




MARIA DAS GRAÇAS GUIMARÃES CARVALHO VIEIRA

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO MONITORAMENTO DA  
QUALIDADE SANITÁRIA E NÍVEL DE DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE  
ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do curso de  
Agronomia, área de concentração Fitotecnia,  
para a obtenção do título de "Doutor".

**Orientador**

Prof. JOSÉ DA CRUZ MACHADO



1. Título  
2. Controle de qualidade  
3. Fitotecnia  
4. Doença - Anticorpo - Rantulose  
5. Marcador molecular  
6. Bio



DATA

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1996

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

Vieira, Maria das Graças Guimarães Carvalho

Utilização de marcadores moleculares no monitoramento do nível de deterioração da qualidade sanitária de sementes do algodoeiro / Vieira, Maria das Graças Guimarães Carvalho. -- Lavras : UFLA, 1996.

118 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Algodão - Qualidade sanitária. 2. Marcador molecular. 3. Biotecnologia. 4. Eletroforese. 5. Doença - Antracnose - Ramulose. 6. Enzima. 7. Sementes - Controle de qualidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.5121

**MARIA DAS GRAÇAS GUIMARÃES CARVALHO VIEIRA**

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO MONITORAMENTO DA  
QUALIDADE SANITÁRIA E NÍVEL DE DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE  
ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 09 de maio de 1996



Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu



Prof. Dr. João Bosco dos Santos



Prof. Dr. Rubens Sader



Prof. Dr. Roberto Ferreira da Silva



Prof. Dr. José da Cruz Machado  
(Orientador)

**Aos familiares e amigos, ancoradouro  
seguro, durante todos estes anos**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José da Cruz Machado (orientador).

À José Caetano Vieira Neto, Leandro, Álvaro e Renato Carvalho Vieira.

Ao Prof. Dr. João Bosco dos Santos.

À Profª Drª Vania Déa de Carvalho.

À Drª Dulcinéia de Carvalho, Drª Edila Vilela de Rezende von Pinho, Drª Maria Laene Moreira de Carvalho, Renzo Garcia von Pinho, Maria de Lourdes de Rezende.

À Profª Ieda Carvalho Alves.

À Andréa de Lourdes Silva.

À todos os colegas de turma,

Aos Professores das disciplinas cursadas.

À todos os funcionários, estagiários e bolsistas do Setor de Sementes e Patologia de Sementes da UFLA.

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA, na pessoa de Luiz Carlos de Miranda.

À Universidade Federal de Lavras - MG (UFLA).

À COTTON - Tecnologia de Sementes S.A.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>RESUMO GERAL</b> .....	xii
<b>GENERAL SUMMARY</b> .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Viabilidade e Deterioração de Sementes.....	3
2.2 Interações Patógenos/Sementes.....	14
2.3 Uso de marcadores moleculares em controle de qualidade de sementes.....	17
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 1 - Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas associadas ao nível de deterioração de sementes de algodoeiro</b> .....	36
<b>RESUMO</b> .....	36
<b>SUMMARY</b> .....	37
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	38
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
2.1 Preparo das Sementes.....	41
2.2 Avaliações.....	42
2.2.1 Teste Padrão de Germinação.....	43
2.2.2 Teste de Tetrazólio.....	43
2.2.3 Teste de Emergência.....	43
2.2.4 Teste de Sanidade.....	44
2.2.5 Análise de Isoenzimas dos Isolados de <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e das sementes submetidas aos diferentes tratamentos.....	44
2.2.6 Análise de proteína dos Isolados de <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e das sementes submetidas aos diferentes tratamentos.....	45
2.3 Procedimentos Estatísticos.....	47

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70
<b>CAPÍTULO 2 - Diferenciação entre <i>Colletotrichum gossypii</i> South e <i>C.gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> Costa &amp; Fraga através de marcadores RAPD</b> .....	75
<b>RESUMO</b> .....	75
<b>SUMMARY</b> .....	76
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	77
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	80
2.1 Obtenção dos isolados fúngicos.....	80
2.2 Análise RAPD.....	81
2.3 Patogenicidade dos isolados.....	82
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	83
3.1 Análise RAPD.....	83
3.2 Patogenicidade dos isolados em plantas de algodão.....	87
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	89
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	90
<b>CAPÍTULO 3 - Uso de isoenzimas para diferenciação de <i>Colletotrichum gossypii</i> South e <i>C.gossypii</i> South var. <i>cephalosporioides</i> Costa &amp; Fraga Jr. isolados de sementes de algodoeiro</b> .....	94
<b>RESUMO</b> .....	94
<b>SUMMARY</b> .....	95
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	96
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	100
2.1 Obtenção e identificação morfológica dos fungos.....	100
2.2 Análise de isoenzimas de isolados de <i>C.gossypii</i> South e <i>C.gossypii</i> South, var <i>cephalosporioides</i> Costa & Fraga Jr.....	100
2.3 Verificação da patogenicidade dos isolados.....	101
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	103
3.1 Identificação e patogenicidade <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em plantas de algodão.....	103

3.2 Análise de isoenzimas.....	104
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>108</b>
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>111</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>115</b>



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Efeito dos tratamentos de desinfestação e inoculação de sementes de algodoeiro com duas espécies de <i>Aspergillus</i> , em separado, sobre a germinabilidade e sanidade (valores em percentagem) - UFLA - MG 1996.....	49
2	Efeito do envelhecimento artificial das sementes de algodoeiro desinfestadas e não inoculadas e inoculadas com duas espécies de <i>Aspergillus</i> , em separado, sobre germinabilidade e sanidade (valores percentuais) - UFLA - MG 1996.....	50
3	Efeito dos tratamentos de desinfestação e inoculação de sementes de algodoeiro com duas espécies de <i>Aspergillus</i> , em separado, submetidas ao envelhecimento artificial, sobre a germinabilidade e sanidade (valores percentuais) - UFLA - MG 1996.....	52
4	Efeito do tempo de envelhecimento artificial de sementes de algodoeiro submetidas a desinfestação e inoculação com duas espécies de <i>Aspergillus</i> , em separado, sobre a germinabilidade e sanidade (valores em percentagem) - UFLA - MG - 1995.....	53

## CAPÍTULO 2

Tabela	Página
1      Padrões eletroforéticos de bandas de DNA de 4 isolados de <i>C. gossypii</i> obtidos através de marcadores RAPD, UFLA - MG, 1995.....	84

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura		Página
1	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidas a envelhecimento artificial; da esquerda para a direita: (1) (2) (3) (4) sementes desinfestadas e não inoculadas, (5) (6) (7) (8) sementes inoculadas com <i>Aspergillus glaucus</i> , (9) <i>Aspergillus glaucus</i> , (10), (11), (12), (13) sementes inoculadas com <i>Aspergillus flavus</i> . UFLA-Lavras/MG, 1995.....	56
2	Atividades enzimáticas reveladas em géis de poliacrilamida a 7,5% de <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidas a envelhecimento artificial. UFLA-Lavras/MG, 1995.....	57
3	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidas a envelhecimento artificial; da esquerda para a direita: (1) (2) (3) (4) sementes desinfestadas e não inoculadas, (5) (6) (7) (8) sementes inoculadas com <i>Aspergillus glaucus</i> , (9) <i>Aspergillus glaucus</i> , (10) (11) (12) (13) sementes inoculadas com <i>Aspergillus flavus</i> , (14) <i>Aspergillus flavus</i> . UFLA-Lavras/MG, 1995.....	63

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
4	Atividades enzimáticas reveladas em géis de poliacrilamida a 7,5% de <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidas a envelhecimento artificial. UFLA-Lavras/MG,1995.....	64
5	Zimograma de proteínas solúveis e total de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com <i>Aspergillus glaucus</i> e <i>Aspergillus flavus</i> em separado, e submetidas a envelhecimento artificial. UFLA-Lavras/MG,1995.....	68

## CAPÍTULO 2

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Gel de agarose mostrando padrão dos produtos amplificados obtidos com os primers. A4 e A7 da marca Operon (da esquerda para a direita) (1), (2), (3) <i>C.gossypii</i> e (4) <i>C.gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , UFLA - MG -1995.....	85
2	Dendograma revelando as distâncias genéticas entre quatro isolados de <i>C. gossypii</i> , baseadas em marcadores RAPD. UFLA, MG, 1995. Isolados 1 - <i>C. gossypii</i> ; 2 - <i>C.gossypii</i> ; 3 - <i>C.gossypii</i> e 4 - <i>C.gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....	87

## CAPÍTULO 3

Figura		Página
1	Representação gráfica das atividades enzimáticas reveladas em géis de poliacrilamida a 7,5%, para os isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> South e <i>C. g south</i> var. <i>cephalosporioides</i> Costa & Fraga. 1. CGC-191; 2. HT-CG; 3. HT-CGC e 4. CG-189, UFLA, 1995.....	106

## RESUMO GERAL

VIEIRA, Maria das Graças Guimarães Carvalho. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).** Lavras: UFLA, 1996. 118p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)\*

O objetivo da presente pesquisa foi o desenvolvimento de metodologia mais segura e rápida de avaliação da qualidade sanitária e fisiológica de lotes de sementes de algodoeiro visando a assegurar o controle de qualidade dessa espécie. Os estudos foram conduzidos utilizando-se dos recursos da biotecnologia voltada para a área de sementes. Primeiramente foi enfocada a viabilidade do uso de variações eletroforéticas nos padrões de proteína e isoenzima como objetivo de detectar o nível de deterioração das sementes do algodoeiro. Os resultados deste estudo indicaram que as bandas de proteínas e isoenzimas podem atuar como marcadores bioquímicos nesse tipo de avaliação. Em etapas subsequentes o trabalho teve como objetivos a diferenciação entre *Colletotrichum gossypii* South e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando de marcadores moleculares RAPD e isoenzimas. Através dessas técnicas, foi possível diferenciar com segurança ambas as variedades de *Colletotrichum*, sendo que dentre os sistemas enzimáticos testados, a distinção dos isolados foi possível pela esterase, fosfatase ácida e peroxidase. As confirmações dos resultados desses testes sobre a identidade dos isolados testados, foram realizadas através de ensaios de inoculação em plantas de algodoeiro

---

\* Orientador: Prof. Dr. José da Cruz Machado. Membros da banca: Prof. Dr. João Bosco dos Santos; Prof. Dr. Rubens Sader; Prof. Dr. Roberto Ferreira da Silva e Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu

suscetíveis. Os resultados deste trabalho indicaram que os métodos estudados podem constituir-se em ferramentas das mais valiosas, com vistas ao seu emprego em sistemas de controle de qualidade de sementes de algodoeiro, contribuindo dessa forma para a melhoria da qualidade desse insumo em nossas condições.

## GENERAL SUMMARY

### Utilization of molecular markers in the monitoring health quality and deterioration level of cotton seeds

The present work aimed to develop more reliable and fast methods to indicate the health and physiological conditions of cotton seed lots, using biochemical and molecular techniques. The investigation was developed by looking at the possibility to identify biochemical and molecular markers that can give indication of the seed deterioration condition and detection of *Colletotrichum gossypii* and *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, which are both seed-transmitted and considered of great importance in Brasil. In the first work emphasis was given on the viability of using electrophoretic variations in protein and isoenzyme patterns aiming to detect the level of deterioration of the cotton seeds. The results of this work showed that protein and isoenzyme bands may be used as biochemical markers, being able to indicate the deterioration condition of cotton seeds. The second part of this study was dedicated to the possibility to differentiate both fungi by using isoenzymes and RAPD techniques. The results indicated that both techniques were able to distinguish the isolates of those *Colletotrichum* varieties. According to the enzymatic systems tested, was possible to differentiate these fungi through esterase, acid phosphatase and peroxidase patterns. The identity of all isolates studied, as revealed by the biochemical and molecular techniques, was confirmed by the pathogenicity tests, which demonstrated that those techniques are of great potential to be used in the quality control program for cotton seeds.



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O algodão tem sido considerado uma das principais culturas desde o início da civilização, sendo cultivado em cerca de 60 países numa faixa compreendida entre 40°N e 20°S. Apesar da competição de fibras sintéticas, a cultura do algodão permanece como principal fonte de material "in natura" para a indústria moderna. Atualmente, com a tendência crescente, por parte da população, de retorno ao uso desse tipo de material no vestuário, em face das vantagens que o mesmo propicia em relação aos produtos sintéticos, essa cultura volta a ocupar lugar de destaque dentre as demais em todo o mundo. Apesar de o algodão ser cultivado principalmente pelo valor de suas fibras, o óleo proveniente de suas sementes é usado tanto para consumo humano direto, quanto na fabricação de margarina. A torta de algodão produzida de resíduos de sementes, é também de alto valor na alimentação de ruminantes.

Segundo estatística de Oerke's (1990) apenas 15,9% do potencial da produção do algodoeiro tem sido atingido, sendo que as causas das perdas estimadas variam por região. Segundo o autor, atualmente 60% em média, da produção potencial pode ser atingida, quando se aplicam algumas medidas estratégicas de proteção de plantas.

No Brasil, dentre as principais variáveis que têm contribuído para essas perdas destacam-se o uso de sementes de má qualidade e a ocorrência de algumas doenças causadas por fungos; sendo que as mais importantes em termos de prejuízos, são disseminadas por sementes.

Em se tratando de sementes, os testes determinantes da qualidade fisiológica e sanitária em algodoeiro, não têm apresentado a precisão, rapidez e segurança exigidos pelo sistema de Produção de Sementes.

No presente trabalho, alguns aspectos metodológicos aplicados ao monitoramento da qualidade sanitária e fisiológica de sementes de algodoeiro foram desenvolvidos, utilizando-se dos recursos da biotecnologia voltada para a área de sementes. Foram consideradas três pesquisas, em que na primeira, buscou-se através de marcadores bioquímicos (proteínas e isoenzimas) detectar perda de germinabilidade de sementes de algodoeiro quando em associação ou não com microorganismos. As outras duas procuram diferenciar dois importantes fungos que ocorrem em lavouras de algodoeiro no Brasil e que são transmitidos por sementes, através de marcadores moleculares RAPD e isoenzimas. O motivo da utilização de métodos RAPD e isoenzimáticos se deve a importância que cada um oferece em termos da simplicidade de uso, rapidez e segurança de identificação para o sistema de controle de qualidade de sementes. A técnica RAPD, por utilizar diretamente o DNA, não sofre influências dos fatores que afetam a expressão gênica e por isso pode indicar com segurança e rapidez a presença ou não do patógeno associado às sementes. Por outro lado, a técnica não informa sobre a viabilidade do patógeno, o que faz com que seus resultados sejam questionáveis, podendo gerar decisões anti econômicas para o produtor. Os testes isoenzimáticos, por utilizarem produtos resultantes da expressão gênica, podem ter seus resultados alterados em função de condições de produção, mas têm, por outro lado, a vantagem de informar sobre a atividade do patógeno. A combinação dos dois testes pode significar uma estratégia segura de se conduzir o controle de qualidade de sementes de algodoeiro, quando portadoras de patógenos importantes cujas identidades são acentuadamente próximas e de difícil detecção por métodos tradicionais.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Sabe-se que a qualidade de sementes é determinada pelo somatório de atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários. Segundo Popinigis (1988), os atributos de qualidade assumem diferentes graus de importância em situações diversas. No caso específico de sementes de algodoeiro, a baixa qualidade fisiológica e sanitária tem se destacado como fator limitante na instalação e estabelecimento das lavouras (Tanaka e Paulinelli, 1984; Vieira et al., 1987; Sobreira, 1988; Vieira, 1988;) e preservação da qualidade na fase pós-colheita, motivo pelo qual, a presente revisão trata de aspectos de viabilidade, deterioração e associação patógenos/sementes.

### **2.1 Viabilidade e Deterioração de Sementes**

Germinação de sementes é um processo multifatorial resultante de ações recíprocas em equilíbrio de diferentes eventos metabólicos (Vazquez et al., 1991). Desta forma, definir causas específicas para baixa germinabilidade é uma tarefa extremamente complexa.

Embora muitas mudanças em atividades enzimáticas e respiratórias, em vias de síntese, em membranas, em compostos armazenados, em cromossomas, têm sido constatadas com a evolução do processo de deterioração de sementes, as causas primárias, local, natureza e sequência das reações químicas envolvidas nesse processo ainda permanecem em grande parte desconhecidas (Abdul-Baki e Anderson, 1972; Gil e Delouche, 1973 e Bewley, 1986).

A falta de esclarecimentos sobre as causas de deterioração segundo Roberts (1973), se deve ao grande volume de alterações citológicas e metabólicas que ocorrem no processo, o que torna difícil a identificação de causa e efeito a uma resposta deteriorativa específica.

Envelhecimento de sementes tem sido referido como consequência de processos metabólicos deficientes revelados durante a germinação, incluindo falha na respiração e funcionabilidade de membranas celulares (Parrish e Leopold, 1978; Duki et al., 1986; Wilson e McDonald, 1986; Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991), síntese de proteína e ácidos nucleicos (Bray e Das Gupta, 1976; Skadsen e Cherry, 1982; Thompson et al., 1987; Clarke e James, 1991; Aguilar et al., 1992) e metabolismo de DNA (Cheah e Osborne, 1978; Vazquez-Ramos et al., 1988; Melendez e Vazquez-Ramos, 1990; Vazquez et al., 1991; Zhou e Fu, 1992) dentre outros.

Abdalla e Roberts (1968) demonstraram, que a redução na qualidade fisiológica das sementes é acompanhada por aberrações cromossômicas, enquanto que Cherry e Skadsen (1983) comentaram que a perda de viabilidade é acompanhada por redução na capacidade de sintetizar proteínas, em função do declínio de ribossomo, RNA mensageiro e fatores citoplasmáticos.

Segundo Martins e Thiamann (1972), alterações degenerativas de sementes podem resultar da ativação e/ou repressão de genes para um envelhecimento programado.

Para Copeland e McDonald Jr. (1985), a medida que se processa a deterioração, a taxa respiratória diminui, culminando com a perda da germinabilidade. Neste processo os autores referem-se a respiração, como sendo a expressão da atividade de um grande número de enzimas, que atuam no metabolismo de reservas.

Segundo Murray (1984), o efeito negativo da deterioração de sementes sobre taxas respiratórias induz a um retardamento na degradação de reservas, prejudicando o desenvolvimento do embrião. Esse fato está ligado a diversos processos ou mecanismos entre os quais podem ser

destacados: (i) pobre desenvolvimento mitocondrial durante as fases iniciais da germinação, (Morahashi et al., 1981 e Pradet, 1982), (ii) fracasso de hidrólises enzimáticas (Rodriguez, 1991); (iii) oxidação de metabólitos derivados de hidrólises de reserva, (Woodstock et al., 1984) (iv) menor produção de ATP, (Anderson, 1977; Ching, 1982; Wang et al., 1990; Schell et al., 1991) (v) produção de voláteis endógenos a níveis tóxicos, tais como acetaldeído, etanol, (Woodstock e Taylorson, 1981; Zhang et al., 1994). Como resultado de tais alterações são relatados incremento da proporção de plântulas com anormalidades morfológicas, a lixiviação de solutos e maior suscetibilidade das sementes a microorganismos (Roberts e Ellis, 1982).

Dentre as teorias propostas para explicar o processo de deterioração, a da degeneração das membranas celulares e a da inativação enzimática têm sido as mais enfocadas (Villiers, 1973; Cherry et al., 1974; Mahaboob Basha e Cherry, 1976; Ross, 1978; 1983; Bewley, 1986; Wilson e McDonald Jr., 1986; Basavarajappa Shetty e Prakash (1991); Vázquez et al., 1991; Hendry, 1993; Trawatha, Tekrony e Hildebrand, 1995;). Segundo Koostra e Harrington (1973), o processo de envelhecimento teria como alteração bioquímica inicial a desestruturação do sistema de membranas ao nível celular, através da ação de radicais livres. Essa desestruturação de membrana, leva a um desequilíbrio na sua capacidade de regular o fluxo de solutos, em ambos sentidos, tanto a nível de célula como de organela. Essas mudanças ocorreriam nos ácidos graxos insaturados pela ação dos radicais livres (Wilson e McDonald Jr., 1986). Os ácidos graxos insaturados, em presença de oxigênio, produzem radicais livres e os hidroperóxidos insaturados (produtos primários). Estes sofrem novas reações produzindo os produtos secundários, que são compostos de menor peso molecular. Essa reação é acelerada por uma classe de enzimas denominada lipoxigenase (Lox), a qual pensa-se ser a principal contribuinte na peroxidação de lípidios e geração de radicais livres (Wilson e McDonald Jr., 1986). No entanto, Trawatha, Tekrony e Hildebrand (1995) em estudo para investigar se a inativação de um ou dois das três

isoenzimas Lox alteraria a armazenabilidade de sementes de soja, concluíram que apesar do conteúdo de ácido graxos livres ter aumentado à medida que a viabilidade e o vigor decresceram e ter havido formação de E - 2 - Hexenal, a perda de uma ou duas dos três isoenzimas Lox não afetaram a deterioração da referida leguminosa. Já Girard e Le - Meste (1992), verificaram ausência de relação entre níveis de radicais livres determinado por análise de ESR(Electron Spin Resonance) e viabilidade de sementes de trigo. Dawidowicz; Grzegorzewska e Podstolski (1992) detectaram decréscimos em fosfolípidios e aumento na exudação de fosfato com perda de viabilidade de sementes, sugerindo danos na membrana celular. Segundo esses autores três sintomas ultraestruturais possivelmente relacionados com deterioração foram observados: (i) redução de contraste de elétrons em todas as membranas celulares excluindo plasmalema. (ii) coalescência de pequenos corpos de lipídios de armazenamento a unidades maiores presumivelmente como resultado de degradação parcial de unidade de membranas e (iii) o aparecimento de inclusão protoplásmica armazenado no interior de corpos protéicos, possivelmente resultante de ruptura das unidades de membrana envolventes. Os autores ainda sugerem que a presença de centros fibrilares volumosos em nucléolos de sementes de baixa viabilidade pode ser a manifestação morfológica de danos induzidos por idade nos ácidos nucléicos.

Segundo Harman, citado por Carvalho (1994), a mais provável origem dos radicais livres seria a interação de enzimas respiratórias envolvidas na utilização de oxigênio molecular, principalmente enzimas contendo ferro e da ação da catalase sobre o peróxido de hidrogênio. Desta forma, os radicais livres seriam grupos que se formariam por efeito de radiações ionizantes, pela quebra de oxigênio molecular; pela ação de enzimas de metais de transição e através de processos metabólicos normais, Harman, citado por Carvalho (1994).

A membrana do mitocôndria, por ser rica em lipídios insaturados e devido à presença de cristas, o que aumenta o efeito de superfície, apresenta mais intensamente essa peroxidação. Além do efeito que essa peroxidação exerce sobre a permeabilidade, ela interfere também na atividade respiratória, por quebrar o gradiente protônico, necessário para manter o acoplamento respiratório (Wilson e McDonald Jr., 1986).

A perda na integridade da membrana plasmática tem sido demonstrada em sementes envelhecidas pela proporção de componentes citoplasmáticos lixiviados para o meio externo, Ghosh, Adhikary e Banerjee, (1981) e pela atividade de certas enzimas.

Com relação às alterações no conteúdo de lipídios, a maioria dos pesquisadores, a exemplo de Koostra e Harrington (1973), Villiers (1973); Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991); Dawidowicz e Podstolski (1992), Pammenter; Adamson e Berjak; Harman e Mattick; Berjak; Gorecki e Harman; Flood e Sinclair, citados por Carvalho (1994), tem verificado que a deterioração leva a uma redução na quantidade de lipídios na semente, ao passo que Priestley, McBride e Leopold. (1980), Powell e Harman (1985) não detectaram redução deste componente associado à deterioração. Vertucci (1992), além de detectar mudanças em conteúdo de lipídios de sementes, com a perda de viabilidade durante armazenamento, afirma que essas mudanças podem ser medidas por calorimetria de varredura diferencial.

Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), detectaram em sementes envelhecidas por 96 horas, queda em fosfolipídios total, aumento no total de ácido graxos e aumento na atividade de fosfolipase A; enzima que segundo o autor, atua sobre fosfolipídios da membrana e libera ácidos graxos. Esse aumento de atividade indica perda de fosfolipídios de membrana e subsequente peroxidação de lipídios. Os autores, também observaram decréscimo na atividade de peroxidase com envelhecimento, o que pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de O<sub>2</sub> e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana e consequente produção de

compostos secundários, de peroxidação de lipídios, tais como malonaldeído e conjugados de lipídios. Por outro lado, radicais livres e peróxidos de hidrogênio, produzidos a partir de várias reações metabólicas, poderiam ser eliminados pela ação de enzimas "SCAVENGER" (removedoras), como a catalase e peroxidase de hidrogênio. Também foi observado pelos referidos autores, perda de ascorbato durante envelhecimento, reforçando possíveis peroxidações de lipídios e aumento em labilidade de membrana.

Jeng e Sung (1994), Sung e Jeng (1994), observaram que envelhecimento artificial estimulou a peroxidação de lipídios e reduziu a atividade de enzimas removedoras de peróxido, tais como superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase, motivo pelo qual, sementes envelhecidas acumularam mais peróxidos do que as não envelhecidas. Outras enzimas como fosfatase ácida e fosfomonoesterase tiveram suas atividades reduzidas após o tratamento de envelhecimento. Por se tratarem de enzimas envolvidas na manutenção de um "pool" constante de fosfato celular, elas podem afetar o metabolismo de fosfato nas sementes, influenciando a mudança de energia de adenilato, mais particularmente os nucleotídeos e suas taxas, pontos-chaves na regulação metabólica. (Basavarajappa, Shetty e Prakash 1991).

Segundo Trelease (1984), durante os primeiros estágios de crescimento de plântulas provenientes de sementes oleaginosas, os lipídios que estão armazenados nos cotilédones são utilizados e convertidos para sacarose via ciclo glioxilato, para suportar o crescimento do eixo embrionário. Nota-se pois que o decréscimo no crescimento de plântulas provenientes de sementes envelhecidas, pode estar associado com o decréscimo de liase isocitrato (ICL) e malato sintase (MS), que exercem papel-chave na conversão de lipídios para sacarose (Trelease, 1984; Fu et al., 1988).

Numerosas tentativas têm sido feitas visando a correlacionar quedas na viabilidade de sementes com decréscimo na atividade de certas enzimas. Oxidases, catalases, peroxidases e



fenolases, foram as primeiras enzimas investigadas nesse sentido (Crocker e Harrington, 1918). Posteriormente, mudanças em atividade da amilase, citocromo oxidase, ácido glutâmico descarboxilase e desidrogenase, dentre outras, vêm sendo investigadas em relação ao processo de perda de viabilidade de semente. (Throneberry e Smith, 1955; Walter, 1963 e Anderson, 1970). Segundo Throneberry e Smith (1955) estas enzimas desempenham importante papel na mobilização e utilização de nutrientes de reserva no processo germinativo. Mcharque citado por Abdul-Baki e Anderson (1972), classificou em três níveis de qualidade (alto, médio e baixo) sementes de nove espécie de plantas, com base na atividade de peroxidase. Throneberry e Smith (1955), relataram correlação positiva entre germinabilidade de sementes de milho e atividade de citocromo oxidase, desidrogenase málica e álcool desidrogenase.

Chauhan; Gopinathan e Babu (1985), trabalhando com esterase, fosfatase ácida e glutamato oxaloacetato transaminase, em sementes secas e germinadas de soja e cevada submetidas a envelhecimento artificial, concluíram que os perfis eletroforéticos são específicos para cada espécie. Seus resultados indicaram um aumento, tanto em soja quanto em cevada, do número de bandas de esterase e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) para sementes secas envelhecidas artificialmente. Os autores também observaram de uma maneira geral, mudanças qualitativas em enzimas de sementes envelhecidas artificialmente e sugerem que essas mudanças sejam devidas ao aumento da atividade metabólica, que conduzem à deterioração. Ao todo, foram encontradas 16 bandas de esterase para soja e 14 para a cevada e nenhuma dessas bandas se encontravam uniformemente presentes em todos os tratamentos. Em relação a fosfatase ácida e GOT, foram encontradas 6 e 5 bandas para soja e 8 e 8 para a cevada, respectivamente. Para as duas espécies o número de bandas dessas enzimas decresceram com o aumento do período de envelhecimento.

Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) em estudo sobre deterioração de membrana e outras mudanças bioquímicas em sementes de milho envelhecidas artificialmente, encontraram decréscimo na atividade de peroxidase, fosfatase ácida, fosfomonoesterase e desidrogenase e aumento na de fosfolipase A. Segundo os autores, um substancial aumento no total de aminoácidos livres e na atividade de amilase e protease confirmaram a degradação de biomoléculas armazenadas em sementes, durante o período de envelhecimento. Rajagopal e Sen-Mandi (1992), em estudos da atividade de fosfatase alcalina e ácida em embriões de sementes de arroz, concluíram que a atividade de fosfatase alcalina decresceu com o envelhecimento tanto natural quanto artificial, enquanto a fosfatase ácida apresentou maior atividade em sementes envelhecidas artificialmente, em relação às envelhecidas naturalmente e não envelhecidas. Perl, Luria e Gelmond (1978), observaram aumento em atividade de protease durante envelhecimento de sementes de sorgo. Somen Nandi e Swatt Senmandi (1995), sugerem que a atividade de  $\beta$  amilase é um indicador real da viabilidade de sementes de arroz. Shatters et al. (1994) em estudo envolvendo o efeito do envelhecimento artificial e "priming" sobre enzimas específicas de sementes de soja, concluíram que atividade de malato desidrogenase (MDH), foi a menos afetada pelos tratamentos de envelhecimento. A atividade da glutamato desidrogenase (GDH) foi reduzida em 17% após 48 horas de envelhecimento artificial e quase completamente perdida após 96 horas. Após 48 horas de envelhecimento artificial houve uma queda de duas isoenzimas esterases na proporção de 77%, no entanto, a esterase total teve sua atividade aumentada.

Hamill e Bewbaker (1969) citam que a atividade das peroxidases tem grande correlação com a viabilidade de sementes. Agrawal (1988), menciona que em sementes ortodoxas, tem sido observado durante o armazenamento, um decréscimo em atividade de PEP carboxilase e RUBP carboxilase e um incremento em atividade de protease. Segundo o autor, esse incremento da atividade de protease pode ser responsável pelo decréscimo na atividade de outras enzimas.

As proteínas podem também sofrer mudanças de configuração resultante da quebra parcial ou desdobramento de estrutura, condensação para formar polímeros e degradação para subunidades. Essas mudanças de configuração têm sido também consideradas como uma forma de estimar a viabilidade e estágio de deterioração de sementes.

Nesse sentido vale ressaltar trabalhos de alguns pesquisadores que de uma forma diferenciada tratam desse aspecto. De modo geral, evidências são apresentadas reforçando a possibilidade de se utilizar de marcadores bioquímicos (proteínas) para estimar a condição fisiológica de uma semente. Como exemplos podem ser referidos inicialmente os trabalhos de Prasad e Pathak (1987), que observaram a degradação de substrato como amido, açúcar total e proteína em sementes de milho. A redução de metabólitos essenciais, incluindo perdas de reservas de alimentos, foi relatado por Roberts (1972), como um dos fatores importantes para perda de viabilidade de sementes em geral. Nauttyal, Thapliyal e Purohtt (1985), relataram um nível bastante inferior de proteína em sementes de *Shorea robusta* não viáveis em relação a sementes viáveis. Basavarajappa; Shetty e Prakash (1991) observaram decréscimo de 50% no conteúdo de proteína solúvel em H<sub>2</sub>O no final do período de envelhecimento de sementes de milho. Chauham; Gopinathan e Babu (1985) encontraram tanto em sementes secas de soja como em cevada, incremento do número de bandas de proteína, com o aumento do período de envelhecimento. Segundo o autor, os perfis eletroforéticos de proteína e enzimas de sementes com envelhecimento prolongado assemelham-se àqueles de sementes não envelhecidas porém germinadas pelo período de 24 a 48 horas. Dell'Aquila (1994), em sementes de trigo, demonstrou que padrões de proteína foram afetados pelo envelhecimento. Os resultados sugerem, segundo o autor, que mudanças bioquímicas requeridas para germinação são gradualmente opostas às requeridas no processo de deterioração e que alguns polipeptídios recém sintetizados podem ser considerados como marcadores na avaliação de sobrevivência de sementes submetidas ao estresse por envelhecimento.

No entanto, Reuzeau, Goffner e Cavalie (1992), analisaram composição de proteína de sementes de girassol para identificar um possível marcador na avaliação da viabilidade de sementes recém colhidas e após armazenamento sob condições ambiente. Segundo os autores a relação precisa entre composição protéica e estimativa de germinabilidade pode não ser determinada. Varier e Dadlani (1992), também encontraram que o padrão de bandas de proteínas solúveis, em algodão, não foi afetado pelo envelhecimento natural, a despeito de considerável perda de viabilidade. Entretanto, sob envelhecimento artificial, diferenças marcantes nos perfis de proteína foram observados, mesmo quando havia somente um decréscimo no vigor e não em viabilidade de sementes.

A interferência de alguns fatores associados intimamente com as sementes, como é o caso da ocorrência de determinados fungos nesta interação, pode determinar modificações significantes nos padrões protéicos de sementes. Isto tem sido abordado em alguns estudos de Cherry, Mayne e Ory (1974); Cherry, Young e Beuchat (1975); Cherry, Beuchat e Young (1976); Cherry, Beuchat e Koehler (1978) em que perfis eletroforéticos de padrões de proteínas extraídas de sementes são distintamente modificados como resultado de infecção por certos microorganismos. Os resultados do estudo envolvendo interação de sementes de amendoim viáveis e *Aspergillus* sp, sugeriram que aminopeptidase de leucina, esterases, peroxidases, oxidases, catalases entre outras enzimas foram responsáveis por estas alterações protéicas nas sementes. Segundo Cherry, Mayne e Ory (1974) muitas enzimas extraídas de sementes de amendoim permaneceram ativas durante a invasão de *Aspergillus*, sendo que em algumas circunstâncias a intensificação de atividade foi correlacionada com enzimas extraídas do micélio de fungo coletado da superfície de sementes infectadas. Cherry, Beuchat e Koehler (1978) em trabalho com o objetivo de detectar mudanças em padrões eletroforéticos de proteína solúvel e certas enzimas de sementes de amendoim infectadas com *Aspergillus flavus*, detectaram

decréscimo em proteína solúvel de sementes infectadas e diferenças em zimogramas de esterase, leucina-aminopeptidase, fosfogluconato, álcool desidrogenase, fosfatase ácida e alcalina de sementes infectadas em relação as não infectadas. Por outro lado, bana peptidase, malato desidrogenase e catalase não apresentaram dissimilaridade entre os tratamentos controle e infectados.

O aumento da atividade das peroxidases também vem sendo associado a alterações na integridade celular em decorrência de infecção de patógenos em sementes. Jenings, Brannaman e Zscheile Jr. (1969) observaram maior atividade das peroxidases em plantas de milho após a inoculação com *H.carborum*. Segundo Goodmam e Stuber (1983) tem havido, em milho, um crescimento do número de estudos com isoenzimas envolvidas em processos respiratórios e de degradação de tecidos pela infecção de microorganismos, tais como álcool desidrogenase, catecol oxidase, peroxidase e esterases.

Embora mudanças em atividade enzimática em sementes deterioradas têm sido descritas desde 1930 (Revisão de Priestley, 1986), segundo Shatters et al. (1994) a maioria das mudanças não apresenta consistência a um mesmo nível, durante deterioração de espécies e variedades semelhantes, pois pouco tem sido feito para determinar a natureza dessas mudanças. Segundo o autor, não é conhecido se essas mudanças aparecem independentemente baseadas na suscetibilidade individual da proteína para estresse físico ambiental, presente durante armazenamento, ou se elas são o resultado de um simples evento, tais como, ativação de proteases ou outros processos celulares que poderiam finalmente afetar a função de muitas enzimas.

## 2.2 Interações Patógenos/Sementes

X Os estudos sobre perda de qualidade de sementes devido à ação de microorganismos, têm sido centrados em maior escala em fungos, de campo e de armazenamento.

EV Reduções significativas na produção do algodoeiro em função da ocorrência de várias doenças, cujos agentes causais são transportados e/ou transmitidos pelas sementes, destacando entre outros organismos, *Colletotrichum gossypii* South e Fraga causador da antracnose, *Colletotrichum gossypii* South e Fraga var. *cephalosporioides* agente causal da ramulose, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Botryodiplodia theobromae*, têm sido relatados por diversos autores (Tanaka e Paolinelli, 1984; Pizzinato, 1986 e Sobreira, 1988). Além desses microrganismos conhecidamente patogênicos à cultura, ocorrem também nas sementes inúmeros outros microrganismos cuja patogenicidade ainda não foi propriamente pesquisada, incluindo-se alguns fungos de armazenamento, que têm sido mencionados por inúmeros autores, a exemplo de Menezes, Bezerra e Ramos (1979); Richardson, (1979); Soave e Cia, (1980); Gerardi, (1981); Pizzinato, Soave e Maeda (1983); Soave, (1983); Tanaka e Paolinelli, (1984); Lima, Vieira e Carvalho (1984); Vieira et al., (1987); Sobreira, (1988).

Atualmente, dentre os fungos patogênicos, ao algodoeiro no Brasil, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* é considerado o mais importante, em virtude das perdas e prejuízos causados na cultura. (Carvalho et al., 1984; Lima, Vieira e Carvalho, 1984, Lima et al., 1985; Pizzinato e Cia, 1987; Tanaka, 1990; Machado, 1994 e Pizzinato, 1994).

—> Em relação aos fungos de armazenamento, segundo Tervet (1945), Christensen e Kaufmann (1965), Christensen (1967, 1973), Moreno e Christensen (1970), Neergaard (1977), Moreno (1979), Mondal, Mandi e Nandi (1981), Kabeere e Taligoola (1983 ) e Berjak (1987), Moreno et al. (1994), algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são comuns e causam danos

a sementes de várias espécies durante o armazenamento. É crescente a importância que esses fungos exercem no processo deteriorativo de sementes, causando reduções parciais e/ou totais da viabilidade. De acordo com estatísticas da F.A.O., citadas por Berjak (1987), 5 a 30 % da colheita anual de sementes são perdidas como resultado da atividade de fungos de armazenamento, sendo que a faixa mais elevada dessas perdas ocorre em países tropicais e subtropicais. Essas perdas são devidas ao decréscimo em germinação, várias mudanças bioquímicas, descoloração de sementes, produção de micotoxinas, aquecimento e boloramento (Christensen, 1972).

X X → Segundo Berjak (1987), a redução de vigor e de germinação de sementes ocorre antes mesmo que apareçam sinais externos indicadores da invasão dos referidos fungos. Em seus trabalhos com sementes de milho, envelhecidas artificialmente, a autora tem detectado que certas alterações ultraestruturais que caracterizam processos de envelhecimento aparecem mais precocemente em sementes infectadas do que nas não infectadas. Efeitos sobre a germinação de sementes têm sido constatados por vários pesquisadores em relação a diferentes espécies de *Aspergillus* em diversas circunstâncias. Dhingra, Nicholson e Sinclair (1973), observaram por exemplo, que *A. flavus* foi o responsável pela redução da germinação de sementes de soja, sendo também relatado por Gupta e Schmitthenner e McDonald Jr. (1993) em relação a *A. niger*, o qual ocasionou maior prejuízo em germinabilidade que *A. glaucus*. Espécies de *Aspergillus* estão dentre os fungos que têm sido isolados com frequência em campos de produção de sementes de algodoeiro (Ashworth, McMeans e Brown, 1969; Ashworth et al., 1971; Christensen, Olafson e Geddes, 1949; Mayne, 1956; Simpson et al., 1973). Ao lado de *Rhizopus*, *A. niger* e *A. flavus* têm sido os fungos mais comumente isolados de amostras de sementes de algodão deterioradas (Haloïn, 1974, 1975). Berjak (1987), cita aspectos ultraestruturais que podem caracterizar a condição de deterioração de células embriônicas de sementes infectadas e ressalta que essas mudanças são distintas daquelas características da progressão deteriorativa por envelhecimento.

Entretanto, a autora ressalta que em estágio avançado de deterioração, a situação subcelular é semelhante tanto se ocasionada por envelhecimento ou por atividade fúngica.

→ Consideráveis mudanças bioquímicas ocorrem em sementes infectadas como resultado de atividades fúngicas (Berjak, 1987). Patógenos de plantas têm habilidade de secretar enzimas líticas capazes de degradar polissacarídeos de parede celular de plantas (Fisher, Anderson e Albersheim 1973). Albersheim e Anderson (1971), Bateman e Miller (1966), Garibaldi e Batman (1971), Mahaboob Basha e Cherry (1978), Cherry, Mayne e Ory (1974); Cherry, Young e Beuchat (1975); Cherry, Beuchat e Young (1976) têm estudado com maiores detalhes a interrelação de fungos de armazenamento e sementes de amendoim. Os resultados mostraram que mecanismos bioquímicos dos organismos saprófitas (ou fracamente patogênicos) funcionaram eficientemente e sistematicamente para o benefício dos fungos às expensas das sementes. Os sistemas estudados incluíram degradação proteolítica de proteínas de armazenamento para pequenos polipeptídeos e amino ácidos livres, hidrólise enzimática de ligações estéres e descomposição, interação hormonal e/ou oxidação de substratos orgânicos com peróxidos de hidrogênio do fungo. Foi demonstrado que padrões eletroforéticos de proteínas extraídas das sementes viáveis são distintamente modificados pela infecção de espécies de *Aspergillus* e outros fungos de armazenamento. Muitas das isoenzimas associadas a esses processos bioquímicos em sementes infectadas foram também observadas em zimogramas dos extratos de tecidos fúngicos.

Em trabalho sobre uso de proteínas solúveis e enzimas como indicadoras de alterações em sementes de amendoim infectados com *A. flavus*, Cherry, Beuchat e Koehler (1978) observaram que proteínas solúveis decresceram em sementes infectadas, e que houve decomposição de proteínas de alto peso molecular, como Araquinin, para produzir proteínas de baixo peso molecular e polipeptídeos, o que foi evidenciado por grande número de bandas que movem rapidamente em géis eletroforéticos desenvolvidos a partir de extratos infectados. Essas



proteínas são, sem dúvida, hidrolizadas para produzir fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento fúngico.

Trabalhos de Krupa e Bandstrom; Zscheile, citados por Cherry, Beuchat e Koehler (1978) têm demonstrado também que proteínas dos tecidos vegetais servem como fontes substanciais de nutrientes para desenvolvimento dos fungos durante o processo da infecção. Embora, segundo os autores, os padrões eletroforéticos de proteínas solúveis possam ser usados para fornecer alguma indicação de infestação fúngica, estes, não dão um diagnóstico de quais são as espécies fúngicas ou mesmo o gênero responsável pela deterioração. Foi possível por meio de diferenças observadas nos zimogramas de esterase, leucina aminopeptidase, fosfogluconato, álcool desidrogenase e atividade de fosfatase ácida e alcalina distinguir sementes infectadas de não infectadas. Dentre essas enzimas, fosfatase alcalina por não estar normalmente presente em sementes de amendoim, se apresentou como um valioso indicador de degradação fúngica. Bana peptidase e catalase não apresentaram diferenças entre extratos de sementes infectadas e não infectadas.

### **2.3 Uso de marcadores moleculares em controle de qualidade de sementes**

Muitas áreas de pesquisas em plantas requerem o uso de algum tipo de marcador para avaliar os propostos estabelecidos. Isoenzimas e vários compostos secundários de processos metabólicos, têm sido e podem ser valiosos para determinados estudos biológicos. O conhecimento dos processos de deterioração, envolvendo reações em diferentes níveis e intensidade, é fundamental na busca de marcadores que revelem com a máxima segurança a condição do material em exame.

A nível molecular muitas mudanças em bioquímica de sementes têm sido correlacionadas com deterioração de sementes. Dentre estas pode-se citar, mudanças em conteúdo e composição de macromoléculas incluindo lipídios (Parrish e Leopold, 1978; Jain e Shivanna, 1989) ácidos nucléicos (Thompson, Bryant e Brocklehurst, 1987; Clarke e James, 1991), carboidratos (Milner e Geddes, 1946; Krober e Collins, 1948), proteínas (Priestley, 1986), nível de energia de sementes (ATP) (Ching, 1982) e integridade de membranas (Parish e Leopold, 1978; Duke et al., 1986), atividade de enzimas, (Mcharque citado por Abdul-Baki e Anderson, 1972; Chauhan, Gopinathan e Babu 1985; Basavarajappa, Shetty e Prakash 1991 e Agrawal, 1988).

Técnicas moleculares, baseadas na imunologia e análises de ácidos nucléicos, têm sido aplicadas em diversas áreas da micologia, o que tem gerado grandes perspectivas para o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de patógenos de plantas, comumente transmitidos por sementes. (Walker e Dougan, 1989; White et. al., 1989; Manicom et. al., 1990; Bej, Mahbuvani e Atlas, 1991; Nazar et al., 1991; Steffan e Atlas, 1991; Ball e Reeves, 1992; Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer, 1993).

A técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) tem sido usada recentemente, para investigar as relações filogenéticas de fungos fitopatogênicos em vários níveis taxonômicos, principalmente nos níveis de sub-espécies, variedades, *formae speciales* e raças fisiológicas (Coddington e Gould, 1992). No entanto, vários autores comentam que apesar de ser eficiente, esta técnica apresenta algumas desvantagens como: custo elevado, necessidade de rádio-isótopos e complexidades para ser utilizada rotineiramente (Coddington e Gould, 1992; Ball e Reeves, 1992 e Foster et al., 1993).

Outra técnica que tem sido bastante utilizada com o propósito de detecção e identificação de fungos é o PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação da Polimerase em Cadeia). Um dos primeiros usos do PCR em estudos de fungos, foi a amplificação das sequências

do DNA ribossomal (rDNA) e a determinação de sua relação evolutiva (White et. al., 1989). Desde então, inúmeros trabalhos científicos têm surgido, não somente de uma grande variedade de fungos, mas também de plantas e protistas (Kocher e White, 1989; Dehmer, Grandner e Wenzl, 1991). Em fungos, a utilização de técnicas moleculares pode ser exemplificada para algumas importantes espécies. Sherrif e Bailey (1991), trabalhando com sequenciamento de DNA ribossomal de 18 isolados de espécies de *Colletotrichum*, a maioria de gramíneas tropicais e leguminosas, conseguiram reunir estes isolados em 3 grupos distintos e comentam que este procedimento é uma técnica eficiente para se diferenciar em fungos fitopatogênicos. Outros trabalhos como os de Rollo, Salvi e Torchia (1990), envolvendo a identificação de *Phoma tracheiphila*, de Mills; Sreenivasaprasad e Brown (1992), que trabalharam com a identificação de *Colletotrichum gloeosporioides* e Henson et al. (1993) que detectaram DNA de *Gaeumannomyces graminis* em plantas cultivadas em solos infestados e sem infestação, são aplicações de grande relevância do uso de PCR na detecção e identificação de fitopatógenos.

A utilização da técnica de PCR oferece várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de detecção, dentre elas o fato de se dispensar o isolamento e cultivo axênico dos organismos para sua identificação final. Além disso, a utilização do PCR possibilita não só a avaliação específica, possuindo uma sensibilidade que permite detectar uma única molécula alvo, em um complexo de misturas, sem uso de sondas radioativas, como também se constitui num teste muito rápido e versátil. (Henson e French, 1993 e Foster et al., 1993). Por outro lado dificuldades ainda persistem neste teste como a necessidade do conhecimento da sequência do DNA a ser amplificado, para a obtenção dos primers. No entanto, com o surgimento da técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ), em 1990, que dispensa as informações de sequência do DNA, por utilizar primers aleatórios (Williams et al., 1990), faz com que essa técnica seja uma das mais viáveis para uso rotineiro, devido a sua rapidez e simplicidade, além de possuir um poder

equivalente ao RFLP para detecção de variabilidade genética especialmente em organismos haploides, como é o caso dos fungos. Trata-se de uma técnica indicada por vários autores como imprescindível em qualquer projeto de identificação genética de fungos (Foster et al., 1993; Henson e French, 1993; Willians e Kubelik, 1991). A técnica de RAPD apresenta diversas vantagens sobre as metodologias estabelecidas do RFLP, tais como: rapidez, podendo processar um grande número de amostras por dia; dispensa da utilização de sondas e radioisótopos, proporcionando redução no custo e aumento na segurança; utilização de menores quantidades de DNA e também, não são necessárias informações sobre as sequências nucleotídicas do genoma (Henson e French, 1993; Foster et al., 1993; Guthrie et al., 1993; Schafer e Wostemeyer, 1992; Sellstedt et al., 1992; Sreenivasaprasad, Brown e Mills, 1992; Vaillancourt e Hanau, 1992; Welsh et al., 1992; Caetano-Anolles, Bassam e Gresshoff, 1991; Crouwhurst et al., 1991). Contudo, para o uso desta técnica deve-se trabalhar com culturas puras do organismo, pois os “primers” sendo aleatórios, podem amplificar qualquer molécula de DNA que esteja na mistura, (Henson e French, 1993; Caetano-Anolles, Bassam e Gresshoff, 1991). Como exemplos da aplicação da técnica do RAPD, podem ser citados, entre outros, os trabalhos de Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer (1993), que conseguiram sucesso na identificação da raça 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* entre três outras; os de Guthrie et al. (1993) que trabalharam com *Colletotrichum graminicola*; os de Schafer e Wostemeyer (1992), que diferenciaram, com o uso dessa técnica, isolados agressivos e não-agressivos de *Phoma lingam*; os de Chowhurst et al. (1991), que trabalharam na diferenciação de 2 raças de *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* e Vilarinhos et al (1995) que caracterizaram raças de *Colletotrichum lindemuthianum* por esta técnica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F.H.; ROBERTS, E.H. Effects of temperature, moisture, and oxygen on the induction of chromosomal damage in seeds of barley, broad beans, and pea during storage. **Annals of Botany**, Oxford, v. 32, n.125, p. 119-136, 1968.
- ABDUL-BAKI, A.A; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWISK, T.T. (ed.) **Seed Biology: germination control, metabolism and pathology**. New York: Academic Press, 1972. v.2, n.4, p.283-315.
- AGRAWAL, P.K. Seed deterioration during storage. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PHYSIOLOGY**, New Delhi, p.15-20, 1988.
- AGUILAR, R.; REYMOSO, E.; ALBORES, M.; SANCHEZ - DE - JIMENEZ, E. Changes in protein synthesis in embryonic axes after long-term storage of maize seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.4, p. 191-198, 1992.
- ALBERSHEIN, P.; ANDERSON, A. Host - pathogen interactions. III proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. **Proceedings of the National Academic Science, USA**, v.68, p.1815-1819, 1971.
- ANDERSON, J.D. Adenylate metabolism of embryonic axes from deteriorated soybean seeds. **Plant Physiology**, Lancaster, v.59, p.610-614, 1977.
- ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical differences in deteriorating barley seed **Crop Science**, Madison, v. 10, p. 36-9, 1970.
- ASHWORTH, L.J.; MCMEANS, J.L. Jr.; BROWN, C.M. Infection of cotton by *Aspergillus flavus*: the influences of temperature and aeration. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, p.669-673, 1969.

- ASHWORTH, L.J.; MCMEANS, J.L. Jr; HOUSTON, B.R.; WHITTEN, M.E.; BROWN, C.M. Mycoflora, aflatoxins and free fatty acids in California cottonseed during, 1967 - 1968. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Illinois, v.48, p.129-133, 1971.
- BALL, S.; REEVES, J. Application of rapid techniques to seed health testing- prospects and potential. In: DUNCAN, J.M.; TORRANCE, L. (ed.). **Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens**. Cambridge: University Press, 1992. p.193-207.
- BASAVARAJAPPA, B.S., SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.19, p.279-286, 1991.
- BATEMAN, D.F.; MILLER, R.L. Pectic enzymes in tissue degradation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.4, p.119-146, 1966.
- BEJ, A.K.; MAHBUVANI, M.H.; ATLAS, R.M. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v.26, p.301-334, 1991.
- BERJAK, P. Stored seeds: The problems caused by micro-organisms (with particular reference to the fungi) In: NASSER, L.C.; WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. (ed.). **Seed Pathology: International Advance Course, proceedings**. Brasília: ABRATES, 1987. p.38-50.
- BEWLEY, J.D. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from detereoration in storage. In: McDONALD, M.B.; NELSON, C.J. (eds). **Physiology of seed detereoration**. Madison: CSSA, 1986. cap.2, p.27-45. (CSSA special publication, 11).
- BRAY, C.M.; DASGUPTA, J. Ribonucleic acid synthesis and loss of viability in pea seed. **Planta**, Berlin, v.132, p.103-108, 1976.
- CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, New York, v.9, p. 553-557, 1991.
- CARVALHO, L.P.; CAVALCANTI, F.B.; LIMA, E.F.; SANTOS, E.O. Influência da ramulose nas características de fibra e produção do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p. 593-598, 1984.

- CARVALHO, N.M. O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.1-30.
- CHAUHAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.13, p.629-641, 1985.
- CHEAH, K.S.; OSBORNE, D. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. **Nature**, London, v.272, p.593-599, 1978.
- CHERRY, J.H.; SKADSEN, R.W. Nucleid acid and protein metabolism during seed deterioration. In: MC DONALD JR., M.D.; NELSON, C.J. **Physiology of seed deterioration**. Madison: CSSA, 1983. cap. 4, p. 65-87. (Special Publication, 11).
- CHERRY, J.P.; BEUCHAT, L.R.; KOEHLER, P.E. Soluble proteins and enzymes as indicators of change in peanuts infected with *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.26, p.242-245, 1978.
- CHERRY, J.P.; BEUCHAT, L.R.; YOUNG, C.T. Protein and aminoacid changes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds infected with *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.24, p.79-85, 1976.
- CHERRY, J.P.; MAYNE, R.Y.; ORY, R.L. Protein and enzymes from seeds of arachishypogae L. IX. Electrophoretically detected changes in is peanut cultivares grown in different areas inoculation with *Aspergillus parasiticus*, **Physiology Plant Pathology**, London, v.4, p.425-434, 1974.
- CHERRY, J.P.; YOUNG, C.T.; BEUCHAT, L.R. Changes in proteins and tree and total aminoacido of peanuts (*Arachis hypogaea*) infected with *Aspergillus parasiticus*, **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.53, p.2639-2649, 1975.
- CHING, T.M. Adenosine triphosphate and seed vigor. In: Khan A.A. (ed.). **The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination**, New York: Elsevier, 1982. p.487-505
- CHRISTENSEN, C.M. Microflora and seed deterioration. In: ROBERTS, E.H. **Viability of Seeds**. London: Chapman and Hall, 1972. p.59-93.

