (12 mM de borato de sódio, pH 10, 1% SDS e 2 β-Mercaptoetanol a 2%).

Os resultados obtidos permitiram concluir que os padrões proteicos de zeína não são alterados pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, quando associados às sementes.

ABSTRACT

Eletroforetic patterns of proteins of seeds from corn on association with microorganisms.

The present work was carried out with the aim to verify the interference of microorganisms associated to the seeds, in the electrophoretic patterns of proteins, which are used in certification of genetic purity of corn cultivars. For this, seeds of the corn cultivar (C-805), were infected with the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp, treated with the fungicides Benomil® and Thiabendazol and nontreated (T2). The seeds was kept in chamber (BOD) to 25° C and 95% of humidits relative, for thirty days. For the evaluation of physiology, health quality and proteic patterns from zein, was taken samples to fifteen days (1st time) and to thirty days (2nd time).

For electrophoresis analysis was used one witness (T1), that do not kept in chamber BOD, with aim to solve possibles effect from chamber.

For eletrophoresis analysis the protein, was extrated of zein to the seeds with the buffers (12,mM of sodic borat, pH 10, 1% of SDS and 2-β Mercaptaetanol to 2%).

The results obtained allow to conclude that the proteic patterns from zein do not change for the fungi *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp, when associated with seeds.



5.1. INTRODUÇÃO

Cultivares com características específicas, resultantes de uma determinada combinação gênica, são desenvolvidas pelos melhoristas e requerem a manutenção de suas características para que possam expressar o seu potencial genético.

A qualidade de sementes é um fator a ser considerado em qualquer programa de produção agrícola, visto que as características agrônômicas das cultivares, obtidas pela pesquisa, chegam aos agricultores através da semente. Esta pode ser analisada sob os aspectos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos.

A certificação da pureza genética garante aos agricultores cultivares com as mesmas características desenvolvidas pelo melhorista. A certificação da pureza genética é realizada pelas instituições produtoras de sementes dentro dos programas de controle de qualidade, principalmente, através de marcadores morfológicos de sementes, plântula e planta.

Porém, o seu emprego apresenta algumas limitações como a influência de fatores ambientais e condições de solo (Cooke, 1984 e Williams et al., 1993).

Para superar essas limitações técnicas eletroforéticas têm sido empregadas com sucesso na certificação da pureza genética de cultivares de milho (ISTA, 1996; Ormam et al.1991; Arús, 1983; Wilson, 1984; Brink et al. 1989; Salamini e Soave, 1979).

A metodologia proposta pela ISTA (1996), baseia-se nas observações dos perfis eletroforéticos de proteína presente no endosperma das sementes de milho como as zeínas.

Todavia, um dos fatores que pode interferir nos resultados dos padrões eletroforéticos, é a presença de microrganismos associados às sementes, uma vez que estes podem provocar alterações no metabolismo celular, além de possuírem seu próprio sistema enzimático (Agrios, 1988).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar a interferência de microrganismos associados às sementes, nos padrões protéicos de zeína, os quais são utilizados na certificação da pureza genética de cultivares de milho.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Sanidade e Biotecnologia de Sementes, dos Departamentos de Fitopatologia e Agricultura respectivamente, da Universidade Federal de Lavras em 1997.

Foram utilizadas sementes de milho da cultivar C-805, safra 94/95. Para se conhecer o nível de alteração provocado pelos microrganismos nos padrões eletroforéticos de isoenzimas, parte das sementes foi infectada com isolados dos fungos em separado de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, parte tratada com os fungicidas Benomil[®] e Thiabendazol, parte não sofreu tratamento(T2). Para a análise eletroforética foi utilizada uma testemunha (T1), que não permaneceu em câmara BOD, para eliminar os possíveis efeitos de câmara. Para os sistemas isoenzimáticos de álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato-oxalacetato transaminase as isoenzimas foram extraídas através do tampão (Tris-HCL 0,2M pH 8,0).

As sementes infectadas, tratadas e não tratadas foram mantidas em câmara BOD a 25° C com 95% de umidade relativa durante trinta dias, de acordo com recomendações de Mycock, Rijkenberg e Berjak(1992). Aos quinze dias (1^a Época) e aos trinta dias (2^a Época), foram retiradas amostras para a realização das análises isoenzimáticas, fisiológica e sanitária.

