

**IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE
MILHO, FEIJÃO, ALGODÃO E SOJA POR
MEIO DE ENZIMAS E DE PROTEÍNAS
RESISTENTES AO CALOR**

MARINEY DE MENEZES

2005

MARINEY DE MENEZES

**IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO, FEIJÃO, ALGODÃO
E SOJA POR MEIO DE ENZIMAS E DE PROTEÍNAS RESISTENTE AO
CALOR**

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

Orientador

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Menezes, Mariney.

Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por
meio de enzimas e de proteínas resistentes ao calor / Mariney de
Menezes -- Lavras : UFLA, 2005.

92 p. : il.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Identificação de cultivares. 2. Enzima. 3. Proteína resistente ao calor.
4. Marcador molecular. 5. Caracterização isoenzimática. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.521

-631.57

MARINEY DE MENEZES

**IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO, FEIJÃO, ALGODÃO
E SOJA POR MEIO DE ENZIMAS E DE PROTEÍNAS RESISTENTE AO
CALOR**

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

APROVADA em 24 de fevereiro de 2005

Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

CNPQ/DCF/UFLA

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães

UFLA

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e se conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, não sou nada. Ainda que distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tiver amor, de nada valeria!”

I Coríntios 13,1-3.

Aos meus pais, Maria Aparecida Menezes e Odilon Silveira Menezes, pelo amor e apoio em todas as etapas de minha vida.

Aos meus irmãos e sobrinhos.

DEDICO.

Às minhas amigas Louise, Wanda, Renata, Keila e Ludmilla, pela amizade e consideração.

À família Amoedo Silva, pela amizade durante todos estes anos.

Aos amigos Toninho, Elenir e Elisa, pela ajuda na execução dos trabalhos.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

À orientadora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela dedicação, disponibilidade, companheirismo e amizade demonstrados durante o curso.

Aos professores João Almir, Renato Mendes e Laene, pela amizade, participação e valiosas contribuições.

Aos amigos de curso Mychelle, João, Renata, Marli e Ricardo, pela amizade e convívio.

Aos amigos Cabacinha e Raissa, pela grande amizade.

Aos amigos Keli e Breno, pela ajuda durante o mestrado.

Aos amigos do setor de Sementes Kalinka, Dinara, Maria de Lurdes, Paulo Albuquerque, Kênia, Keline, André, Carlos Eduardo, Denise, Aline, Priscila, Luiz e Túlio, pela amizade, convívio e ajuda.

Aos funcionários do Setor de Sementes, Elza e Andréia, pela amizade, convívio e ajuda durante a condução do experimento.

À minha amiga Bebel e família, pela amizade e hospedagem em Brasília.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
1.INTRODUÇÃO	1
2.REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1.Identificação de cultivares.....	4
2.2.Marcadores protéicos.....	7
2.3.Proteínas resistentes ao calor.....	11
3.MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1.Avaliação da qualidade fisiológica.....	20
3.1.1.Teste de germinação.....	20
3.2.Extração de Isoenzimas e análise eletroforética:	21
3.3.Extração de proteínas resistentes ao calor e análise eletroforese	23
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1.Análise da qualidade fisiológica das sementes de milho.....	26
4.1.1.Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de milho	28
4.1.2.Análise das proteínas resistentes ao calor em milho	39
4.2.Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de feijão.....	47
4.2.1.Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de feijão	49
4.2.2.Análise das proteínas resistente ao calor em feijão	53
4.3.Análise da qualidade fisiológica das sementes de algodão	55
4.3.1.Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de algodão.....	56
4.3.2.Análise das proteínas resistentes ao calor em algodão.....	61
4.4.Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de soja.....	63
4.4.1.Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de soja	65
4.4.2.Análise das proteínas resistentes ao calor em soja	78
5.CONSIDERAÇÕES GERAIS	81
6.CONCLUSÕES	83
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

RESUMO

MENEZES, Mariney. **Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e de proteínas resistentes ao calor.** 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

A necessidade de identificação de cultivares tem crescido, principalmente após a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares e da Nova Lei de Sementes, tornando-se necessária a utilização de marcadores estáveis e polimórficos. Nessa pesquisa foram avaliados o polimorfismo e a estabilidade de isoenzimas e de proteínas resistentes ao calor em sementes de cultivares de milho, feijão, algodão e soja, com diferentes níveis de qualidades fisiológicas. Para a análise de isoenzimas foram usadas sementes de milho e de algodão e epicótilos de soja e feijão com 5 dias de germinação. Já as proteínas resistentes ao calor foram extraídas de eixos embrionários das sementes, em tampão Tris-HCl 0,05 M. As isoenzimas álcool desidrogenase, catalase, esterase, malato desidrogenase e superóxido dismutase foram eficientes na separação de cultivares de milho, com diferentes qualidade fisiológica. Para as cultivares de feijão, verificou-se que os padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase e glutamato oxalacetato transaminase foram monomórficos, mesmo em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Já pela enzima peroxidase foi possível diferenciar a cultivar Carioca das demais, no entanto, este padrão mostrou-se variável em sementes com baixa germinação. Dentre as cultivares de soja, a cultivar Conquista foi diferenciada das demais pelos sistemas enzimáticos superóxido dismutase e diaforase e a 'BRS-154' pela esterase, em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Para a cultivar Liderança, foi observada alteração dos padrões eletroforéticos da enzima diaforase em sementes deterioradas. Foi possível a identificação de cultivares de algodão por meio das isoenzimas diaforase e malato desidrogenase, independente

* **Comitê Orientador:** Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho - UFLA (Orientadora), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira – UFLA e Dr. João Almir Oliveira - UFLA.

da qualidade fisiológica das sementes. Padrões de proteínas resistentes ao calor apresentaram-se polimórficos e estáveis em sementes de milho com diferentes níveis de qualidade. Já as cultivares de soja, feijão e algodão apresentaram-se monomórficas, independentemente do nível de deterioração das sementes.

ABSTRACT

MENEZES, Mariney. **Identification of cultivar of corn, bean, cotton and soybean by using both enzymes and heat-resistant proteins.** 2005. 92 p. Dissertation (Master Degree) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

After the approval of the cultivars protection law and the new seed law there was an increase in cultivars identification using polymorphic markers. In this work both polymorphism and stability of isoenzymes and heat-resistant proteins in corn, bean, cotton, and soybean seeds with different levels of physiological quality were evaluated. Five-days germinated corn, cotton, soybean and bean epicotyls were used for enzymes analysis. The heat-resistant proteins were extracted from embryo axes in Tris- HCl 0,05 M buffer. The alcohol dehydrogenase, catalase, esterase, malate dehydrogenase and superoxide dismutase enzymes were effective in identifying corn cultivars with different levels of physiological quality. For bean cultivars was observed that the electrophoretical pattern for esterase and glutamate oxaloacetic transaminase were monomorphic even in seeds with different physiological quality levels. The peroxidase enzyme allowed the differentiation of the bean cultivar Carioca from the others. However, the peroxidase enzyme pattern varied in seeds with low-germination percentage. The soybean Conquista cultivar was separated from the others by superoxide dismutase and diaphorase enzyme systems, and BRS-154 was separated by esterase in seeds with different levels of physiological quality. Changes in the electrophoretical patterns of diaphorase enzyme in deteriorated seeds were observed in the soybean Liderança cultivar. Cotton cultivars were identified by using both diaphorase and malate dehydrogenase enzymes, regardless the seeds physiological quality. Patterns of heat resistant protein showed to be polymorphic and stable in corn seeds with different levels of physiological quality. The soybean, bean and cotton showed monomorphic pattern regardless the deterioration

***Guidance Committee:** Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho (Major Professor), Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira e Dr. João Almir Oliveira.

level of the seeds. For the same cotton seeds monomorphic bands were found when esterase and superoxide dismutase isoenzymes were used. Heat-resistant protein patterns showed polymorphism and stable in corn seeds with different quality levels. However, those proteins showed to be monomorphic in bean, soybean, and cotton cultivars, regardless the level of deterioration.

1.INTRODUÇÃO

O interesse pela identificação de cultivares tem aumentado significativamente no mundo, principalmente devido à crescente necessidade de proteção de cultivares. Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares, nº 9.456, sancionada no Brasil em 25 de abril de 1997, tornou-se possível proteger as variedades vegetais desenvolvidas nos programas de melhoramento genético.

Após a aprovação dessa Lei, no Brasil, foi observado aumento em investimentos nos programas de melhoramento, assim como no lançamento de novas cultivares protegidas. Sabe-se, no entanto, que, para a proteção de uma nova cultivar, a mesma deverá ser registrada e submetida ao teste de DHE (distinguíbilidade, homogeneidade e estabilidade).

No Brasil, a identificação de cultivares visando à proteção, assim como a certificação da pureza genética, tem sido realizada principalmente por meio de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e plantas nas fases de florescimento e maturação.

No entanto, o emprego desses marcadores apresenta algumas limitações, como influência do ambiente, das condições nutricionais da planta e presença de microrganismos, além de requererem tempo e espaço para serem avaliados e apresentarem certo grau de subjetividade nas avaliações

Apesar de não serem utilizados como descritores na Lei de Proteção de Cultivares (LPC), no Brasil, os marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas, tem sido recomendados como auxiliares ao uso de marcadores morfológicos. A International Seed Testing Association (ISTA) (1996) e Associação of Seed Analysis (AOSA), (1991) têm indicado vários tipos de proteínas de armazenamento para a caracterização de cultivares, dentre elas as hordeínas em cevada, as secalinas em centeio, glutelinas em trigo, aveninas em aveia, zeínas

em milho, lectinas e vicilinas em *Phaseolus*, legumininas em *Pisum sativum* e glicina em soja (Kigel & Galili, 1995).

Apesar dos padrões de proteínas de armazenamento apresentarem-se estáveis em sementes associadas com microrganismos (Silva, 1997) e em sementes produzidas sob diferentes doses de nitrogênio (Imolesi et al., 2001), com frequência não tem sido observado polimorfismo entre as cultivares, o que dificulta a caracterização das mesmas.

De acordo com a Association of Official Seed Analysts (AOSA) (1991) e com a International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) (1998), os marcadores enzimáticos podem ser utilizados para a caracterização de cultivares. O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima, que ocorrem em uma espécie como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Moss, 1982). As isoenzimas desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas, podendo ser separadas por processos bioquímicos. São encontradas em células de todos os organismos e podem exercer seus efeitos em muitos níveis de organização biológica.

O uso de isoenzimas como marcadores moleculares apresenta algumas vantagens, tais como estar presentes em diferentes materiais, como semente, plântula, raiz, folha, pólen ou outros tecidos vegetais, e em diferentes fases de desenvolvimento da planta (Marcon, 1986) obtenção de resultados num prazo de 24-48 horas, um custo relativamente baixo e a simplicidade de operação (Cooke, 1998).

Porém, esses marcadores podem se apresentar variáveis, dependendo do tecido analisado, da ocorrência de microrganismo em associação com esses tecidos, da adubação, das condições ambientais e, ainda, do nível de qualidade fisiológica das sementes (Silva, 1997; Pierce & Brewbaker, 1973; Imolesi, 1999).

Mediante tal situação, torna-se necessário estudar o polimorfismo, assim como a estabilidade de enzimas para a identificação de cultivares em várias espécies.

Um outro grupo de proteínas que tem apresentado potencial para a identificação de cultivares é o de proteínas resistentes ao calor. Essas proteínas são robustas, hidrofílicas, abundantes, extraídas em condições de altas temperaturas e são armazenadas nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes.

Porém, essas proteínas têm sido pouco estudadas com relação à estabilidade e ao polimorfismo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo e a estabilidade das enzimas e proteínas resistentes ao calor para a identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Identificação de cultivares

A identificação de cultivares é de fundamental importância para o melhorista e para o produtor de sementes. Pela Lei de Proteção de Cultivares, uma cultivar pode ser protegida, garantindo ao melhorista o direito sobre o material desenvolvido e ao agricultor a obtenção da semente com as características desejadas. A Nova Lei de Sementes, sancionada em agosto de 2003, tem como principal objetivo auxiliar a LPC, por meio da fiscalização do comércio, impedindo a circulação de sementes piratas. Com a falta de uma metodologia segura para a identificação dessas cultivares, corre-se o risco de que o produto, resultante do melhoramento genético, seja utilizado por terceiros sem que a instituição criadora tenha controle sobre esse material (Grattapaglia & Ferreira, 1996).

Após a promulgação da Lei de Proteção de Cultivares (LPC) houve um grande interesse na produção e no lançamento de materiais genéticos (Brasil, 1997). Foi observado um grande aumento nos investimentos e desenvolvimento em pesquisa, principalmente no setor privado, resultando em novas cultivares mais adaptadas às necessidades dos agricultores.

Para legitimar a LPC, foi criado o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), que tem como principais atividades, a inclusão de novas espécies no sistema de produção de cultivares, elaboração e revisão de descritores e implantação e acompanhamento dos ensaios para a caracterização de cultivares.

Nos programas de controle de qualidade do Brasil, a identificação de cultivares tem sido realizada, principalmente, por meio de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e plantas nas fases de florescimento e

maturação (Silva, 1997). Porém, o uso desses marcadores apresenta limitações como tempo espaço e mão-de-obra requeridos para as avaliações (Smith & Register III, 1998), podendo apresentar baixa precisão dos resultados devido à influência dos fatores ambientais (Cooke, 1984). Sabe-se, que para a proteção de uma nova cultivar, a mesma deverá ser aprovada por meio do teste de D.H.E., ou seja, deverá ser distinta das demais e os descritores utilizados na distinção deverão ser homogêneos e estáveis.

Apesar dos marcadores morfológicos serem recomendados na proteção de cultivares, muito desses não atendem aos critérios do teste de D.H.E. Dessa forma, têm-se buscado outras alternativas que sejam mais seguras para a identificação de cultivares.

A ISTA recomenda as proteínas de armazenamento para a caracterização de cultivares. Dentre essas, têm sido estudadas as vicilinas e lectinas em *Phaseolus*, legumininas em *Pisum*, secalinas em centeio, glutelinas em trigo, aveninas em aveia, zeínas em milho e glicina em soja (ISTA, 1996, AOSA, 1991; Kigel & Galili, 1995). Por serem um produto direto da expressão de genes, as proteínas exibem um considerável polimorfismo, que se baseia no fato de que esses produtos apresentam diferenças na mobilidade por serem codificados por diferentes seqüências de nucleotídeos no DNA. Assim, os perfis eletroforéticos das proteínas possuem uma base genética e são herdáveis (Murphy et al., 1990).

Os marcadores enzimáticos também têm sido utilizados na caracterização de várias espécies, como arroz (Bonow et al., 2001), feijão (Vieira, 2000), milho (Salgado, 2001) e soja (Aguero, 2002; Bloog & Imrie, 1982; Pinto et al., 1995 e Vieira, 2004). Esses marcadores têm sido recomendados pela AOSA (1991) e UPOV (1998).

Apesar dos marcadores de enzimas apresentarem vantagens como rapidez, estarem presentes em diferentes órgãos de plantas, dentre outros podem

se apresentar variáveis, dependendo do tecido analisado, da ocorrência de microrganismos associados com esses tecidos, da adubação, das condições ambientais e, ainda, do nível de qualidade fisiológica das sementes (Brandão Junior, 1996; Silva 1997; Imolesi, 1999).

Um grupo de proteínas robustas, hidrofílicas, extraídas em condições de altas temperaturas, que se armazenam nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes, conhecidas por LEA proteínas (Late Embryogenesis Accumulated), têm sido sugeridas como marcadores bioquímicos estáveis para a caracterização de cultivares (Mann, 2002).

As LEA proteínas não têm nenhuma atividade catalítica aparente, mas sua natureza conservada, propriedades físicas e sua abundância sustentam um papel de tolerância a dessecação (Kiegel & Galili, 1995). A natureza conservadora dessas proteínas as coloca como marcadores promissores na identificação de cultivares.

Mann (2002) e Roveri José (2003), estudando a utilização das proteínas resistentes ao calor para a caracterização de cultivares de algodão e de linhagens de milho, observaram alto polimorfismo e a não variação dos padrões eletroforéticos, mesmo havendo extremos de qualidade fisiológica, sugerindo tais marcadores para a caracterização de cultivares. No entanto, poucos estudos têm sido realizados no sentido de avaliar o polimorfismo e a estabilidade desses marcadores para a identificação de cultivares em outras espécies.

Dessa forma, torna-se necessário avaliar o polimorfismo e a estabilidade de proteínas resistentes ao calor, consideradas marcadores promissores para a caracterização de cultivares e de enzimas já utilizadas na identificação de várias cultivares, para que as mesmas possam ser utilizados como descritores para a identificação de cultivares de milho, feijão, soja e algodão com diferentes níveis de qualidade fisiológica.

2.2. Marcadores protéicos

A identificação de cultivares baseada em marcadores morfológicos continua sendo predominante e importante, mas apresentam algumas limitações, tornando-se necessária a busca de outras alternativas.