- CHRISTENSEN, C.M.; OLAFSON, J.H.; GEDDES, W.F. Grain storage studies VIII Relation of molds in moist stored cotton seed to increased production of carbon dioxide, fatty acids and heat. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.26, p.109-128, 1949.
- CHRISTENSEN, C.M. Germinability of seeds free of and invaded by storage fungi. **Proceedings Association of Official Seed Analysts**, v.57, p.141-143, 1967.
- CHRISTENSEN, C.M. Loss of viability in storage: microflora. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.1, p.547-562, 1973.
- CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Deterioration of stored grains by fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.3, p.69-84, 1965.
- CLARKE, N.A.; JAMES, P.E. The effects of priming and accelerated ageing upon the nucleic acid content of leek seeds and their embryos. **Journal of Experimental Botany**, London, v.42, p.261-268, 1991.
- COODINGTON, A.; GOULD, D.S. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. In: DUNCAN, J.M.; TORRANCE, L., (ed.). **Techniques for the rapid detection of plant Pathogens**. Cambridge: University Press, 1992. p.162-76.
- COPELAND, L.O.; McDONALD JR., M.B. **Principles of Seed Science and Technology**. New York, Mcmillan, 1985. 321p.
- CROCKER, N.; HARRINGTON, G.T. Catalase and oxidase content of seeds in relation to their dormency, age, vitality and respiration. **Journal of Agricultural Research**, Islamabad, v.15, p.137-74, 1918.
- CROWHURST, R.N.; GAWTHORNE, B.T.; RIKKERJNK, E.H.A.; TEMPLETON, M.D. Differentiation of *Fusarium solani* f.sp. Cucurbitae. **Current Genetics**, v. 20, p. 391-6, 1991.
- DAWIDOWICZ, GRZEGORZEWSKA, A.; PODSTOLSKI, A. Age related changes in the ultrastructure and membrane properties of Brassica napus L. seeds. **Annals of Botany**, London, v.69, n.1, p.39-46, 1992.
- DEHMER, K.J.; GRANER, A.; WENZEL, G. Screening by PCR for defined DNA sequences in minimal amounts of barley tissue. **Plant Breeding**, Berlin, v.107, p.70-72, 1991.



- DELL'AQUILA - A. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n.3, p. 293-298, 1994.
- DHINGRA, O.D.; NICHOLSON, J.F.; SINCLAIR, J.B. Influence of temperature on recovery of *Aspergillus flavus* from soybean seed. **Plant Disease Report**, Washington, v.57, n.2, p.185-187, 1973.
- DUKE, S.H.; KAKEFUDA, G.; HENSON, C.A.; LOEFFLER, N.L.; VAN HULLE, N.M. Role of the testa epidermis in the leakage of intracellular substances from imbibing soybean seeds and its implications for seeding survival. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.68, p.625-631, 1986.
- FISHER, M.L.; ANDERSON, A.J.; ALBERSHEIM, P. Host Pathogen Interactions. VI A single Plant Protein Efficiently Inhibits Endopolygalacturonases Secreted By *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*. **Plant Physiology**, Washington, v.51, p.489-491, 1973.
- FOSTER, L.M.; KOZAK, K.R.; LOFTUS, M.G.; STEVENS, J.J.; ROSS, K.I. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. **Mycology Research**, Great Britain, v. 97, n.7, p.769-781, 1983.
- FU, J.R.; LU, X.H.; CHEN, R.Z.; ZHANG, B.Z.; LIV, Z.S.; LI, Z.S.; CAI, D.Y. Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogea* L.) seeds with PEG to improve vigour and some biochemical activities. **Seed Science & Technology**, Zurich, v.16, p. 197-212, 1988.
- GARIBALDI, A.; BATEMAN, D.F. Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue. **Physiology Plant Pathology**, London, v.1, p.25-40, 1971.
- GERARDI, M.A.P. Sanidade de sementes de algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.7, n.3/3, p. 15-16, 1981.
- GHOSH, B.; ADHIKARY, J.; BANERJEE, N.C. Changes of some metabolites in rice seeds during ageing. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v.9, n.2, p.468-473, 1981.
- GIL, N.S.; DELOUCHE, J.C. Deterioration of seed corn during storage. **Proceeding of the Association of Official Seed Analysts**, Virginia, p. 63:33, 1973.

- GIRARD, J.; LE MESTE, M. Lack of relationship between free radical levels determined by ESR technique and viability of wheat seeds. *Comptes rendus de L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III SCIENCES DE LA VIE*, v. 314, n.9, p. 417-422, 1992.
- GOODMAN, M.N.; STUBER, C.W. Maize. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (ed.). *Isozymes in plant genetic and breeding*. Amsterdam, Elsevier Science, 1983. pt. B, p.1-31.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lisi*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 83, n.6, p. 612-14, 1993.
- GUPTA, I.J.; SCHMITTHENNER, A.F.; McDONALD, M.B. Effects of storage fungi on seed vigour of soybean. *Seed Science & Technology*, New Delhy, v.21, p.581-591, 1993.
- GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, St. Paul, v.82, p.832-835, 1992.
- HALLOIN, J.M. Effects of some storage fungi on cottonseed deterioration. *Belteide Cotton Prod*, v. 30, p.7-9, 1974.
- HALLOIN, J.M. Postharvest infection of cotton seed by *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus neger* and *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, st. Paul, v. 65, n.11, p. 1229-32, Nov. 1975.
- HAMILL, D.E.; BREWBBAKER, J.L. Isoenzyme polimorphis in flowering plants. IV The peroxidase isoenzymes of maize. *Physiology Plantarum*, Prague, v. 22, p. 945-58, 1969.
- HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity *Seed Science Research*, Wallingford, v.3, p.141-153, 1993.
- HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.31, p. 81-109, 1993.
- HENSON, J.M.; GOINS, T.; GREY, W., MATHRE, D.E.; ELLIOTT, M.L. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* Dna in plants grown in artificially-and naturally-infested soil. *Phytopathology*, St.Paul, v. 83, n.3, p.283-287, 1993.

- JAIN, A.; SHIVANNA, K.R. Loss of viability during storage is associated with changes in membrane phospholipid **Phytochemistry**, Elmsford, v.28, p.299-1002, 1989.
- JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.22, p.531-539,1994.
- JENINGS, P.H.; BRANNAMAN, B.L.; ZSCHEILE JR., F.P. Peroxidase and polyphenoloxidase activity associated with Helminthosporium leaf spot of maize. **Phytopathology**, St Paul, v. 59: p.963-967, 1969.
- KABEERE, F.; TALIGoola, M.K. Microflora and deterioration of soybean seeds in Uganda. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, p.381-392, 1983.
- KOCHER, T.D.; WHITE, T.J. Evolutionary analysis via PCR, in: ERLICH, H.A., (ed.) **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification**. New York: Stockton University Press, 1989. p.137-151.
- KOOSTRA, P.; HARRINGTON, J. Biochemical effects of age on membranal lipids of *Cucumis sativus* L. seed. **Proceedings International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.34, p.329-340, 1973.
- KROBER, V.A.; COLLINS, F.I. Effects of weather chamage on the chemical composition of soybeans. **Journal of American Oil Chemists Society**, Illinois, v.25, p.296-298, 1948.
- LIMA, E.F.; CARVALHO, J.M.F.C.; CARVALHO, L.P.; COSTA, J.N. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, através da sementes do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 99-109, 1985.
- LIMA, E.F.; VIEIRA, R.M.; CARVALHO, J.M.C. Influencia de *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* na deterioração de sementes de algodoeiro armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.3, p.555-560, 1984.
- MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p. 229-264, 1994.

- MAHABOOB BASHA, S.M.; CHERRY, J.P. Proteolytic enzyme activity and storage protein degradation in cotyledons of germinating peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.26, n.1, p.229-234, 1978.
- MAHABOOB BASHA, S.M.; CHERRY, J.P. Composition, solubility and gel eletrophoretic properties of proteins isolated from florunner (*Arachis hypogaea* L.) Peanut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.24, n.2, p.359-365, 1976.
- MANICOM, B.Q.; BAR-JOSEPH, M.; KOTZE, J.M.; BECKER, M.M. A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, p.336-339, 1990.
- MARTINS, C.; THIAMANN, R.V. The role of protein synthesis in the senescence of barley leaves 1. The formation of proteases. **Plant Physiology**, Washington, v.49, p.64-71, 1972.
- MAYNE, R.Y. Lipolytic microorganisms associated with prime and deteriorated cottonseed. **Applied Microbiology**, Washington, v.4, p.263-269, 1956.
- MELLENDEZ, S.; VÁZQUEZ - RAMOS, J.M. Estudios sobre la naturaleza y localizacion de la sintesis de ADN durante las etapas iniciales de la germinacion de maiz. **Revista de la Sociedad Quimica de México**, v. 14, p.354-359, 1990.
- MENEZES, L.M.; BEZERRA, J.L.; RAMOS, R.L.B. Microflora fúngica de sementes de quatro cultivares de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.1, p.129, 1979. (Resumos).
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Cambridge, v.98, p.137-144, 1992.
- MILNER, M.; GEDDES, W.F. Grain storage studies.III The relationship between moisture content, mold growth, and respiration of soybeans. **Cereal chemistry**, Minnessota, v.23, p.225-247, 1946.
- MONDAL, G.C.; MANDI, D.; NANDI, B. Studies on deterioration of some oil seeds in storage. I: variation in seed moisture, infection and germinability. **Mycology**, New York, v.63, n.1, p.157-166, 1981.

- MORAHASHI, Y; BEWLEY, J.D.; YEUNG E.C. Biogenesis of mitochondria in peanut cotyledons. Influence of the axis. **Journal of Experimental Botany**, London, v.32, p.605-613, 1981.
- MORENO - MARTINEZ, E.; VAZQUEZ - BADILLO, M.E.; NAVARRETE, R.; RAMIREZ - GONZALEZ, J. Effect of fungi and chemical treatment on viability of maize and barley seeds with different storage characteristics. **Seed Science & Technology**, New Delhi, v.22, p.541-549, 1994.
- MORENO, M.E.; CHRISTENSEN, C.M. Efectos de la humedad y hongos sobre la viabilidad de maiz almacenado. **Revista latino - americana de Microbiologia**, México, v.12, p.115-121, 1970.
- MORENO, M E. Efecto de los hongos de almacen sobre la viabilidad de las semillas de maiz y soya. **Boletin da Sociedade Mexicana Micologia**, Mexico, v.13, p.195-205, 1979.
- MURRAY, D.R. Axis - cotyledon relationships during reserve mobilization. In: MURRAY, D.R. (ed.). **Seed physiology**, New York: Academic Press, 1984. p.295.
- NAUTIYAL, A.R.; THAPLIYAL, A.P.; PUROHIT, A.N. Seed viability in sal. IV. Protein changes accompanying loss of viability in *Shorea robusta*. **Seed Science & Tecnology**, New Delhi, v.13, p.83-86, 1985.
- NAZAR, R.N.; HU, X. ; SCHMIDT, J.; CULHAM, D.; ROBB, J. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 39, p. 1-11, 1991.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Macmillan Press, 1977. v.1, 1191p.
- OERKE, E.C. **Non-cereal crops and plant protection**. Brussels: ECPA, 1990. n.p.
- PARRISH. D.J.; LEOPOLD. A.C. On the mechanism of ageing soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v.61, p.365-368, 1978.
- PERL, M.; LURIA, I.; GELMOND, H. Biochemical changes in sorghum seeds affected by accelerated ageing. **Journal of Experimental Botany**, London, v.29, p.497-509, 1978.

- PIZZINATO, M.A.; CIA, E.; FUZZATTO, M.G. Relação entre a severidade de ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.50-54, 1994.
- PIZZINATO, M.A.; SOAVE, J.; CIA, E.; MAEDA, J.A. Relação entre presença de patógenos, densidade e qualidade de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.9, n.1/2, p.47-48, 1983. (Resumo).
- PIZZINATO, M.A. Tratamento de sementes de algodão. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE SEMENTES, 2, Campinas, 1986. **Resumos...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.111-116.
- PIZZINATO, M.A.; CIA, E. Relação entre incidência de ramulose do algodoeiro em campo e detecção de *C.gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.13, p.15, 1987.
- POPINIGIS, F. Controle de Qualidade de Sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3, Lavras-MG, 1988. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1988. p.13-29.
- POWELL, A.A.; HARMAN, G.E. Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. **Seed Science & Tecnology**, New Delhi, v.13, n.3, p.659-667, 1985.
- PRASAD, T.; PATHAK, S.S. Impact of various storage systems on biodeterioration of cereal. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 40, n.1, p. 39-46, 1987.
- PRIESTLEY, D.A.; McBRIDE, B.; LEOPOLD, C. Tocopherol and organic free radicals in soybean seeds during natural and accelerated ageing. **Plant Physiology**, Washington, v.66, n.4, p.715-719, 1980.
- PRIESTLEY, D.A. **Seed ageing**. New York: Comstock Publication Association, 1986.
- PRADET, A. Oxidative phosphorylation in seeds during the initial phases of germination. In: KHAN, A.A. (ed.). **The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination**, New York: Elsevier Biomedical Press, 1982.

- RAJAGOPAL, A.S.M.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.20, n.2, p. 215-222, 1992.
- REUZEAU, C.; GOFFNER, D.; CAVALIE, G. Relation between protein composition and germination capacity of sunflower seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.4, p.223-230, 1992
- RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed borne diseases**. 3. ed. Zurich: ISTA, 1979. 320p.
- ROBERTS, E.H. Cytological, genetical and metabolic changes associated with loss of viability. In: ROBERTS, E.H. (ed.). **Viability of seed**. London: Chapman and Hall, 1972. p.253-306.
- ROBERTS, E.H. Loss of viability, ultrastructural and physiological aspcts. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.1, p.529-45, 1973.
- ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Physiological, ultrastructural and metabolic aspects of seed viability. In: KHAN, A.A. **The physiology and biochemistry of seed development. dormancy and germination**. New York: Elsevier Biomedical Press, 1982. p.367-389.
- RODRIGUEZ, P.M. **Actividad de  $\alpha$ -amilasa en aleuronas de semillas de trigo deterioradas**. México: UNAM, 1991. 87p. (Tesis - Maestria en Ciencia).
- ROLLO, F.; SALVI, R.; TORCHIA, P. Highly sesitive and fast detection of *Phoma tracheiphila* by polymerase chain reation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.572-6, 1990.
- ROSS, E.E. Precepts of success ful seed storage. In: Mc DONALD JR., M.D.; NELSON, C.S. (ed.). **Physiology of seed deterioration**. Madison: CSSA, 1983. cap.1, p.1-27. (CSSA Publication , 11).
- SCHAFER, C.; WOSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen **Phoma lingam (Leptosphaeria maculans)** **Journal Phytopathology**, Washington, v.136, n. 124-36, 1992.

- SCHELL, L.P.; DANEHOWER, D.A; ANDERSON, Jr., J.R.; PATTERSON, R.P. Rapid isolation and measurement of adenosine triphosphate levels in corn embryos germinated at suboptimal temperatures, *Crop Science*, Madisn, v.31, p.425-430, 1991.
- SELLSTEDT, A.; WULLINGS, B.; NYSTROM, U.; GUSTAFSSON, P. Identification of *casuarina-Fankia* strains by use of polymerase chain reaction (PCR) with arbitrary primers. *FEMS Microbiology Letters*, v. 93, p.1-6, 1992.
- SHATTERS, R.G.Jr, ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Science Research*, Wallingford, v.4, n.1, p.33-41, 1994.
- SHERRIFF, C.; BAILEY, J.A. Ribosomal DNA sequences as a means of establishing a phylogenetic taxonomy for the genus *Colletotrichum*, *IACR Report*, v.5, p. 55-56, 1991.
- SIMPSON, M.E.; MARSH, P.B; MEROLAR, G.V.; FERETTI, R.J.; FILSINGER, E.C. Fungi that infect cotton seeds before harvest. *Applied Microbiology*, Bulgaria, v.28, p.608-613, 1973.
- SKADSEN, R.W.; CHERRY, J.H. Quantitative changes in vitro and in vivo protein synthesis in ageing and rejuvenated soybean cotyledons. *Plant Physiology*, Washington, v.71, p.861-868, 1982.
- SOAVE, J.; CIA, E. Levantamento preliminar de fungos associados às sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 3, Jaboticabal, 1980. *Resumos...* Jaboticabal: UNESP, 1980. p.26.
- SOAVE, J. Diagnóstico da patologia de sementes de algodoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 7, n.1, p. 195-200, 1983.
- SOBREIRA, G.D. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no estado de Minas Gerais, safra 85/86.** Lavras - ESAL, 1988. 70p.(Tese MS).
- SOMEN NANDI, GITALI DAS; SWATI SEN - MANDI. B- Amylase Activity as an Index for Germination Potencial in Rice, *Annais of Botany*, London, v.75, p. 463-467, 1995.



- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.41, p.265-281, 1992.
- STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p.137-161, 1991.
- SUNG, J.M.; JENG, T.L. Peroxides scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, (in press).1994.
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 111p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TANAKA, M.A.S.; PAOLINELLI, G.D.P. Avaliação sanitária e fisiológica de sementes de algodão produzidas em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 6, n.1, p. 71-81, 1984.
- TERVET, I.W. The influence of fungi on storage, on seed viability and seedling vigor of soybeans. **Phytopathology**, Lancaster, v. 35, p.3-15, 1945.
- THOMPSON, S.; BRYANT, J.A.; BROCKLEHURST, P.A. Changes in levels and integrity of ribosomal RNA during seed maturation and germination in carrot (*Daucus carota* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v.38, p.1343-1350, 1987.
- THRONEBERRY, G.O.; SMITH, F.G. Relations of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability to corn seed viability. **Plant Physiology**, Washington, v.30, p.337-410-416, 1955.
- THRONEBERRY, G.O.; SMITH, K.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. **Plant Physiology**, Washington, v.30, p.337, 1955.
- TRAWATHA, S.E.; TEKRONY, D.M.; HILDEBRAND, D.F. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity **Crop Science**, Madison, v.35, p.862-868, 1995.
- TRELEASE, R.N. Biogenesis of glyoxysomes. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.35, p.321-347, 1984.

- VAILLANCOURT, L.J.; HANAU, R.M. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and sorghum. **Experimental Mycology**, New York, v.16, p. 219-229, 1992.
- VARIER, A.; DADLANI, M. Effects of ageing on profiles of soluble protein of cotton and esterase isoenzymes of pearl millet seeds. **Indian Journal of Plant Physiology**, Washington, v.35, n.2, p. 145-151, 1992.
- VÁZQUEZ - RAMOS, J.M.; LOPEZ, S.; VÁZQUEZ, E.; MURILLO, E. DNA integrity and DNA polymerase activity in deteriorated maize embryo axes. **Journal of Plant Physiology**, Washington, v.133, p.600-604, 1988.
- VÁZQUEZ, E.; MONTIEL, F.; VÁZQUEZ, RAMOS, M. DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. **Seed Science Research**, Wallingford, v.1, p. 269-273, 1991.
- VERTUCCI, C.W. Acalorimetric study of the changes in lipids during seed storage under dry conditions **Plant Physiology**, Washington, v.99, n.1, p.310-316, 1992.
- VIEIRA, M.G.G.C. Aspectos de integração, tecnologia e sanidade em estudos de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3, Lavras - MG, 1988. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1988. p.48-57.
- VIEIRA, M.G.G.C.; PITTIS, J.G.; MACHADO, J.C.; FRAGA, A.C.; SILVEIRA, J.F.; LAPOSTA, J.A.; SILVA, S.M. Identificação de fatores determinantes da baixa qualidade de alguns lotes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidos no Estado de Minas Gerais, safra 1985/86. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5, Gramado, 1987. **Resumos...** Brasília: ABRATES, 1987. p.89.
- VILARINHOS, A.D.; PAULO JR., T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the Random Amplified Polymorphic DNA Technique. **Fitopatol Brasileira**, Brasileira, v.20, n.2, p.194-197, 1995.
- VILLIERS, T.A. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. In: HEYDECKER, W. (ed.). **Seed Ecology**. Nottingham: ISA, Pennsylvania State university Press, 1973. p.265-288.
- WALKER, J.; DOUGAN, G. DNA probes: a new role in diagnostic microbiology. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.67, p.229-238, 1989.

- WALTER, J. Chemical reactivity of a macromolecule as function of its age. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 69, p.410-411, 1963.
- WANG, J; FUJIMOTO, K.; MIYAZAWA, T.; ENDO, Y.; KITAMURA, K. Sensitivities of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated ageing and their chemiluminescence levels. **Phytochemistry**, Elmsford, v.29, p. 3739-3742, 1990.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S.S., CHENG, R.; RALPH, D.; McCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.4965-4970, 1992.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GLEFAND, D.H., SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (ed.). **PCR protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic press, 1989. p.315-322.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, J.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p. 6531-6535, 1990.
- WILSON, JR., D.O.; McDONALD JR., M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, p.269-300, 1986.
- WOODSTOCK, L.W.; FURRMAN, K.; SOLOMONS, T. Changes in respiratory metabolism during ageing in seeds and isolated axes of soybean. **Plant Physiology**, Washington, v.25, p.15-26, 1984.
- WOODSTOCK, L.W.; TAYLORSON, R.B. Ethanol and acetaldehyde in imbibing soybean seeds in relation to deterioration. **Plant Physiology**, Maryland, v.67, n.3, p.424-428, 1981.
- ZHANG, M.; MAEDA, Y; FUTHATA, Y.; NORAMURA, Y-I; ESASHI, Y. A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Washington, v.4, n.1, p.49-56, 1994.
- ZHOU, X. Q.; FU, J.R. Studies on the correlation between seed vigor and DNA synthesis in the axis of peanut seed during early germination. **Acta Phytophysiological sinica**, Peking, v.18, n.4, p.393-398, 1992.

## Capítulo 1

### RESUMO

VIEIRA, Maria das Graças Guimarães Carvalho. **Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas associadas ao nível de deterioração de sementes de algodoeiro.** Lavras: UFLA, 1996 (Tese - Doutorado em Fitotecnia)\*

A presente pesquisa teve como objetivo a verificação da viabilidade do uso de técnicas eletroforéticas de isoenzimas e proteínas na determinação do nível de deterioração de sementes de algodoeiro, considerando-se, além do envelhecimento artificial, a presença e ausência de duas espécies de *Aspergillus*, que normalmente são encontradas associadas a lotes de sementes destinados à semeadura e que são causas frequentes de perda de qualidade de sementes desta espécie. As sementes foram submetidas ao envelhecimento artificial por zeroh, 96h, 120h e 168horas. As características de germinabilidade foram determinadas pelos testes, padrão de germinação, tetrazólio (germinação potencial) e emergência aos 7 e 28 dias. Eletroforese em gel de poli-acrilamida foi empregada para detectar polimorfismo em proteínas e sistemas enzimáticos. Fosfatase ácida, malato desidrogenase e esterase apresentaram aumento de atividade com o aumento do tempo de envelhecimento artificial, ao passo que 6 - fosfogluconato desidrogenase, hexoquinase, peroxidase e fosfoglucose isomerase apresentaram redução. As enzimas álcool desidrogenase, glutamato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase não tiveram seus padrões alterados. Os resultados indicaram que bandas de proteínas e isoenzimas podem atuar como marcadores bioquímicos na determinação do nível de deterioração de sementes de algodoeiro.

---

\* Orientador: Prof. Dr. José da Cruz Machado. Membros da banca: Prof. Dr. João Bosco dos Santos; Prof. Dr. Rubens Sader; Prof. Dr. Roberto Ferreira da Silva e Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu

## SUMMARY

### **Electrophoretic variations of proteins and isoenzymes associated with the deterioration process in cotton seed**

The present work aimed to verify the viability of the use of electrophoretic and isoenzyme patterns to detect the deterioration level in cotton seeds, considering artificial ageing and the presence of two species of *Aspergillus* which are often associated with seeds and are responsible for common losses during storage. The seeds were submitted to artificial ageing for 0, 96, 120 and 196 h. The characteristics of germinability were determined by the standard germination test, tetrazolium (germination and vigour potential), emergence at the 7<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days following seeding. Electrophoresis in polyacrylamid gels was employed to detect polymorphism in protein and enzymatic systems. Acid phosphatase, malate dehydrogenase and esterase enzymes showed a increased activities according to the ageing time, whereas, 6-phosphoglutamate dehydrogenase, hexokinase, peroxidase and phosphoglucose isomerase presented a decrease in their activities. The enzymes alcohol dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and glutamate oxaloacetate transaminase did not show any modification in their patterns. The results indicated that proteins and isoenzymes bands may be used as biochemical markers in the determination of the level deterioration condition of cotton seeds.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da agricultura, acompanhado de uma demanda cada vez mais crescente de tecnologia avançada, o aspecto qualidade cresce conseqüentemente em importância, desde que a meta final seja o estabelecimento de uma agricultura mais produtiva e autosustentável. Qualidade de um produto, segundo Montgomery (1985), significa adequação ao uso. Por tratar-se de um insumo vivo, e sujeito portanto a inúmeras interferências até a sua utilização, as sementes necessitam de permanente monitoramento quanto à sua condição biológica. Nesta direção a indústria de sementes tem solicitado o desenvolvimento de testes mais rápidos e seguros de modo a possibilitar o aprimoramento progressivo de seus programas de controle de qualidade interno, visando à produção e manutenção de lotes com alta qualidade.

Os atuais testes indicadores da qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro, não têm apresentado a precisão, rapidez e segurança requerida pela indústria sementeira. A exemplo do que ocorre com outras espécies, dificuldades têm sido constatadas para o algodão, motivo pelo qual, a pesquisa tem ultimamente procurado encontrar indicadores de deterioração nos processos de metabolismo de sementes. Neste sentido a produção e quantidade de certos metabólitos podem oferecer uma indicação mais realista da condição fisiológica de um lote. Exemplos como determinação de radicais livres por EPR (Buchvarov e Gantcheff, 1984; Priestley et al. 1985; Hepburn et al., 1986; Hendry et al., 1992; Girard e Le Meste, 1992;), mudanças na composição de ácidos graxos (Harman e Mattick, 1976; Priestley e Leopold, 1979; Francis e Coolbear, 1988; Pukacka, 1991); peroxidação de lipídios (Stewart e Bewley, 1980; Pearce e Abdel Samad, 1978;

Rudrupal and Nakamura, 1988; Hailstones e Smith, 1988), mudanças em antioxidantes (Fielding e Goldsworthy, 1980; Priestley, McBride e Leopold 1980; Gorecki e Harman, 1987; Pukacka, 1991), dão uma dimensão do nível de preocupação da pesquisa neste campo. No entanto, os resultados encontrados pelos diversos autores, para as diferentes espécies trabalhadas, não têm sido ainda consistentes.

Para Copeland e McDonald Jr. (1985), para medir a deterioração na sua essência, os testes mais sensíveis são aqueles que medem a atividade de certas enzimas associadas com a metabolização ou biossíntese em tecidos novos. Oxidases, catalases, peroxidases e fenolases, foram as primeiras enzimas investigadas nesse sentido (Crocker e Harrington, 1918). Posteriormente, mudanças em atividade da amilase, citocromo oxidase, ácido glutâmico descarboxilase e desidrogenase, dentre outras, vêm sendo investigadas em relação ao processo de perda de viabilidade de semente. (Throneberry e Smith, 1955; Walter, 1963 e Anderson, 1970). Segundo Throneberry e Smith, (1955) estas enzimas desempenham importante papel na mobilização e utilização de nutrientes de reserva no processo germinativo. Mcharque citado por Abdul-Baki e Anderson,(1972), classificou em três níveis de qualidade (alto, médio e baixo) sementes de nove espécie de plantas, com base na atividade de peroxidase, Throneberry e Smith (1955), relataram também correlação positiva entre germinabilidade de sementes de milho e atividade de citocromo oxidase, desidrogenase málica e álcool desidrogenase. Chauhan, Gopinathan e Babu (1985), trabalhando com esterase, fosfatase ácida e glutamato oxaloacetato transaminase, em sementes secas e germinadas de soja e cevada submetidas a envelhecimento artificial, concluíram que os perfis eletroforéticos são específicos para cada espécie. Basavarajappa; Shetty e Prakash (1991) encontraram decréscimo na atividade de peroxidase, fosfatase ácidas, fosfomono esterase e desidrogenase, e aumento para fosfolipase A, em sementes de milho envelhecidas artificialmente. Por sua vez, Perl, Luria e Gelmond (1978) observaram

aumento em atividade de protease durante envelhecimento de sementes de sorgo. Os resultados de trabalho de Somen Nandi e Swati Senmandi (1995), sugerem que a atividade de  $\beta$  amilase é um real indicador da viabilidade de sementes de arroz. Hamil e Bewbaker (1969) citam que a atividade das peroxidases tem alta correlação com a viabilidade de sementes. Trabalhos também têm sido desenvolvidos no sentido de detectar mudanças nos padrões de proteínas totais e solúveis associados com deterioração. Dentre estes, podem-se citar estudos de Roberts (1972); Chauham (1985); Nautiyal, Thapliyal e Purohit (1985); Prasad e Pathak (1987); Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991). No entanto, estudos têm mostrado que perfis eletroforéticos de padrões de proteínas extraídas de sementes de amendoim viáveis são distintamente modificados como resultado da ação de *Aspergillus sp.* e outros fungos interagidos com essas sementes (Cherry, Mayne e Ory, 1974; Cherry, Young e Beuchat, 1975; Cherry, Beuchat e Young, 1976; Cherry, Beuchat e Koehler, 1978).