A qualidade fisiológica foi determinada pelos testes de germinação e tetrazólio.

Os fungos utilizados na inoculação foram isolados de sementes de milho submetidas ao “blotter” test conforme descrição na literatura.

O inóculo conjunto de uma mistura de Caolim, foram obtidos segundo a metodologia descrita por Vieira (1996).

A concentração de esporos na formulação de pó foi ajustada para 10×10^6 esporos/g do produto com auxílio de uma câmara de Neubayer. As sementes foram infectadas com o pó contendo os esporos dos fungos considerados, na dosagem de 200g/100Kg de sementes.

Os fungicidas utilizados no tratamento das sementes, foram Benomil[®] na dosagem de 200 g do produto comercial em 100 Kg de sementes e a partir do 14^o dia as sementes foram tratadas com Thiabendazol na dosagem de 60 g do produto comercial em 100 Kg de sementes.

5.2.1 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado em 8 repetições de 25 sementes por amostra. A semeadura foi realizada em papel toalha na forma de rolo, umedecido em água na quantidade equivalente a 2,5 ó peso do papel. As sementes foram colocadas para germinar em aparelho previamente regulado a temperatura de 30^o C. As avaliações foram feitas aos 7 dias após a semeadura, segundo as prescrições contidas na Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

5.2.2 Teste de tetrazólio

Quatro subamostras de 25 sementes foram pré-acondicionadas em recipiente com água por um período de 18 horas a temperatura de 25^o C. Posteriormente as sementes foram seccionadas no sentido longitudinal e imersas em solução de

cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio a 0,1% por um período de 6 horas à temperatura de 30° C na ausência de luz para coloração. Após este período as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas de acordo com as recomendações de Dias e Barros (1995), sendo que os resultados foram expressos em porcentagem.

5.2.3. Qualidade sanitária das sementes

A sanidade das sementes foi determinada pelo teste de incubação em papel de filtro (“Blotter test”) em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. As sementes foram distribuídas sobre dois discos de papel de filtro previamente esterilizados e umedecidos com água destilada e esterilizada.

Foram distribuídas 25 sementes por placa, em 8 repetições, perfazendo um total de 200 sementes por tratamento. A seguir, as placas contendo as sementes foram incubadas em ambiente controlado a uma temperatura de 20° C \pm 2° C sob regime de alternância de luz negra e escuro. Após as primeiras 24 horas de incubação, as sementes foram mantidas em freezer a temperatura de -20° C por 24 horas. Em seguida as placas foram retornadas para a sala de incubação à 20° C \pm 2° C sobre regime alternado de 12 horas de luz negra e 12 horas no escuro, durante 7 dias. Após este período, foi feita avaliação dos patógenos com o auxílio de um microscópio estereoscópico, de acordo com as características morfológicas de seu crescimento sobre as sementes, sendo que os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas.

Antes de submeter as sementes ao teste de sanidade, as mesmas foram tratadas com Hipoclorito a 1% durante um minuto.

5.2.4 Extração de zeína e análise eletroforética

As zeínas foram extraídas pela adição de 1000 µl de tampão de extração (12,5 mM de borato de sódio, pH 10, 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2 β-mercaptoetanol a 2%), a 50 mg do pó de sementes moídas. Após agitação constante a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm a 4° C por 15 minutos. Ao sobrenadante (300 µl), foi adicionado 700 µl de isopropanol, seguido de agitação em vortex para homogeneização. A mistura foi incubada a 37° C (banho maria) durante 1 hora, seguido de centrifugação a 14.000 rpm a 4° C. Os extratos foram diluídos em 50 µl de tampão da amostra contendo 0,125M de Tris pH 6,8, 4% de SDS, 30% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol e aquecidos por 5 minutos. Em seguida foram aplicados 16 µl dessa mistura em canaleta de gel. A avaliação da extração da fração zeína foi feita sob eletroforese SDS-PAGE a 12,5% no gel separador e 6% no gel concentrador. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9. As corridas foram desenvolvidas em cuba vertical a 12 mA no gel concentrador 24 mA no gel separador.

Após a corrida, os géis foram corados em solução Coomassie Brilliant Blue a 0,05%, conforme Alfenas et al. (1991), durante 12 horas e descorados em solução de etanol 5%, ácido acético 10% e água 85%.