A International Seed Testing Association (ISTA) (1996) e a Association of Seed Analysis (AOSA) (1991) têm indicado a técnica de eletroforese para avaliação de vários tipos de proteínas de armazenamento para a caracterização de cultivares quando os marcadores morfológicos não atendem aos critérios do teste de D.H.E. A eletroforese é uma técnica bioquímica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo, que consiste na separação de macromoléculas ionizadas de acordo com suas cargas elétricas, formas e pesos moleculares, por meio da migração em um meio suporte e tampões adequados sob influência de um campo elétrico. Dentre as proteínas de armazenamento, têm sido utilizadas as hordeínas em cevada, as secalinas em centeio, as glutelinas em trigo, as aveninas em aveia, as zeínas em milho, as lectinas e vicilinas em *Phaseolus*, as legumininas em *Pisum sativum* e a glicina em soja (Kigel & Galili, 1995).

Padrões eletroforéticos de zeínas têm sido utilizados em milho devido à menor influência dos fatores ambientais, atendendo ao critério de estabilidade requerido pelos descritores na Lei de Proteção de Cultivares. Padrões eletroforéticos das zeínas têm sido considerados estáveis em sementes de milho infectadas com os fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Silva, 1997) e em sementes de milho produzidas sob diferentes doses de nitrogênio (Imolesi et al., 2001).

Vieira (2000) avaliou a variabilidade genética entre as cultivares de feijão Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81, pertencentes ao grupo Carioca, por meio da eletroforese de proteínas pelo método SDS-PAGE e isofocalização. A autora observou baixo nível de

polimorfismo pelo método SDS-PAGE, sendo possível somente a distinção das cultivares Aporé e Pérola das demais. No entanto, foi observado elevado nível de polimorfismo pela técnica de isofocalização, sendo as cultivares separadas em quatro grupos: 1) Carioca e Carioca MG, 2) Aporé e Pérola, 3) IAPAR 57 e 4) IAPAR 81.

Além das proteínas de armazenamento, sistemas isoenzimáticos têm sido estudados na identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Esses marcadores têm sido adotados para complementar os marcadores morfológicos durante a identificação de cultivares e na certificação da pureza genética em lotes de sementes de diferentes espécies (Kiang & Gorman, 1983).

O termo isoenzima foi primeiramente introduzido por Market & Mollet (1959) para referir-se as múltiplas formas moleculares de uma enzima, com afinidade para substratos idênticos ou similares, que ocorrem em um organismo. As isoenzimas de um mesmo grupo diferem entre si na seqüência de aminoácidos que possuem, o que poderá influenciar, por conseguinte, a natureza da estrutura protéica secundária, terciária e quaternária da enzima. De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1995), o número de isoenzimas de uma determinada enzima está relacionado ao número de compartimentos subcelulares nos quais a mesma reação catalítica é realizada.

As isoenzimas têm se apresentado como valiosos marcadores na caracterização de cultivares em programas de certificação e teste de pureza genética em lotes de sementes (Kiang & Gorman, 1983).

A AOSA (1991) tem recomendado álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida e glutamato-oxalacetato transaminase em milho. Estudando esses sistemas, Salgado (2001) observou que apenas a esterase e a malato desidrogenase apresentaram atividades, tanto nas sementes como nos tecidos dos coleótilos e das folhas de milho.

Nos estudos utilizando as isoenzimas como descritores para a caracterização e identificação de cultivares ou determinação da pureza genética, as funções bioquímicas passam a ter importância secundária, diferente de estudos envolvendo qualidade fisiológica ou outros. Dessa maneira, qualquer sistema enzimático que preencha os requisitos de um marcador, principalmente quanto à estabilidade, é um descritor potencial.

Bonow (1999), avaliando dez genótipos de *Oryza sativa* L. pela análise de isoenzimas de esterase, fosfatase ácida, fosfoglucoisomerase, 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e aspartato transaminase, observou polimorfismo entre todos os materiais estudados.

Além das vantagens anteriormente citadas, os marcadores isoenzimáticos são de caráter co-dominante, possibilitando a separação de genótipos homozigotos e heterozigotos, o que é de grande utilidade nos testes de certificação da pureza genética em sementes híbridas (Alfenas et al., 1998; Ferreira & Grattaglia, 1998).

Devido ao grande número de cultivares de soja existentes no mercado e sua base genética estreita, muitos pesquisadores têm utilizado os marcadores protéicos para a caracterização dessas cultivares. Aguerro (2002), por meio dos sistemas enzimáticos fosfatase alcalina, malato desidrogenase e glutamato oxalacetato transaminase, obteve a separação das cultivares de soja em quatro grupos: 1) 'BR-4', 'BR-16' e 'BR-36', 'EMBRAPA 4', 'EMBRAPA 48', 'FT-Estrela', 'FT-Abyara', 'FT-Jatobá', 'Ocepar 13' e 'Ocepar 14'; 2) 'Ocepar-4', 'CD-201', 'CD-208', 'CD-209', 'CD-204', 'CD-207', 'CD-205' e 'CD-206'; 3) 'CD-202' e 'CD-203', e 4) 'Aurora' e 'Uniala'. Já Vieira (2004) observou variações nos padrões eletroforéticos dos sistemas enzimáticos superóxido dismutase, diaforase, fosfoglucomultase, esterase, álcool desidrogenase, isocitrato desidrogenase e peroxidase para as cultivares de soja 'Conquista',

‘BRIAC 21’, ‘Liderança’, ‘Confiança’, ‘Splendor’, ‘UFV 16’, ‘Garantia’, ‘FT 2000’, ‘Monarca’ e ‘Vencedora’.

Porém, os padrões de isoenzimas podem variar dependendo do tecido utilizado, da presença de microrganismo associados a estes tecidos, da adubação, das condições ambientais e, ainda, do nível de qualidade fisiológica das sementes (Imolesi, 1999; Pierce & Brewbaker, 1973; Silva, 1997).

Em sementes de algodão, enzimas como a fosfatase ácida, catecol oxidase, hexoquinase, enzima málica e esterase, tiveram seus zimogramas alterados em função da associação de fungo às sementes. Apenas as enzimas glutamato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase mantiveram seus padrões inalterados, sendo recomendadas para a identificação e certificação de cultivares de algodão (Vieira, 1996).

Em um estudo realizado por Silva (1997), os padrões eletroforéticos das enzimas álcool desidrogenase, malato desidrogenase, peroxidase, esterase e glutamato oxaloacetato transaminase de sementes de milho apresentaram-se alterados principalmente em função da presença de microrganismos, devendo ser utilizados com restrições nos testes de identificação de cultivares e certificação da pureza genética, apesar da rapidez na obtenção dos resultados. O autor verificou ainda que os padrões eletroforéticos dos coleóptilos foram menos alterados pela presença de microrganismos. Brandão Junior (1996) também observou sensíveis diferenças nos padrões isoenzimáticos, relacionadas à ação de microrganismos associados ao processo de deterioração em sementes de milho.

Imolesi (1999) estudou a influência de diferentes doses de nitrogênio no desenvolvimento do milho por meio dos marcadores morfo agrônômicos e isoenzimáticos de sementes de milho. O autor observou influência do nitrogênio sobre o número de folíolos expostos das plântulas, data de florescimento das plantas, altura das plantas, inserção da primeira espiga e alteração no padrão

eletroforético da isoenzima catalase. Os padrões das isoenzimas esterase e malato desidrogenase não sofreram alterações com a adubação nitrogenada.

Dessa forma, sendo os marcadores isoenzimáticos recomendados para identificação de cultivares, torna-se necessário avaliar o polimorfismo assim como a estabilidade desses marcadores para a identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica.

2.3. Proteínas resistentes ao calor

Um grupo particular de proteínas chamadas LEA foram identificadas em sementes tolerantes à dessecação, denominadas ortodoxas.

As proteínas LEA são formadas por segmentos aleatórios, têm forma de espiral ocasionalmente com uma longa α -hélice amplificada que deve servir como uma base para ordenar a estrutura superior. Possuem alta solubilidade em água e estabilidade mesmo na ebulição que é atribuída à sua grande proporção de aminoácidos hidrofílicos, particularmente glutamina e glicina; podem ainda ligar íons e água, e estar associadas com os açúcares, controlando a taxa de perda de água, mantendo a viabilidade das sementes ortodoxas no estado seco (Walters et al., 1997). Elas podem também atuar como agentes protetores de componentes celulares, como membranas e outras proteínas, possivelmente pela sua habilidade de formar espirais amorfas, protegendo-as contra danos de rompimento na ausência de água (Black et al., 1999; Kermode, 1997).

Diversos grupos de genes produtores de LEA têm sido detectados e caracterizados num grande número de espécies de sementes, incluindo cevada, cenoura, algodão, milho, ervilha, arroz, girassol, tomate e trigo (Almoguera & Jordano, 1992; Dure et al.; 1989; Lane, 1991; Robertson & Chandler, 1992; Skriver & Mundy, 1990 citados por Guimarães 2000). Elas têm sido

classificadas em três diferentes grupos, de acordo com a sequência apresentada. O grupo I inclui o gen Em (trigo), o grupo II o RAB e genes desidratantes e o grupo III vários genes, tais como: DC3 e DC8 (cenoura); gene pH Val (cevada) e MLG3 (milho), de acordo com Thomann et al., 1992.

Em sementes ortodoxas têm merecido maior atenção a classe II de LEA, as desidrinas, que inclui a família D11 e algumas RAB, responsivas a ABA, caracterizadas por serem hidrofílicas, robustas, acumuladas em estádios tardios de desenvolvimento e podem ser induzidas por uma dessecação prematura ou por tratamento que afeta o conteúdo de água da célula (Blackman et al., 1991; Galau et al., 1991). Segundo Kermodé (1997), as desidrinas agem na hidratação de regiões hidrofílicas formando um envelope de água que inibe a desnaturação proteica.

Por meio de vários estudos tem sido observado que essas proteínas se armazenam nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes, coincidindo com a tolerância à dessecação. Em sementes de *Arabidopsis*, na fase inicial de maturação, foram observadas menores porcentagens de regiões EST (*Expressed Sequence Tags*), relacionadas às proteínas LEA (White et al., 2000).

Em um trabalho realizado por Faria (2003), no qual avaliou-se a germinabilidade e tolerância à dessecação de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de linha de leite e submetidas à secagem artificial, ficou evidente a ausência ou menor intensidade de bandas de proteínas resistentes ao calor em sementes nos estádios iniciais de desenvolvimento e não submetidas à secagem. Mas, o padrão de bandas foi idêntico para as sementes colhidas nos quatro estádios de linha de leite, após a secagem.

As LEA proteínas estão presentes em grandes quantidades em cultivares de arroz tolerantes à salinidade, comparadas com cultivares sensíveis (Moons et al., 1995). O gene *hval*, que expressa proteína LEA em cevada, foi utilizado para transformar células em arroz (Xu et al., 1996). Essas plantas transformadas

mantiveram uma taxa maior de crescimento do que plantas não transformadas, sob condições de estresse salino e hídrico.

Em outras pesquisas, foi constatado também que o estresse pode afetar a expressão de inúmeros produtos gênicos, incluindo desidrinas, antioxidantes, proteínas heat shock (HSPs) e proteínas relacionadas à senescência (Ingram & Bartels, 1996; Shinozaki et al., 1998).

De acordo com Vierling (1997), todos os organismos respondem à alta temperatura por meio da síntese de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins–HSPs). As HSPs são geralmente designadas pelo seu peso molecular em kDa, como as HPS 110, HSP 100 e HSP 60, sendo as proteínas de baixo peso molecular de 15-30 kDa são definidas como “small heat shock proteins (sHSPs)” (Sun et al., 2002; Vierling, 1991, 1996). Em plantas, há uma maior ocorrência de sHSPs (Mansfield, 1987), sendo que todas as sHSPs em plantas são codificadas por seis famílias de genes nucleares, e cada família corresponde a proteínas encontradas em diferentes compartimentos celulares: citosol (Classe I e Classe II), cloroplasto, retículo endoplasmático, mitocôndria e membranas (Waters et al., 1996). Em soja, sob condições de estresse térmico, o nível de expressão para a classe I de sHSPs pode superar 1% de toda a proteína celular (Hisieh et al., 1992).

Treglia et al. (1999) analisaram, por meio da técnica de northern blot, mRNAs da proteína de armazenamento gliadina e de proteínas de choque térmicos em sementes de trigo. As sementes foram expostas a diferentes regimes de temperatura durante a maturação. Observou-se não ter havido diferença no padrão de bandas entre plantas controle e estressadas em mRNAs de proteínas de armazenamento. No entanto, houve diferença nas proteínas resistentes ao calor, com uma maior atividade em plantas estressadas do que em plantas não estressadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Perrota et al. (1998).

Em oito cultivares de feijoeiro comum e de caupi, também foi avaliada a indução de proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (sHSPs) utilizando a técnica de “Northern blot”, após a exposição das mesmas sob condições de alta temperatura (40°C/2h). Todas as cultivares avaliadas induziram mRNAs para sHSP, porém, houve uma variação entre as diferentes cultivares. Os níveis de mRNA induzidos em caupi após o choque térmico, foram bem maiores que os observados para as variedades de feijoeiro (Simões-Araújo et al., 2003).

As sHSPs são envolvidas em diversos estresses ambientais e são expressas durante estágios específicos do desenvolvimento das plantas (Simões-Araújo et al., 2003; Walters et al., 1996). A indução de sHSPs na ausência de estresses tem sido reportada em diversas espécies de plantas sob diferentes estádios de desenvolvimento (Walters et al., 1996). A expressão de sHSP durante o desenvolvimento de sementes é o exemplo mais caracterizado dessa regulação na ausência de estresse. Em embriões de *Arabidopsis*, a classe I citocólica de sHSPs começa a ser acumulada na metade do período de maturação e é abundante durante o final do período de maturação, bem como em sementes secas (Wehnmeyer et al., 1996). Em ervilha, as classes I e II de sHSPs começam a ser acumuladas na metade do período de maturação e aumenta a concentração com a desidratação das sementes (DeRocher & Vierling, 1994). Uma acumulação similar da classe II de sHSPs ocorre em sementes de girassol, enquanto a classe I de sHSPs acumula mais no final do programa de maturação das sementes (Coca et al., 1994).

Em milho, ervilha, feijão fava, tomate e *Nicotiana rústica* verificou-se que a acumulação de sHSPs ocorre em diferentes estágios após a antese. Entretanto, a expressão sempre foi observada significativamente antes do período de dessecação das sementes (Zur Nieden et al., 1995).

Devido às suas propriedades físicas, abundância e natureza conservadora, essas proteínas são muito estáveis, podendo ser eficientes marcadores (Mann, 2002 e Roveri José et al., 2003). Roveri José et al. (2003), realizaram trabalho com o objetivo de avaliar a viabilidade das proteínas resistentes ao calor como descritores para linhagens de milho provenientes do programa de melhoramento de milho da UFLA. Estes autores verificaram que para cada genótipo foi observada estabilidade nos padrões de bandas das proteínas consideradas robustas, mesmo naquelas que apresentaram grandes variações nos valores de germinação. Foram observadas também variações tanto no número quanto na intensidade das bandas e os padrões foram diferentes para todas as linhagens analisadas. Mann et al. (2002), ao avaliarem a diversidade genética de cultivares de algodoeiro por meio das proteínas resistentes ao calor, observaram que as variedades apresentaram variações tanto no número de bandas quanto na intensidade e ou nitidez. As variedades foram separadas em três grandes subgrupos: 1) Precoce Alva, Precoce Liça, ITA-96 e Precoce (Epamig-5), 2) Delta Opal, IAC-20, IAC-21, IAC-22 e Redenção e 3) Delta Pine e a ITA-90. Segundo os mesmos autores, para que esse marcador seja sugerido como descritor, investigações devem ser feitas para avaliar os atributos de homogeneidade, distinguibilidade e estabilidade, como recomendado na Lei de Proteção de Cultivares.

Apesar de se conhecer o papel das proteínas resistentes ao calor nos processos de tolerância à dessecação, poucas pesquisas foram realizadas no sentido de testá-las para a identificação de cultivares.

3.MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes e de Eletroforese do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, região Sudoeste do estado de Minas Gerais.

Foram utilizadas sementes de linhagens e de híbridos de milho 1, 1/11, 11, 3, 8/3, 8, 4, 11/4, 5, 12/5 e 12 da Geneseeds Recursos Genéticos em milho Ltda., de seis cultivares de feijão do tipo Carioca pertencentes ao Centro de Domesticação Mesoamericano Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81; de dezenove cultivares de soja, sendo elas Conquista, Monarca, Liderança, Confiança, Splendor, UFV-16, Garantia, FT-2000, BRIAC-21, Vencedora, BRS 133, BRS 154, BRS 216, CD 201, CD 208, IAC 15-2, M-SOY 6101, M-SOY 8001 e M-SOY 8411 e de cinco cultivares de algodão EPAMIG-Precoce 1, MG-110, MG-0304, MG-0316 e MG 3305, cujas genealogias estão apresentadas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

TABELA 1. Genealogia das cultivares de feijão do grupo Carioca. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	Genealogia
Carioca	Seleção dentro de lavoura de produtores
Carioca MG	Car. 80 ¹ / Rio Tibagi
Aporé	(Car./ México 168) // (Car. / Bat 76 ²)
IAPAR 57	(Porrilo Sintético / Aeté 1-38) // [(CENA 83-1 / IAPAR BAC 32) // (CENA 83-2 / CENA 83-1)]
IAPAR 81	BAT 93 ³ / [(Carioca 80/ G.N. Nebtaska 1 Sel. 27) // Sel. Aroana / 5 / A 176 ⁴ / 4 / A 259
Pérola	Seleção Aporé

Fonte: Carneiro, J.E.S. (trabalho a ser publicado).