A presente pesquisa objetivou verificar a viabilidade do uso de técnicas eletroforéticas de isoenzimas e proteínas na determinação do nível de deterioração de sementes de algodoeiro considerando-se além do envelhecimento artificial, a presença e ausência de duas espécies de *Aspergillus*, que normalmente são encontradas associadas a lotes de sementes destinados à semeadura e que são causas frequentes da perda de qualidade de sementes desta espécie.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Sanidade e Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras em 1995.

Foram utilizadas sementes de algodão deslintadas quimicamente, cultivar IAC - 20, cedidas pela Empresa COTTON - Tecnologia de Sementes S.A. - Uberlândia - MG, as quais foram uniformizadas pelo método de sedimentação em água e secas à sombra, temperatura ambiente, até atingir cerca de 13% de umidade.

### 2.1 Preparo das Sementes

A fração de sementes sedimentadas foi homogeneizada e dividida em três porções iguais (de aproximadamente 2 kg) pelo método de divisões sucessivas Brasil, (1992). Dessas três partes, uma foi superficialmente desinfestada com hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, e duas outras inoculadas com *Asperfillus flavus* e *Aspergillus glaucus*.

Os fungos utilizados na inoculação foram isolados de sementes de algodoeiro submetidas ao "blotter" test. Esses fungos foram transferidos para meio BDA e mantidos por 7 dias sob regime de 12 horas de luz negra, à temperatura de 20°C. Vencido esse período a suspensão de esporos foi feita acrescentando 10ml de água esterilizada e 50ppm de TWEEN 80 por placa. Com o auxílio de um pincel, os esporos foram liberados da colônia. Em seguida, foi preparado meio BDA com ágar a 0,5% (5g/l), o qual foi autoclavado e ao atingir uma temperatura

em torno de 50°C, a suspensão de esporos (5% v/v) foi adicionada. Após homogeneização desse meio, três discos de papel de filtro de 15 cm de diâmetro, previamente esterilizados foram mergulhados nessa suspensão de esporos agarizada e colocados em placas de petri de 15cm de diâmetro, previamente esterilizadas. Essas placas foram incubadas à 25°C, por um período de aproximadamente 20 dias, até a desidratação completa do papel de filtro. A esse substrato, contendo colônias de *Aspergillus* esporuladas, foram adicionadas 2g de Caolim, previamente esterilizado (material inerte de granulometria fina) por placa de 15cm de diâmetro, obtendo assim, com o auxílio de um pincel, o pó com propágulos das espécies de *Aspergillus*.

A concentração de esporos na formulação de pó foi ajustada para  $10 \times 10^6$  conídios/g de produto, com auxílio de uma câmara Neubauer e por diluições de quantidade definida.

A incorporação do inóculo composto de propágulos fúngicos, foi realizada na base de 200g do produto/100kg de sementes.

As sementes foram então submetidas ao envelhecimento artificial (42°C, 100% de umidade relativa e escuro), em mini câmaras adaptadas, pelos períodos de zero, 96, 120 e 168 horas. O grau de umidade das sementes foi determinado antes e após o envelhecimento artificial e seus valores estão apresentados na Tabela 1A.

## 2.2 Avaliações

Para se conhecer o nível de deterioração e efeitos atingidos pelos tratamentos estabelecidos neste estudo, as sementes após o envelhecimento artificial, foram submetidas ao teste padrão de germinação, teste de tetrazólio (germinação e potencial), emergência em canteiro e teste de sanidade ("Blotter Test"). A determinação da concentração de proteína foi feita pelo

método Bradford, (1976) e os padrões de proteínas solúveis, de armazenamento e isoenzimas por eletroforese em gel de acrilamida.

### **2.2.1 Teste Padrão de Germinação**

O percentual de germinação foi obtido utilizando 8 repetições de 25 sementes, por amostra. Optou-se pelo sistema de rolo de papel umedecido com 2,5 vezes o peso do papel em água. Os rolos foram dispostos em germinador, previamente regulado a 25°C. A avaliação seguiu os critérios estabelecidos pelas Regras Para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

### **2.2.2 Teste de Tetrazólio**

Quatro repetições de sementes por amostra foram acondicionadas em substrato de papel, umedecido à 25°C, por um período aproximado de 16 horas. Posteriormente procedeu-se à retirada dos tegumentos e as sementes foram acondicionadas em recipientes com solução de 2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio a 0,1% por aproximadamente 4 horas, temperatura ambiente, quando então foram lavadas em água corrente e avaliadas. A avaliação seguiu os critérios estabelecidos por Moore, (1985), sendo que os resultados foram expressos em percentagem.

### **2.2.3 Teste de Emergência**

Para condução deste teste foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. A sementeira foi processada em canteiros contendo uma mistura de terra e areia, na proporção 2:1. O teste foi conduzido à temperatura ambiente com

regas manuais numa frequência de duas vezes por semana. As avaliações foram realizadas aos 7 e 28 dias após semeadura, onde foram computadas as plântulas emergidas. Os resultados foram expressos em percentagem.

#### **2.2.4 Teste de Sanidade**

A sanidade das sementes foi determinada pelo teste de incubação em substrato de papel de filtro ("Blotter Test"), em placas de petri de 15 cm de diâmetro, contendo dois discos de papel de filtro, previamente esterilizados e umedecidos com água destilada e autoclavada. Os tegumentos das sementes foram previamente removidos manualmente.

Por placa de 15cm de diâmetro foram utilizadas 25 sementes, perfazendo um total de 400 por tratamento. As placas foram incubadas à  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob regime de 12 horas de luz negra por 7 dias. A avaliação foi efetuada com auxílio de estereomicroscópio.

#### **2.2.5 Análise de Isoenzimas dos Isolados de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus* e das sementes submetidas aos diferentes tratamentos.**

Inicialmente foi obtida a cultura pura dos fungos em BDA à  $20^{\circ}\text{C}$  em regime de 12 horas de luz negra. Posteriormente o micélio foi transferido para meio líquido de glicose e extrato de levedura (Mills, Sreenivasaprasad e Brown, 1994), à  $25^{\circ}\text{C}$ , sob agitação e escuro.

A curva de crescimento micelial dos isolados cultivados no meio foi determinada de acordo com procedimento descrito por Alfenas et al. (1991). Após o período de incubação o micélio foi coletado a vácuo e macerado em nitrogênio líquido em presença de PVP (Polyvinyl pirrolidone). O pó micelial obtido foi armazenado em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ , em recipiente contendo sílica

gel. Após o envelhecimento duzentas sementes foram destegumentadas manualmente, liofilizadas e maceradas em nitrogênio líquido em presença de PVP. O pó obtido foi armazenado em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ , em recipiente contendo sílica gel.

As proteínas foram extraídas ressuspendendo 100mg do pó micelial ou de sementes em 200 $\mu\text{l}$  de tampão Tris HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,1% de  $\beta$  ME, 0,4% PVP, 0,4% PEG e 1mM EDTA) e mantidos por 12 horas em geladeira. Após a ressuspensão, foi feita uma centrifugação à 14.000 xg por 60 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ .

A eletroforese foi desenvolvida em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel de separação) e 4,5% (gel de concentração). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. Cada gel recebeu 20  $\mu\text{l}$  do extrato da amostra. A migração foi efetuada por um período aproximado de 3:30` horas à  $4^{\circ}\text{C}$ , 12mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador.

Após a eletroforese, os géis foram corados para detecção da atividade das enzimas esterase (EST), álcool desidrogenase (ADH), fosfatase ácida (ACP), malato desidrogenase (MDH), peroxidase (PO), glutamato oxaloacetato transminase (GOT), fosfogluconato desidrogenase (6 -PGDH), hexoquinase (HK), fosfoglucose isomerase (PGI), glutamato desidrogenase (GDH), enzima málica (ME), catecol oxidase (COX).

#### **2.2.6 Análise de proteína dos Isolados de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus* e das sementes submetidas aos diferentes tratamentos.**

As proteínas foram extraídas triturando por 3 minutos, com auxílio de haste de teflon 100mg do pó micelial e/ou de sementes em 300 $\mu\text{l}$  de Hepes, em tubos Ependorf, mantidos sobre gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 xg à  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e as duas fases

foram separadas. Ao sobrenadante foram acrescentados 200µl de Laemmli 2x, e ao pellet 300µl de tampão Laemmli 1x. Ambas amostras foram fervidas por 5 minutos. Nova centrifugação à 4°C à 14.000 xg por 10 minutos foi efetuada. Ao pellet foi acrescentado 200µl de TCA com a finalidade de purificar proteínas. Após eliminação do TCA o pellet foi ressuspenso em 300µl de tampão Laemmli 1x.

A avaliação da extração da fração de proteína foi feita sob eletroforese SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9.

Foram colocados 30 µl de mistura tampão da amostra (5ml de glicerol; 2,5ml de solução tampão do gel concentrador; 2,5 mg de azul de Bromofenol e completado o volume para 25 ml com água deionizada) + extrato de proteína em cada canaleta do gel. As corridas foram desenvolvidas a 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador.

Para estimativa dos pesos moleculares, foi aplicada em cada gel uma amostra do padrão de proteínas, SIGMA M - 2789, com pesos moleculares variando de 14,2 a 205,0 KD ( $\alpha$  Lactalbumina, leite bovino - 14,000; Inibidor de tripsina, soja - 20,100; Anidrase carbônica, eritrócito bovino - 29,000; Albumina, ovo - 45,000; Soro albumina, bovino - 66,000; Fosforilase b, músculo de coelho - 97,400;  $\beta$  Galactosidase, *Escherichia coli* - 116,000; Miosina, músculo de coelho - 205,000).

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

### 2.3 Procedimentos estatísticos

Foi utilizado o esquema fatorial e os delineamentos blocos casualizados para o teste de emergência e inteiramente casualizado para as demais avaliações, ambos com quatro repetições.

Para todos os testes foi realizada a análise de variância, fazendo-se a transformação dos valores expressos em percentagem para  $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ . Na comparação entre as médias, empregou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância para os diversos parâmetros utilizados na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de algodoeiro, submetidas aos tratamentos de desinfestação, inoculação com *Aspergillus glaucus*, com *Aspergillus flavus* e envelhecidas posteriormente sob condições artificiais, por diferentes períodos de tempo, indicaram significância ao nível de 1% de probabilidade para tempo de envelhecimento e interação tempo de envelhecimento x tratamento. Para tratamentos, foi detectada significância ao nível de 5% de probabilidade apenas pelo parâmetro tetrazólio (Tabela 2A). Para a quantificação de proteína pelo método Bradford (1976), os resultados da análise de variância não revelaram significância nem para proteínas solúveis (fase sobrenadante), nem para proteínas de armazenamento (fase pellet). Em relação à qualidade sanitária, os dados referentes à análise de variância para os diferentes fungos, associados às sementes indicaram significância para tempo de envelhecimento, tratamento e para a interação, à exceção de *Aspergillus glaucus*, para tratamento x tempo de envelhecimento, (Tabela 3A).

Os testes determinantes da qualidade sanitária detectaram resposta diferencial dos fungos associados às sementes de algodoeiro em relação aos tratamentos. Assim é que *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* e *Aspergillus flavus* apresentaram uma menor incidência nas sementes desinfestadas com hipoclorito. *Aspergillus glaucus* apresentou maior incidência em sementes desinfestadas, seguida de inoculação com *Aspergillus glaucus* e inoculação com *Aspergillus flavus*; *Aspergillus flavus* teve sua menor incidência em sementes desinfestadas e não inoculadas e a maior em sementes inoculadas com *Aspergillus flavus* (Tabela 1). Vale ressaltar, que de uma



TABELA 1. Efeito dos tratamentos de desinfestação e inoculação de sementes de algodoeiro com duas espécies de *Aspergillus*, em separado, sobre a germinabilidade e sanidade (valores em percentagem) - UFLA - MG 1996.

TESTES	Desinfestação com Hipoclorito 1%	Inoculação com <i>Aspergillus glaucus</i>	Inoculação com <i>Aspergillus flavus</i>
TPG	37,5a	36,8a	36,4a
TZ - PG	46,9ab	49,3a	38,5b
Emergência (7dias)	30,6a	32,3a	27,7a
Emergência (28dias)	29,0a	28,0a	28,0a
Blotter test*			
<i>Fusarium sp.</i>	1,8b	5,7a	5,2a
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	0,6a	0,01b	zerob
<i>Aspergillus sp.</i>	3,9b	7,0a	5,9ab
<i>Rhizopus sp.</i>	6,3a	0,2b	0,1b
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,9a	0,4ab	0,2b
<i>Aspergillus flavus</i>	4,4c	9,3b	20,5a

Média seguidas da mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

\*Resultados baseados na análise de sementes destegumentadas.

maneira geral, a desinfestação de sementes com hipoclorito não foi capaz de manter as sementes livres de microrganismos, uma vez que esse composto não tem ação erradicante. Por outro lado, é válido lembrar que esses resultados são relativos a sementes destegumentadas e que, provavelmente, a análise de sementes com o tegumento proporcionaria maior diferença entre os tratamentos, inclusive com valores mais elevados para os fungos em teste. A opção de se utilizarem sementes destegumentadas teve como base verificar a microflora das sementes no estado em que elas seriam utilizadas para determinar os perfis eletroforéticos. Para tempo de envelhecimento artificial, todos os testes determinantes da germinabilidade, detectaram maiores percentuais para sementes envelhecidas por zero horas, seguida dos tempos de envelhecimento de 96, 120 e 168 horas (Tabela 2). No caso específico de fungos associados às sementes pode ser

observado que *Botryodiplodia theobromae* teve sua incidência diminuída com o aumento do período de envelhecimento. Esse seria o comportamento esperado, uma vez que as condições de temperatura e umidade a que as sementes são submetidas durante o envelhecimento artificial não são favoráveis ao desenvolvimento deste organismo patogênico. Já os demais fungos, denominados fungos de armazenamento (Berjak e Villiers, 1972) apresentaram, de uma maneira geral, tendências de maior incidência com o aumento do tempo de envelhecimento (Tabela 2).

Apesar de todos os testes terem detectado reduções na capacidade germinativa das sementes submetidas aos diferentes tratamentos de envelhecimento artificial, para sementes desinfestadas e não inoculadas os testes de emergência foram os que detectaram maiores diferenças (53% de queda entre o tempo zero e o de 168 horas de envelhecimento). Reduções maiores, 63% e 68%, foram detectadas para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus* quando se considerou

TABELA 2. Efeito do envelhecimento artificial das sementes de algodoeiro desinfestadas e não inoculadas e inoculadas com duas espécies de *Aspergillus*, em separado, sobre germinabilidade e sanidade (valores percentuais) - UFLA - MG 1996.

TESTES	ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL			
	zero h	96h	120h	168h
TPG (%)	72,0a	51,6b	18,4c	11,9b
TZ - PG (%)	82,9a	48,9b	25,2c	21,1c
Emergência (7 dias)	73,3a	45,0b	15,2c	2,7d
Emergência (28 dias)	72,0a	40,3b	12,9c	2,7d
Blotter test*				
<i>Fusarium sp.</i>	4,1ab	3,6b	6,3a	2,4b
<i>B. theobromae</i>	0,5a	0,3ab	zerob	zerob
<i>Aspergillus sp.</i>	1,3c	6,2b	4,9b	12,1a
<i>Rhizopus sp.</i>	0,45bc	0,16c	1,3b	4,28a
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,03b	0,20b	0,03b	4,03a
<i>Aspergillus flavus</i>	1,98d	15,65b	22,7a	7,54c

Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

\*Resultados baseados em sementes destegumentadas.

o tempo zero de envelhecimento artificial, em relação ao tempo de 168h, avaliados pelos testes padrão de germinação e emergência aos 28 dias, respectivamente. Resultados similares, reduções de 64% e 73%, foram detectados para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus* nos mesmos períodos de envelhecimento pelos dois testes acima referidos, (Tabela 3).

Quando se considera o fator tratamento nos diferentes tempos de envelhecimento artificial, os resultados da Tabela 4, indicaram diferenças estatísticas ao nível de 5% para tratamentos apenas no tempo de 120 horas de envelhecimento. Neste tempo pode ser observado que o tratamento de inoculação das sementes com *Aspergillus flavus* foi o que propiciou maior queda em germinabilidade nas sementes de algodão. As condições de envelhecimento por proporcionar alta umidade relativa e temperaturas elevadas (42°C) são mais favoráveis ao desenvolvimento de *Aspergillus flavus* em comparação a outras espécies de *Aspergillus* (Christensen, 1972).

Em relação à análise eletroforética, pode ser observado, pelos zimogramas em geral (Figuras 1 e 3), que dentre as enzimas avaliadas, a fosfatase ácida, a malato desidrogenase, a esterase, a enzima málica e a catecol oxidase, apresentaram aumento do número e/ou de intensidade das bandas com o aumento do tempo de envelhecimento artificial. Nos padrões eletroforéticos das enzimas glutamato desidrogenase, 6 - fosfogluconato desidrogenase, hexoquinase, peroxidase e fosfoglucose isomerase foram detectados diminuição no número e/ou intensidade das bandas; ao passo que nos padrões das enzimas álcool desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase não houve alterações com o aumento do período de envelhecimento artificial. As isoenzimas que apresentaram atividade para os fungos enfocados neste estudo foram: fosfatase ácida, catecol oxidase, hexoquinase, enzima málica e esterase, sendo que dentre estas apenas as enzimas málica e esterase detectaram diferenças entre *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus flavus*. À exceção da enzima málica, que é uma oxiredutase, as enzimas que detectaram atividade

TABELA 3. Efeito dos tratamentos de desinfestação e inoculação de sementes de algodoeiro com duas espécies de *Aspergillus*, em separado, submetidas ao envelhecimento artificial, sobre a germinabilidade e sanidade (valores percentuais) - UFPA - MG 1996.

TESTES	TRATAMENTOS												
	Sementes desinfestadas				Infestadas com <i>Aspergillus glaucus</i>				Infestadas com <i>Aspergillus flavus</i>				c.v.
	Tempo de envelhecimento				Tempo de envelhecimento				Tempo de envelhecimento				
	(zeroh)	(96h)	(120h)	(168h)	(zeroh)	(96h)	(120h)	(168h)	(zeroh)	(96h)	(120h)	(168h)	
TPG	65,8a	55a	25,4b	10,3c	75a	44b	19,5c	12,2c	75a	56b	13c	11c	
TZ - PG	83a	46b	37bc	21,7c	82a	53b	35bc	26c	84a	48b	20c	8c	14%
Emergência (7d)	69a	41b	26c	2,0d	79a	46b	16c	3d	72a	49b	6c	3c	12,8%
Emergência (28d)	68a	42b	22c	1,5d	71a	35b	16c	3d	77a	44b	5c	4c	12,3%
Blotter test*													
<i>Fusarium</i> sp.	4,9a	1,1bc	4,3ab	zeroc	4,2a	5,5a	5,9a	7,4a	3,3b	5,4ab	9,4a	3,7b	
<i>Bot. theobromae</i>	2,2a	2,8a	zerob	zerob	0,12a	zeroa	zeroa	zeroa	0,06a	zeroa	zeroa	zeroa	
<i>Aspergillus</i> sp.	1,9b	zeroc	8,2a	12,6a	4,3b	13,5a	0,25c	17,7a	zerob	13,7a	10,6a	7,0a	
<i>Rhizopus</i> sp.	1,3c	0,4c	10,0b	24,4a	0,8a	0,12a	0,06a	0,12a	zeroa	0,06a	zeroa	0,06a	
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,06	0,4	0,3	5,9	0,06	0,56	zero	2,7	zero	zero	zero	3,7	
<i>Aspergillus flavus</i>	zeroc	9,9b	25,0a	zeroc	zerob	13,5a	18,4a	17,0a	16,8ab	25,0a	25,0a	15,8b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

\* Resultados baseados em sementes destegumentadas.

TABELA 4. Efeito do tempo de envelhecimento artificial de sementes de algodoeiro submetidas à desinfestação e inoculação com duas espécies de *Aspergillus*, em separado, sobre a germinabilidade e sanidade (valores em porcentagem) - UFLA - MG - 1996.

TESTES	TRATAMENTOS											
	TEMPO DE ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL											
	zero h			96h			120h			168h		
	1*	2**	3**	1	2	3	1	2	3	1	2	3
TPG (%)	65,8a	74,8a	75,3a	55,0a	44,0b	56,0a	25,5a	20,0a	11,5b	10,3a	12,2a	13,2a
TZ - PG (%)	82,0a	82,0a	84,0a	46,0a	53,0a	48,0a	37,0a	26,0a	8,0b	22,0a	35,0a	20,0a
Emergência 7d (%)	68,6a	78,5a	72,4a	40,5a	45,5a	49,0a	26,0a	16,3a	6,3b	2,2a	2,9a	2,9a
Emergência 28d (%)	68,0a	71,0a	68,0a	42,5a	35,0a	43,5a	22,0a	15,0a	5,0b	1,5a	3,0a	4,0a
Blotter test****												
<i>Fusarium sp.</i>	4,9a	4,2a	3,3a	1,1b	5,5a	5,2a	4,3b	5,9ab	9,4a	zerob	7,4a	3,7a
<i>B. theobromae</i>	2,2a	0,1b	0,1b	2,9a	zerob	zerob	zeroa	zeroa	zeroa	zeroa	zeroa	zeroa
<i>Aspergillus sp.</i>	1,9a	4,3a	zerob	zerob	13,6a	13,7a	8,2a	0,3b	10,6a	12,6ab	17,7a	7b
<i>Rhizopus sp.</i>	1,3a	0,8a	zeroa	0,4a	0,1a	0,1a	10,0a	0,1b	zerob	24,2a	0,1b	0,7b
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,1	0,1	zero	0,4	0,7	zero	0,3	zero	zero	5,9	2,7	3,7
<i>Aspergillus flavus</i>	zerob	zerob	16,8a	9,9b	13,6b	25,0a	25,0a	18,4a	25,0a	zerob	17,0a	15,9a

Médias seguidas, na linha, com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

1\* Sementes desinfestadas com hipoclofite de sódio a 1%.

2\*\* Sementes infestadas com *Aspergillus glaucus*.

3\*\*\* Sementes infestadas com *Aspergillus flavus*.

\*\*\*\* Resultados baseados em sementes destegumentadas.

em ambos os fungos, foram as da categoria das hidrolases e transferases. Dentre as enzimas que não apresentaram atividade para os referidos fungos, 6 - fosfo-gluconato desidrogenase, álcool desidrogenase, glutamato desidrogenase, glutamato oxaloacetato transminase, fosfoglucoase isomerase e peroxidase, a maioria é do grupo das oxiredutases, indicando provavelmente, que os fungos não atuam nesse nível de reação. Apenas uma enzima do grupo das transferases e uma do grupo das isoemerases (racemases) apresentaram atividade para esses fungos.

A álcool desidrogenase (ADH) - EC 1.1.1.1) (Figuras 1 e 2) uma das enzimas que mantiveram seus padrões isoenzimáticos inalterados com avanço do processo deteriorativo das sementes, participa de reações de oxiredutase, agindo mais especificamente na oxidrila alcóolica. Essa enzima atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Vantoi, Fausey e McDonald Jr., 1987), motivo pelo qual, provavelmente, esta enzima não apresentou alterações no seu perfil isoenzimático. Já a glutamato oxaloacetato transminase (GOT - EC - 2.6.1.1.), outra enzima que manteve seu padrão isoenzimático inalterado, participa da transferência de grupamentos amina de um composto para outro, apresentando-se importante no processo de degradação e síntese de proteínas (Conn e Stumpf, 1986). Esses resultados diferiram dos encontrados por Throneberry e Smith (1995), os quais relataram correlação positiva entre germinabilidade de sementes de milho e atividade da álcool desidrogenase, dos de Chauhan, Gopinathan e Babu, 1985), que detectaram aumento, tanto em soja quanto em cevada, do número de bandas da glutamato oxaloacetato transminase para sementes envelhecidas artificialmente. Apesar de estes autores terem concluído que essas mudanças sejam devidas ao aumento da atividade metabólica que conduzem à deterioração, eles citam que os perfis eletroforéticos são específicos para cada espécie. No caso específico dos trabalhos de Chauhan, Gopinathan e Babu (1985) os quais encontraram alterações no número de bandas da glutamato oxaloacetato transminase, vale ressaltar que esses autores também detectaram variações nos padrões de proteína. No

presente trabalho as proteínas de armazenamento, globulinas, não tiveram seus padrões eletroforéticos alterados (Figura 5), o que justifica a não alteração dos padrões eletroforéticos da glutamato oxaloacetato transaminase, uma vez que se trata, como mencionado anteriormente, de uma enzima importante no processo de degradação e síntese de proteína. Pode ser observado ainda (Figura 1), que essas enzimas não apresentaram atividade para os fungos em estudo.