5.2.5 Procedimentos estatísticos

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, em parcela subdividida no tempo, de acordo com Steel e Torrie (1980). Foram avaliados os tratamentos (sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, infectadas com *Fusarium moniliforme* e infectadas com *Penicillium* spp, tratadas

com fungicidas e não tratadas em duas épocas de avaliação: aos 15 dias (1^a época), e aos 30 dias (2^a época). Foi verificado a normalidade dos dados pelo teste de Lilliefors. Na comparação das médias foi utilizado o teste de Duncan ao nível de 5%.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Padrão eletroforético de zeína

Com relação aos perfis eletroforéticos de zeína, referentes as sementes que foram infectadas com *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, tratadas com fungicidas e não tratadas, não foram observadas alterações nas duas épocas de avaliação (Figura 8). Estas informações estão de acordo com Righetti e Bossio (1981), de que o padrão de zeína não sofre alteração devido aos fatores ambientais.

Apesar da porcentagem de germinação durante a segunda época de avaliação ter sido baixa, a fração zeína não apresentou alteração, sugerindo que essa fração é bastante estável. De acordo com o presente trabalho, a presença de microrganismos, aos níveis aqui observados, não foram suficientes para promover alterações nos perfis eletroforéticos da fração zeína, extraída de sementes, sugerindo que a utilização de sementes para fins de certificação da pureza genética, pode impor maior rapidez na obtenção dos resultados das análises requeridas. Os resultados obtidos no presente trabalho estão em concordância com a metodologia proposta pela ISTA (1996), para a certificação da pureza genética de cultivares.

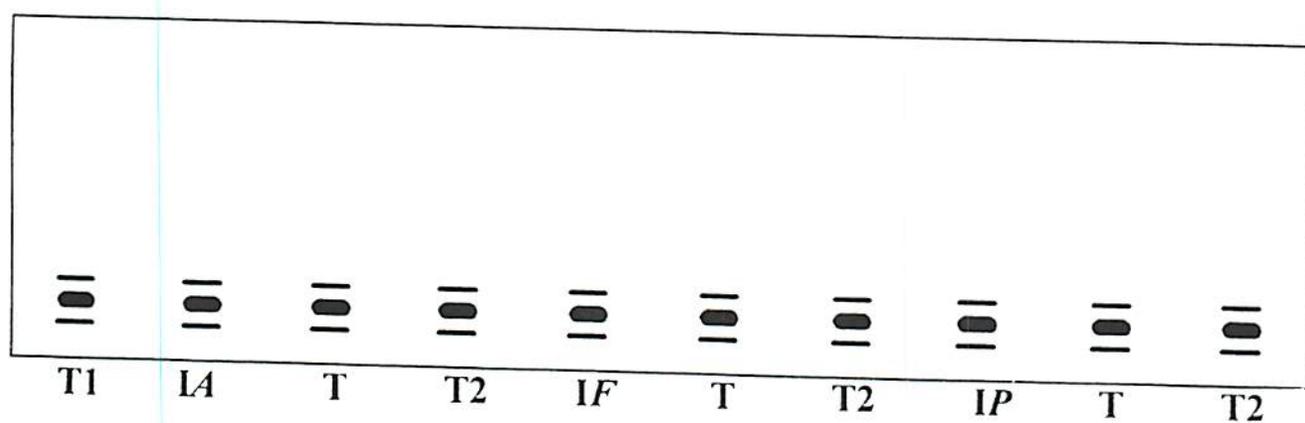
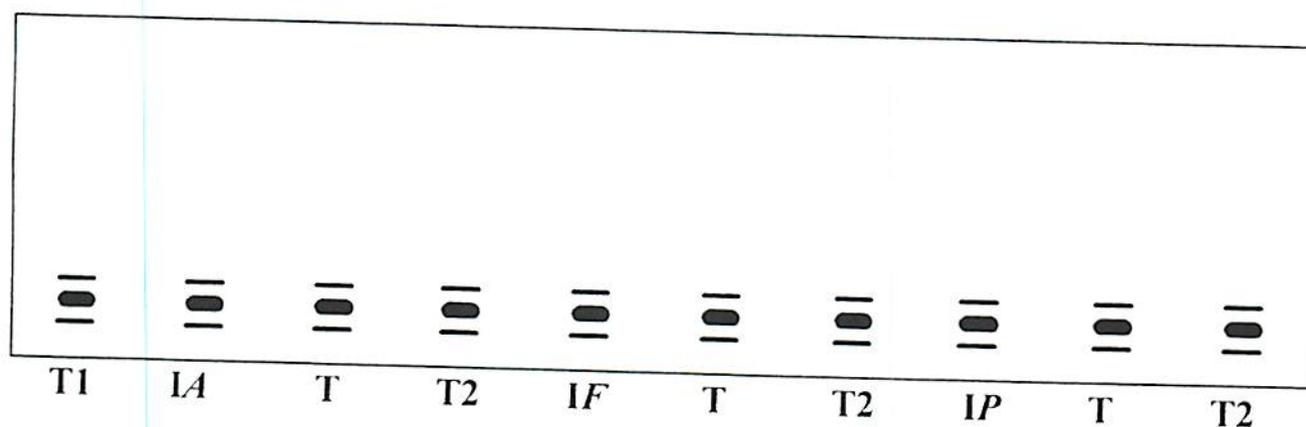