¹ Car.80: Carioca / Cornell 49-242; ² BAT 76: Carioca / México 168 /4/ Carioca /// [(Porrillo nº 1 / Gentry 21439) / (Gentry 21439 // 51052 / Cornell 49-242)]; ³ BAT 93: (Veranic 2 / Tlalnepantha 64) // (Jamapa / Tara)]. ⁴A176: Aroana /// [(Veranic 2 / Tlalnepantla 64) // (Jamapa / Tara)].

TABELA 2. Genealogia das cultivares de algodão. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	Genealogia
EPAMIG/Precoce	Variedade comercial
MG 110	6195-H-129 x IAPAR- 1.
MG 304	EPAMIG 4
MG 316	IAC-22 x JPM 781-8-71
MG 3305	AHA 1-9-104 x EPAMIG 4

Fonte: Dr. Júlio Pedro Laka Buendía (EPAMIG, Uberaba, MG).

TABELA 3. Genealogia das cultivares de soja. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	Genealogia
Conquista	Lo79-4484 / Numbaíra ^a
BRIAC-21	RC IAC 8/ (IAC 8 ^b / FT Cristalina ^c)
Liderança	Centenial /[(Paraná ^d / Bossier ^e) / Davis ^f]
Confiança	Paraná / BR83-147
Splendor	IAC / FT 2 ^g
UFV-16	FT 12 / IAC 8
Garantia	Braxton / (Cariri / FT Cristalina)
FT-2000	_____
Monarca	Seleção de CAC 1 ^h
Vencedora	Braxton / [FT 5 ⁱ / (Dourados ^j / Ocepar 9-SSI ^k)]
BRS 133	FT Abyara x BR 83-147
BRS 154	EMBRAPA 1 (IAS 5 RC) x Braxton
BRS 216	[BR 79-15807 x EMBRAPA 4 (BR 4 RC)] x IAC 13
CD 201	OCEPAR 4 IGUAÇU (5) x Willians 20
CD 208	OCEPAR 4 IGUAÇU (6) x Willians 20
IAC 15-2	_____
M-SOY 6101	_____
M-SOY 8001	_____
M-SOY 8411	_____

Fonte: Priolli et al. (2002), Abdelnoor et al. (1995), EMBRAPA e COODETEC.

^a: progênie F6 selecionada a partir de Davis / IAC 71-113; ^b: Bragg / (Hill / PI240664); Bragg: Jackson / D49-2491: irmã de Lee.;^c: Cruzamento natural em UFV 1; ^d: Hill / F1 (Roanoke / Ogden); ^e: mutação natural de Lee; ^f: Roanoke / [(Ogden / CNS) / (Ralsoy / Ogden)]; ^g: Seleção em IAC 5; ^h: Seleção em IAC 8; ⁱ: FT 9510 / Sant' Ana; ^j: Seleção em Andews; ^k: mutação natural em Paraná.

TABELA4. Genealogia das linhagens e híbridos de milho. UFLA, Lavras-MG, 2005.

Cultivar	Genealogia
1	(176/19) x 167
1/11	(176/19) x 167) X (1701 P42527) x 10
11	(1701 x P42527) x 10
3	(9811) x 181
8/3	((73/414) x 230) X ((9811) x 181)
8	(73/414) x 230
4	(BT1BT2 / 7927) x 63
11/4	((1701 P42527) x 10) X ((BT1BT2 / 7927) x 63)
5	176 x 498 / P 30047) x 7
12/5	((292 / FBR 201) x 109) X ((176 x 498 / P 30047) x 7)
12	(292 / FBR 201) x 109

Fonte: Geneseeds Recursos Genéticos em Milho Ltda.

O teor de água das sementes foi determinado pelo método da estufa a 105°C por 24 horas (Brasil, 1992).

Para avaliar a estabilidade das enzimas e proteínas, uma parte das sementes foi submetida à deterioração controlada. Primeiramente, estas foram separadas em grupos de 50 sementes e acondicionadas em embalagens revestidas de alumínio, adicionando-se a quantidade de água necessária para se atingir os níveis de teor de água de 20%. A embalagem foi selada a quente e mantida por 24 horas a 10°C, para a uniformização do teor de água das sementes. Em seguida, apenas metade das sementes foi exposta à deterioração controlada em BOD a 42°C por 48 horas para o milho (Padilha, 2002), 96 horas para a soja e 120 horas para o feijão (Rossetto & Marcos Filho, 1995) e 108

horas para o algodão (Vieira, 1996). Dessa forma, foram obtidas sementes com dois níveis de qualidade fisiológica.

Posteriormente, essas sementes foram submetidas aos testes de germinação para a avaliação da qualidade fisiológica. Foram avaliados ainda padrões isoenzimáticos e de proteínas resistentes ao calor dessas sementes, com diferentes níveis de qualidade, visando à identificação de cultivares e à estabilidade desses padrões protéicos.

3.1.Avaliação da qualidade fisiológica

3.1.1.Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com 200 sementes de cada cultivar de milho, feijão, soja e algodão, distribuídas em quatro repetições de 50 sementes. A semeadura foi realizada em papel de germinação previamente umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Em seguida, as sementes foram transferidas para germinador previamente regulado à temperatura constante de 25°C.

As avaliações foram realizadas no 4º e 7º dia para o milho, 5º e 9º para o feijão, 5º e 8º para a soja e 4º e 12º para o algodão. Foi computado o número de plântulas normais, de acordo com as prescrições contidas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais das quatro repetições. Os dados foram comparados pelo teste de Tuckey a 5%. As análises foram realizadas no programa estatístico Sisvar (Sistema de Análise de Variância) (Ferreira, 2000) e as variáveis, expressas em porcentagem, tiveram os dados transformados em arco-seno $\sqrt{x/100}$.

3.2.Extração de Isoenzimas e análise eletroforética:

Para a extração das isoenzimas de milho seguiu-se a metodologia utilizada por Imolesi et al. (1999).

De acordo com as recomendações de Konarev (1988), foram amostradas 50 sementes de cada cultivar e trituradas em moinho refrigerado marca Tecnal modelo TE613/1, na presença de PVP (Polivinil pirrolidone).

Aos 100 mg do pó das sementes foram adicionados 350 µl do tampão de extração Tris-HCl 0,2 M pH 8. A mistura foi agitada em vortex e, posteriormente, mantida por uma noite em geladeira. Em seguida foi centrifugada á 14.000 rpm por, 30 minutos, a 4°C.

Foram aplicados 50 µl do sobrenadante em gel de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo usado foi a tris-glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 150 V por 4 horas.

Após a eletroforese, os géis foram revelados e corados para os sistemas isoenzimáticos: esterase (EST-EC 3.1.1.), álcool desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1), malato desidrogenase (MDH-EC 1.1.1.37) e catalase (CAT-EC 1.11.1.6), segundo metodologia descrita por Alfenas (1991).

As análises eletroforéticas de isoenzimas de feijão foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado por Vieira et al. (2000).

Foram utilizados 100 mg de epicótilo das plântulas de cada cultivar. Inicialmente, as sementes foram colocadas em papel de germinação á 25°C e, após cinco dias os epicótilos foram retirados, macerados sobre gelo, sendo adicionados 2,5 vezes o seu peso de tampão de extração e cerca de 0,05 g de antioxidante PVP 40 (polivinilpirrolidone). Os tampões usados foram Tris-HCl 0,2M +0,01% de β-mercaptoetanol pH 8 e tampão fosfato (0,034 M de fosfato de sódio bi-básico, 0,2 M de sacarose, 2,56% de PVP 40, 3 M de DDT, 5,7 mM L ácido ascórbico, 2,5 mM de borato de sódio, 1% de PEG 6000, 0,002% de β-

mercaptanol), sendo que este último só foi utilizado para extração da enzima peroxidase.

Após a maceração, as amostras foram deixadas a uma temperatura de 4°C por 24 horas e, depois, centrifugadas a 16.000 xg por 60 minutos a 4°C.

Em seguida, 100 µl do sobrenadante de cada amostra foram aplicados no gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão de corrida foi o Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada a 4°C por quatro horas a uma voltagem de 150 v; após isso, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos esterase, peroxidase (PO-EC 1.11.1.1) e glutamato-oxalacetato transaminase (GOT-EC 2.6.1.1), seguindo as prescrições de Alfenas (1991).

Para as análises isoenzimáticas de algodão, seguiram-se as recomendações de Vieira et al. (1996), com algumas modificações. Primeiramente, as sementes foram destegumentadas manualmente, liofilizadas e trituradas em moinho refrigerado em presença de PVP e armazenada a – 86°C.

Para a extração das isoenzimas foi utilizado o tampão Tris HCl 0,2M pH 8,0 + (0,1 % de β ME, 0,4% PVP, 0,4% PEG e 1 mM EDTA), na proporção de 400 µL por 100 mg das sementes, homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas a 4°C, seguido de centrifugação a 16.000 xg por 60 minutos a 4°C.

A corrida eletroforética foi desenvolvida em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 20µl do extrato da amostra e as corridas foram efetuadas a 150 V por 4 horas.

Terminada a corrida, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos esterase, diaforase (DIA-EC 1.8.14), superóxido-dismutase (SOD-EC 1.15.1.1) e malato desidrogenase, conforme Alfenas et al. (1991).

Para cada cultivar de soja foram utilizados 100 mg de epicótilos de plântula com 5 dias de germinação, maceradas sobre gelo na presença de

antioxidante PVP e 700 µl de tampão de extração. Este tampão de extração consistiu de dois tampões: uma parte de tampão 0,2 M de borato de lítio (0,2 M de hidróxido de lítio pH 8,3, titulado com 0,4 M de ácido bórico), nove partes de tampão 0,2 de Tris citrato pH 6,5 (0,2 M de Tris base pH 6,5, titulado com 0,4 M de ácido cítrico) e 0,15% de β-mercaptanol (Aguerro, 2002). As amostras de sementes de cada cultivar, foram deixadas em eppendorf a 4°C, na presença de tampão de extração por uma noite e centrifugados a 16.0000 xg, por 30 minutos, a 4°C. Foram aplicados 60 µl do sobrenadante de cada amostra em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão de corrida usado foi o Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética realizada a 4°C, por quatro horas, a uma voltagem constante de 150 V. Após a eletroforese, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos diaforase, esterase e superóxido dismutase, de acordo com Alfenas (1991).

3.3.Extração de proteínas resistentes ao calor e análise eletroforese

Para as extrações das proteínas resistentes ao calor, foi seguido o protocolo utilizado por Roveri José et al. (2004), com algumas modificações.

As sementes foram embebidas por 5 horas para a extração dos eixos embrionários, os quais foram colocados em eppendorf e mantidos a -86°C.

Os eixos embrionários foram moídos em mortar sobre gelo na presença de solução tampão, na proporção de 100 mg:1000 µl (eixo embrionário: solução tampão). O tampão utilizado foi 50 mM de Tris HCl 7,5; 500 mM de NaCl₂; 5 mM de Mg Cl₂; 1 mM de PMSF. O homogeneizado foi centrifugado a 16000 xg por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi vertido em microtubos limpos e o pellet descartado, os quais foram incubados em banho-maria a 85°C, por 15 minutos e novamente centrifugados como já citado. Em seguida, o sobrenadante foi pipetado em microtubos e os pellets descartados.

Para a aplicação no gel, foram retiradas alíquotas de 70µl de extrato + 40µl de tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46 de SDS; 20 mg de azul de bromofenol e completado o volume para 20 ml de tampão de extração Tris HCl pH 7,5) para o milho e 10 µl do extrato protéico + 40 µl de tampão da amostra para as cultivares de soja, feijão e algodão, as quais foram colocados em água em ponto de ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 50 µl de cada amostra para o milho e 40 µl da amostra para soja, feijão e algodão, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% de gel separador e 6 % de gel concentrador.

A corrida foi realizada a 150 V, os géis corados em Coomassie Blue a 0,05% conforme Alfenas et al. (1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

Como referência, foi utilizado o padrão da INVITROGEN Cat N°10747-012, com os padrões de calibração de 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 Kda.

A avaliação dos padrões protéicos, tanto de enzimas como de proteínas resistentes ao calor, constou da observação da presença e ausência de bandas em cada genótipo, designadas por 1 e 0, respectivamente. Foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa da similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de Jaccard: } s_{gij} = \frac{a}{a + b + c}$$

sendo:

a = presença da banda em ambos os genótipos i e j,

b = presença da banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j,

c = ausência da banda no indivíduo i e presença no indivíduo j.

Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo método Unweighted *Pair-Group* Method (UPGMA), utilizando-se o programa NTSYS versão 2.11 (Rohlf, 1992).

A consistência do dendrograma obtido foi avaliada pelo método de "bootstrap". Os cálculos de consistência foram realizados pelo programa BOOD versão 3.1 (Coelho, 2001).

Para a obtenção da linha de corte no dendrograma, o erro (sgs) associado a cada similaridade genética foi calculado pela fórmula:

$$Sgs = [gs_{ij} * (1 - gs_{ij}) / (n - 1)] * 0,5.$$

em que:

sgs = erro

gs_{ij} = similaridade genética

n = número total de bandas polimórficas obtidas.

Após, o valor da linha de corte (gsn) foi calculado aplicando-se o erro médio na seguinte fórmula (Hagiwara et al., 2001):

$$gsn = 1 - (t_{x\%} * \text{erro médio}).$$

em que:

gsn = valor da linha de corte

t_{x%} = valor de t com n-2 graus de liberdade

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.Análise da qualidade fisiológica das sementes de milho

Os valores iniciais de teores de água das sementes de milho, antes de serem submetidas ao processo de deterioração controlada, variaram de 10,93% a 12,44%. Após a deterioração das mesmas, esse valor foi elevado para 20%. Segundo Marcos Filho et al. (1987), para se obter resultados confiáveis durante a deterioração das sementes, é necessária a uniformização do grau de umidade das sementes antes do início deste, uma vez que, quanto mais úmidas estiverem as sementes, maiores serão os efeitos deletérios deste envelhecimento.

Quanto aos valores de germinação das sementes de milho, antes e após o processo de deterioração, observaram-se menores valores em sementes de milho das cultivares 1, 1/11, 11, 3, 8/3, 8 e 4 submetidas à deterioração controlada por 48 horas (Tabela 5).

TABELA5. Porcentagem de germinação de sementes de milho submetidas e não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivares	Período de deterioração controlada (20% U)	
	Germinação	
	0 horas	48 horas
1	91 a	52 b
1/11	89 a	81 b
11	83 a	56 b
3	90 a	58 b
8/3	99 a	92 b
8	95 a	79 b
4	94 a	78 b
11/4	98 a	76 b
5	88 a	85a
12/5	94 a	95a
12	93 ^a	94a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade

As sementes das linhagens 5 e 12 e do híbrido 12/5 não tiveram a germinação reduzida nas condições de envelhecimento propostas. Provavelmente, este resultado pode ser atribuído à maior tolerância das sementes desse genótipos às condições de envelhecimento. De acordo com Roveri José (2003) e Gomes (2000), sementes de diferentes cultivares de milho podem apresentar diferenças quanto à qualidade fisiológica das sementes sob condições de estresse. Os autores atribuíram essas diferenças ao genótipo de cada cultivar. Gomes (2000) observou, ainda, que sementes de linhagens de milho apresentam menores valores de germinação e vigor quando comparados aos das sementes híbridas sob condições de envelhecimento artificial

Dessa forma, para a maioria das cultivares, a metodologia utilizada de envelhecimento foi eficiente para gerar sementes com diferentes níveis de qualidade.

4.1.1. Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de milho

Os perfis isoenzimáticos das sementes de linhagens e híbridos de milho de diferentes qualidades fisiológicas estão apresentados na Figuras 1, 2 e 3.

No presente estudo, por meio do sistema enzimático da álcool desidrogenase (Figura 1), foram obtidos dois padrões eletroforéticos diferentes. Dessa forma, as cultivares foram separadas em dois grupos: 1) 1, 1/11, 11, 8/3, 4, 11/4 e 12/5 e 2) 3, 8, 5 e 12. Foi possível separar, por meio desse sistema, os híbridos 8/3 e 12/5 de seus progenitores.