Por sua vez, o número de bandas de malato desidrogenase (MDH - EC 1.1.1.37) (Figura 1) aumentou nas sementes envelhecidas artificialmente por 120 e 168 horas para sementes não inoculadas e desinfestadas e, inoculadas com *Aspergillus flavus* e nas envelhecidas por 96h, 120h e 168horas, para as inoculadas com *Aspergillus glaucus*. Esses resultados coincidem com os detectados pelo teste padrão de germinação para sementes não inoculadas e desinfestadas, o qual revelou diferença em percentagem de germinação a partir de 120 horas de envelhecimento (Tabela 3) e com todos os outros testes determinantes da germinabilidade para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus*. Para *Aspergillus flavus*, os testes, de uma maneira geral, começaram a detectar diferenças significativas em deterioração a partir de sementes envelhecidas artificialmente por 96 horas, ao passo que essa enzima detectou diferenças a partir do tempo de 120horas. Por se tratar de uma enzima importante na respiração celular, o aumento do número e/ou intensidade de coloração de bandas em sementes submetidas a períodos mais longos de envelhecimento artificial, pode ser em função do aumento da respiração que ocorre em sementes que se encontram em processo de deterioração avançado, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de qualidade reduzida (Shatter et al., 1994). Isto também acontece no teste de tetrazólio, que se trata da análise colorimétrica pela ação da enzima desidrogenase, em que sementes deterioradas apresentam coloração vermelho mais intenso em relação as de alta qualidade, Moore (1985). Portanto, enzimas envolvidas na respiração, podem apresentar alta atividade em sementes de qualidade reduzida e ser um possível marcador molecular para deterioração. Além do

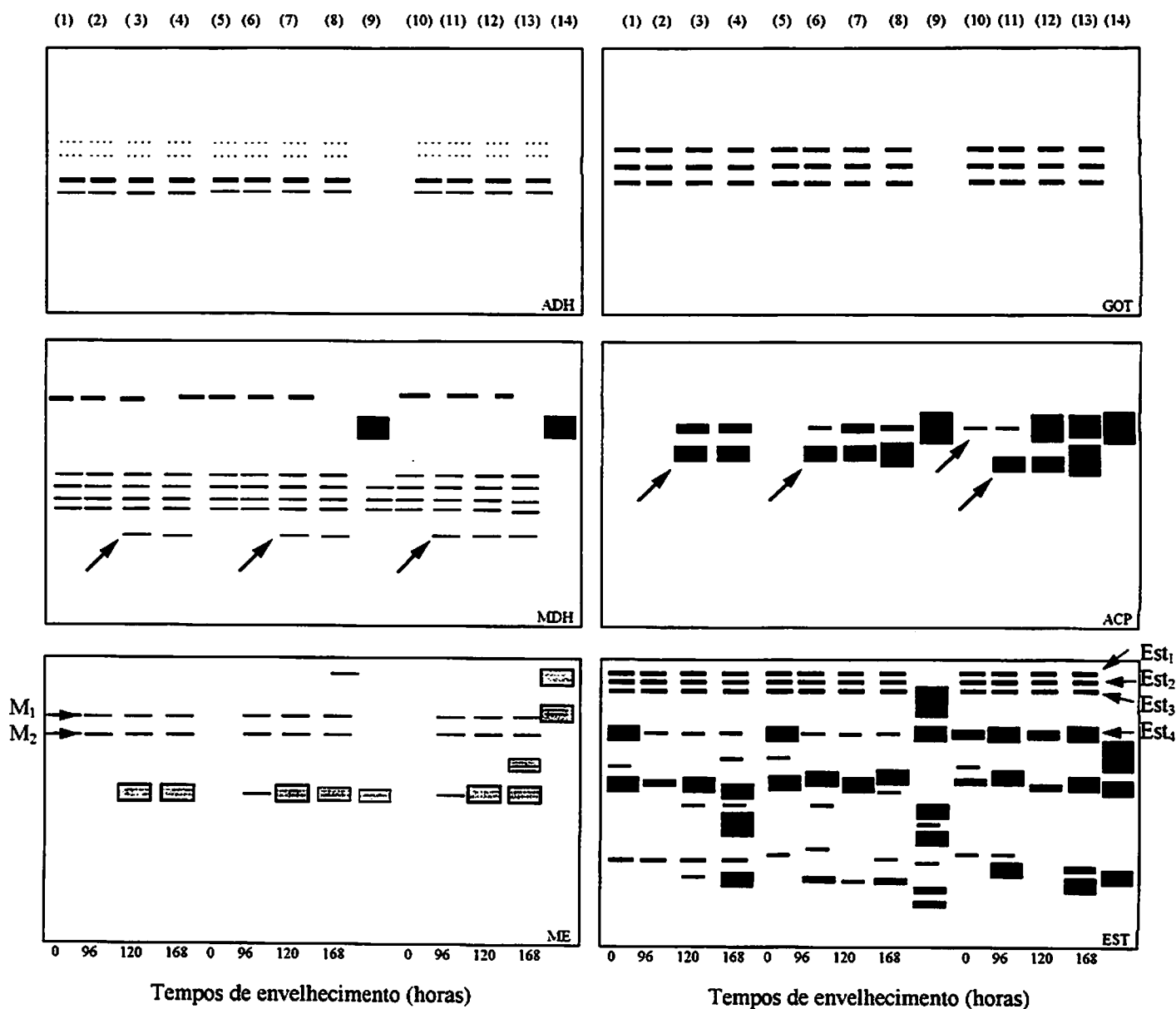



FIGURA 1. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus* e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidas a envelhecimento artificial; da esquerda para a direita: (1) (2) (3) (4) sementes desinfestadas e não inoculadas, (5) (6) (7) (8) sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus*, (9) *Aspergillus glaucus*, (10), (11) (12) (13) sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*, (14) *Aspergillus flavus*. UFLA- Lavras/MG, 1995.

A espessura e a tonalidade das bandas indicam intensidade relativa.

 Bandas densas, porém claras



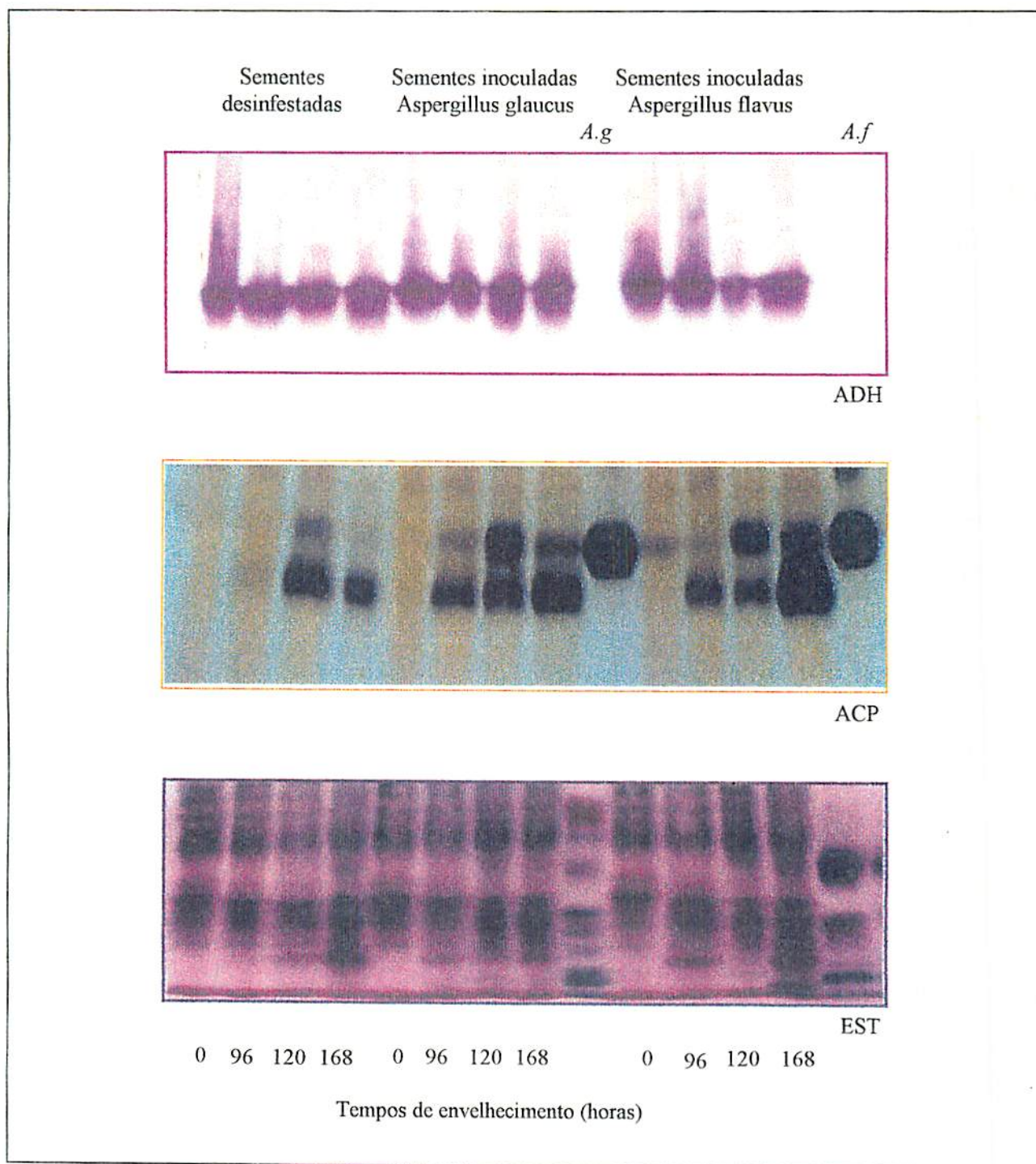


FIGURA 2. Atividades enzimáticas reveladas em géis de poliacrilamida a 7,5% de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus* e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidos a envelhecimento artificial. UFLA - Lavras/MG, 1995.

mais, segundo Harman, (1956) citado por Carvalho (1994) a mais provável origem dos radicais livres seria a interação de enzimas respiratórias envolvidas na utilização do oxigênio molecular, principalmente as contendo ferro.

A fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2.) (Figuras 1 e 2) apresentou atividade a partir de 120h de envelhecimento para sementes não inoculadas e desinfestadas, a partir de 96 horas para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus* e em todos os tempos para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. No entanto, houve aumento na intensidade de bandas a partir de 120h de envelhecimento para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus* e a partir de 96h para as inoculadas com *Aspergillus flavus*. Esses resultados estão correlacionados com os detectados por todos os testes de germinabilidade para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. Para sementes não inoculadas e desinfestadas os percentuais de germinação detectados pelos testes padrão de germinação e tetrazólio correlacionaram com os encontrados pela atividade dessa enzima. No caso de sementes inoculadas por *Aspergillus glaucus*, o perfil enzimático dessa isoenzima classificou, a exemplo de todos os testes determinantes da germinabilidade, as sementes em diferentes níveis de qualidade. Apesar dos resultados estarem em desacordo com os encontrados por Chauhan, Gopinathan e Babu (1985), Perl, Luria e Gelmond (1977); Jeng e Sung (1994); Sung e Jeng (1994); Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), eles reforçam os de Rajagopal e Sen - Mandi (1992); Krupta e Bandstrom (1974) e Zscheile, (1974) citados por Cherry (1978).

A fosfatase ácida é uma hidrolase envolvida em reações de hidrólise de ésteres, que pode atuar sobre fosfolípidios de membrana, tendo como consequência a peroxidação de lípidios. Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), encontraram um significativo incremento no total de ácidos graxos livres para sementes deterioradas e, segundo os autores, isto pode ter sido devido à atividade catalítica de enzimas esterolíticas. Roberts, (1973) cita a preponderância de enzimas hidrolíticas, dentre elas as fosfatases, em terem sua atividade incrementada com a perda de viabilidade, o que levanta a possibilidade, sugerida por estudos de ultraestrutura de Berjak e Villiers (1978), de que ruptura de lisossomo pode estar envolvida com perda de viabilidade.

Por outro lado, pela fosfatase ácida ter apresentado atividade para os dois fungos em estudo e não ter apresentado atividade para sementes não envelhecidas, não se sabe até que ponto essa peroxidação é em função de atividade de enzimas dos fungos ou das sementes. Também Krupta e Brandstrom, (1974) e Zscheile (1974), citados por Cherry (1978) e Cherry (1978) detectaram diferenças no zimograma de fosfatase ácida de sementes infectadas por fungos.

- Pálido a 100%

A enzima málica (ME -EC 1.1.1.40) apresentou atividade a partir de 96h de envelhecimento para sementes não inoculadas e desinfestadas e sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus*. Para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*, apenas a partir de 120h de envelhecimento foi detectada atividade dessa isoenzima. Com exceção das bandas nas zonas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, as demais não estavam uniformemente presentes em todos os tratamentos de envelhecimento e apesar de densas, apresentaram-se bastante difusas (Figura 1). Segundo Shatter et al. (1994), o aparecimento de bandas difusas de isoenzimas em amostras de sementes submetidas ao envelhecimento artificial, sugere que proteólise ou glicosilação não específica está ocorrendo. Desta forma, a existência de uma população de enzima málica com este tipo de banda, pode estar com números variados de carboidratos ligados, o que poderia estar ocasionando o obscurecimento da observação da atividade. Por se tratar de uma enzima envolvida em reações de oxiredução, agindo na oxidrila alcoólica, portanto importante na respiração celular, esse aumento do número e/ou intensidade de bandas em sementes submetidas ao envelhecimento artificial, pode ser devido ao aumento da respiração que ocorre em sementes deterioradas. Tanto assim é, que esses resultados estão em concordância com os encontrados através da malato desidrogenase, neste trabalho.

Os padrões isoenzimáticos de esterase (EST - EC 3.1.1.1.) (Figuras 1 e 2) apresentaram tendência de aumento do número e intensidade de bandas com envelhecimento artificial (o maior número e intensidade de bandas sempre ocorreu no tratamento de 168 horas de envelhecimento). Pode ser observado pelo zimograma da Figura 1, que os três grupos Est<sub>1</sub>, Est<sub>2</sub> e Est<sub>3</sub> da isoenzima esterase, estavam presentes em todos os tratamentos e apresentaram-se bastante uniformes, quanto a intensidade das bandas. As demais bandas apresentaram-se de forma variada nos diferentes tratamentos. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Chauhan, Gopinathan e Babu (1985), Shatters et al., (1994). Observa-se ainda que a banda da região Est<sub>4</sub> decresceu em intensidade com o aumento do tempo de envelhecimento, à exceção das sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. Ao que parece, trata-se de uma isoenzima em que o perfil eletroforético é bastante alterado pela ação de microorganismos, o que suporta resultados de Cherry (1978) devendo portanto ser usada com restrição em análises de identificação de cultivares. Apesar de ser uma enzima envolvida em reações de hidrólise de esteres e desempenhar papel chave no metabolismo de lipídios, ponto importante no processo deteriorativo de sementes, a variação no seu perfil eletroforético parece estar mais relacionada a associação de microorganismos do que ao processo deteriorativo em si. Vale ressaltar que foi uma das únicas

isoenzimas capazes de diferenciar os dois fungos em estudo. Também no trabalho de diferenciação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (capítulo 3) ela apresentou-se eficiente em detectar diferenças entre os dois organismos. Parece portanto, ser mais indicada a sua utilização em trabalhos de diferenciação de microorganismos, com identidade morfológica próxima, do que como marcador bioquímico de processos deteriorativos de sementes.

A enzima catecol oxidase (COX) (Figura 3) apenas apresentou alteração em seu padrão isoenzimático para sementes não inoculadas e desinfestadas. Mesmo assim essa variação não se correlacionou com os resultados encontrados pelos testes determinantes da germinabilidade de sementes. Apesar de ter apresentado atividade para os fungos em referência, pode ser observado que estes não alteraram os padrões eletroforéticos dessa enzima, quando em associação com as sementes de algodoeiro. Se não fosse o fato de ela não ter apresentado polimorfismo, seria provavelmente, uma enzima em potencial a ser utilizada em trabalhos de identificação de cultivares.

Dentre as enzimas que apresentaram decréscimo no número e/ou intensidade de bandas com o envelhecimento artificial, a glutamato desidrogenase (GDH - EC - 1.4.1.3.), como pode ser observado pelas Figuras 3 e 4, teve redução tanto em intensidade de bandas quanto desaparecimento. A redução na atividade das bandas, ocorreu, na região G3 a partir de 120 horas de envelhecimento para sementes não inoculadas e desinfestadas e 96 horas para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus* e quase desaparecimento com 120 e 168 horas. Para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus* além da diminuição da intensidade de bandas, houve desaparecimento total a partir de 120 horas. A enzima glutamato desidrogenase está presente apenas na mitocôndria, mais especificamente na matriz mitocondrial. Trata-se de uma enzima alostérica, complexa, que cataliza a deaminação oxidativa do glutamato, formando amônia e  $\alpha$  cetoglutarato. A amônia pode ser recuperada e reutilizada na síntese de aminoácidos. Embora a amônia e o  $\alpha$  cetoglutarato sejam catalisadas pela mesma enzima, o uso de duas coenzimas (NAD e NADPH) diferentes, pela glutamato desidrogenase, possibilita a regulação independente da deaminação do glutamato e da aminação do  $\alpha$  cetoglutarato (Lehninger, 1992). Uma vez que esta enzima atua na oxidação de aminoácidos (proteínas de reserva) fornecendo energia para as células (ciclo do ácido cítrico) e/ou na redução do  $\alpha$  cetoglutarato para a síntese de aminoácidos, ela pode desempenhar um importante papel na germinação de sementes. Apesar de esses resultados estarem de acordo com os encontrados por Shatter et al (1994) em sementes de milho, a perda de ativi-

dade dessa enzima só acontece em estágios mais avançados de deterioração (germinação variando de 40 a 50%), provavelmente em função de sua atuação, ou seja, a nível de proteína de reservas.

Pelas Figuras 3 e 4, pode ser observada também, uma mudança nos padrões isoenzimáticos da peroxidase (PO - EC 1.11.1.7) com o aumento do tempo de envelhecimento artificial das sementes. Em todos os tratamentos, essa isoenzima na região P<sub>1</sub> só apresentou atividade para o tempo de zero horas de envelhecimento. Na região P<sub>2</sub> foi detectada uma certa atividade apenas para os tempos de 120 e 168 horas de envelhecimento, sendo que esta atividade se apresentou mais intensa para sementes desinfestadas e não inoculadas. A região P<sub>3</sub> apresentou atividade apenas para zero horas de envelhecimento, podendo ser notado um decréscimo na intensidade dessa banda para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. Em relação a região P<sub>4</sub>, foi observada uma diminuição na intensidade de banda, sendo essa diminuição intensificada para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. Todos os tratamentos apresentaram completo desaparecimento desta banda no período correspondente a 168 horas de envelhecimento das sementes. A atividade dessa enzima, correlacionou negativamente com os resultados detectados pelos testes de germinabilidade de sementes (Tabela 3). Por ser a peroxidase uma das enzimas "scavenger" (Basavarajappa et al., 1991; Jeng e Sung, 1994), ou seja removedora de peróxido, a perda da atividade dessa enzima, pode parcialmente esclarecer porque sementes envelhecidas acumulam mais peróxidos. Os resultados deste trabalho reforçam os de Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991); Jeng e Sung (1994); Sung e Jeng (1994); Nkang (1988) citado por Basavarajappa et al. (1991). Também outros autores a exemplo de Abdul - Baki e Anderson, (1972); Hamill e Bewbaker, (1969), têm encontrado relação entre atividade das peroxidases com viabilidade de sementes.

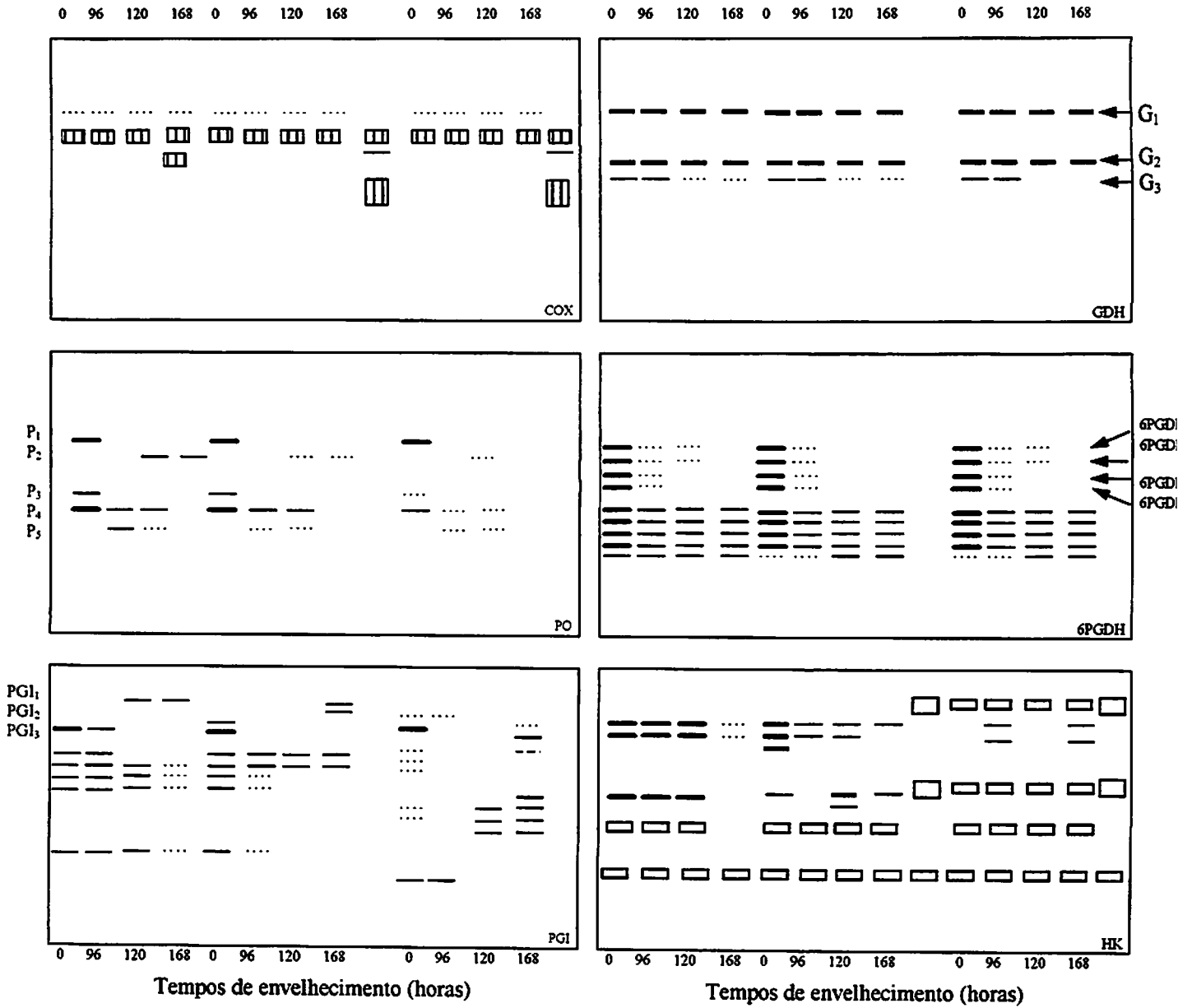


FIGURA 3. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus* e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidas a envelhecimento artificial; da esquerda para a direita: (1) (2) (3) (4) sementes desinfestadas e não inoculadas, (5) (6) (7) (8) sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus*, (9) *Aspergillus glaucus*, (10) (11) (12) (13) sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*, (14) *Aspergillus flavus*. UFLA- Lavras/MG,1995  
A espessura e a tonalidade das bandas indicam intensidade relativa.

□ Bandas acromáticas



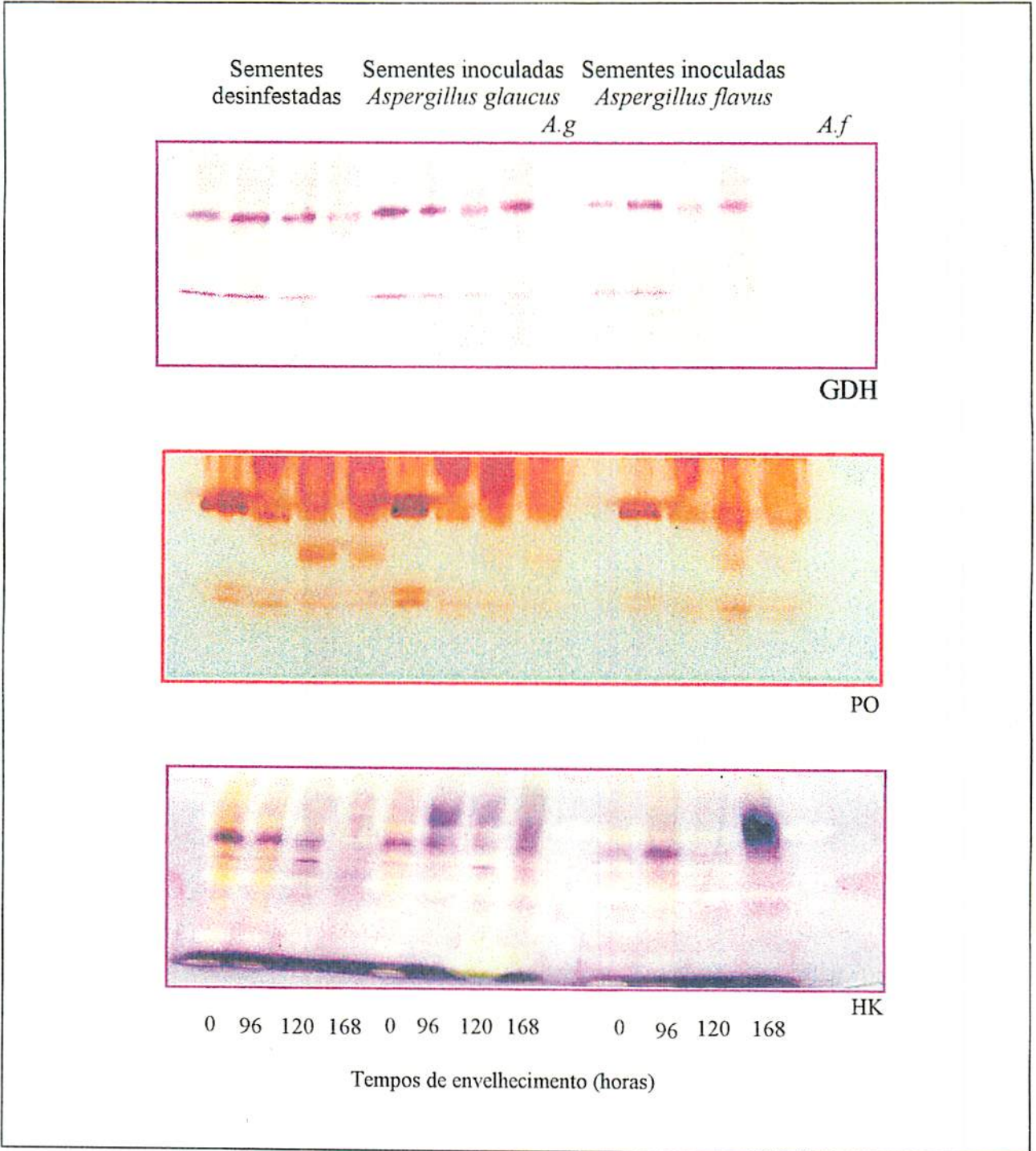


FIGURA 4. Atividades enzimáticas reveladas em géis de poliacrilamida a 7,5% de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus* e de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com ambos os fungos em separado, e submetidos a envelhecimento artificial. UFLA - Lavras/MG, 1995.

O zimograma da Figura 3, referente aos padrões de bandas da 6 - fosfogluconato desidrogenase (6 PGDH - EC 1.1.1.44) variaram tanto em número quanto em intensidade de bandas. A partir de 96 horas de envelhecimento artificial, todas as bandas perderam a intensidade. No tempo de 120 horas as bandas 6PGDH<sub>3</sub> e 6PGDH<sub>4</sub> desapareceram em todos os tratamentos o que ocorreu somente no tempo de 168 horas com as isoenzimas 6PGDH<sub>1</sub>, 6PGDH<sub>2</sub>. Os resultados de atividade dessa enzima mostraram similaridade com os encontrados pelos testes de germinabilidade de sementes (Tabela 3), sendo detectadas diferenças já nos períodos correspondentes a 96 horas de envelhecimento. A enzima 6 fosfogluconato desidrogenase não apresentou atividade para nenhum dos fungos em teste, não tendo portanto seus padrões modificados pela associação de microorganismos com as sementes. Trata-se portanto de uma enzima promissora para ser utilizada como marcador bioquímico que visa a detectar alterações em viabilidade de sementes.

A fosfoglucose isomerase (PGI - EC 5.3.1.9) (Figura 3) apesar de apresentar tendência de diminuição do número e intensidade de bandas com o processo de envelhecimento artificial, seus padrões eletroforéticos não se apresentaram uniformes para todos os tratamentos. Assim é que a banda PGI<sub>2</sub> estava presente nos tratamentos zero e 96 horas para sementes não inoculadas e desinfestadas, zero horas de envelhecimento para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus* e zero e 168 horas de envelhecimento para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. De uma maneira geral, houve tendência de desaparecimento da banda PGI<sub>3</sub> com aumento do tempo de envelhecimento (a partir de 120h para sementes não inoculadas e desinfestadas e de 96h para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus flavus*). Os resultados detectados por essa região PGI<sub>3</sub>, estão de acordo com os encontrados pelos testes padrão de germinação e tetrazólio para sementes desinfestadas e não inoculadas e pelos demais testes determinantes da germinabilidade para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus flavus* (Tabela 3). As demais bandas não apresentaram consistência em desaparecimento, perda de intensidade e aparecimento com relação ao envelhecimento artificial de sementes. Esta enzima encontra-se envolvida em reações de isomerização racemases, com fornecimento de energia, ou seja ela cataliza a transformação de glicose em frutose e vice - versa, no ciclo das hexoses com liberação de energia para o processo. Em sementes deterioradas esses processos energéticos podem ficar diminuídos pela menor atividade dessa enzima. Vale destacar também que esta isoenzima não apresentou atividade para os fungos em estudo.