FIGURA 8 . Zimograma protéico de zeína de sementes de milho da cultivar C-805, durante a 1ª e 2ª épocas de avaliação respectivamente, onde (T1) Testemunha, (IA) Infectada com *Aspergillus flavus*, (T) Tratada, (T2) Não tratada, (IF) Infectada com *Fusarium moniliforme* e (IP) infectada com *Penicillium* spp.

5.3.2. Qualidade sanitária

Os resultados obtidos na análise sanitária das sementes de milho, revelaram maior incidência dos fungos: *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp. Nas sementes infectadas com o fungo *Aspergillus flavus* foi observado um aumento de 60% na porcentagem de sementes infectadas aos 15 dias de exposição em câmara. Após este período houve uma redução da ordem de 20% de sementes infectadas pelo respectivo patógeno até o período de 30 dias nas mesmas condições (Figura 9). Esses resultados sugerem que o período de 15 dias de exposição das sementes, nas condições do presente trabalho, permite é possível obter infecções significativas pelo referido fungo. Resultado semelhante foi observado em sementes de milho que não receberam o tratamento fungicida para o mesmo fungo (Figura 10).

Para *Fusarium moniliforme*, foi observado aumento na porcentagem de sementes infectadas aos quinze e trinta dias, 1ª e 2ª épocas respectivamente, de exposição em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa (Figura 9). O aumento na porcentagem de sementes infectadas da primeira época para a segunda foi de 6% (Figura 9). Sementes que não receberam o tratamento fungicida apresentaram aumento de 4% de infecção pelo fungo *Fusarium moniliforme* da primeira época para a segunda. Sementes não tratadas com fungicidas apresentaram porcentagem superior de sementes infectadas, com o referido fungo, nas duas épocas de avaliação (Figuras 9 e 10). Estes resultados sugerem que a utilização desse método de infecção para *Fusarium moniliforme*, não contribui para um aumento significativo na porcentagem de sementes infectadas.

Foi observado redução na porcentagem de sementes infectadas com *Penicillium* spp, aos quinze dias de exposição em câmara e após este período houve um aumento da ordem de 27%. Resultados diferentes foram observados para as

sementes que não receberam o tratamento fungicida, uma vez que ocorreu aumento na porcentagem de sementes com *Penicillium* spp. após quinze dias de exposição em câmara e posterior redução da ordem de 1,5%, após a exposição das mesmas em câmara por um período de 15 dias (Figura 10). Com relação às sementes tratadas com fungicidas houve redução na infecção destas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, após exposição das mesmas em câmara por um período de 15 dias. Após este período, ocorreu aumento na porcentagem de sementes infectadas com os fungos de armazenamento. Esse comportamento não foi observado para *Fusarium moniliforme* cuja porcentagem de sementes infectadas permaneceu em zero, até o período de exposição das sementes por trinta dias em câmara (Figura 11).

Comparando os resultados obtidos para as sementes infectadas (Figura 9) e para aquelas que receberam o tratamento fungicida (Figura 11), foi observado que os fungicidas utilizados foram capazes de manter em níveis bastante reduzidos a porcentagem de sementes infectadas.