A álcool desidrogenase atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Vantoi et al., 1987). O acetaldeído pode ser um importante fator que acelera a deterioração de sementes, independente do ambiente de armazenamento, enquanto o etanol causa deterioração somente em umidades relativas altas. Salgado (2001), estudando a atividade dessa enzima em sementes, coleóptilos e folhas de milho de diferentes cultivares, observou atividade da mesma somente nos tecidos das sementes; entretanto, o padrão de bandas apresentou-se monomórfico entre as cultivares testadas. Provavelmente, esse resultado pode ser atribuído ao fato da enzima ser codificada apenas em dois locos, que se expressam durante os primeiros estádios de desenvolvimento da semente (Torggler et al., 1995).

Quanto à estabilidade desse sistema não foram observadas modificações nos padrões eletroforéticos em sementes com diferentes níveis de qualidade. Os padrões dessa enzima, em sementes, podem ser alterados na presença de patógenos. Silva (1997) observou uma diminuição da intensidade de bandas da

álcool desidrogenase em sementes associadas com *Aspergillus flavus*. Já Brandão Junior (1996) verificou uma diminuição da intensidade de bandas da álcool desidrogenase com o aumento do tempo de envelhecimento.

Seis padrões eletroforéticos diferentes foram obtidos para a catalase (Figura 1), sendo as cultivares separadas em seis grupos: 1) 11, 3 e 8/3; 2) 5, 12/5 e 12; 3) 1 e 4; 4) 8; 5) 1/11 e 6) 11/4. Vale ressaltar que foi possível, ainda, a separação dos híbridos 1/11 e 11/4 e ainda desses em relação aos seus parentais. O padrão de bandas do híbrido 8/3 foi diferente apenas do parental masculino, impossibilitando a separação entre o híbrido e o parental feminino. Pôde-se observar, ainda, estabilidade desses padrões em sementes de qualidade fisiológica diferentes. Os resultados divergiram dos encontrados por Hendrich Sobrinho (1982), que não observou polimorfismo entre as nove linhagens de milho por esse sistema enzimático. Provavelmente, essa divergência deve-se aos diferentes materiais genéticos utilizados. Ao contrário, esse sistema enzimático foi considerado eficiente por Salgado (2001), por meio do qual foi possível separar o híbrido 7/4 de seus progenitores. Porém, nessa mesma pesquisa, não foi possível separar o híbrido 8/3 do parental masculino. Imolesi (1999) abordou que cuidados deverão ser tomados ao adotar esse sistema enzimático para a diferenciação de cultivares, uma vez que o mesmo observou a influência da adubação nitrogenada, durante o processo de produção, no padrão eletroforético da mesma.

Pela enzima esterase (Figura 2), foi possível separar diferentes linhagens e híbridos de milho estudadas. Oito padrões eletroforéticos diferentes foram obtidos, tendo as cultivares sido separadas em oito grupos: 1) 1 e 8; 2) 11 e 11/4; 3) 3 e 12/5; 4) 1/11; 5) 8/3 ; 6) 4; 7) 5 e 8) 12 e as cinco últimas cultivares apresentando padrões eletroforéticos específicos. Foi observada ainda, segregação mendeliana para os híbridos 11/4 e 12/5, os quais foram caracterizados por duas bandas provenientes de cada um dos parentais. Este padrão de bandas

possibilitou a separação dos híbridos de seus parentais, bem como das duas linhagens parentais entre si. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Salgado (2001), ao estudar marcadores para a separação de híbridos, dos seus parentais. Dessa forma, essa enzima torna-se promissora para a certificação da pureza genética, em sementes híbridas de milho.

Para a enzima malato desidrogenase (Figura 2), foram observados dois padrões eletroforéticos diferentes, sendo possível separar as cultivares em dois grupos: 1) 5, 8 e 11 e 2) 1, 1/11, 3, 8/3, 4, 11/4, 12/5 e 12. Resultado semelhante foi encontrado por Salgado (2001), ao tentar separar os híbridos dos seus parentais, por meio dessa enzima. Bilgen et al. (1995) conseguiram também diferenciar os híbridos simples de seus progenitores por meio desse sistema.

Não foram detectadas diferenças de atividade dessa enzima entre materiais de diferentes qualidades fisiológicas. Brandão Junior (1996) não observou correlações entre a qualidade fisiológica de sementes de milho e a atividade da malato desidrogenase. Satters et al. (1994) concluíram também que, em sementes de soja essa enzima foi a menos afetada pelos tratamentos de envelhecimento.

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa os radicais superóxidos livres (O_2^-), produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular e H_2O_2 (Rabinowitch & Fridovich, 1983, citados por Brandão Junior, 2000). Por meio do sistema enzimático da SOD, foram observados dois padrões eletroforéticos diferentes, sendo as linhagens 1 e 12 separadas dos demais materiais. Bonow (2004), analisando oito cultivares de arroz utilizando a superóxido dismutase, não encontrou polimorfismo entre os materiais estudados. Já Vieira (2004), considerou este sistema enzimático o mais discriminativo para as dez cultivares de soja estudadas, havendo separação das cultivares em oito grupos. Para esse sistema enzimático, também não foram detectadas alterações com relação aos materiais de qualidade fisiológica diferente. Em um trabalho

realizado por Brandão Junior (2000), em sementes de café, também não foi possível verificar alterações em função dos diferentes estágios de desenvolvimento, teores de água das sementes e períodos de armazenamento para a enzima SOD.

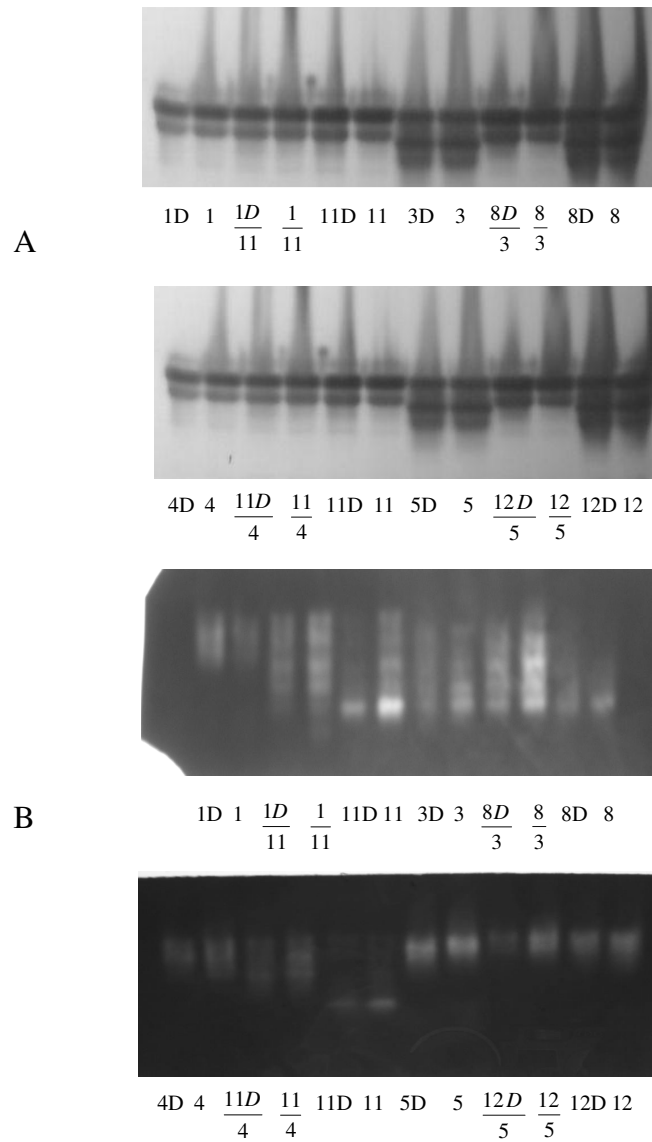


FIGURA1. Padrões eletroforéticos das isoenzimas álcool desidrogenase (A) e catalase (B) de sementes de milho de linhagens e híbridos submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

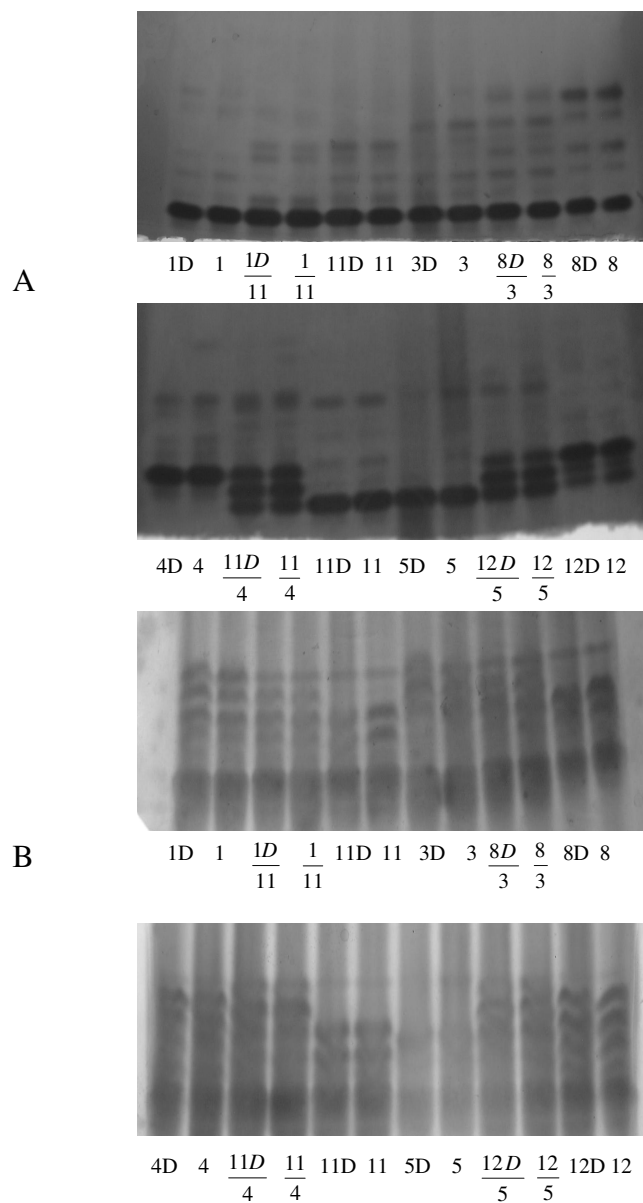


FIGURA2. Padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase (A) e malato desidrogenase (B) de sementes de milho de linhagens e híbridos submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

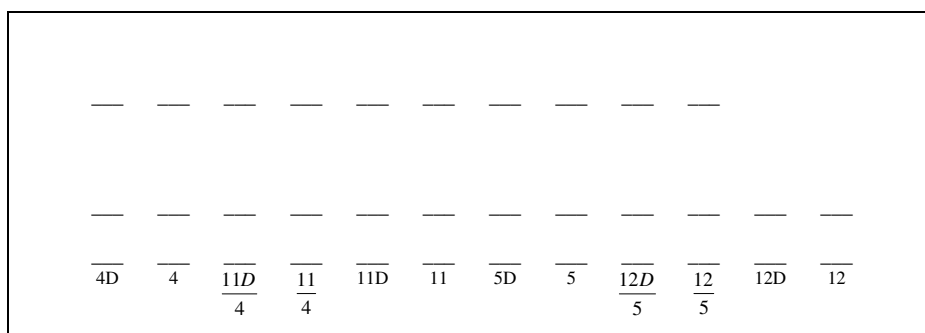
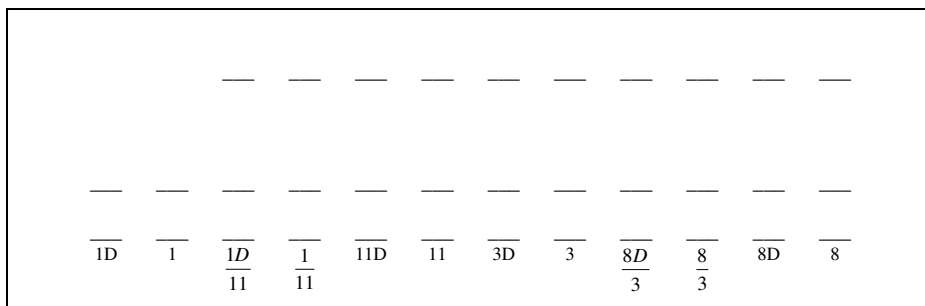


FIGURA3. Padrões eletroforéticos da isoenzima superóxido dismutase de sementes de milho de linhagens e híbridos, submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras-MG, 2005.

Pode ser observado, pela Tabela 6, que a similaridade genética média das linhagens e híbridos de milho obtida a partir dos marcadores isoenzimáticos foi de 0,64. O valor máximo foi de 0,857 entre a linhagem 11 e o híbrido 8/3, e mínimo de 0,521 entre a linhagem 8 e o híbrido 1/11. Ainda foi observado que não houve alteração nos valores de similaridade genética, quando trabalhou-se com sementes de milho de diferentes qualidades fisiológicas.

TABELA6. Similaridades genéticas entre as linhagens e híbridos de milho com base na eletroforese de isoenzimas de sementes deterioradas e não deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	1	1/11	11	3	8/3	8	4	11/4	5	12/5	12
1	1,000										
1/11	0,619	1,000									
11	0,619	0,809	1,000								
3	0,590	0,772	0,727	1,000							
8/3	0,750	0,772	0,857	0,739	1,000						
8	0,631	0,521	0,590	0,636	0,636	1,000					
4	0,812	0,650	0,650	0,619	0,700	0,578	1,000				
11/4	0,736	0,850	0,850	0,727	0,809	0,545	0,777	1,000			
5	0,666	0,619	0,700	0,666	0,666	0,631	0,705	0,736	1,000		
12/5	0,764	0,700	0,700	0,750	0,666	0,550	0,812	0,833	0,764	1,000	
12	0,722	0,590	0,590	0,636	0,636	0,523	0,578	0,700	0,722	0,722	1,000

De acordo com o dendrograma obtido a partir dos coeficientes de similaridade de Jaccard (Figura 4), as linhagens e híbridos foram agrupadas em sete grupos: 1) linhagem 1 e 4; 2) híbrido 12/5; 3) linhagem 5 e 12; 4) híbridos 1/11 e 11/4; 5) linhagem 11 e híbrido 8/3; 6) linhagem 3 e 7) linhagem 8.

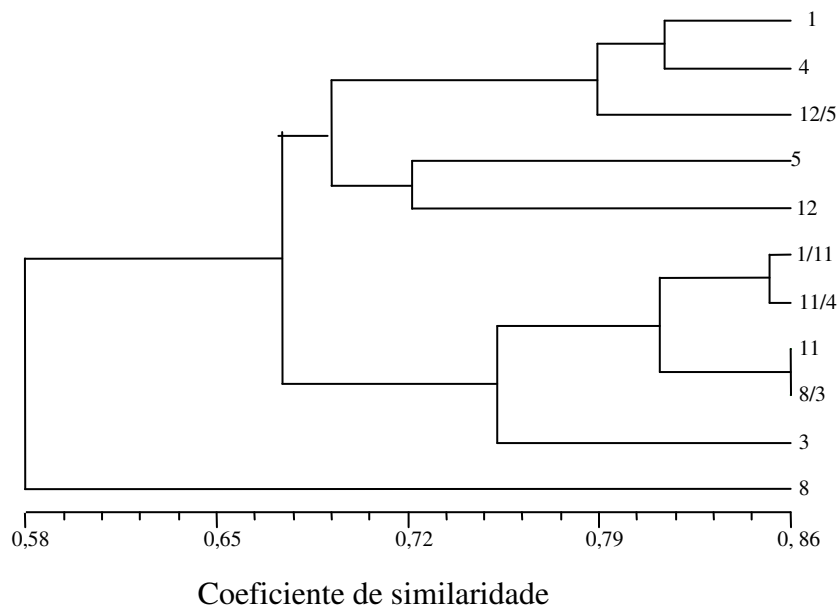


FIGURA4. Dendrograma de linhagens e híbridos de milho, utilizando marcadores isoenzimáticos em sementes deterioradas e não deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Por meio do dendrograma, o maior valor da similaridade genética foi de 0,86 entre a linhagem 11 e o híbrido 8/3, e o valor da linha de corte, mesmo com a menor porcentagem do valor de t ($t_{0,1\%}$), foi de 0,87. Sendo assim, todos os agrupamentos que estão à esquerda da linha de corte, ou seja, com similaridade abaixo de 0,87, são considerados com baixa similaridade genética entre si. Este resultado pode ser confirmado pelos valores de bootstrap (BS), que foram todos abaixo de 50%, para os agrupamentos apresentados no dendrograma.

Verifica-se, no geral, que das linhagens e híbridos avaliadas nessa pesquisa (Tabela 4), apenas os híbridos possuem genealogia comum ao dos parentais.

De maneira geral, os sistemas enzimáticos catalase (Figura 1) e esterase (Figura 2) foram os que apresentaram maior polimorfismo em cultivares de milho, sendo que, os mesmos apresentaram-se estáveis em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Um sistema enzimático que permita a diferenciação entre sementes híbridas e de seus parentais se constitui em um bom marcador que pode ser utilizado na certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho. Sabe-se que, no Brasil, em algumas empresas, alguns desses sistemas enzimáticos já têm sido utilizados para a certificação da pureza genética.