Apesar de a tendência de desaparecimento de bandas com o aumento de tempo de envelhecimento artificial (sementes não inoculadas e desinfestadas e inoculadas com *Aspergillus*



*glaucus*), os padrões isoenzimáticos da hexoquinase (HK - EC. 2.7.1.1.) (Figuras 3 e 4) não foram consistentes, principalmente para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. Por tratar-se de uma enzima de transferência de grupos fosfatos, podendo atuar no metabolismo de açúcar, transformando por exemplo glicose em glicose fosfato com fornecimento de energia para a cadeia respiratória, seria correto a perda de atividade com o aumento do tempo de envelhecimento artificial, pois menor atividade menor liberação de energia. A atividade dessa enzima para os fungos em questão, apresentaram-se em forma de bandas acromáticas e não foi detectada diferença entre os dois organismos. O maior número de bandas acromáticas ocorreu para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*, o que coincide com os resultados detectados pelo "Blotter test" (Tabela 2A), onde o maior percentual de *Aspergillus flavus* foi detectado nas sementes desse tratamento.

Em relação aos perfis eletroforéticos de proteínas solúveis (fase sobrenadante) e de proteínas de armazenamento (fase pellet), referentes aos extratos de sementes secas de algodoeiro que foram submetidas aos tratamentos de desinfestação, inoculação com *Aspergillus glaucus*, com *Aspergillus flavus* e posteriormente envelhecidas pelos tempos de zero, 120 e 168 horas, pode ser observado pela Figura 5, que as três primeiras bandas dos perfis de proteína solúvel desapareceram para todos os tratamentos a partir de 120 horas de envelhecimento. As bandas 12 e 13 tenderam a desaparecer no tratamento de 168 horas para sementes não inoculadas e desinfestadas, a partir de 120 horas para sementes inoculadas com *Aspergillus glaucus*, e a partir de 96 horas para sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*. Esses resultados estão parcialmente de acordo com os detectados pelos testes determinantes da viabilidade de sementes. Também Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) e Varier e Dadeam encontraram decréscimo na quantidade de proteínas solúveis de sementes envelhecidas artificialmente. Essas três bandas iniciais, que desapareceram em sementes envelhecidas artificialmente, apresentaram um peso molecular em torno de 116.000 daltons, e as bandas 12 e 13 em torno de 14.200 daltons. Em relação às proteínas de armazenamento, globulinas (fase pellet), os perfis eletroforéticos não variaram nem com os diferentes tratamentos, nem com o envelhecimento artificial (Figura 5). Também Reuzeau, Goffner e Cavalie (1992) não detectaram relação precisa entre composição protéica e estimativa de germinabilidade. Já Cherry, Mayne e Ory (1974); Cherry, Young e Beuchat (1975); Cherry, Beuchat e Young (1976); Cherry, Beuchat e Kocheler (1978) encontraram perfis eletroforéticos de padrões de proteínas extraídas de sementes, modificadas pela ação de microrganismos. Neste trabalho tais mudanças não foram detectadas, provavelmente pelo estágio inicial e baixo nível de infecção que as sementes destegumentadas apresentavam (Tabela

1). A primeira banda de proteína de armazenamento detectada, apresentou um peso molecular em torno de 80.000 daltons, o que concorda com os resultados de Karavaeva, (1972), que isolou uma proteína de sementes de algodão, globular (peso molecular 170.000) dissociada em 2 subunidades de aproximadamente 80.000 daltons em SDS page. Muitos autores a exemplo de Nauttyal, Thapliyal e Purohtt (1985), Chauham, Gopinathan e Babu (1985), Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991); Dell'Aguila (1994) têm encontrado variações nos perfis eletroforéticos de proteínas associadas ao envelhecimento de sementes. É importante, no entanto, que se determine, para que se obtenha relação precisa entre composição protéica e estimativa de germinabilidade, qual tipo de proteína está variando, ou seja, proteínas solúveis ou de armazenamento. É válido lembrar que as proteínas solúveis são predominante as funcionais do citoplasma de sementes e as de armazenamento, globulinas (alcalina A, e alcalin B), fornecem polipeptídios, aminoácidos e nitrogênio para o desenvolvimento de plântulas no processo germinativo. Mudanças em atividades enzimáticas em sementes determinadas têm sido descritas desde 1930 (Revisão de Priestley, 1986); no entanto, parece que mudanças em proteínas de armazenamento só ocorrem em estágios bastante avançados de deterioração.

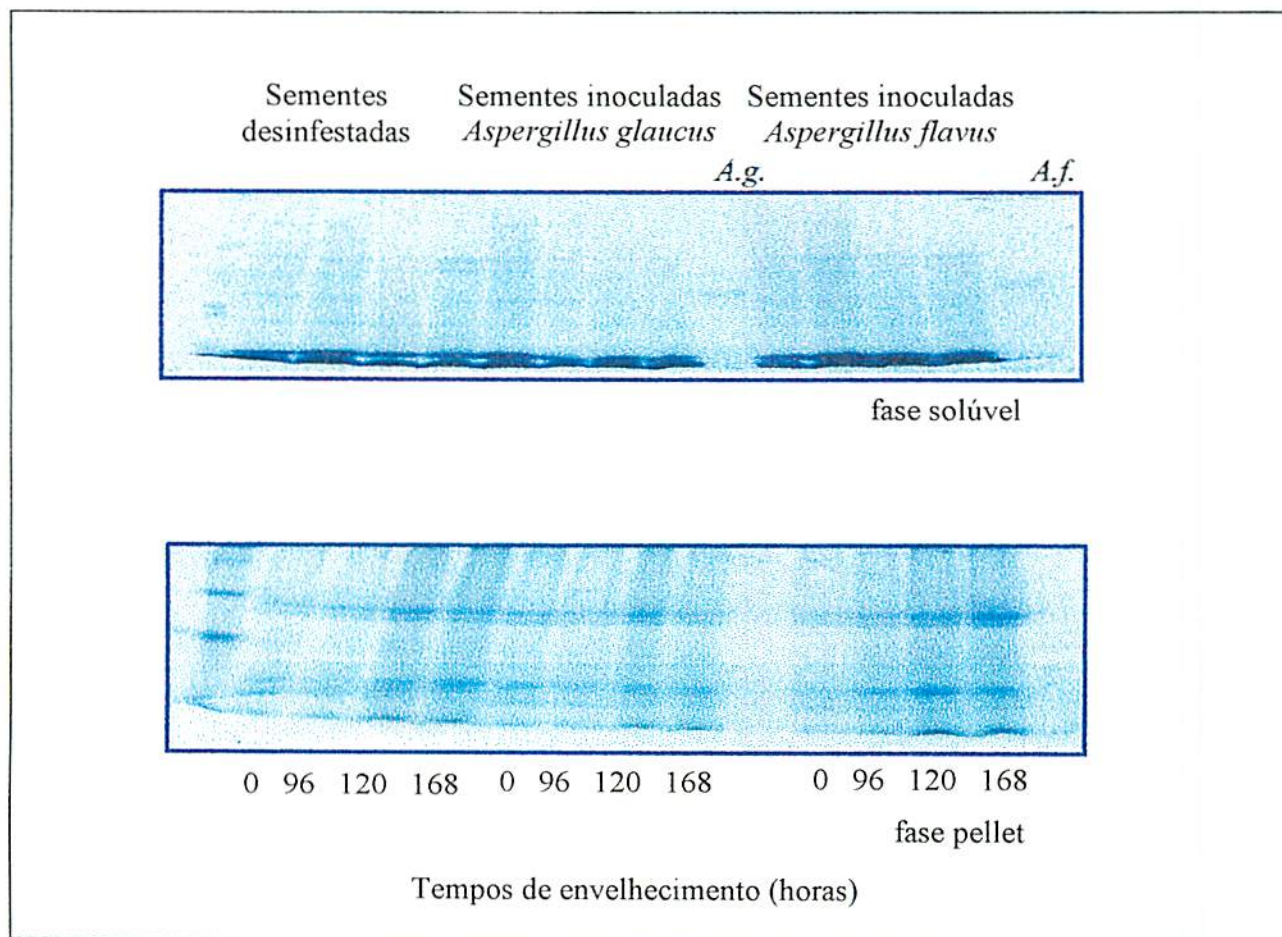


FIGURA 5. Zimograma de proteínas solúveis e total de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus flavus* em separado, e submetidas a envelhecimento artificial. UFLA - Lavras/MG, 1995.

#### 4 CONCLUSÕES

- 1 - Variações eletroforéticas nos padrões de isoenzimas e proteínas solúveis estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de algodoeiro.
- 2 - Não foram detectadas mudanças nos padrões eletroforéticos de proteínas de armazenamento de sementes de algodoeiro, em associação ao processo deteriorativo.
- 3 - Fosfatase ácida, enzima málica, esterase e hexoquinase apresentaram modificações em seus padrões eletroforéticos em função da associação fungos/sementes.
- 4 - As enzimas glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, enzima málica, peroxidase e 6 - fosfogluconato desidrogenase, revelaram-se como indicadores promissores do estágio de deterioração de sementes de algodoeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZIOWISK, T.T. (ed.). **Seed Biology: germination control, metabolism and pathology**. New York: Academic Press, 1972. v.2, n.4, p.283-315.
- ALFENAS, A.C.; JENG, R.; HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, p.1756-1762, 1984.
- ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical differences in deteriorating barley seed **Crop Science**, Madison, v. 10, p. 36-9, 1970.
- BASAVARAJAPPA, B.S., SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, New Delhi, v.19, p.279-286, 1991.
- BERJAK, P.; VILLIERS, T.A. Ageing in plant embryos. III. Acceleration of senescence following artificial ageing treatment. **New Phytologist**, v.71, p.513-518, 1972.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNAD - Departamento Nacional de Defesa Vegetal, 1992. 365p.
- BUCHVAROV, P.; GANTCHEFF, T.S. Influence of accelerated and natural ageing on free radical levels in soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.60, p.53-56, 1984.
- CARVALHO, N.M. de O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor de Sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

- CHAUHAN, K.P.S.; GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.13, p.629-641, 1985.
- CHERRY, J.P.; BEUCHAT, L.R.; YOUNG, C.T. Protein and aminoacid changes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds infected with *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.24: p.79-85, 1976.
- CHERRY, J.P.; MAYNE, R.Y.; ORY, R.L. Protein and enzymes from seeds of arachis hypogae L. IX. Electrophoretically detected changes in is peanut cultivares grown in different areas inoculation with *Aspergillus parasiticus*, **Physiology Plant Pathology**, v. 4, p. 425-434, 1974.
- CHERRY, J.P.; YOUNG, C.T.; BEUCHAT, L.R. Changes in proteins and tree and total aminoacido of peanuts (*Arachis hypogaea*) infected with *Aspergillus parasiticus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.53, p.2639-2649, 1975.
- CHERRY, J.P. Enzymes as quality indicators in edible plant tissues. In: HULTIN, H.O.: MILNER, M. (eds.). **Postharvest Biology and Biotechnology**. Wesport: Food and Nutrition Press, 1978. 462p.
- CONN, E.C.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451p.
- COPELAND, L.O.; McDONALD JR., M.B. **Principles of seed science and technology**. New York: Collier Mcmillan, 1985. 321p.
- CROCKER, N.; HARRINGTON, G.T. Catalase and oxidase content of seeds in relation to their dormency, age, vitality and respiration. **Journal of Agricultural Research**, Islamabad, v.15, p.137-74, 1918.
- FIELDING, J.L.; GOLDSWORTHY, A. Tocopherol levels and ageing in wheat grains. **Annals of Botany**, London, v.46, p.453-456, 1980.
- FRANCIS, A.; COOLBEAR, P. Changes in fatty acid content of the polar lipid fraction of ramato seeds induced by ageing and/or subsequent low temperature pre-sowing treatment. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.16, p.87-95, 1988.

- GIRARD, J.; LE MESTE, M. Absence de relation entre taux de radicaux libres mesuré par RPE et viabilité des semences de blé. **Comptes Rendus de L'Académie de Sciences, Series 3, Sciences de la Vie**, v. 314, p. 417-422, 1992.
- GORECKI, R.J.; HARMAN, G.E. Effects of antioxidants on viability and vigour of ageing seeds. **Seed Science and Technology**, New York, v.15, p.109-117, 1987.
- HAILSTONES, M.D.; SMITH, M.T. Lipid peroxidation in relation to declining vigour in seeds of soya (*Glycine max* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.133, p. 425-436, 1988.
- HAMILL, D.E.; BREWBBAKER, J.L. Isoenzyme polymorphisms in flowering plants. IV The peroxidase isoenzymes of maize. **Physiology Plantarum**, Prague, v. 22, p. 945-58, 1969.
- HARMAN, G.F.; MATTICK, L.R. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. **Nature**, London, v.260, p.323-324, 1976.
- HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.M.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.A. Free radical processes and loss of seed viability during drying in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, v.122, p. 273-279, 1992.
- HEPBURN, H.A.; GOODMAN, B.A.; MCPHAIL, D.B.; MATTHEWS, S.; POWELL, A.A. An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. **Journal of Experimental Botany**, London, v.37, p.1675-1684, 1986.
- KARAVAEVA, N.N. Study of structure of cottonseed globulin A. **Biochemistry (Translation) Biokhimiya**, Moscow, v.37, p.603-608, 1972.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1992. 725p.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection of the Antracnose Pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A.; DEWEY, F.M.; OLIVER, R. (ed.) **Modern Assays for Plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification**. Cambridge, 1994, p.183-189.

- MONTGOMERY, D.C. **Introduction to statistical quality control**. Washington: Journal Wiley & Sons, 1985. 520p.
- MOORE, R.P. **Mnaual de ensayos al tetrazólio**. Asociacion Internacional de Ensayos de Semillas. 1985. 91p.
- NAUTIYAL, A.R.; THAPLIYAL, A.P.; PUROHIT, A.N. Seed viability in sal. IV. Protein changes accompanying loss of viability in *Shorea robusta*. **Seed Science & Tecnology**, New Delhy, v.13, p.83-86, 1985.
- PEARCE, R.S.; ADBEL SAMAD, I.H. Change in fatty acid content of polar lipids during ageing of seeds of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v.31, p.1213-1290, 1978.
- PERL, M.; LURIA, I; GELMOND, H. Biochemical changes in sorghum seeds affected by accelrated ageing. **Journal of Experimental Botany**, London, v.29, p.497-509, 1978.
- PRASAD, T.; PATHAK, S.S. Impact of various storage systems on biodeterioration of cereal. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.40, n.1, p.39-46, 1987.
- PRIESTLEY, D.A.; LEOPOLD, A.C. Absence of lipid oxidation during accelerated ageing of soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v.63, p.726-729, 1979.
- PRIESTLEY, D.A.; McBRIDE, B.; LEOPOLD, C. Tocopherol and organic free radicals in soybean seeds during natural and accelerated ageing. **Plant Phisiology**, Washington, v.66, n.4, p.715-719, 1980.
- PRIESTLEY, D.A.; WERNER, B.G.; LEOPOLD, A.C.; MCBRIDE, M.B. Organic free radical levels in soybean seeds and pollen: the effects of hydration and ageing. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.64, p.88-94, 1985.
- PUKACKA, S. Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural ageing of seeds of *Acer platanoides*. **Physiologia Plantarum**, Conpenhagen, v.82, p.306-310, 1991.
- ROBERTS, E.H. Cytological, genetical and metabolic changes associated with loss of viability. In: ROBERTS, E.H. (ed.). **Viability of seed**. London: Chapman and Hall, 1972. p.253-306.



- RUDRUPAL, D.; NAKAMURA, S. The effect of hydration - dehydration pretreatments on eggplant and radish seed viability. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v.16, p.123-130, 1988.
- SHATTERS JR.; ABDEL-GHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: Changes in specific enzymne activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.33-41, Mar. 1994.
- SOMEN NANDI, GITALI DAS; SWATI SEN - MANDI. B- Amylase Activity as an Index for Germination Potencial in Rice, **Annals of Botany**, London, v.75, p.463-467, 1995.
- STEWART, R.R.C.; BEWLEY, J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated ageing of soybean axes. **Plant Physiology**, Washington, v.65, p.245-248, 1980.
- THRONEBERRY, G.O.; SMITH, K.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. **Plant Physiology**, Washington, v.30, p.337, 1955.
- VANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; McDONALD JR., M.B. Anaerobic metaolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, New York, v.102, n.1, p.33-39, 1987.
- WALTER. J. Chemical reactivity of a macromolecule as function of its age. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.69, p.410-411, 1963.

## Capítulo 2

### RESUMO

VIEIRA, Maria das Graças Guimarães Carvalho. **Diferenciação entre *Colletotrichum gossypii* South e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* Costa & Fraga através de marcadores RAPD.** Lavras: UFLA, 1996. 113p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).<sup>\*</sup>

*Colletotrichum gossypii* e *C.gossypii* var. *cephalosporioides* são fungos causadores de diferentes e importantes doenças em algodoeiro, ambos transmissíveis por sementes e de difícil diferenciação em laboratório por métodos convencionais. Apesar da semelhança morfológica entre ambos, *C.gossypii* var. *cephalosporioides* causa danos mais severos à cultura já estabelecida no campo. O desenvolvimento de técnicas moleculares visando à diferenciação desses organismos é uma alternativa na busca de um diagnóstico rápido e seguro do estado sanitário das sementes. No presente trabalho, diferentes isolados de cada fungo foram comparados pela técnica de marcadores moleculares RAPD. As reações de amplificação geraram 109 bandas de DNA polimórficas e 34 monomórficas. Os produtos de amplificação polimórficos produziram um padrão característico para cada um dos fungos estudados, permitindo estimar a distância genética entre eles. Foi verificada alta dissimilaridade genética entre os isolados de *C.gossypii* var. *cephalosporioides* e os isolados de *C.gossypii* (80%). A dissimilaridade genética dentro de *C. Gossypii* variou de 23% a 32%. Os ensaios de patogenicidade comprovaram os resultados acima, concluindo que a utilização de marcadores moleculares constitui-se em uma ferramenta útil na diferenciação dos dois fungos considerados.

---

<sup>\*</sup>Orientador: Prof. Dr. José da Cruz Machado. Membros da banca: Prof. Dr. João Bosco dos Santos; Prof. Dr. Rubens Sader; Prof. Dr. Roberto Ferreira da Silva e Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu.

## SUMMARY

### **Differentiation between *Colletotrichum gossypii* south and *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* based on RAPD markers**

*Colletotrichum gossypii* and *C.gossypii* var. *cephalosporioides* are fungi causing different and economically important diseases in cotton, both seed transmitted and hardly differentiated by conventional seed health testing used in routine analysis. Despite the high morphological similarity between both fungi, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* is considered more damaging to cotton in the field where it may cause considerable reduction in yield. The development of molecular techniques aiming to distinguish both organisms is a promising alternative which can be launched to perform a reliable, quick and early diagnostic of their occurrence in seed lots of cotton. In the present work, some isolates of both fungi were compared by using RAPD markers. The amplification reaction provided 109 polymorphic and 34 monomorphic DNA bands; the polymorphic ones producing typical patterns for both fungi. These patterns allowed the estimation of the genetic distance between isolates of each *Colletotrichum*. The genetic dissimilarity between isolates of *C.gossypii* var. *cephalosporioides* was 80% and of *C.gossypii* ranged 23 to 32%. The results of the molecular determinations were confirmed by the pathogenicity tests, indicating accordingly the reliability of molecular markers to distinguish both *Colletotrichum* varieties.

## 1 INTRODUÇÃO

Os métodos tradicionais de identificação de fungos em sementes, como a incubação em meio ágar e em papel de filtro (Blotter Test) apresentam pouca sensibilidade, sobretudo quando se trata de sub-espécies, variedades, raças e até mesmo espécies morfológicamente semelhantes.

No caso específico da cultura do algodoeiro, a ramulose, uma das doenças mais sérias atualmente no Brasil devido aos danos e prejuízos causados à cultura, (Himati, 1980; Carvalho et al., 1984; Lima, Vieira, Carvalho, 1984, 1985; Pizzinato 1987, Pizzinato e Cia, 1987, Tanaka, 1990; Pizzinato, 1994, Machado, 1994) cujo patógeno é transmitido por semente (Tanaka 1990), não tem tido sua presença relatada como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nos testes de sanidade de rotina. A grande semelhança das estruturas de *Colletotrichum gossypii* agente causal da antracnose e o agente causal da ramulose, observadas pelos métodos rotineiros, não tem permitido distingui-los. <sup>De aqui</sup> Dudiénas (1990) em estudos sobre caracterização morfológica, auxanográfica e patogênica desses dois fungos, encontrou dificuldades na distinção rápida e segura desses dois patógenos através das características morfológicas, conseguindo no entanto, diferenciá-los quanto à auxanografia e patogenicidade. Nesses casos torna-se necessário o isolamento do patógeno visando sua obtenção em cultura pura para após determinar as diferenças entre os dois organismos quanto ao aspecto nutricional e via inoculação em plantas susceptíveis. Tais processos além de morosos, caros e inviáveis em testes rotineiros, quase sempre apresentam resultados inconclusivos, havendo questionamento quanto a sua validade em esquemas de controle

de qualidade para organismos de alto risco. Segundo (Malaguti, 1955; Follin e Mangano, 1983, citados por Tanaka, 1991; Tanaka, Menten e Machado, 1995), existe ainda a possibilidade de diferenciar esses organismos quanto ao hábito de crescimento. Por exemplo, as culturas do agente causal da antracnose geralmente apresentam crescimento mais uniforme, superfície mais homogênea e coloração rosada devido ao grande número de conídios formados, enquanto para o agente da ramulose, as culturas, no geral, são mais escuras, tendendo a tons pardos, acinzentados ou cinza esverdeado, com aspecto granuloso e menor esporulação. Segundo Tanaka (1991) a separação baseada apenas nessas características não é por si só segura, uma vez que se tem constatado dentre isolados de um mesmo patógeno, diferenças acentuadas quanto a esporulação, taxa de crescimento, pigmentação, forma e relevo das colônias. Culturas atípicas de um dos organismos, muitas vezes se assemelham às culturas do outro, dificultando a identificação. Segundo a autora, características culturais só têm sido feitas por comparação, e em testes rotineiros em laboratório de patologia de sementes, questiona-se, além da falta de precisão, a viabilidade de se manter um grande número de isolados dos patógenos, para comparações.

A avaliação da qualidade de sementes através de testes rápidos e precisos vêm assumindo cada vez maior importância no contexto da produção de sementes, não só para dar subsídios aos programas de controle de qualidade, mas na agilização do processo de produção, redução de custos, preservação de áreas de plantio redução do uso de defensivos, além de proporcionar o diagnóstico precoce de inúmeras doenças.

O uso de técnicas moleculares, baseadas na imunologia e análises de ácidos nucleicos, tem sido aplicada em diversas áreas da micologia e tem possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de patógenos de plantas, comumente transmitidos por sementes. (Manicom et al., 1990; Walker e Dougan, 1989; White et al., 1989; /

abragui

Bej, Mahbuvani, Atlas, 1991; Nazar et al., 1991; Steffan e Atlas, 1991; Ball e Reeves, 1992; Mills, Sreenivasaprasad e Brown, 1992; Grajal-Martin, Simon, Muehlbauer, 1993).

O teste de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é um dos recursos mais viáveis para uso rotineiro, devido a sua rapidez e simplicidade, além de possuir um poder equivalente ao teste de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) para detecção de variabilidade genética. Contudo, para o uso desta técnica deve-se trabalhar com culturas puras do fitopatógeno, pois os “primers” são aleatórios e podem portanto, sequenciar qualquer molécula que esteja na mistura, (Henson e French, 1993; Caetano-Anolles, Bassam, Gresshoff., 1991). Utilizando a técnica do RAPD, podem ser citados, entre outros, os trabalhos de: Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer (1993), que conseguiram sucesso na identificação da raça 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp.pisi de outras três raças; Guthrie et al. (1993) trabalhando com *Colletotrichum graminicola*; Schafer e Wostemeyer (1992), trabalhando na diferenciação de isolados agressivos e não-agressivos de *Phoma lingam*; o de Crowhurst et al. (1991), os quais trabalharam na diferenciação de 2 raças de *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* e Vilarinhos et al. (1995) que trabalharam na caracterização de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Em face dos aspectos considerados procurou-se no presente estudo diferenciar os fungos *Colletotrichum gossypii* South. var. *Cephalosporioides* Costa e Fraga Jr. e *C. gossypii* South., através de marcadores moleculares RAPD, utilizando isolados de cultura pura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados fúngicos

Quatro isolados foram obtidos de sementes de algodão, através do método de incubação em papel de filtro (Blotter Test), dois provenientes de região produtora do Estado de São Paulo e dois do Triângulo Mineiro. De acordo com o hábito de crescimento apresentado sobre as sementes examinadas em estereiomicroscópio, seguindo metodologia de Tanaka, Menten e Machado (1995), dois isolados apresentaram-se com características de *Colletotrichum gossypii* e dois outros com características de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Posteriormente, tais fungos foram cultivados em meio BDA, visando a obter culturas puras. Para a multiplicação de inóculos dos isolados obtidos, foram preparadas culturas com idade de sete dias em meio BDA e em seguida, fragmentos de micélio retirados da periferia das colônias foram transferidos para meio líquido de glicose e extrato de levedura (Mills, Sreenivasaprasad e Brown, 1994), em frascos cônicos de 250ml que permaneceram incubados à 25°C sob agitação, no escuro, por mais 7 dias. O micélio produzido foi então coletado à vácuo e moído em nitogênio líquido.

O DNA genômico foi extraído de 200mg (peso fresco) de micélio por trituração manual em almofariz e pistilo de porcelana, utilizando o protocolo de extração de Doyle and Doyle (1987), modificado pela adição de 1% de 2- mercaptoethanol. A concentração de DNA foi determinada em fluorômetro Hoefer Scientific Modelo TKO 100.

## 2.2 Análise RAPD

Vinte e cinco primers de 10 bases, da marca Operon (A<sub>1</sub>; A<sub>3</sub>; A<sub>4</sub>; A<sub>7</sub>; A<sub>10</sub>; A<sub>11</sub>; A<sub>15</sub>; A<sub>17</sub>; A<sub>18</sub>; B<sub>01</sub>; B<sub>02</sub>; B<sub>3</sub>; B<sub>4</sub>; B<sub>8</sub>; C<sub>4</sub>; C<sub>9</sub>; D<sub>7</sub>; D<sub>14</sub>; G<sub>9</sub>; E<sub>20</sub>; F<sub>15</sub>; F<sub>3</sub>; G<sub>8</sub>; G<sub>3</sub>; G<sub>2</sub>.) foram obtidos comercialmente. Cada reação de 10µl foi preparada com a seguinte constituição: água pura, 2µl de tampão 5X (Santos et al., 1994), DNTPs (100µM cada), Taq polimerase (0,6 unidades), 2µl de Primer (0,4µM) e 2µl de DNA (10ng/µl)

As amplificações foram processadas em tubo ependorf de 0,2ml usando termo-ciclador Perkim Elmer. O programa constou de uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos; 45 ciclos de amplificações à 94°C por 15 segundos; 36°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto. Após os 45 ciclos foi incluído um programa de extensão à 72°C por 5 minutos com a finalidade de assegurar que todos produtos fossem completamente amplificados. Os produtos de RAPD foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente corados com Brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 minutos. Os geis foram fotografados sob luz ultravioleta e avaliados quanto a ocorrência de bandas monomórficas e polimórficas entre os genótipos dos fungos. Considerando as bandas polimórficas foi estimada a distância genética entre os pares de genótipos. Para isso, foi atribuído o valor 1 para a presença de uma dada banda em um genótipo e zero, para sua ausência em outro genótipo. A distância genética foi estimada através da seguinte expressão:

$$d_{ij} = m/n$$

Onde:  $d_{ij}$  é a distância genética entre os genótipos  $i$  e  $j$ ;  $m$  é o número de bandas polimórficas entre os genótipos  $i$  e  $j$ , isto é, 0,1 e 1,0;  $n$  é o número total de bandas polimórficas envolvendo todos os genótipos.