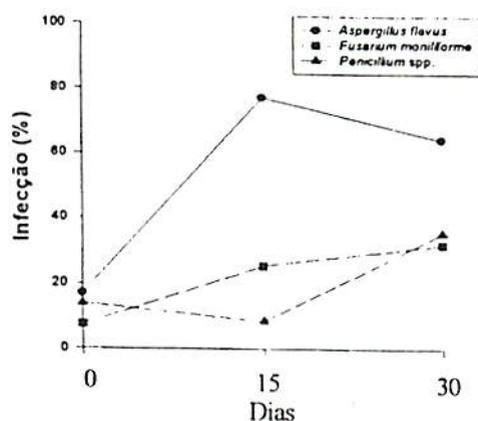


FIGURA 9. Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, após a infecção das mesmas pelos respectivos fungos aos quinze e aos trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa.

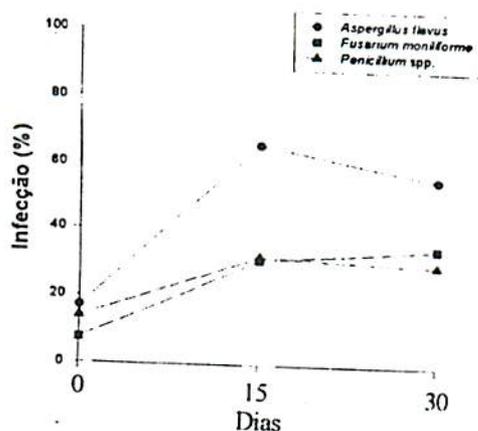


FIGURA 10. Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, obtidos de sementes não submetidas ao tratamento fungicida aos quinze e trinta de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C e 95% de umidade relativa.

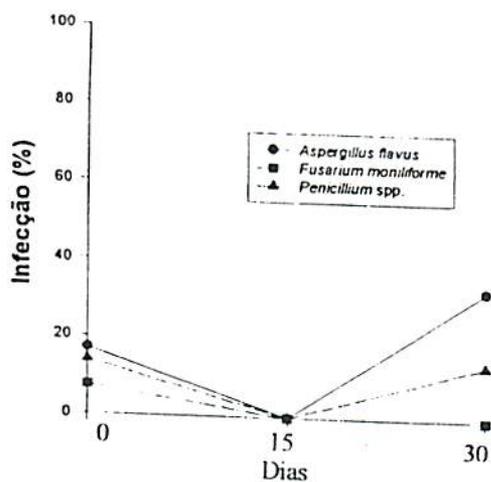


FIGURA 11. Porcentagem de sementes infectadas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium spp*, obtidos de sementes tratadas com fungicidas aos quinze e trinta dias de exposição das sementes em câmara BOD a 25° C a 95% de umidade relativa.

5.3.3 Qualidade fisiológica

A análise de variância dos dados obtidos nos testes de germinação e tetrazólio (potencial de germinação e vigor) (Tabela 1 A), revelou efeito significativo para tratamento, época e para a interação tratamento x época.

5.3.3.1 Potencial de germinação

TABELA 4. Resultados médios (%) do potencial de germinação obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG, 1997.

TRATAMENTOS	ÉPOCAS		MÉDIAS
	ÉPOCA 1	ÉPOCA2	
Infectada <i>Aspergillus flavus</i>	38c	41b	40b
Infectada <i>Fusarium moniliforme</i>	58b	41b	50ab
Infectada <i>Penicillium spp</i>	80a	51ab	66a
Tratada	74a	61a	68a
Não tratada	63bc	48ab	55ab
MÉDIAS	63	48	

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Os dados do potencial de germinação, obtidos pelo teste de tetrazólio, indicam diferença estatística entre os tratamentos nas duas épocas de avaliação (Tabela 4). Na 1ª época as sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, apresentaram o menor potencial de germinação, seguidas pelas sementes infectadas com *Fusarium moniliforme* e não tratadas. Maior potencial de germinação foi observado em sementes infectadas com *Penicillium spp* e naquelas tratadas com fungicidas. Durante a 2ª época as sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* não diferiram estatisticamente, seguidas pelas sementes

infectadas com *Penicillium* spp e não tratadas com fungicidas as quais não diferiram daquelas tratadas com fungicida.

TABELA 5. Resultados médios (%) de germinação de sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas em duas épocas-UFLA-MG,1997.