4.1.2. Análise das proteínas resistentes ao calor em milho

Observam-se, pelo zimograma (Figura 5), os padrões de bandas das proteínas resistentes ao calor para as sementes de linhagens e híbridos de milho de diferentes qualidades fisiológicas.

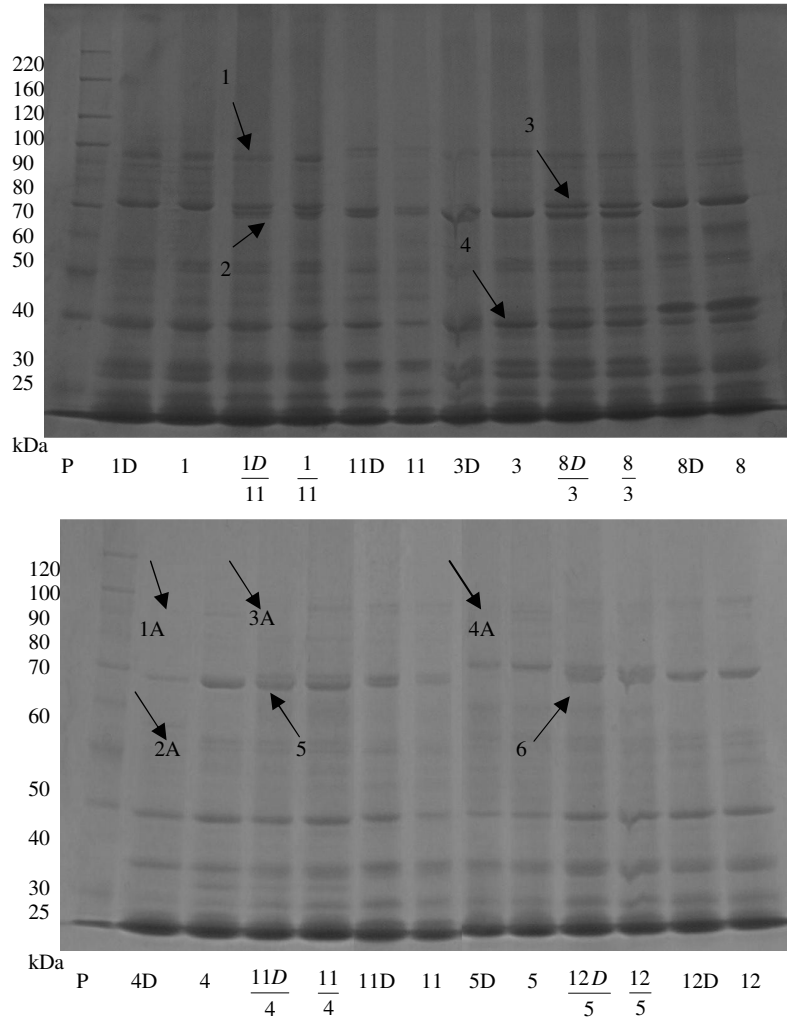


FIGURA 5. Padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor provenientes de sementes deterioradas (D) e não deterioradas de linhagens e híbridos de milho, obtidos na presença de um padrão protéico (P). A: ausência de bandas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

A análise das bandas polimórficas foram realizadas em função dos pesos moleculares. Quanto ao polimorfismo, foram analisadas em torno de 15 bandas protéicas, e devido ao objetivo da pesquisa, foram consideradas apenas as bandas robustas. Foram observados padrões eletroforéticos diferentes em todas as linhagens e híbridos analisados.

Foi possível diferenciar o híbrido 1/11 (Figura 5) de seus parentais pela presença da banda 1, com peso molecular de 95 kDa e da banda 2, com peso molecular de aproximadamente 65 kDa.

No híbrido 8/3 (Figura 5) foi observada a banda 3 que representa uma segregação mendeliana, em que o híbrido possui duas bandas, provenientes de cada um dos parentais. Salgado (2001) observou codominância ao avaliar o perfil eletroforético da esterase em sementes de linhagens e híbridos de milho. A característica de codominância em um marcador é importante na certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho, por meio do qual é possível separar as sementes híbridas do parental feminino autofecundado. Isso é extremamente importante nos programas de controle de qualidade de empresas, pelo fato de se poder detectar falhas no processo de despendoamento do parental feminino. Sabe-se que esse tipo de contaminação genética é comum nos campos de produção de sementes híbridas, o que reduz a qualidade fisiológica das sementes, assim como a produção de grãos (Von Pinho, 1995).

Na linhagem 3 foi observada uma banda 4, com peso de 40 kDa que a diferenciou do híbrido (8/3) e do parental masculino (8).

A banda 5, de aproximadamente 70 kDa, estava presente apenas no híbrido 11/4, diferenciando-o dos seus parentais.

No híbrido 12/5, foi observado uma banda 6 de aproximadamente 65 kDa, diferenciando-o do parental feminino (5).

Apesar de terem ocorrido alterações nos padrões das proteínas resistentes ao calor, como nas linhagens 4 e 5 e híbrido 11/4, quando as sementes foram

deterioradas, não foram observadas alterações nos padrões que separavam as cultivares, não interferindo na interpretação dos resultados. De maneira geral, não foram observadas alterações nos valores de similaridade genética entre os genótipos, quando se trabalhou com sementes de diferentes níveis de qualidade. As diferenças observadas (Tabelas 7 e 8) podem ser atribuídas à ausência das bandas (1A, 2A, 3A e 4A) em sementes de milho deterioradas.

É necessário a utilização de marcadores que sejam polimórficos e estáveis para a identificação de cultivares. Os padrões eletroforéticos das proteínas zeínas têm sido considerados estáveis em sementes de milho infectadas com os fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Silva, 1997) e em sementes de milho produzidas sob diferentes doses de nitrogênio (Imolesi et al., 2001).

De acordo com esses resultados, foi observado um alto nível de polimorfismo para as proteínas resistentes ao calor nas diferentes linhagens e híbridos utilizados. Resultados semelhantes foram encontrados por Roveri José (2004), ao avaliar o polimorfismo e a estabilidade dessas proteínas em sementes de milho produzidas em diferentes safras e submetidas à secagem natural e artificial.

TABELA7. Similaridades genéticas entre as linhagens e híbridos de milho, com base na eletroforese de proteínas resistentes ao calor em sementes deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	1	1/11	11	3	8/3	8	4	11/4	5	12/5	12
1	1,000										
1/11	0,750	1,000									
11	0,666	0,750	1,000								
3	0,666	0,750	0,818	1,000							
8/3	0,833	0,769	0,692	0,692	1,000						
8	0,833	0,642	0,571	0,571	0,846	1,000					
4	0,363	0,454	0,500	0,500	0,416	0,307	1,000				
11/4	0,583	0,818	0,583	0,727	0,615	0,500	0,555	1,000			
5	0,545	0,500	0,545	0,545	0,461	0,583	0,500	0,600	1,000		
12/5	0,818	0,615	0,666	0,538	0,692	0,833	0,363	0,461	0,700	1,000	
12	0,900	0,666	0,727	0,583	0,750	0,750	0,400	0,500	0,600	0,900	1,000

Pela similaridade genética, representada no dendrograma (Figura 6) foi observada a separação das linhagens e híbridos de milho de sementes deterioradas em seis grupos: 1) 1 e 12 e 12/5; 2) 8/3 e 8; 3) 1/11 e 11/4; 4) 11 e 3; 5) 5 e 6) 4.

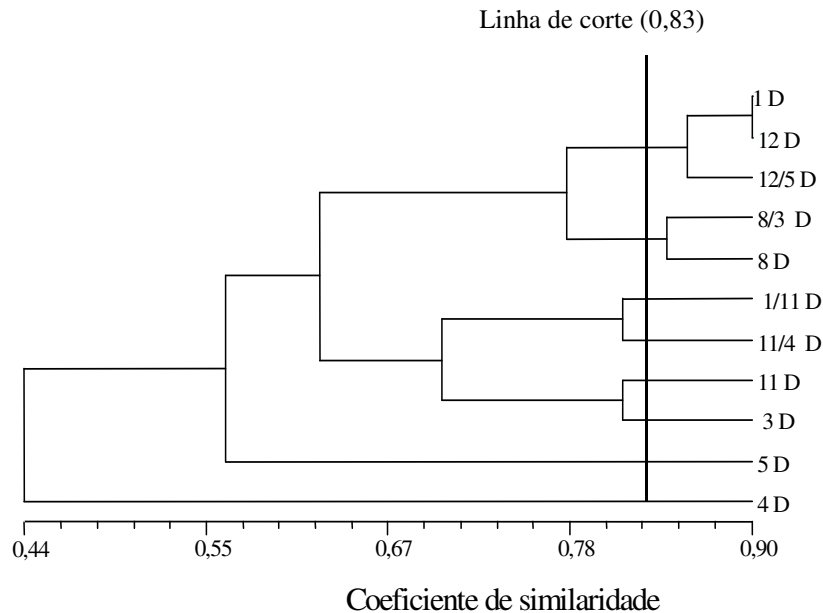


FIGURA6.Dendrograma de linhagens e híbridos de milho, utilizando as proteínas resistentes ao calor em sementes deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

A similaridade genética entre as cultivares do grupo 1 e 2 pode ser confirmada pela linha de corte de 0,83 com $t_{0,1\%}$, segundo a qual os agrupamentos à direita da linha são considerados semelhantes.

Os baixos valores de bootstrap (50%), indicam a baixa similaridade genética entre as linhagens e híbridos da Geneseeds Recursos Genéticos em Milho Ltda.

Pode ser observado, pela Tabela 8, que a similaridade média entre as linhagens e híbridos provenientes de sementes de milho não-deteriorada é de 0,66. Os maiores valores de similaridade genética foram também verificados entre as linhagens 1 e 12 (0,900) e híbrido 12/5 e linhagem 12 (0,900).

TABELA8.Similaridades genéticas entre as linhagens e híbridos de milho, com base na eletroforese de proteínas resistentes ao calor em sementes não deterioradas.UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	1	1/11	11	3	8/3	8	4	11/4	5	12/5	12
1	1,000										
1/11	0,750	1,000									
11	0,666	0,750	1,000								
3	0,666	0,750	0,818	1,000							
8/3	0,833	0,769	0,692	0,692	1,000						
8	0,833	0,642	0,571	0,571	0,846	1,000					
4	0,545	0,636	0,545	0,700	0,583	0,461	1,000				
11/4	0,583	0,818	0,583	0,727	0,615	0,500	0,600	1,000			
5	0,666	0,500	0,666	0,666	0,571	0,692	0,416	0,461	1,000		
12/5	0,818	0,615	0,666	0,538	0,692	0,833	0,416	0,461	0,818	1,000	
12	0,900	0,666	0,727	0,538	0,750	0,750	0,454	0,500	0,727	0,900	1,000

De acordo com o dendrograma obtido (Figura 7), as cultivares foram separadas em seis grupos: 1) 1,12 e 12/5; 2) 8 e 8/3; 3) 5; 4) 1/11 e 11/4; 5) 11 e 3 e 6) 4.

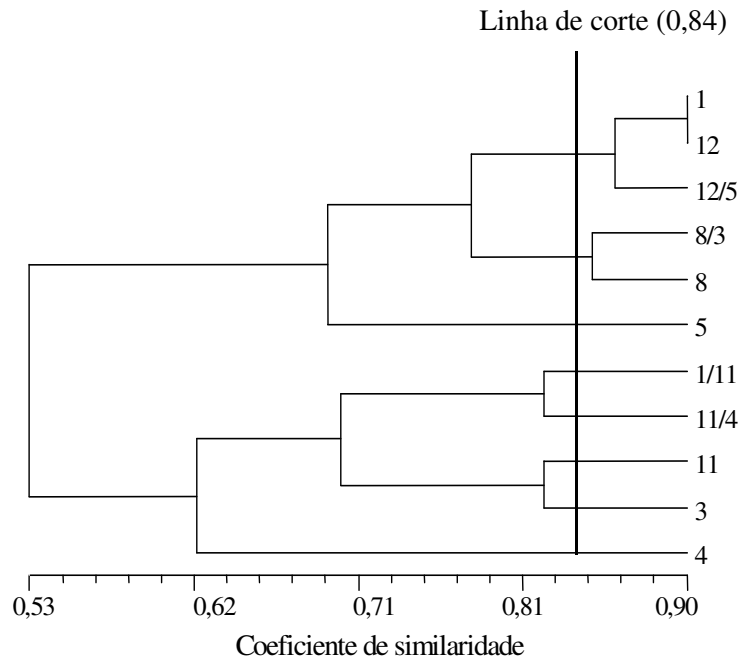


FIGURA7. Dendrograma de linhagens e híbridos de milho, utilizando as proteínas resistentes ao calor em sementes deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

O maior valor de similaridade genética foi de 0,90, entre as linhagens 1 e 12 e o valor da linha de corte foi de 0,84 com $t_{0,1\%}$, todos os agrupamentos obtidos a direita da referida linha, ou seja, com similaridade acima de 0,84, indicando que os agrupamentos 1 (1, 12 e 12/5) e 2 (8/3 e 8) possuem uma alta similaridade genética entre si. Os valores de bootstrap (50%) indicam a baixa

similaridade genética dos agrupamentos apresentados no dendrograma (Figura 7).

Como já abordado, foi observado polimorfismo entre as cultivares de milho, por meio de proteínas resistentes ao calor. Comparando-se os resultados obtidos nessa pesquisa com esse marcador e com os observados em outras pesquisas como os de Imolesi (1999) e de Silva (1997) com marcadores de zeína, observou-se maior polimorfismo entre os materiais, quando utilizaram-se proteínas resistentes ao calor. Nas pesquisas desses autores foi observada estabilidade dos padrões de zeína em sementes de milho produzidas sob diferentes condições e na presença de microrganismos. No entanto, os padrões não se apresentaram polimórficos. Dessa forma, infere-se que as proteínas resistentes ao calor podem ser mais promissoras que a proteína zeína para a identificação de cultivares de milho.

4.2.Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de feijão

Os valores iniciais de teores de água das sementes de feijão, antes do processo de deterioração controlada, variaram de 11,90% a 12,76%. Após a deterioração das mesmas, esse valor foi elevado para 20%.

Os valores de germinação das sementes submetidos a 120 horas de deterioração apresentaram-se inferiores quando comparados aos das sementes não-deterioradas (Tabela 9).

TABELA9. Porcentagem de germinação de sementes de feijão do grupo Carioca submetidas e não, à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivares	Período de deterioração controlada (20% U)	
	Germinação	
	0 horas	120 horas
Aporé	98a	72 b
Carioca	97a	60 b
Carioca MG	97a	80 b
IAPAR 57	99a	90 b
IAPAR 81	98a	55 b
Pérola	99a	58 b

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Sabe-se que a qualidade fisiológica das sementes pode influenciar nos resultados de padrões eletroforéticos de enzimas, podendo resultar em erros de interpretação. Estudos realizados por Brandão Júnior (1996), Imolesi (1999), Silva (1997), Vieira (1996) mostraram alterações dos padrões eletroforéticos de proteínas e enzimas em razão de fatores, como a presença de microrganismos, envelhecimentos e doses de adubação, durante o processo de produção

Com a metodologia utilizada durante a deterioração controlada, foi possível obter sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica, para se estudar a estabilidade dos padrões protéicos em sementes, nessas condições.

4.2.1. Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de feijão

As peroxidases são enzimas que podem utilizar o peróxido de hidrogênio para oxidar uma grande quantidade de doadores de hidrogênio, tais como substâncias fenólicas, citocromo C, ácido ascórbico e alguns íons inorgânicos. Para essa enzima, foram observados dois padrões eletroforéticos diferentes (Figura 8), separando as cultivares em dois grupos: 1) Aporé, Carioca MG, IAPAR 57, IAPAR 81 e Pérola e 2) Carioca. Pode ser observado que na cultivar Carioca, além da presença das bandas 1 e 2, houve o aparecimento das bandas 3 e 4, o que a diferenciou das demais cultivares. Já Vieira (2000) observou padrões de bandas monomórficas dessa enzima para as mesmas cultivares. Dessa forma, constata-se a falta de estabilidade do padrão dessa enzima em diferentes lotes da mesma cultivar. Na presente pesquisa, foi observada ainda diminuição da intensidade das bandas 3 e 4 em sementes deterioradas da cultivar Carioca .

Para a enzima glutamato oxalacetato transaminase, foram observados padrões monomórficos para as sementes de feijão do grupo Carioca com diferentes qualidades fisiológicas. Esses resultados também foram observados por Vieira (2000), ao estudar as mesmas cultivares de feijão. Essa enzima participa do metabolismo de aminoácidos e da descarboxilação, via enzima do ácido málico, na transformação de aspartato em ácido oxalacético e malato, durante a fixação do gás carbônico pelas plantas.

Perfis eletroforéticos da enzima esterase também apresentaram-se monomórficos. Tais resultados foram diferentes dos encontrados por Vieira (2000), em cujo trabalho diferentes padrões de bandas foram detectados para a cultivar Aporé. Por meio desses resultados observa-se instabilidade desses padrões, mesmo utilizando-se da mesma metodologia de extração e de revelação da enzima.