### 2.3 Patogenicidade dos isolados

A patogenicidade dos quatro isolados foi avaliada através da inoculação por pulverização da suspensão do inóculo constituída de conídios, em plantas de algodoeiro, var. IAC-20, em casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em vasos de plástico, de 15cm de diâmetro, contendo uma mistura de terra e areia na proporção 2:1 esterilizada com brometo de metila.

Para o preparo da suspensão de esporos, foram adicionados 10ml de água destilada esterilizada, à cada placa de Petri contendo a cultura dos fungos, com idade de 7 dias, obtida por incubação à 20°C sob NUV., com fotoperíodo de 12h. Um pincel fino foi aplicado suavemente sobre a superfície das colônias a fim de facilitar a liberação dos conídios. Essas suspensões foram filtradas através de duas camadas de gase esterilizado e suas concentrações ajustadas para  $1 \times 10^6$  conídios/ml, por contagens em câmara de contagem de Neubauer e subseqüente diluições com água destilada esterilizada.

A pulverização foi realizada quando as plantas tinham 30 dias de idade, ao final da tarde, utilizando-se um atomizador De Vilbiss modelo 15, procurando atingir principalmente a parte apical da planta.

Após a inoculação as plantas permaneceram em câmara úmida, proporcionada por uma cobertura plástica, por 48 horas.

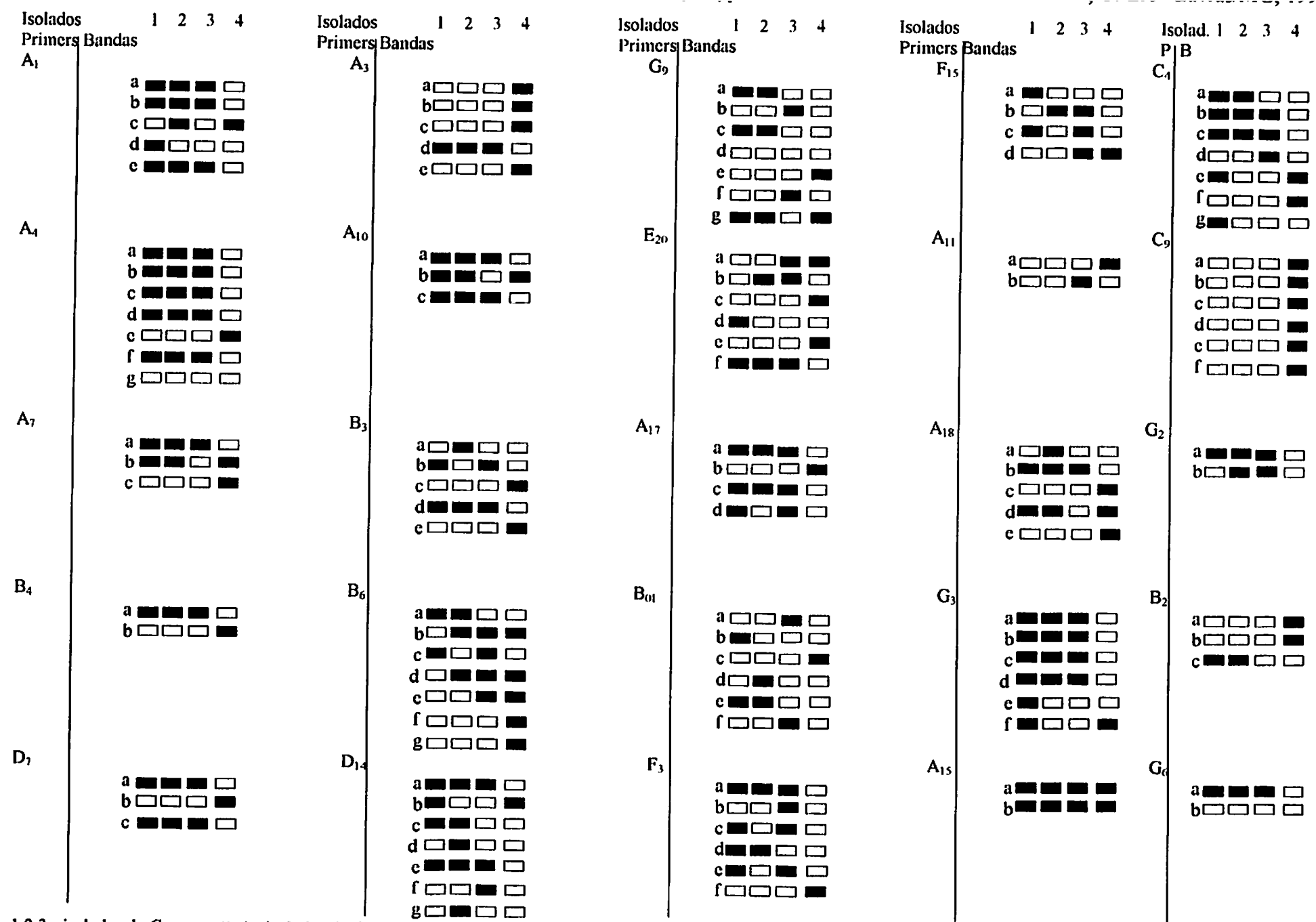
A avaliação foi efetuada 25 dias após a inoculação, através de sintomas visuais típicos da ramulose.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise RAPD

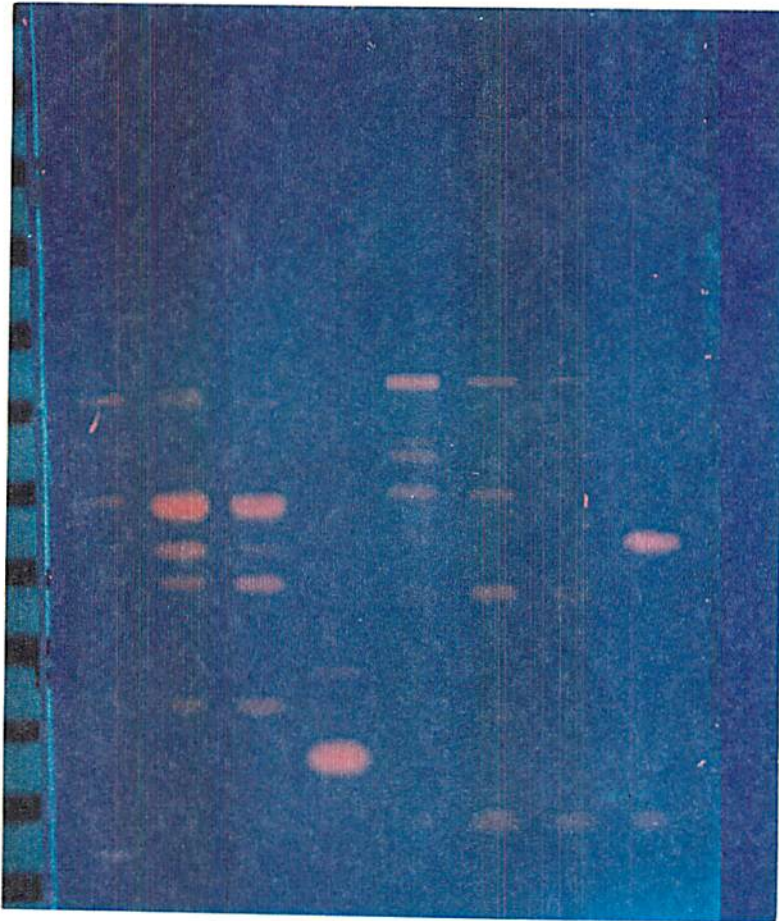
As reações de amplificação com os vinte e cinco primers geraram cento e nove bandas de DNA polimórficas e trinta e quatro monomórficas (Figura 1 e Tabela 1). As bandas foram identificadas com letras do alfabeto. No caso do primer A1 por exemplo, foram observadas cinco bandas polimórficas e identificadas de "a" até "e". Seguindo-se a ordem alfabética, a banda "a" corresponde ao maior fragmento de DNA e a "e", ao fragmento mais curto.

Os padrões de bandas obtidos de DNA, similarmente a um código, permitem a identificação de cada indivíduo. Pode-se observar pela Tabela 1, que a maioria dos primers testados geraram bandas exclusivas dos diferentes genótipos, as quais podem ser usadas para caracterização e identificação dos mesmos. Dos vinte e cinco primers testados, dez (A<sub>1</sub>; A<sub>3</sub>; A<sub>4</sub>; A<sub>7</sub>; A<sub>10</sub>; B<sub>4</sub>; C<sub>9</sub>; D<sub>14</sub>; G<sub>3</sub> e G<sub>2</sub>.) foram capazes de diferenciar 3 isolados de *C.gossypii* (1,2 e 3) e um de *C.gossypii* var. *cephalosporioides* (isolado 4), demonstrando a eficiência de marcadores RAPD na genética dos fungos, a exemplo de outros autores, (Foster et al., 1993; Henson e French, 1993; Willians et al., 1990). Os demais primers, com exceção do A<sub>15</sub>, o qual não conseguiu detectar qualquer diferença entre os isolados, detectaram certa variabilidade existente dentro de *C.gossypii*, o que indica a possibilidade do uso dessa técnica na identificação de raças neste caso. Esses resultados reforçam o sucesso que outros autores, (Grajal - Martin, Simon e Muehlbauer 1993;



1,2,3 - isolados de *C. gossypii*; 4 - isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

■ Presença de bandas  
□ Ausência de bandas



(1) (2) (3) (4) (1) (2) (3) (4)

FIGURA 1. Gel de agarose mostrando padrão dos produtos amplificados obtidos com os primers A4 e A7 da marca Operon (da esquerda para a direita) (1), (2), (3) *C. gossypii* e (4) *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, UFLA - MG - 1995.

Guthrie et al., 1993; Chowrurst et al., 1991; Vilarinhos et al., 1995) têm conseguido na identificação de raças de diferentes fungos patogênicos.

Os produtos de amplificação polimórficos produziram um padrão característico para a distância genética entre eles (Tabela 1). De acordo com as distâncias genéticas entre os pares dos genótipos analisados, os isolados 1 e 2 de *C.gossypii* foram os que apresentaram maior similaridade (d= 24%), seguido dos isolados 2 e 3 (d = 28%) e 1 e 3 (d= 32%). Esses resultados discordam dos encontrados por Dudienas, 1990; Tanaka, Menten e Machado, 1995, os quais afirmam ser possível a identificação e diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pela análise morfológica, uma vez que o isolado 3 tinha sido classificado anteriormente, pelos método "Blotter Test", como *C. gossypii* var *cephalosporioides*. Por outro lado, os isolados de *C.gossypii* (1,2 e 3) apresentaram alta dissimilaridade genética em relação ao isolado de *C.gossypii* var. *cephalosporioides* (1 e 4 = 80%; 2 e 4 = 76%; 3 e 4 = 77%).

Desta forma, pode ser observado pelo dendograma (Figura 2), que os isolados foram agrupados em 2 grupos distintos, sendo que o primeiro grupo, composto dos isolados 1,2 e 3, apresentam baixa dissimilaridade genética entre eles. O segundo grupo ficou constituído apenas pelo isolado 4, o qual é o mais distinto deles, com distâncias genéticas variando de 76 a 80% em relação aos demais.

Esses resultados, demonstram que a técnica RAPD pode ser de grande utilidade para a identificação e diferenciação de importantes fungos patogênicos, a exemplo de *C.gossypii* e *C.gossypii* var. *cephalosporioides*.

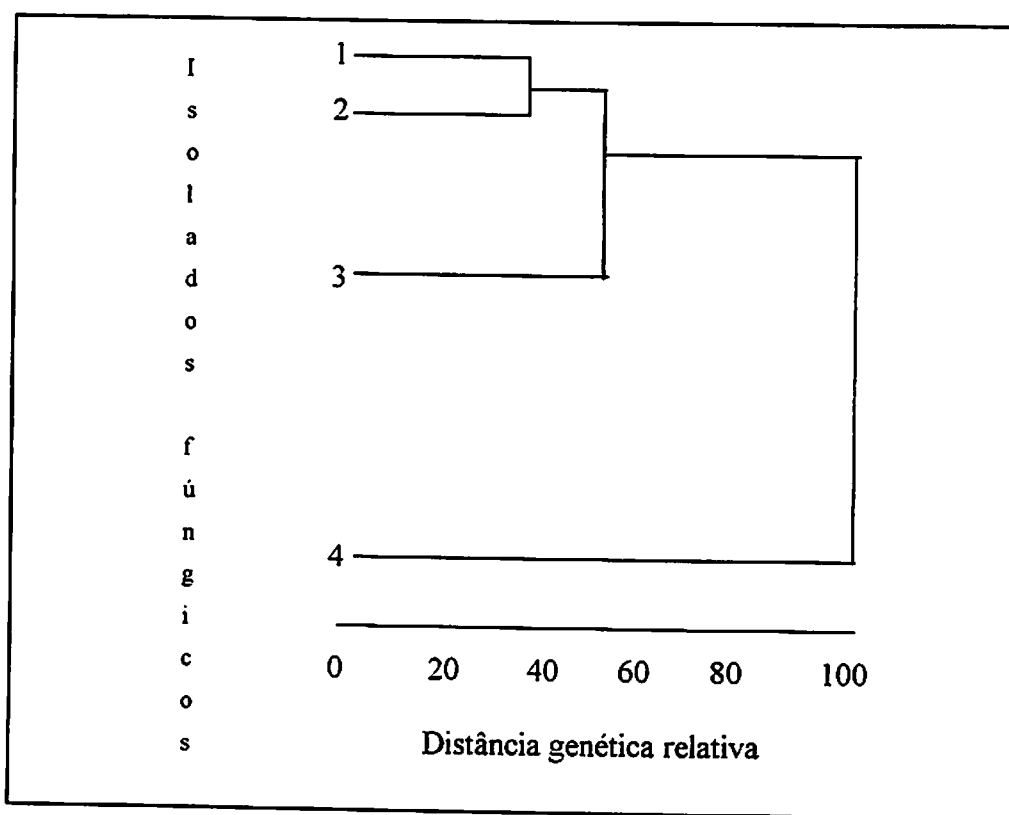


FIGURA 2. Dendrograma revelando as distâncias genéticas entre quatro isolados de *C. gossypii*, baseadas em marcadores RAPD. UFLA, MG, 1995. Isolados 1 - *C. gossypii*; 2 - *C. gossypii*; 3 - *C. gossypii* e 4 - *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

### 3.2 Patogenicidade dos isolados em plantas de algodão

Dos quatro isolados comparados, apenas o isolado número quatro apresentou sintomas característicos da ramulose em plantas de algodoeiro, o que confirmou os resultados obtidos com a análise de RAPD. O isolado três inicialmente considerado como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelo hábito de crescimento sobre as sementes de algodoeiro, teve sua identidade revelada como *C. gossypii*, agente causal da antracnose. Os sintomas da ramulose consistiram de pequenas lesões necróticas no limbo foliar, nervuras e ao longo do pecíolo. Em

estágios mais avançados, essas lesões provocaram deformação e/ou queda das folhas, atingindo a parte apical, levando a um superbrotamento das plantas.

Os demais isolados (1,2 e 3), não apresentaram sintomas característicos nas plantas adultas de algodoeiro.

#### 4 CONCLUSÃO

- A utilização de marcadores moleculares RAPD permitiu a diferenciação dos fungos patogênicos *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, S.; REEVES, J. Application of rapid techniques to seed health testing- prospects and potential. In: DUNCAN, J.M.; TORRANCE, L. (ed.). **Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens**. Cambridge: University Press, 1992. p.193-207.
- BEJ, A.K.; MAHBUVANI, M.H.; ATLAS, R.M. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 26, p.301-334, 1991.
- CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, New York, v.9 p.553-557, 1991.
- CARVALHO, L.P.; CAVALCANTI, F.B.; LIMA, E.F.; SANTOS, E.D. Influência da ramulose nas características de fibra e produção do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p.593-8, 1984.
- CROWHURST, R.N.; GAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLETON, M.D. differentiation of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* **Current Genetics**, New York, v.20, p.391-396, 1991.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, London, v.12, p.13-15, 1987.
- DUDIENAS, C. **Caracterização morfológica, auxanográfica e patogenicidade de *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr.** Piracicaba: ESALQ, 1990. 67p.
- FOSTER, L.M.; KOZAK, K.R.; LOFTUS, M.G.; STEVENS, J.J.; ROSS, K.I. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. **Mycology Research**, Great Britain, v.97, n.7, p.769-781, 1993.

- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *psi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n.6, p.612-614, 1993.
- GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, W.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.3, p.283-287, 1993.
- HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.31, 81-109, 1993.
- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro - *Gossypium spp.* In: GALLI, F. (coord). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: ed. Agronômica Ceres, 1980. v.2, p.29-48.
- LIMA, E.F.; CARVALHO, J.M.F.C.; CARVALHO, L.P.; COSTA, J.N. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, através da sementes do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p. 99-109, 1985.
- LIMA, E.F.; VIEIRA, R.M.; CARVALHO, J.M.C. Influencia de *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* na deterioração de sementes de algodoeiro armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.3, p.555-560, 1984.
- MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. In: LUZ, W.C., ed. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.229-264, 1994.
- MANICOM, B.Q.; BAR-JOSEPH, M.; KOTZE, J.M.; BECKER, M.M. A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compability groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, p.336-339, 1990.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.98, p.137-144, 1992.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection of the Antracnose Pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A.; DEWEY, F.M.; OLIVER, R. (ed.) **Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification**. Cambridge, 1994, p.183-189.

- NAZAR, R.N.; HU, X. ; SCHMIDT, J.; CULHAM, D.; ROBB, J. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p. 1-11, 1991.
- PIZZINATTO, M.A. Testes de sanidade de sementes de algodão. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.331-346.
- PIZZINATTO, M.A.; CIA, E. Relação entre incidência de ramulose do algodoeiro em campo e detecção de *C.gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.13, p. 15, 1987.
- PIZZINATO, M.A.; CIA E.; FUZATTO, M.G. Relação entre a severidade de ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.1 p. 50-54, 1994.
- SANTOS, J.B. dos; NIENHUIS, J.; SCKROCH, P.; SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and genetic markers in determining genetic similarity among *Bassica oleraceae* L. genotypes. **Theoretical Applied Genetics**, Vienna, v.87, n.8, p909-915, Mar. 1994.
- SCHAFER, C.; WOSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*) **Journal Phytopathology**, v.136, p. 124-136, 1992.
- STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.45, p.137-161, 1991.
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 111p. (Tese-Doutorado em Fitopatologia).
- TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; MACHADO, J.C. Growth habit of *Colletotrichum* species on cotton seeds. In: INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 24 th Congress, Copenhagen, June, 7-16. 1995.
- TANAKA, M.A.S.; Problemas na detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J.O.M. (ed.). **Patógenos em Sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. p. 93-108.

VILARINHOS, A.D.; PAULO JR., T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the Random Amplified Polymorphic DNA Technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.194-197, 1995.

WALKER, J.; DOUGAN, G. DNA probes: a new role in diagnostic microbiology. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.67, p.229-238, 1989.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GLEFAND, D.H., SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (ed.). **PCR protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York, Academic press, p. 315-322, 1989.

## Capítulo 3

### RESUMO

VIEIRA, Maria das Graças Guimarães Carvalho. **Uso de isoenzimas para diferenciação de *Colletotrichum gossypii* South e *C.gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr. isolados em sementes de algodão.** Lavras: UFLA, 1996. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).\*

Para diferenciar os fungos *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, análises de isoenzimas foram efetuadas a partir de isolados em cultura pura dos dois fungos. Análise isoenzimática foi efetuada em eletroforese monodimensional de gel poliacrilamida (1D-PAGE) a 7,5% (gel de separação) e a 3,5% (gel de concentração), utilizando Tris-Glicina pH 8,9 como sistema-tampão gel/eletrodo. Dentre os cinco sistemas enzimáticos testados, os perfis de esterase, fosfatase ácida e peroxidase permitiram distinguir os isolados *C. gossypii* do *C.gossypii* var. *cephalosporioides*. Os ensaios de patogenicidade comprovaram os resultados obtidos concluindo-se que a utilização de padrões eletroforéticos empregando marcadores bioquímicos pode ser uma ferramenta útil na diferenciação dos dois fungos.

Abreviaturas: 1D-PAGE- Eletroforese monodimensional em gel poliacrilamida

---

\*Orientador: Prof. Dr. José da Cruz Machado. Membros da banca: Prof. Dr. João Bosco dos Santos; Prof. Dr. Rubens Sader; Prof. Dr. Roberto Ferreira da Silva e Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu.

## SUMMARY

**Differentiation of *Colletotrichum gossypii* south e *C. gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr. by isoenzymes in cotton seeds**

The differentiation of *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* by electrophoretic analysis using isoenzymes was investigated in pure culture. The isoenzyme analysis was performed in electrophoresis 1D-PAGE at 7.5% (separating gel) and at 3.5% (concentrating gel), using Tris-Glycine pH 8.9 as standard buffer in the gel-electrode system. Out of the five isoenzymes systems tested, the profiles of esterase, phosphatase acid and peroxidase were able to distinguish the isolates of both *Colletotrichum* in the present work. The results of the pathogenicity and electrophoresis assays were correlated which makes this technique as a promising tool to be used to differentiate both pathogens.

## 1 INTRODUÇÃO

Grande importância tem sido dada à detecção e identificação de fungos patogênicos de plantas, em função da necessidade de se utilizarem materiais propagativos livres de agentes infecciosos, de conferir proteção às áreas de cultivo agrícola e da preocupação em se reduzir o uso de defensivos químicos na agricultura.

A semente é o insumo biológico utilizado universalmente na prática de propagação de plantas da maior parte das espécies cultivadas pelo homem, e sobre o qual recaem todos os fatores de produção, condicionando o sucesso ou o fracasso da atividade agrícola correspondente. O aspecto sanitário, segundo Machado (1994), assume real importância, uma vez que a associação patógenos/semente, apesar de poder ser avaliada sob diferentes prismas, sempre culmina com a dimensão econômica que cada tipo de interação determina. Vale ressaltar que prejuízos decorrentes dessa associação não se restringem apenas a perdas imediatas de população de plantas no campo, mas abrangem também uma série de outras implicações, que podem levar a danos incalculáveis todo o sistema agrícola, tais como introdução de patógenos em novas áreas e/ou mesmo inviabilização de áreas nobres e tradicionais de cultivo.

Do ponto de vista sanitário, considera-se primordial o estabelecimento de padrões em programas de certificação e de quarentena vegetal. Reconhece-se também que, o estabelecimento de padrão de tolerância para um dado patógeno em um hospedeiro é tarefa das mais complexas, sendo destacados por Machado (1994) quatorze aspectos que de forma direta ou indireta devem ser considerados neste tipo de decisão. Dentre os aspectos considerados, torna-se

oportuno salientar a importância econômica do patógeno e o método de análise sanitária em sementes.

Com relação ao aspecto econômico, Machado (1994), relata como de grande importância para o Brasil na atualidade, para a cultura do algodoeiro, o patógeno *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr. Segundo Abrahão e Costa (1949); Cia (1977); Kimati (1980); Carvalho et al. (1984) os danos causados por este fungo são severos, com redução de 20 a 30% na produção, podendo chegar em casos extremos a 85%. A importância das sementes na transmissão desse patógeno, é evidenciada pela constatação da doença em áreas antes isentas (Tanaka, 1990). Desta forma, considera-se de capital importância a identificação segura desse patógeno quando em associação às sementes.

Os métodos convencionais de identificação de fungos, baseados em características morfológicas, nem sempre oferecem a segurança e precisão requeridos, uma vez que, características como pigmentação de micélio, formação, forma, tamanho de conídios são instáveis e altamente dependentes da composição dos meios, condições de ambiente e da própria variação do patógeno. A variação fenotípica é abundante e muita habilidade é requerida para distinguir entre espécies intimamente relacionadas e para reconhecer variações dentro de espécies.

No caso específico de sementes de algodão, a identificação diferenciada dos fungos *C. gossypii* South, causador da antracnose e *C. gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr., agente causal da ramulose, é necessária, uma vez que, sementes portadoras desse último patógeno não devem ser recomendadas para plantio, conforme padrões propostos pela ABRATES (Machado\*, comunicação pessoal).

---

\* Machado, José da Cruz, Professor Titular do Departamento de Fitossanidade da UFLA.



A exemplo do que ocorre com a maioria dos fungos, a identificação de *C. gossypii* é baseada em características morfológicas que não têm se mostrado sensíveis para diferenciação precisa desse fungo e sua forma variante *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Em virtude disso, a utilização de marcadores bioquímicos (proteínas e de isoenzimas) e moleculares (RAPD) podem constituir métodos seguros e viáveis, visto que os mesmos têm se mostrado seguros para apontar variações mesmo ao nível de raças fisiológicas e patogênicas de inúmeros tipos de fungos (Foster et al., 1993; Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer, 1993).

Nesta direção, os estudos têm avançado rapidamente, podendo ser destacados os trabalhos de Brommonschenkel, Alfenas et al. (1987); Nwaga, Lenormand e Citharel (1990) com espécies de *Phytophthora*; Moreira (1989) com espécies de *Cylindrocladium*; Kimura e Dianese (1983) com *Xanthomonas campestris*; Alfenas, Jeng e Hubbes (1984) com *Cryphaeotria cubensis*; Alfenas, Jeng e Hubbes, 1984 com espécies de fungos; Keller (1992) com *Suillus* isolados de *Pinus cembra* L.; Pujol et al., (1993) com *Candida albicans*; Ferreira, Bosland e Williams (1991) com *Pyrenochaeta terrestris* isolado de cebola; Bonde et al. (1991) com espécies de *Septoria* associadas a citrus na Austrália e Estados Unidos; Tuskan, Walla e Leendquist (1990) com isoladas de *Peridermium* de diferentes hospedeiros e localização geográfica; Cruickshank (1987) com espécies de *Penicillium*. Com relação ao tipo e número de isoenzimas utilizados nestes estudos, nota-se que há uma variação acentuada. Por exemplo, para identificação de espécies de *Fusarium* segundo Keressies et al. (1994), a maioria das pesquisas tem sido desenvolvidas com esterases não específicas e polygalacturonase. Ainda sob este aspecto, o referido autor cita trabalhos de Meyer et al.; Meyer e Renard; Drysale e Bratt; Matsuyama e Wakimoto; Szecsi et al.; Ho et al.; Strand et al.; Scala et al.; Keressies et al., que trabalhando com  $\alpha$  e  $\beta$ - D-galactosidase,  $\alpha$ -esterase,  $\beta$ - D glucosidase, leucina amino peptidase, liase, peroxidase, glutamato oxaloacetato transmitase e poligalacturonase pode ser possível distinguir *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* de

*Fusarium oxysporum* não patogênico e de *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*; por outro lado, Some e Tivoli, (1993) trabalhando com 3 espécies de *Fusarium* e 5 variedades de *Fusarium roseum* comentam que de vinte isoenzimas analisadas apenas três ou quatro puderam ser usadas na identificação.