TRATAMENTOS	ÉPOCAS		MÉDIAS
	ÉPOCA 1	ÉPOCA 2	
Infectada <i>Aspergillus flavus</i>	37b	01b	19c
Infectada <i>Fusarium moniliforme</i>	44b	12ab	28bc
Infectada <i>Penicillium</i> spp	64a	07ab	35b
Tratada	63a	27a	45a
Não tratada	41b	15b	28bc
MÉDIAS	50	12	

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

De acordo com a Tabela 5, durante a 1^a época, as sementes infectadas com *Penicillium* spp e tratadas com fungicidas apresentaram maior porcentagem de germinação, seguidos pelas sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*, que não diferiram estatisticamente entre si. Na 2^a época, as sementes infectadas com *Aspergillus flavus* foram as que apresentaram a menor germinação, porém não diferiram estatisticamente das sementes infectadas com *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, que por sua vez, não diferiram das sementes não tratadas. As sementes tratadas com fungicidas apresentaram maior porcentagem de germinação quando comparadas com àquelas infectadas com *Aspergillus flavus* e não tratadas. A exposição das sementes em câmara BOD a 25° C a 95% de umidade relativa, por um período de trinta dias (2^a época), reduziu significativamente a germinação destas (Tabela 5)

De uma maneira geral, sementes infectadas com *Aspergillus flavus*, e *Fusarium moniliforme*, apresentaram menor potencial de germinação obtido pelo teste de tetrazólio e porcentagem de germinação. A redução na qualidade

fisiológica de sementes infectadas com *Fusarium moniliforme* pode estar relacionada com a capacidade rápida desse fungo em diminuir a qualidade das sementes quando comparadas com os fungos de armazenamento. As sementes submetidas ao tratamento fungicida apresentaram maior germinação e potencial de germinação, obtido através do tetrazólio, quando comparadas com as sementes não tratadas e infectadas com os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp.

Foi detectado pelo teste de germinação, redução mais acentuada na qualidade fisiológica das sementes infectadas e não tratadas, quando comparada com a obtida no potencial de germinação, através do teste de tetrazólio. Essa diferença deve-se, provavelmente, ao fato de que o resultado obtido no teste de germinação sofre a influência da presença de fungos de armazenamento, os quais impedem a germinação de sementes viáveis, fato que não ocorre no teste de tetrazólio.

TABELA 6. Resultados médios (%) de vigor obtidos pelo teste de tetrazólio em sementes de milho submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas para duas épocas-UFLA-MG, 1997.

TRATAMENTOS	ÉPOCAS		MÉDIAS
	ÉPOCA 1	ÉPOCA 2	
Infectada <i>Aspergillus flavus</i>	38c	38b	38b
Infectada <i>Fusarium moniliforme</i>	55b	39b	47ab
Infectada <i>Penicillium</i> spp	75a	49ab	62a
Tratada	70ab	60a	65a
Não tratada	63ab	45a	54ab
MÉDIAS	60	46	

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Durante a 1ª época de avaliação, as sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* apresentaram-se com menor vigor quando comparado com as sementes tratadas com fungicida e não tratadas as quais não diferiram estatisticamente das sementes infectadas com *Penicillium* spp (Tabela 3).

Os resultados de vigor obtidos em sementes infectadas com *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* não diferiram entre si e foram estatisticamente iguais àquelas obtidas em sementes infectadas com *Penicillium* spp (Tabela 6).

O teste de sanidade, revelou menor porcentagem de sementes infectadas com o fungo *Penicillium* spp, sugerindo que o maior vigor pode ser atribuído à menor incidência desse microrganismo (Figura 9). O teste de sanidade revelou maior porcentagem de sementes infectadas para os fungos *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus* (Figura 9), os quais podem ter contribuído para a redução do vigor (Tabela 6).