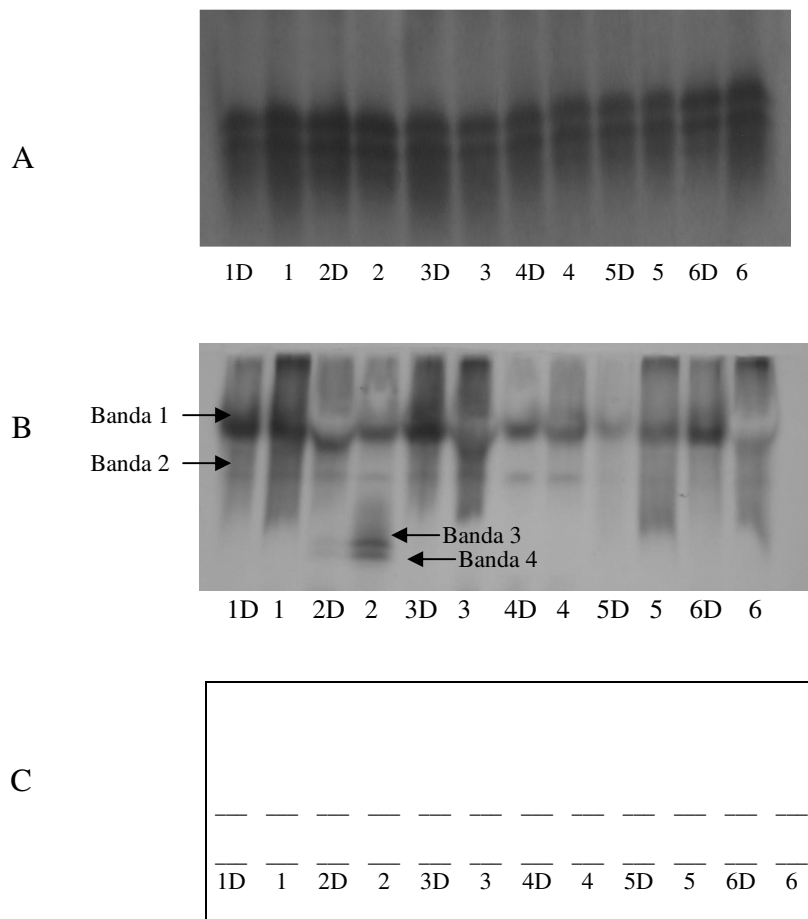


FIGURA8. Padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase (A), peroxidase (B) e glutamato oxalacetato transaminase (C), extraídos de epicótilos de plântulas de feijão das cultivares Aporé (1), Carioca (2), Carioca MG (3), IAPAR 57 (4), IAPAR 81 (5) e Pérola (6), submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Na Tabela 10 estão apresentados os valores de similaridade genética entre as cultivares de feijão do grupo Carioca, calculados a partir dos marcadores isoenzimáticos. A similaridade genética média entre as seis cultivares de feijão foi de 0,83. Os maiores valores de similaridade foram verificados entre as cultivares Carioca MG e IAPAR 57 (1,000) e IAPAR 81 e Pérola (1,000).

TABELA10. Similaridades genéticas entre as cultivares de feijão Aporé (1), Carioca (2), Carioca MG (3), IAPAR 57 (4), IAPAR 81 (5) e Pérola(6), com base na eletroforese de isoenzimas de sementes deterioradas e não deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	1	2	3	4	5	6
1	1,000					
2	0,750	1,000				
3	1,000	0,750	1,000			
4	1,000	0,750	1,000 ¹	1,000		
5	0,833	0,625 ²	0,833	0,833	1,000	
6	0,833	0,625 ²	0,833	0,833	1,000 ¹	1,000

¹: par de genótipos menos divergentes.

²: par de genótipos mais divergentes.

Pelo dendrograma obtido a partir dos coeficientes de Similaridade de Jaccard (Figura 9), as seis cultivares de feijão do Grupo Carioca foram separadas em 3 grupos: I) Aporé, Carioca MG e IAPAR 57; II) IAPAR 81 e Pérola e III) Carioca.

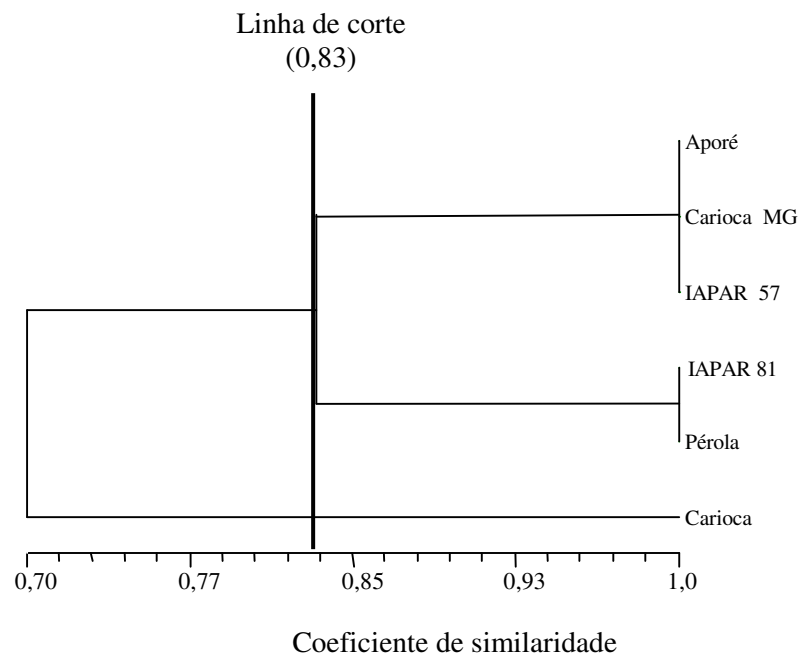


FIGURA9. Dendrograma de cultivares de feijão do Grupo Carioca, utilizando marcadores isoenzimáticos em sementes deterioradas e não-deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

A alta similaridade existente entre as cultivares Aporé, Carioca MG e IAPAR 57, provavelmente está relacionada com a existência de um progenitor comum entre as cultivares Aporé e IAPAR 57, sendo este a cultivar Porrilo. Entre as cultivares Carioca MG e Aporé pode ser explicada pela presença de alelos comuns da cultivar Carioca.

A grande similaridade verificada entre as cultivares IAPAR 81 e Pérola está relacionada com a existência da cultivar Carioca como progenitor comum.

A distinção da cultivar Carioca em relação às demais cultivares provavelmente deve-se à existência de genes provenientes de outra espécie.

A similaridade genética entre as cultivares pode ser confirmada pela linha de corte de 0,83 com $t_{0,1\%}$, segundo a qual os agrupamentos à direita da referida linha são considerados semelhantes e pelos valores de bootstrap (BS), que foram todos acima de 50% (Figura 9).

4.2.2. Análise das proteínas resistente ao calor em feijão

Para as proteínas resistentes ao calor (Figura 10), não foram encontrados padrões polimórficos para as cultivares Aporé, Carioca, Carioca MG, IAPAR 57, IAPAR 81 e Pérola, pertencentes ao grupo de feijão Carioca. Provavelmente, este resultado se deve ao fato de todas as cultivares terem se originado de uma seleção dentro da cultivar Carioca, o que faz com que tenham vários genes em comum. Mesmo em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica, o padrão de bandas mostrou-se estável.

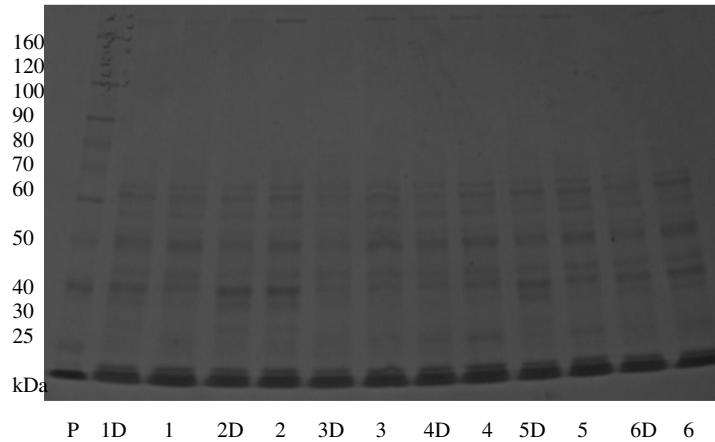


FIGURA10. Padrões eletroforéticos das proteínas resistente ao calor provenientes de sementes deterioradas (D) e não-deterioradas de cultivares de feijão Aporé (1), Carioca (2), Carioca MG (3), IAPAR 57 (4), IAPAR 81 (5) e Pérola (6), obtidos na presença de um padrão protéico (P). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Como já mencionado anteriormente, as cultivares de feijão do grupo Carioca apresentaram padrões de bandas monomórficas e estáveis em sementes de diferentes níveis de qualidade fisiológica. Já Mann (2002) e Roveri José (2003) relataram, além da estabilidade, um alto polimorfismo desses padrões nas cultivares de algodão e milho. Sendo assim, conclui-se que os padrões de proteínas resistentes ao calor não se constituem em marcadores eficientes como descritores em cultivares de feijão com base genética estreita.

Nas revisões bibliográficas realizadas não foram encontradas pesquisas com esse tipo de marcador visando a identificação de cultivares de feijão, o que restringe sobremaneira a discussão dos resultados obtidos.

4.3. Análise da qualidade fisiológica das sementes de algodão

Antes do processo de deterioração controlada, os valores de teores de água das sementes de algodão variaram de 9,08% a 10,69%. Após a deterioração controlada das mesmas, esse valor foi elevado para 20%.

De maneira geral, os valores de germinação das sementes submetidas à deterioração controlada, por 108 horas, foram inferiores aos observados em sementes não deterioradas. Observa-se que a maioria das sementes de diferentes cultivares foi bastante sensível ao tipo de envelhecimento empregado. Para a cultivar MG 110, por exemplo, a germinação foi nula após o envelhecimento das sementes (Tabela 11).

TABELA 11. Porcentagem de germinação de sementes de algodão submetidas e não, à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG. 2005.

Cultivares	Período de deterioração controlada (20% U)	
	Germinação	
	0 horas	108 horas
EPAMIG/Precoce	66a	52 b
MG 110	69a	0 b
MG 304	83a	2 b
MG 316	63a	15 b
MG 3305	23a	17a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de F, a 5 % de probabilidade.

4.3.1. Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de algodão

Para a identificação dos genótipos de algodão foram avaliados os sistemas isoenzimáticos da esterase, superóxido dismutase, diaforase e malato desidrogenase (Figura 11). Dentre esses, apenas as enzimas diaforase e malato desidrogenase apresentaram padrões polimórficos.

A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, desempenhando um papel chave no metabolismo de lipídios, ponto importante no processo deteriorativo de sementes (Vieira, 1996). Neste trabalho foi observado padrão monomórfico para essa enzima (Figura 11). Esses resultados foram diferentes dos encontrados por Vieira (2004), Bonow (2004), Vieira (2000) e Cardoso & Nedel (2002), que separaram diferentes cultivares de soja, arroz, feijão e trigo, respectivamente, utilizando a esterase como marcador isoenzimático. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que outras enzimas podem apresentar atividade para o mesmo substrato da esterase. Além disso, a atividade da esterase varia com o estágio de desenvolvimento da planta, com as condições fisiológicas e com o tecido utilizado (Alfenas et al., 1998). Não foram observadas alterações dos padrões de bandas dessas enzimas em sementes com diferentes valores de germinação. Já Ribeiro (2000), ao estudar a atividade da esterase em cultivares de algodão, observou aumento do número de bandas com o envelhecimento artificial. Provavelmente, esta divergência deve-se às diferentes metodologias utilizadas no processo de envelhecimento das sementes.

Pela enzima diaforase constataram-se dois padrões eletroforéticos diferentes, sendo as cultivares separadas em dois grupos: 1) Epamig/Precoce, MG 110 e MG 3305; 2) MG 304 e MG 316. De acordo com a Figura 11, observa-se ausência da banda 3 nas cultivares MG 304 e MG 316.

Com relação aos padrões isoenzimáticos da superóxido dismutase e diaforase, não foram detectadas alterações nos padrões de bandas dessas

enzimas em sementes com diferentes níveis de qualidade. Vale ressaltar que a estabilidade desse sistema não foi testada em outras pesquisas.

A malato desidrogenase catalisa a reação de malato à oxaloacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de krebs, além de participar do movimento de malato por meio da membrana mitocondrial e fixação do CO₂ nas plantas. Por meio da enzima malato desidrogenase (Figura 11), foram observados dois padrões eletroforéticos diferentes, sendo possível separar as cultivares em dois grupos: 1) MG 110, MG 304, MG 316 e 2) Epamig/Precoce e MG 3305. Pode-se observar que, nas cultivares Epamig/precoce e MG 3305, houve o aparecimento de uma banda 2, que as diferenciou das demais cultivares. Não foi observada variação do padrão de bandas dessa enzima com o envelhecimento das sementes. Já Vieira (1996) observou aumento do número de bandas nos padrões de malato desidrogenase em sementes de algodoeiro não inoculadas com patógenos e desinfestadas e ainda submetidas ao envelhecimento artificial por 120 e 168 horas. O autor abordou que, por tratar-se 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. Provavelmente, essa diferença de resultados pode ser atribuída aos diferentes métodos de envelhecimentos utilizados nessas pesquisas.

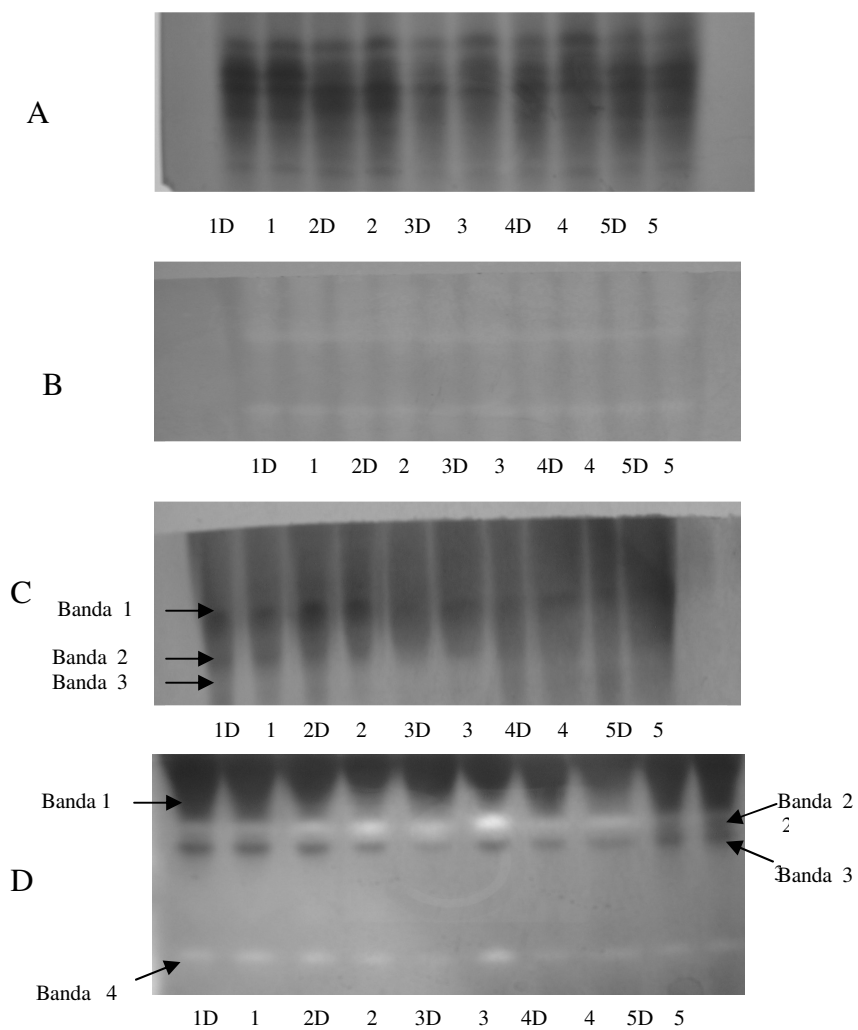


FIGURA11. Padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase (A), superóxido dismutase (B), diaforase (C) e malato desidrogenase (D) de sementes de cultivares de algodão Epamig/Precoce (1), MG 110 (2), MG 304 (3), MG 316 (4) e MG 3305 (5), submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

De acordo com os dados gerados pelos marcadores isoenzimáticos, a similaridade genética média entre as 5 cultivares de algodão foi de 0,91 (Tabela 12). Sendo as cultivares MG 304 e MG 316 (1,000) 100% similares.

TABELA12. Similaridades genéticas entre as cultivares de algodão EPAMIG/Precoce (1), MG 110 (2), MG 304 (3), MG 316 (4) e MG 3305 (5), com base na eletroforese de isoenzimas de sementes deterioradas e não deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	1	2	3	4	5
1	1,000				
2	0,923	1,000			
3	0,846 ²	0,916	1,000		
4	0,846 ²	0,916	1,000 ¹	1,000	
5	1,000	0,923	0,846 ²	0,846 ²	1,000

¹: par de genótipos menos divergentes.