Análises de isoenzimas também têm sido usadas com sucesso para detectar fungos em tecidos de plantas, sendo exemplos os trabalhos de Dewit et al. ; Hepper et al. (1986, 1988a, b) citados por Kerssies et al. (1994).

Por ser um método relativamente simples, barato quando considerados os prejuízos causados em decorrência da sua não utilização, além de possibilitar a análise de vários locos simultaneamente o que permite a diferenciação de organismos intimamente ligados e ainda o fato de constituir-se de um produto direto da ação gênica, tornando-se portanto mais confiável que outros métodos baseados na avaliação de características morfológicas, é que se acredita que o uso de marcadores bioquímicos pode ser uma das alternativas mais promissoras para identificação e detecção de fungos voltados principalmente para programas de produção de sementes de alta qualidade.

A presente pesquisa objetivou portanto, diferenciar os fungos *C.gossypii* South e *C.gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa & Fragra Jr. pela análise de isoenzimas utilizando-se neste estágio de estudo isolados em cultivo axênico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e identificação morfológica dos fungos

Quatro isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, oriundos de sementes de algodão foram obtidos em cultura pura por transferência direta através do teste de Incubação em papel de filtro ("blotter test"). Estruturas de ambos fungos foram transferidos assepticamente de sementes com auxílio de um estereiomicroscópio, em capela de fluxo laminar, para meio BDA. A incubação ocorreu a temperatura média de 21°C com fotoperíodo de 12h, durante 8 dias. A distinção entre os dois *Colletotrichum* foi baseada em característica escrita por Tanaka, Menten, Machado, (1995), que consideram o hábito de crescimento dos fungos sobre as sementes e o tipo de frutificação apresentado por ambos nestas circunstâncias.

### 2.2 Análise de isoenzimas de isolados de *C.gossypii* South e *C.gossypii* South, var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr.

Inicialmente foi obtida a cultura pura dos fungos com 7 dias de idade, em BDA, à 20°C sob 12 horas de luz negra. Posteriormente, discos de micélio com 5 mm de diâmetro, foram transferidos para meio líquido de glicose e extrato de levedura em erlemmyers de 250 ml sob

agitação controlada em Shaker Orbital, a uma temperatura média de 25°C, durante 8 dias. (Mills, Sreenivasaprasad e Brown, 1994).

A curva de crescimento micelial dos isolados, cultivados em meio líquido foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Alfenas et al. (1991). Após o período de incubação, o micélio foi coletado a vácuo e lavado com solução de PBS. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o procedimento de Bradford (1976).

As proteínas foram extraídas de 200 mg (peso fresco) de micélio por trituração manual, em almofariz e pistilo de porcelana, previamente mantidos sob gelo. A ressuspensão do material triturado foi feita em 1,5 ml de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 6.8. Após a ressuspensão, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. Vinte µl do sobrenadante foram pipetados e misturados em vinte µl de tampão da amostra (Glicerol, Tris-HCl 0.6 M pH 6.8 e Azul de Bromofenol).

A eletroforese foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel de separação) e a 3,5% (gel de concentração), de acordo com procedimento descrito por Alfenas et al. (1991). O sistema-tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-Glicina pH 8.9. Cada gel recebeu 20 µl do extrato da amostra. A migração foi efetuada durante 3 horas a 4°C e 12 mA.

Após migração, os géis foram corados para detecção da atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (PO), conforme metodologia de Alfenas et al. (1991).

### **2.3 Verificação da patogenicidade dos isolados**

Para a verificação da patogenicidade dos 4 isolados em estudo (2 de *C.gossypii* e 2 de *C. gossypii* var *cephalosporioides*) procedeu-se à pulverização de suspensão do inóculo em

plantas de algodão, cultivar IAC-20, com 30 dias de idade. A inoculação foi realizada no final da tarde, através de pulverizador manual, procurando-se atingir principalmente a parte apical da planta. Após a inoculação, as plantas colocadas em casa de vegetação telada permaneceram em câmara úmida proporcionada por uma cobertura plástica por 42 horas. A avaliação foi efetuada 25 dias após a inoculação, observando-se sintomas visuais típicos da ramulose, conforme descrito por Tanaka, Menten e Machado (1995).

As suspensões de conídios utilizados nos testes de incubação foram preparadas adicionando-se 5 ml de água destilada e esterilizada a cada placa de Petri ( $\varnothing$  9cm) contendo as culturas fúngicas . Com auxílio de um pincel fino passado sobre a superfície das colônias promoveu-se a liberação dos conídios em água. As suspensões foram filtradas através de 2 camadas de gaze esterilizada e suas concentrações ajustadas para  $1 \times 10^6$  conídios/ml, através de contagem em câmara de contagem de Neubauer.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação e patogenicidade *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas de algodão

Apesar da possibilidade de identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelo hábito de crescimento e características morfológicas, conforme descrição de Tanaka et al. (1995), constata-se que o método apresenta dificuldades para o analista na avaliação das sementes ao microscópio. Trata-se de uma operação que quase sempre requer exames microscópicos adicionais sob alta resolução. Este fato faz com que o método perca em viabilidade para uso mais extensivo em rotina de laboratório ou precisão para programas de certificação e a nível de quarentena vegetal. Dos isolados dos quais dois tinham sido identificados como *Colletotrichum gossypii* e dois como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, somente o CGC-191, apresentou sintomatologia típica da ramulose nas plantas de algodoeiro inoculadas. Os demais isolados (HT-CGC, HT-CG e CG-189) não apresentaram reações nas plantas inoculadas, indicando tratarem-se de agentes causais da antracnose.

Os sintomas iniciais da doença causados pelo isolado CGC-191 começaram a se manifestar alguns dias após a inoculação, na forma de pequenas lesões necróticas no limbo foliar, nervuras e ao longo do pecíolo. Essas lesões, com o tempo, provocaram enrugamento, deformações ou queda das folhas, e em consequência a parte apical foi atingida levando ao

superbrotamento das plantas. É válido lembrar que embora a distinção entre *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* possa ser realizada com segurança, através de testes de patogenicidade artificiais, estes demandam entretanto um longo período e um maior espaço físico para sua execução.

### 3.2 Análise de isoenzimas

Dentre as enzimas estudadas, apenas álcool desidrogenase (ADH) não apresentou atividade. Por sua vez as enzimas esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (PO) apresentaram atividade, sendo portanto, utilizadas para analisar os isolados de ambos *Colletotrichum*. Com exceção da enzima peroxidase, as demais apresentaram-se polimórficas (Figura 1). As bandas foram identificadas com letras do alfabeto. Por exemplo, no caso da esterase, foram observadas quatro bandas polimórficas para o isolado 1 (CGC-191) e identificadas de *a* até *f*. Seguindo a ordem alfabética, a banda *a* corresponde ao maior polipeptídeo e a banda *d* ao menor, sendo que a banda *c* apresentou maior atividade. Os resultados mostraram (Figura 1), que os quatro isolados não foram distinguíveis pelos perfis de malato desidrogenase (MDH). Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Bromoonschenkel et al. (1987), para esse mesmo tipo de estudo, porém com *P. infestans*. Outros trabalhos realizados por Some e Tivoli (1983), revelaram também que nem todas as isoenzimas utilizadas, no estudo de espécies e variedades de *Fusarium* demonstraram atividade, apenas três ou quatro puderam ser usadas na identificação dos fungos estudados.

Em relação aos perfis de esterase e fosfatase ácida, apesar de baixa atividade, nota-se que foi possível distinguir os dois *Colletotrichum* (*C.gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*). Esses resultados coincidem em parte, com os de Kimura e Dianese (1983) e

com os de El-Sharkawy e Huising (1971) citados por Kimura e Dianese (1983) os quais também detectaram baixa atividade de fosfatase ácida em seus estudos sobre espécies de *Xanthomanas*. Observa que no perfil de esterase (Figura. 1), as bandas *c* e *d* encontram-se ausentes nos isolados 2 (HT-CG), 3 (HT-CGC) e 4 (CG-189), apesar do isolado 3 (HT-CGC) ter sido identificado pelo método "Blotter Test", como *C.gossypii* var. *cephalosporioides*, o que discorda de resultados encontrados por Dudienas (1990) e Tanaka, Menten e Machado (1995) os quais defendem a possibilidade de diferenciação dos 2 fungos pela análise de características morfológicas. Apesar do isolado 3 (HT-CGC) não ter apresentado perfil idêntico em atividade de esterase aos isolados 2 (HT-CG) e 4 (CG-189), ele difere totalmente do isolado 1 (CGC-191). Como para fosfatase ácida os isolados 2 (HT-CG), 3 (HT-CGC) e 4 (CG-189), apresentam atividade semelhante, uma pequena variação no perfil de esterase nos três isolados pode indicar certa variabilidade genética entre *C.gossypii*.

Apesar de os quatro isolados apresentarem atividade nas regiões das bandas *a* e *b*, a banda *b* apresentou uma maior atividade para o isolado 1 (CGC-191) em relação aos demais, e as bandas *c* e *d* foram exclusivas do isolado 1. No perfil de peroxidase apenas o isolado 1 apresentou atividade. De qualquer forma, as bandas *c*, para os perfis de esterase e fosfatase ácida e a banda *a* para peroxidase apresentaram forte atividade, não deixando dúvidas quanto a diferenciação desses organismos. Além disso, houve coincidência entre os perfis de esterase, fosfatase ácida e peroxidase com as encontradas por Vieira, Machado e Santos (1996) (dados não publicados) por RAPD e os resultados do teste de patogenicidade em plantas de algodoeiro.



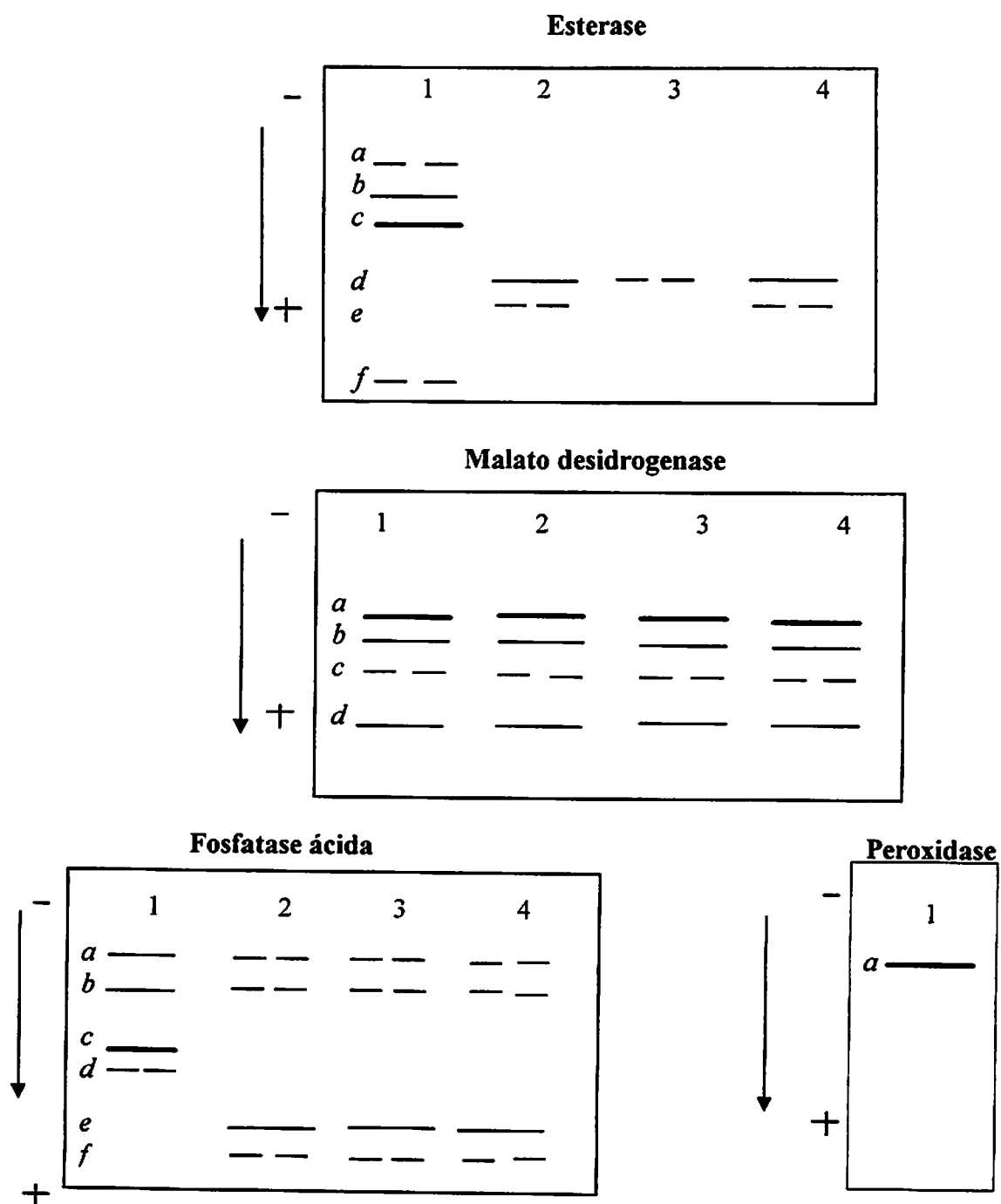


FIGURA 1. Representação gráfica das atividades enzimáticas reveladas em géis de poliacrilamida a 7,5%, para os isolados de *Colletotrichum gossypii* South e *C. g south* var. *cephalosporioides* Costa & Fraga. 1. CGC-191; 2. HT-CG; 3. HT-CGC e 4. CG-189, UFLA, 1995

#### 4 CONCLUSÃO

- Padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase, fosfatase ácida e peroxidase permitiram diferenciar os fungos patogênicos *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J.; COSTA, A.S. Instruções para reconhecimento da ramulose do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.15, p.59-60, 1949.
- ALFENAS, A.C.; JENG, R.; HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, p.1756-1762, 1984.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W ; PASSADOR, G.C. **Electroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- ALFENAS, A.C.; MOREIRA, M.A.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; OLIVEIRA, R. Eletroforese de proteínas e isoenzimas para a identificação de espécies de fungos. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 14, Viçosa, 1987. **Resumos...** Viçosa: UFV, 1987. p.
- BONDE, M.R.; PETERSON, G.L.; EMMETT, R.W.; MENGE, J.A. Isozyme comparisons of *Septoria* isolates associated with citrus in Australia and the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.5, p.517-521, 1991.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K. Análise genética de padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, n.2, p.155, 1987.
- CARVALHO, L.P.; CAVALCANTI, F.B.; LIMA, E.F.; SANTOS, E.D. Influência da ramulose nas características de fibra e produção do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p.593-598, 1984.

- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.3, p.167-193, 1977.
- CRUICKSHANK, R.H. Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* by enzyme electrophoresis. *Mycologia*, New York, v.79, n. 4, p.615-620, 1987.
- DUDIENAS, C. **Caracterização morfológica, auxanográfica e patogenicidade de *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr.** Piracicaba: ESALQ, 1990. 67p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- FERREIRA, J.F.; BOSLAND, P.W.; WILLIAMS, P.H. The variability of *Pyrenochaeta terrestris* isolates based on isozyme polymorphism, cultural characteristics and virulence on differential onion breeding lines. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.133, n.4, p.289-296, 1991.
- FOSTER, L.M.; KOZAK, K.R.; LOFTUS, M.G.; STEVENS, J.J.; ROSS, K.I. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycology Research*, Great Britain, v. 97, n.7, p.769-781, 1993.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.6, p.612-614, 1993.
- KELLER, G. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L.. *New Phytologist*, v.120, n.3, p. 351-358, 1992.
- KERSSIES, A.; EVERINK, A.; HORNSTRA, L.; VAN TELGEN, H.J. Electrophoretic detection method for *Fusarium oxysporum* species in cyclamen and carnation by using isoenzymes In: SCHOTS, A.; DEWEY, F.M; OLIVER, R. *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, detection and quantification*. Cambridge: CAB International, 1994. p.57-62.
- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro - *Gossypium* spp. In: GALLI, F. (coord). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 29-48.
- KIMURA, O.; DIANESE, J.C. Caracterização protéica e isoenzimática das patovares. de *Xanthomonas campestris* que atacam a mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.18, p.1215-1228, 1983.

- MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. In: LUZ, W.C., ed. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo-RS, 1994. v.2, p.229-264.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection of the Antracnose Pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A.; DEWEY, F.M.; OLIVER, R. (ed.). **Modern assays for plant pathogenic fungi: Identification, Detection and Quantification**. Cambridge: CAB International, 1994. p.183-189.
- MOREIRA, A.M. **Caracteres morfológicos e padrões eletroforéticos de proteínas e isoesterase na identificação de espécies de *Cylindrocladium***. Viçosa: UFV, 1989. 118p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- NWAGA, D. LeNORMAND, M.; CITHAREL, J. Identification and differentiation of *Phytophthora* by electrophoresis of mycelial proteins and isoenzymes **EPPO Bulletin**, v.20, p.35-45, 1990.
- PUJOL, C.; REYNES, J. RENAUD, F.; MALLIE, M.; BASTIDE, JM. Genetic analysis of *Candida albicans* strains studied by isoenzyme electrophoresis. **Journal de Mycologie Medicale**, v.3, n.1, p.14-19, 1993
- SOME, A.; TIVOLI, B. *Fusarium spp.*, from potato: polymorphism of esterase phenotypes on polyacrylamide gel electrophoresis. **Agronomie**, v.13, n.7, p. 637-649, 1993.
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 111p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; MACHADO, J.C. Growth habit of *Colletotrichum* species on cotton seeds. In: INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 24 th Congress, Copenhagen, Juin, 7-16. 1995.
- TUSKAN, G.A.; WALLA, J.A.; LUNDQUIST, J.E. Genetic geographic variation in *Peridermium harknessii* in the north - central united States. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, n.9, p.857-861, 1990.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os trabalhos constantes deste estudo fazem parte de uma linha de pesquisa, onde o objetivo central é o desenvolvimento de testes seguros, rápidos e de fácil aprendizagem, de maneira que possam ser utilizados em todos os segmentos do sistema de produção de sementes visando ao estabelecimento de esquemas de controle de qualidade de alto nível para as principais culturas no país.

À medida que a agricultura se moderniza em todo o mundo em consequência da crescente demanda de alimentos, percebe-se que o nível de conhecimento existente sobre metodologias de controle de qualidade do insumo semente é ainda insuficiente e relativamente pouco investigado no âmbito da Biotecnologia.

Na primeira etapa da referida linha de pesquisa, compreendida neste trabalho por 3 capítulos foi possível constatar a grande possibilidade de se utilizarem marcadores moleculares para avaliar o nível de deterioração e da qualidade sanitária de sementes de algodoeiro. Preliminarmente a este estudo, protocolos de extração e execução dos testes foram exaustivamente trabalhados, tendo sido ajustadas e adaptadas metodologias que para sementes de algodoeiro são praticamente inexistentes.

O primeiro capítulo deste trabalho enfoca um dos pontos cruciais de controle de qualidade em programas de sementes, através do emprego de técnicas eletroforéticas em que se busca identificar variações nos padrões de isoenzimas e proteínas correlacionando-as com o nível de deterioração. Em uma primeira tentativa, procurou-se correlacionar variações nos padrões

eletroforéticos de proteínas totais e solúveis de sementes de algodoeiro em interação com duas espécies de *Aspergillus*, *A. glaucus* e *A. flavus*, tendo em vista a importância que estes fungos exercem no processo deteriorativo de sementes. O processo de deterioração foi simulado através do envelhecimento artificial em diferentes períodos de tempo, das sementes anteriormente submetidas a desinfestação e não inoculação e inoculação com as duas espécies de *Aspergillus* em separado. Apesar de terem sido detectadas diferenças nos padrões eletroforéticos nestas condições, é recomendável que se leve em consideração neste tipo de estudo a utilização de sementes naturalmente envelhecidas em diferentes estágios. Ao lado de corridas eletroforéticas, considera-se imprescindível a realização de testes de sanidade e de testes determinantes da qualidade fisiológica. Acredita-se ser válido também continuar trabalhando com sementes secas, posto que é importante identificar algum tipo de marcador que detecte nível de deterioração em sementes nesta condição, visto que o processo de controle de qualidade na empresa moderna visa sempre à precisão e economia de tempo. Atrás do mesmo objetivo foram testadas no presente estudo atividades de 12 enzimas que foram selecionadas em função de sua participação no desenvolvimento de processos metabólicos que ocorrem à medida que as sementes deterioram. Neste sentido, por exemplo a escolha de malato desidrogenase se deu pelo fato de ser essa enzima importante na respiração celular, e portanto apresentar grande possibilidade como marcador molecular neste processo. Outra enzima considerada e que apresenta grande possibilidade como marcador é a peroxidase por tratar-se de enzima "scavenger", estando a mesma intimamente ligada ao processo de peroxidação de lipídios, e a consequente desestruturação de membranas a nível celular e organelas, pelo efeito de radicais livres, uma das teorias mais bem aceitas no processo de deterioração biológica. Também foram escolhidas enzimas que atuam sobre fosfolipídios de membrana com posterior liberação de ácidos graxos, os quais também reforçariam a teoria acima mencionada. Outras enzimas foram trabalhadas a exemplo daquelas envolvidas em

metabolismo de fosfatos, em degradação por hidrólise, etc, na tentativa de se associarem aumento ou perda de atividade e germinabilidade. Resultados promissores foram encontrados nesta investigação e parece que o uso de isoenzimas é um valioso marcador bioquímico a ser usado em programas de controle de qualidade de sementes. É importante no entanto, que se tenha cautela na escolha das isoenzimas adequadas. Observou-se por exemplo, no presente trabalho que fosfatase ácida, catecol oxidase, hexoquinase, enzima málica e esterase apresentaram atividade para os dois fungos estudados. Dessa forma percebe-se que tais isoenzimas devem ser evitadas em programas de identificação de cultivares, uma vez que elas podem ter os resultados de seus zimogramas alterados em função da presença dos microorganismos. Por outro lado, as enzimas málica e esterase por detectarem diferenças entre os dois organismos, tornam-se potencialmente importantes em trabalhos que envolvam diferenciação de organismos com características morfológicas próximas.

Dentre o grupo de isoenzimas que mantiveram seus padrões inalterados, portanto mais indicadas em trabalhos de identificação de cultivares, destacam-se a glutamato desidrogenase e a glutamato oxaloacetato transaminase. Por sua vez as enzimas fosfatase ácida, malato desidrogenase, esterase, enzima málica, catecol oxidase, 6-fosfogluconato desidrogenase, hexoquinase, peroxidase e fosfoglucose isomerase tiveram seus padrões eletroforéticos alterados em função do envelhecimento artificial, isto faz com que sua utilização em processos de identificação de cultivares seja questionável, devendo ser melhor investigadas nesta direção. Embora algumas das isoenzimas tenham demonstrado variações em seus padrões eletroforéticos neste estudo, sua atividade não retratou a condição de deterioração, alvo de avaliação da pesquisa. As enzimas que se apresentaram mais promissoras em detectar níveis de deterioração foram: glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, enzima málica, peroxidase, 6-fosfogluconato desidrogenase. Vale ressaltar que à exceção da fosfatase ácida que é uma



hidrolase, as demais são oxiredutases. Recomenda-se portanto, em trabalhos similares estudar enzimas mais específicas, bem como seu comportamento sob condições de armazenamento natural. Por fim, desde que a hexoquinase apresenta bandas acromáticas para atividade fúngica, essa enzima pode ser um valioso indicador sobre a presença de microorganismos em associação com as sementes. Esta possibilidade do ponto de vista de controle de qualidade, pode ser de grande utilidade a uma empresa principalmente por possibilitar um diagnóstico precoce deste tipo de causa deteriorativa.

Em relação aos estudos sobre a identificação e diferenciação dos fungos *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (capítulos 2 e 3) ambos patogênicos ao algodoeiro, e transmitidos via sementes, os resultados revelaram que o uso de marcadores moleculares RAPD e isoenzimas constituem-se em uma das mais promissoras maneiras de se desenvolverem testes de maior precisão e de fácil execução a nível de rotina em laboratórios, para tais finalidades. Com base nestes trabalhos os estudos encontram-se em continuidade, caminhando-se a partir deste estágio para a fase de desenvolvimento de sondas visando à detecção do agente causal da ramulose, via PCR e isoenzimas específicas, em extrato cru de sementes. O alvo final deste projeto é o desenvolvimento de "Kits" para a detecção segura, rápida e de fácil acesso, dos principais fungos de espécies de importância agrícola, cuja identificação por métodos convencionais é ainda imprecisa.

Em última análise fica evidenciado que o uso de métodos de avaliação da qualidade de sementes, de modo geral, que empregam princípios da biotecnologia, constituem, não somente para a cultura do algodoeiro como para as demais que são propagadas por sementes, um avanço dos mais expressivos, podendo contribuir decisivamente para a melhoria da qualidade das sementes, tanto do ponto de vista fisiológico como de diagnose precoce de patógenos importantes cuja identificação e detecção em laboratório é ainda um desafio.

## APÊNDICES

TABELA 1A. Grau de umidade, em percentagem, das sementes de algodoeiro submetidas a diferentes tratamentos, UFPA - MG, 1995.

TRATAMENTOS	ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL			
	zero h	96 h	120 h	168 h
Desinfestadas com hipoclorito de sódio 1%	8,93	30,13	29,02	30,44
Infestadas com <i>Aspergillus glaucus</i>	9,20	28,49	26,10	27,93
Infestadas com <i>Aspergillus flavus</i>	9,64	30,60	27,27	28,90

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos de avaliações das sementes de algodoeiro, submetidas a diferentes tratamentos - UFLA - Lavras - MG, 1995.

CAUSAS DE		QUADRADOS MÉDIOS					
VARIAÇÃO	G.L.	TPG (%)	TZ - PG (%)	Emergência 7 dias (%)	Emergência 28 dias (%)	Proteína (mg/µl)	
						Pellet	Sobrenadante
Tempo	3	3768,3203132**	3591,2833639**	5642,7698156**	5474,0209442**	1,66666667	1,60833333
Tratamento	2	1,9854228	174,0877595*	33,0077249	7,0822501	1,71666667	1,01666667
Tem. X Trat	6	73,8497933**	135,5135248**	99,37044575**	110,5440780**	0,4041667	4,74583333
Resíduo	36	11,9923369	34,7480557	18,3897335	16,9545961	1,18333333	2,57222222
Coef.de variação	%	9,254	14,012	12,866	12,856	31,838	32,843
Média		37,422142	42,070168	33,331657	32,028435	3,416667	4,883333

\* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significância ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 2A. Resumo da análise de variância dos dados obtidos das avaliações da sanidade das sementes de algodoeiro, submetidas a diferentes tratamentos - UFLA - Lavras - MG, 1995.

CAUSAS DE		QUADRADOS MÉDIOS DAS AVALIAÇÕES						
VARIAÇÃO	G.L.	<i>Fusarium sp.</i>	<i>B. theobromae</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>A. flavus</i>
Tempo	3	66,5972727**	53,2780701**	107,9084683**	380,1471637**	215,3122500**	311,7647428**	945,9187986**
Tratamento	2	181,5388979**	9,1502**	24,2359311**	66,0457666**	834,1752656**	29,3102169*	897,6110726**
Tem. X Trat	6	64,9934939**	3,2635**	17,2410434**	366,9989688**	189,1224343**	8,9351756	274,6355453**
Resíduo	36	10,1072189	9,9065339	3,4621581	13,8625250	15,2735452	7,9446842	11,3071745
Coef.de variação	%	27,549	174,186	112,459	27,455	63,218	70,107	17,747
Média		11,539989	1,806952	1,654542	13,561215	6,182025	4,020485	18,947571

\* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significância ao nível de 1% de probabilidade.