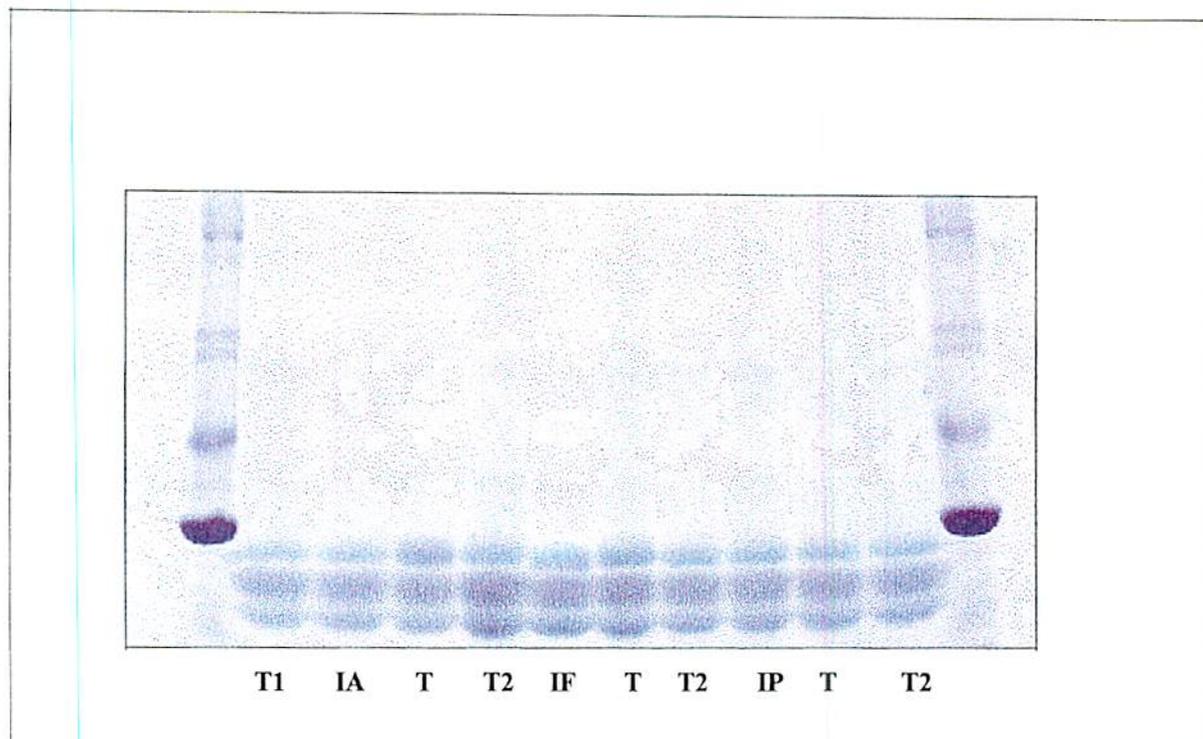


FIGURA 12 - Zimograma proteico de zeína, de sementes de milho da cultivar C-805, durante a segunda época, onde (T1) Testemunha, (IA) Infectada com *Aspergillus flavus*, (T) Tratada, (T2) Não tratada, (IF) Infectada com *Fusarium moniliforme* e (IP) Infectada com *Penicillium* spp.

5.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

1- Os padrões protéicos de zeína não são alterados pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* spp, quando associados às sementes.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, C.N. **Plant pathology**. 2. ed. New York: Academic, 1988. 703p.
- ALFENAS, A .C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos florestais. Viçosa:UFV, 1991. 242p.
- ARÚS, P. Genetic purity of commercial seeds lots. In: TANKSLEY, S. D; ORTON, T.J. **Isoenzymes in plant genetics and breeding**-Part A. Amsterdam: Elsevier 1983, p.415-423.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BRINK D.E; PRICE, S.C; NGUYEN, H; FUERST, G; MARTINEZ, C. Genetic purity assessment of commercial single cross maize hybrids: Isoelectric focusing of zeins. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.17, p.91-98, 1989.
- COOKE, R.J. The characterization and identification of crop cultivars by eletrophoresis. **Eletrophoresis**, Weinheim, v. 5, p. 59-72, 1984.
- DIAS, M.C.LL; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 43p. (Circular Técnica, 88).
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 323p.
- MYCOCK, D.J; RIJKENBERG, F.H.J; BERJAK, P. Infection of maize seedlings by *Aspergillus flavus* var. *columnaris* var. nov. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, p. 683-701, 1992.