²: par de genótipos mais divergentes.

A partir do dendrograma obtido pelos coeficientes de similaridade genética de Jaccard (Figura 12), as cultivares de algodão foram separadas em três grupos: I) Epamig/Precoce e MG 3305, II) Epamig/Precoce, MG 3305 e MG 110 e III) MG 304 e MG 316.

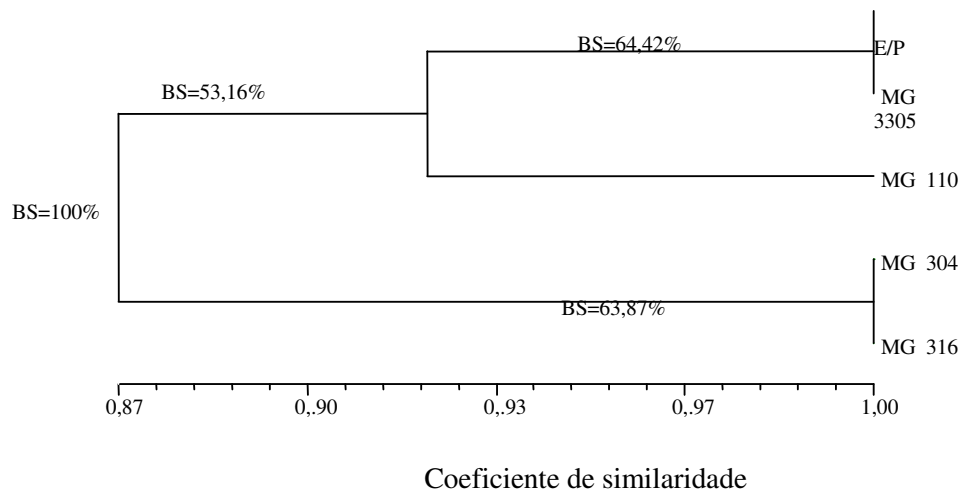


FIGURA12. Dendrograma de cultivares de algodão, utilizando marcadores isoenzimáticos em sementes deterioradas e não deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

A elevada similaridade genética entre as cultivares Epamig/Precoce e MG 3305, provavelmente, se deve à existência da cultivar Epamig na genealogia dessas cultivares.

O agrupamento das cultivares MG 304 e MG 316 provavelmente se deve à seleção dentro da cultivar MG.

O valor da linha de corte foi de 0,84 com $t_{0,1\%}$. Dessa forma, como todos os agrupamentos estão à direita da referida linha, são considerados semelhantes (Figura 12).

Para os valores de bootstrap (BS), os agrupamentos apresentados no dendrograma foram todos acima de 50%, o que comprova a consistência dos resultados obtidos (Figura 12).

De maneira geral, apenas dois (diaforase e malato desidrogenase) dos cinco sistemas enzimáticos analisados apresentaram padrões polimórficos. Provavelmente, deve-se à estreita base genética dos materiais analisados, pois essas cultivares de algodão fazem parte do programa de melhoramento do estado de Minas Gerais.

Vale ressaltar ainda que foi detectada estabilidade dos padrões isoenzimáticos, mesmo em sementes com baixa qualidade fisiológica.

4.3.2. Análise das proteínas resistentes ao calor em algodão

Os padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor para as cultivares Epamig/Precoce, MG 110, MG 304, MG 316 e MG 3305 apresentaram-se monomórficos (Figura 13), independente das sementes apresentarem diferença na qualidade fisiológica. Já Mann (2002) trabalhando com outras variedades de algodão, observou que essas apresentaram variações tanto no número de bandas quanto na intensidade. Nessa pesquisa foi possível separar as cultivares em três grandes grupos: 1) Precoce Alva, Precoce Liça, ITA 96 e Precoce (Epamig-5); 2) Delta Opal, IAC-20, IAC-21, IAC-22 e Redenção e 3) Delta Pine e a ITA-90. O autor observou que, no primeiro grupo, apesar das variedades Precoce Alva e Precoce Liça serem semigaméticos e similares, foi possível diferenciá-las por meio desse marcador. No segundo grupo, só não foi possível detectar diferenças entre as variedades Delta Opal e a IAC 22 e entre as variedades Redenção e IAC 21, apesar de a Delta Opal ter como principal característica agrônômica a fibra longa e a IAC 22 e 21, a precocidade, e todas apresentam resistência múltiplas a doenças. Já no terceiro grupo, Delta Pine e

ITA 90, ambas resistentes à ramulose, se apresentaram completamente diferentes das demais em relação ao caráter proteínas resistentes ao calor.

Apesar das extrações e revelações dessa proteína terem sido repetidas por algumas vezes, não foi observado polimorfismo dos padrões dessa entre as diferentes cultivares trabalhadas. Provavelmente, a base genética dessas cultivares é bastante estreita e ou não houve condições de estresse durante o desenvolvimento da semente, impedindo as manifestações de alguns alelos que codificam para as proteínas resistente ao calor, impedindo a separação das cultivares de algodão por meio desse marcador.

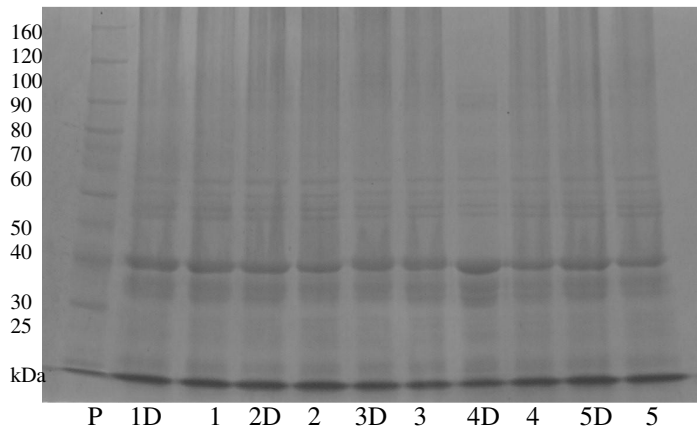


FIGURA13. Padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor provenientes de sementes deterioradas (D) e não-deterioradas de cultivares de algodão EPAMIG/Precoce (1), MG 110 (2), MG 304 (3), MG 316 (4) e MG 3305 (5), obtidos na presença de um padrão protéico (P). UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.4. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de soja

Para as sementes das cultivares de soja, os valores iniciais de teores de água variaram de 10,90% a 12,54%. Depois da deterioração das mesmas, esse valor foi elevado para 20%.

Com relação à germinação, foram observados menores valores em sementes submetidas a 96 horas de deterioração, quando comparadas as sementes não deterioradas (Tabela 13).

TABELA13. Porcentagem de germinação das cultivares de soja submetidas e não, à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG. 2005.

Cultivares	Período de deterioração controlada (20% U)	
	Germinação	
	0 horas	96 horas
Conquista	77a	0 b
Monarca	74a	2 b
Liderança	91a	29 b
Confiança	95a	7 b
Splendor	94a	59 b
UFV-16	97a	64 b
Garantia	61a	22 b
FT-2000	95a	15 b
IAC-21	86a	12 b
Vencedora	95a	38 b
BRS 133	87a	43 b
BRS 154	46a	0 b
BRS 216	95a	15 b
CD 201	78a	0 b
CD 208	91a	11 b
IAC15-2	93 a	19 b
M-SOY 6101	82a	4 b
M-SOY 8001	81a	0 b
M-SOY 8411	94a	0 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Este resultado permitiu concluir que, com a metodologia utilizada para a deterioração das sementes, foi possível a obtenção de lotes com diferentes níveis de qualidade.

4.4.1. Análise dos marcadores bioquímicos de enzimas de soja

Podem-se observar, nas Figuras 14, 15 e 16, os padrões de bandas para as enzimas diaforase, esterase e superóxido dismutase nas cultivares de soja estudadas.

Para a enzima diaforase (Figura 14), foram observados padrões de bandas monomórficos para as cultivares Conquista, Monarca, Liderança, Confiança, Splendor, UFV-16, Garantia, FT-2000, BRIAC-21, Vencedora, BRS 133, BRS 154, BRS 216, CD 201, CD 208, IAC 15-2, M-SOY 6001, M-SOY 8001 e M-SOY 8411. Já Vieira (2004), por meio desse mesmo sistema enzimático, obteve três padrões eletroforéticos diferentes, o que possibilitou a separação das cultivares Conquista, Liderança, Confiança, Splendor, UFV-16, Monarca e Vencedora; BRIAC 21; Garantia e FT 2000. Com relação à estabilidade dos padrões, houve alteração dos mesmos para a cultivar Liderança quando as sementes apresentavam-se com menores valores de germinação.

Para a enzima esterase foram observados quatro padrões eletroforéticos diferentes, permitindo a separação das cultivares em quatro grupos: 1) Monarca, Liderança, Confiança, Splendor, UFV-16, Garantia, FT-2000, BRIAC-21, Vencedora, BRS-133 e BRS-216; 2) CD-201, CD-208, IAC 15-2, M-SOY 6101, M-SOY 8001 e M-SOY 8411; 3) Conquista e 4) BRS-154. Para as duas últimas cultivares, os padrões eletroforéticos foram específicos. Este sistema foi considerado como um dos mais polimórficos em outros estudos de identificação de cultivares, em diferentes espécies (Bonow; 2001; Cardoso & Nedel, 2002; Vieira, 2000). Para a cultivar M-SOY 8411, padrões distintos foram observados

em sementes deterioradas e não deterioradas. Como a estabilidade é um dos requisitos importantes para um descritor, deve-se ter o cuidado ao adotar essa isoenzima para a identificação de cultivares. Silva (1997) e Vieira (1996) observaram alterações dos padrões eletroforéticos dessa enzima ao avaliarem a associação de microrganismos em sementes e períodos de envelhecimento.

Para a enzima superóxido dismutase (Figura 16), foram observados dois padrões eletroforéticos diferentes, tendo sido verificado um padrão eletroforético específico na cultivar Conquista. Já Vieira (2004) observou oito padrões eletroforéticos diferentes, sendo as cultivares separadas em oito grupos: 1) Conquista e Liderança; 2) BRIAC 21; 3) Confiança; 4) Splendor; 5) UFV 16 e Garantia; 6) FT 2000; 7) Monarca e 8) Vencedora. Provavelmente, essas diferenças nos resultados atribuem-se ao fato de os padrões dessas enzimas terem sido obtidos de epicótilos com 5 dias, enquanto Vieira (2004) observou os padrões de bandas a partir de sementes secas. Sabe-se que a atividade dessas enzimas pode variar com o estágio de desenvolvimento das plantas, o que restringe sua utilização como descritor para a identificação de cultivares. De acordo com Alfenas et al. (1998), certas enzimas podem ser controladas por diferentes locos nos vários estádios de desenvolvimento e tecidos, o que deve ser levado em consideração ao se utilizar enzimas como marcadores.

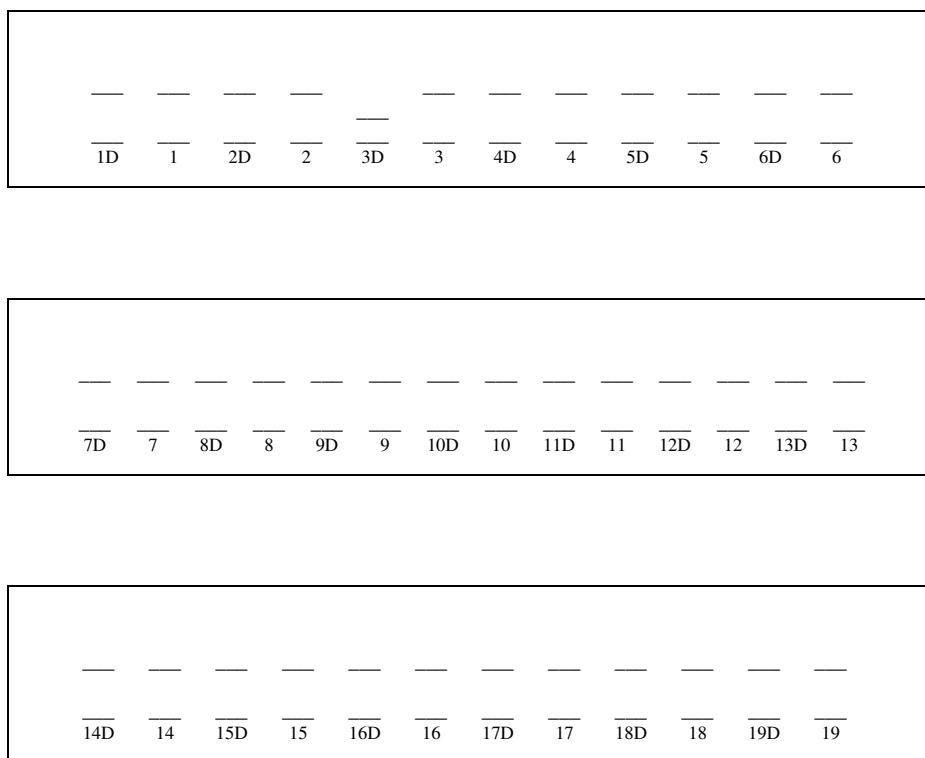


FIGURA14. Padrões eletroforéticos das isoenzimas diaforase, extraídos de epicótilos de soja das cultivares Conquista (1), Monarca (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV-16 (6), Garantia (7), FT-2000 (8), BRIAC-21 (9), Vencedora (10), BRS133 (11), BRS 154 (12), BRS 216 (13), CD 201 (14), CD 208 (15), IAC 15-2 (16), M-SOY 6101 (17), M-SOY 8001 (18), M-SOY 8411 (19), submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

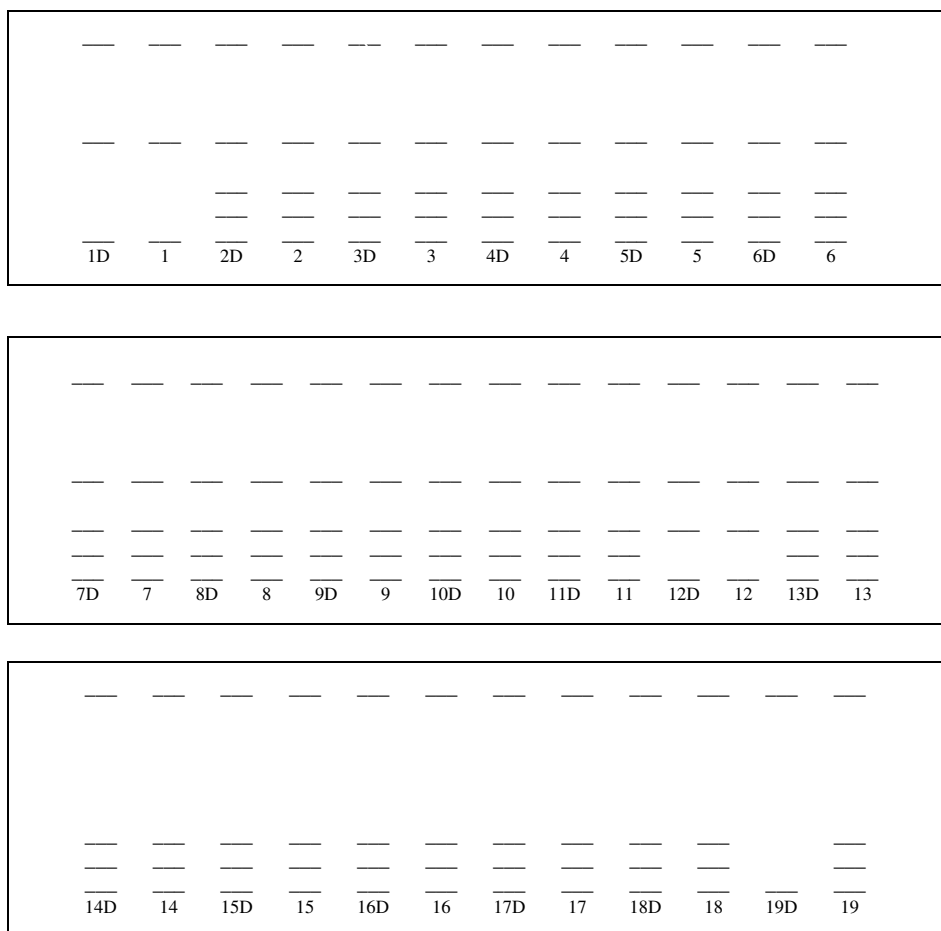


FIGURA15. Padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase, extraídos de epicótilos de soja das cultivares Conquista (1), Monarca (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV-16 (6), Garantia (7), FT-2000 (8), BRIAC-21 (9), Vencedora (10), BRS133 (11), BRS 154 (12), BRS 216 (13), CD 201 (14), CD 208 (15), IAC 15-2 (16), M-SOY 6101 (17), M-SOY 8001 (18), M-SOY 8411 (19), submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.