- ORMAN, B.A; LAWRENCE, G.D; DOWNES, P.M; PHILLIPS, D.S; RIPBERGER, C. J. Assessment of maize inbred genetic purity by isozyme electrophoresis. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.19, p.527-535, 1991.
- RIGHETTI, P.G; BOSSIO A. B. Applications of isoelectric focusing to the analysis of plant and food proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v.2, p. 65-75, 1981.
- SALAMINI, M.M; SOAVE; R.R. Evaluation of genetic purity in hybrid corn (*Zea mays* L.) seed production through zein isoelectrophoretic patterns. **Maydica**, Bergamo, v. 24, p. 223-233, Sept. 1979.
- STEEL, R.G.D; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics – A biochemical approach**. 2 ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.
- 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.)**. Lavras: UFLA, 1996. 114p.(Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- WILLIAMS, J.G.K; REITER, R.S; YOUNG, R.M; SCOLNIK, P. A. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, n. 11, p. 2697-2702, Apr. 1993.
- WILSON, C.M. Isoelectric focusing of zein in agarose. **Cereal Chemistry**, San Joseph, v.16, p. 198-200, 1984.

Considerações finais

No Brasil, a utilização de técnicas moleculares, em laboratórios de análises de sementes, para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética ainda é pequena.

Para a utilização de isoenzimas na identificação de cultivares e certificação da pureza genética em milho, voltada para as condições brasileiras, há a necessidade de um estudo da variabilidade genética dos nossos híbridos e linhagens, com o objetivo de verificar o potencial das mesmas para tal finalidade, apesar da literatura confirmar seu potencial para as condições temperadas. Este tipo de trabalho, deve envolver as instituições de pesquisas, universidades e principalmente as empresas produtoras de sementes. Além disso, a escolha do tecido da planta a ser utilizado, nestes estudos, é de fundamental importância para o sucesso deste trabalho. O presente trabalho permitiu concluir que partes da plântula, como os coleótilos, têm os padrões isoenzimáticos menos alterados em função da presença de microrganismos, apesar da rapidez que as sementes impõem na obtenção dos resultados. A AOSA (1991) recomenda a utilização de várias isoenzimas entre elas a álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, glutamato-oxalacetato transaminase.

Com relação a utilização de zeínas, já existem metodologias proposta pela ISTA (1996), capazes de serem utilizadas com sucesso por nossos laboratórios e ao que parece estamos mais próximos da utilização de zeínas, do que as isoenzimas. Todavia, as isoenzimas não devem ser desconsideradas, uma vez que a literatura demonstra a contribuição das mesmas para tal finalidade. As zeínas juntamente

com as isoenzimas são ferramentas indispensáveis que auxiliam nas análises de identificação de cultivares e certificação da pureza genética.

Com relação a identificação de cultivares de milho, tem sido observado que a utilização de marcadores moleculares baseados na análise do DNA, tem sido crescente para a obtenção de “fingerprints” para fins de registro de materiais com a finalidade de obter a proteção legal. Tudo indica que a utilização de marcadores moleculares deverá ser incrementada, bem como a utilização de marcadores mais eficientes os quais possam garantir maior confiabilidade nos resultados obtidos. A utilização destes marcadores torna-se mais promissora em função da recente aprovação da lei de proteção de cultivares pelo governo brasileiro este ano.

Em síntese, o conhecimento e a aplicação de técnicas, tal como a eletroforese de isoenzimas e proteínas na identificação e principalmente, na certificação da pureza genética de cultivares, como teste de rotina em laboratórios de análise de sementes em nosso país, merece a atenção de todas as entidades envolvidas no processo de produção de sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Cultivar purity testing.**
Lansing, 1991.371p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing.**
Switzerland, 1996. 323p.

APÊNDICE

TABELA 1A. Resumo da análise de variância para os resultados do teste de germinação, potencial de germinação e tetrazólio da cultivar C-805-UFLA-MG, 1997.

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios		
		GERMINAÇÃO	POTENCIAL DE GERMINAÇÃO	TETRAZÓLIO
Tratamento	04	743,0625**	1072,1000**	973,6000**
Resíduo a	15	38,4500	144,9000	187,7333
Época	01	14137,6000**	2044,9000**	1960,0000**
Trat x Época	04	288,1625*	262,9000*	188,0000*
Resíduo b	15	91,3833	76,9000	74,1333
Médias		31,00	55,45	53,20
CVs		20,00	21,70	25,75
		30,84	15,82	16,18

** significativo a 1% pelo teste de F.

* significativo a 5% pelo teste de F.