FIGURA16. Padrões eletroforéticos das isoenzimas superóxido dismutase, extraídos de epicótilos de soja das cultivares Conquista (1), Monarca (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV-16 (6), Garantia (7), FT-2000 (8), BRIAC-21 (9), Vencedora (10), BRS133 (11), BRS 154 (12), BRS 216 (13), CD 201 (14), CD 208 (15), IAC 15-2 (16), M-SOY 6101 (17), M-SOY 8001 (18), M-SOY 8411 (19), submetidas (D) ou não à deterioração controlada. UFLA, Lavras, MG, 2005.

A similaridade genética média observada entre as cultivares de soja, considerando os sistemas enzimáticos superóxido dismutase, diaforase e esterase, foi de 0,91 para as sementes deterioradas (Tabela 14).

TABELA14.Similaridades genéticas entre cultivares de soja,com base na eletroforese de isoenzimas de sementes deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	Conquista	Monarca	Liderança	Cofiança	Splendor	UFV16	Garantia	FT 2000	IAC 21	Vencedora
Conquista	1,000									
Monarca	0,785	1,000								
Liderança	0,666	0,866	1,000							
Confiança	0,785	1,000	0,866	1,000						
Splendor	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000					
UFV 16	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000				
Garantia	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000			
FT 2000	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
IAC 21	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
Vencedora	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
BRS 133	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
BRS 154	0,846	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
BRS 216	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CD 201	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
CD 208	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
IAC 15-2	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
M-SOY 6101	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
M-SOY 8001	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
M-SOY 8411	0,833	0,785	0,666	0,785	0,785	0,785	0,785	0,785	0,785	0,785

Continua...

Continuação da Tabela 14.

Cultivar	BRS 133	BRS 154	BRS 216	CD 201	CD 208	IAC 15-2	M-SOY 6101	M-SOY 8001	M-SOY 8411
BRS 133	1,000								
BRS 154	0,928	1,000							
BRS 216	1,000	0,928	1,000						
CD 201	0,928	0,857	0,928	1,000					
CD 208	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000				
IAC 15-2	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000	1,000			
M-SOY 6101	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000	1,000	1,000		
M-SOY 8001	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
M-SOY 8411	0,785	0,846	0,785	0,846	0,846	0,846	0,846	0,846	1,000

Pela similaridade genética, representada no dendrograma (Figura 17) obtido pelo método UPGMA, as cultivares de soja provenientes de sementes deterioradas foram separadas em 5 grupos: 1) Conquista e M-SOY 8411; 2) Monarca, Confiança, Splendor, UFV-16, Garantia, FT-2000, BRIAC-21, Vencedora, BRS 133 e BRS 216; 3) BRS 154; 4) CD 201, CD 208, IAC 15-2, M-SOY 6101, M-SOY 8001 e 5) Liderança. A similaridade genética entre as cultivares do grupo 2 e 4 pode ser confirmada pela linha de corte, que é de 0,92 com $t_{0,1\%}$, segundo a qual os agrupamento à direita da referida linha são considerados semelhantes.

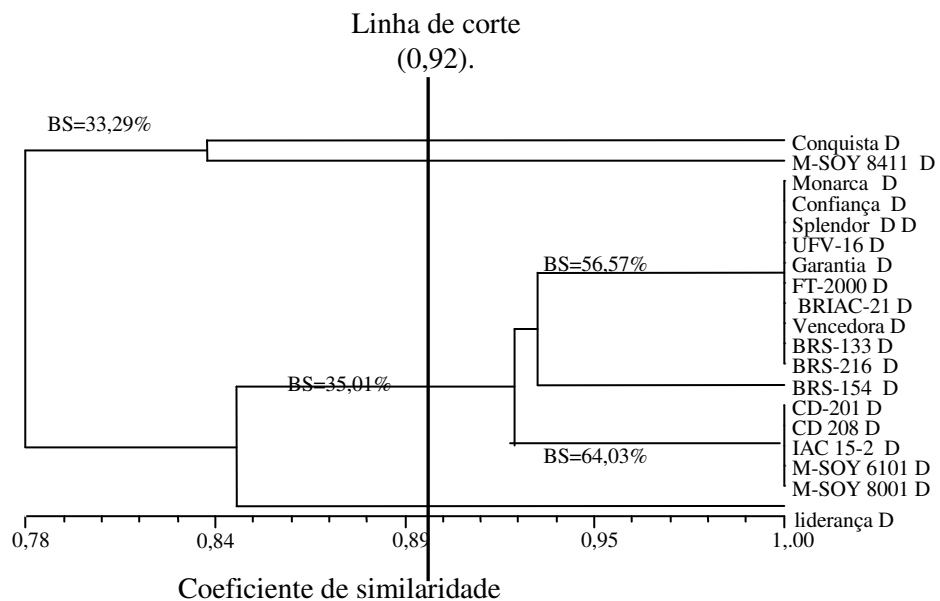


FIGURA17.Dendrograma de cultivares de soja, utilizando marcadores isoenzimáticos em sementes deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

A alta similaridade das cultivares do grupo 2, provavelmente, deve-se à presença de progenitores em comum, como a presença da cultivar Paraná nas cultivares Confiança e Vencedora, presença da FT Cristalina nas cultivares BRIAC 21 e Garantia, IAC 8 nas cultivares BRIAC 21 e UFV 16 e Braxton nas cultivares Garantia e Vencedora.

O grupo 3 possui 100% de similaridade genética. Cultivares desse grupo possuem ancestrais comuns, como a cultivar Willians 20 na genealogia das cultivares CD 201 e CD 208. Provavelmente, as cultivares M-SOY 6101 e M-SOY 8001 também possuem progenitores em comum.

A similaridade dos grupos 2 e 4 pode ser confirmado pelos valores de bootstrap de (BS=56,57%) e (BS=64,03%).

A similaridade genética média, considerando os sistemas enzimáticos avaliados para as sementes não deterioradas de soja foi de 0,92 (Tabela 15).

TABELA15.Similaridades genéticas entre cultivares de soja, com base na eletroforese de isoenzimas de sementes não deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

75

Cultivar	Conquista	Monarca	Liderança	Cofiança	Splendor	UFV16	Garantia	FT 2000	IAC 21	Vencedora
Conquista	1,000									
Monarca	0,785	1,000								
Liderança	0,666	0,866	1,000							
Confiança	0,785	1,000	0,866	1,000						
Splendor	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000					
UFV 16	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000				
Garantia	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000			
FT 2000	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
IAC 21	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
Vencedora	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
BRS 133	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
BRS 154	0,846	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
BRS 216	0,785	1,000	0,866	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CD 201	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
CD 208	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
IAC 15-2	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
M-SOY 6101	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
M-SOY 8001	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
M-SOY 8411	0,714	0,928	0,800	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928

Continua...

Continuação Tabela 15.

Cultivar	BRS 133	BRS 154	BRS 216	CD 201	CD 208	IAC 15-2	M-SOY 6101	M-SOY 8001	M-SOY 8411
BRS 133	1,000								
BRS 154	0,928	1,000							
BRS 216	1,000	0,928	1,000						
CD 201	0,928	0,857	0,928	1,000					
CD 208	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000				
IAC 15-2	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000	1,000			
M-SOY 6101	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000	1,000	1,000		
M-SOY 8001	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
M-SOY 8411	0,928	0,857	0,928	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

De acordo com o dendrograma obtido a partir dos coeficientes de similaridade de Jaccard (Figura 18), as cultivares de soja provenientes de sementes não deterioradas foram separadas em 5 grupos: 1) Conquista; 2) Monarca, Confiança, Splendor, UFV 16, Garantia, FT 2000, BRIAC 21, Vencedora, BRS 133, BRS 216; 3) BRS 154; 4) CD 201, CD 208, IAC 15-2, M-SOY 6101, M-SOY 8001, M-SOY 8411 e 5) Liderança.

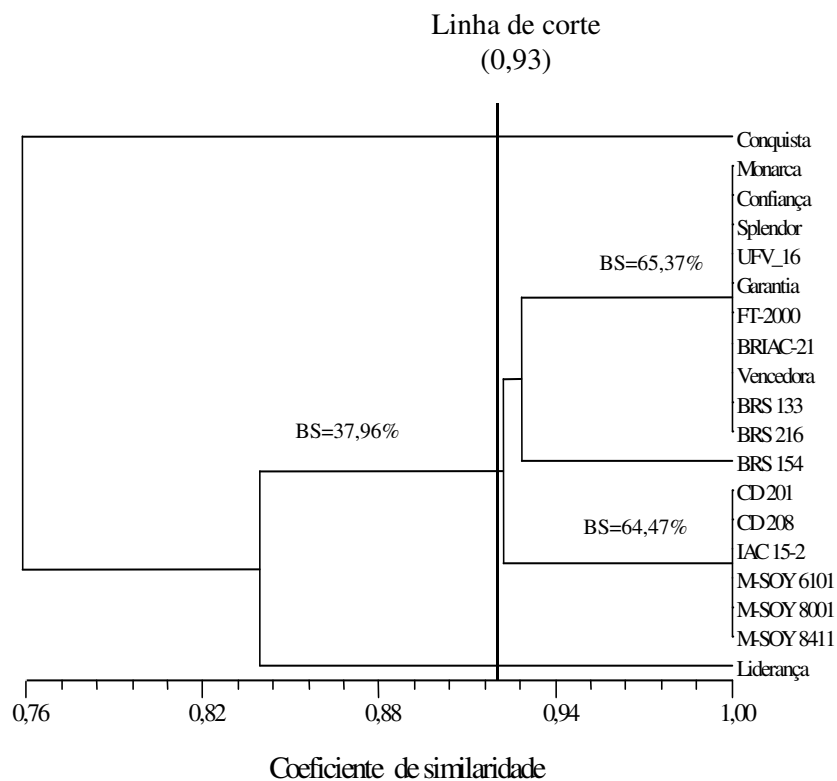


FIGURA18.Dendrograma de cultivares de soja, utilizando marcadores isoenzimáticos em sementes não deterioradas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

O valor da linha de corte é de 0,93 com $t_{0,1\%}$, segundo a qual todos os agrupamentos à direita (grupos 2 e 4) possuem uma alta similaridade genética entre si.

Ao comparar o dendrograma obtido de sementes deterioradas (Figura 13) com o das sementes não deterioradas (Figura 14), observa-se que houve uma diferença no agrupamento das cultivares, pois a cultivar M-SOY 8411 passou a pertencer ao grupo 4. Esta diferença de resultados se deve à falta de estabilidade nos padrão de bandas de sementes submetidos à deterioração.

De maneira geral, observou-se que a base genética do germoplasma brasileiro de soja é estreita e os sistemas enzimáticos esterase, superóxido dismutase e diaforase não foram eficientes para a separação das cultivares. Apenas a cultivar Conquista foi diferenciada das demais pelos sistemas enzimáticos superóxido dismutase e diaforase e a BRS 154, pela esterase.

4.4.2. Análise das proteínas resistentes ao calor em soja

Não foi observado polimorfismo nos padrões de proteínas resistentes ao calor para as cultivares de soja estudadas (Figuras 19 e 20), independente do nível de deterioração das sementes. Já Vieira 2004 observou uma banda polimórfica na faixa correspondente ao peso molecular de 30 kDa, a qual estava presente somente nas cultivares Conquista, Confiança, Splendor, FT 2000 e Monarca. Os padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor para cultivares de soja mantiveram-se estáveis quando foram comparadas as sementes deterioradas com as não deterioradas.

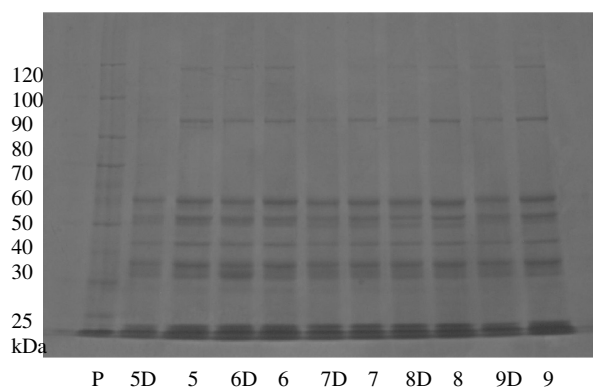
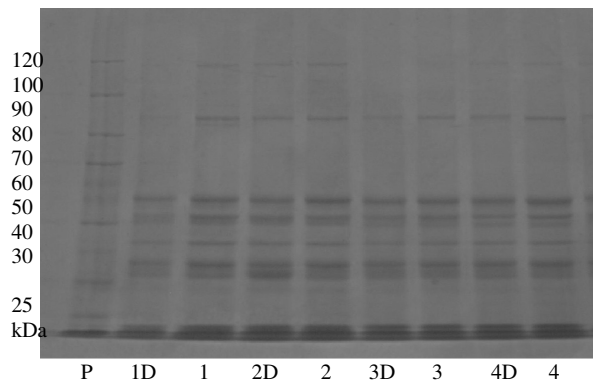


FIGURA19. Padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor provenientes de sementes deterioradas (D) e não deterioradas das cultivares de soja Conquista (1), Monarca (2), Liderança (3), Confiança (4), Splendor (5), UFV-16 (6), Garantia (7), FT 2000 (8), BRIAC 21 (9), obtidos na presença de um padrão protéico (P). UFLA, Lavras, MG, 2005.

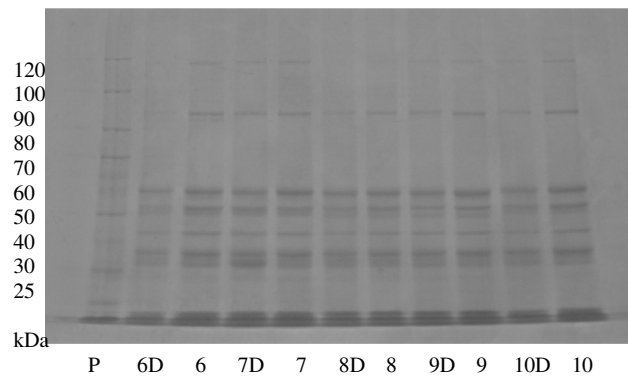
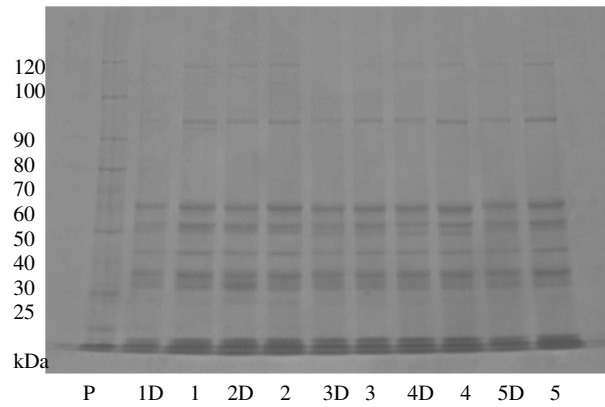


FIGURA20. Padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor provenientes de sementes deterioradas (D) e não deterioradas das cultivares de soja Vencedora (1), BRS133 (2), BRS 154 (3), BRS 216 (4), CD 201 (5), CD 208 (6), IAC 15-2 (7), M-SOY 6101 (8), M-SOY 8001 (9) e M-SOY 8411 (10), obtidos na presença de um padrão protéico (P). UFLA, Lavras, MG, 2005.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

De maneira geral, dentre os sistemas enzimáticos avaliados em cultivares de milho visando à identificação de cultivares e à certificação da pureza genética de lotes de sementes, foram observados polimorfismo e estabilidade para os sistemas álcool desidrogenase, catalase, esterase e superóxido dismutase, tanto em sementes de linhagens como nas híbridas com diferentes qualidades fisiológicas.

Já para as cultivares de feijão estudadas, a maioria dos sistemas testados foi monomórfico, o que torna esses marcadores pouco promissores para serem utilizados como descritores para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Foram observados padrões polimórficos apenas para o sistema peroxidase e, mesmo assim, esse se mostrou instável em sementes deterioradas. Em algodão foi possível separar cultivares por meio da diaforase e malato desidrogenase, que se apresentaram estáveis quanto à qualidade fisiológica das sementes.

Para as cultivares de soja foram observados padrões polimórficos apenas para as enzimas superóxido dismutase e esterase, tendo esse último também se apresentado instável.

Com relação às proteínas resistentes ao calor, foi possível a diferenciação das linhagens e híbridos de milho, cujos padrões permaneceram estáveis, mesmo em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Já para as cultivares de feijão, soja e algodão foram observados padrões monomórficos, resultado que, provavelmente, deve-se ao fato dessas cultivares possuírem uma base genética estreita.

Foram verificados ainda, para as mesmas cultivares de soja, padrões de proteínas resistentes ao calor diferentes dos observados por outros autores. Sabe-se, por meio de outras pesquisas, que a expressão de alguns alelos que

codificam para essas proteínas acontece sob condições de estresse durante o desenvolvimento das sementes, o que pode causar o tipo de variação observada nessa pesquisa.

6.CONCLUSÕES

Padrões isoenzimáticos de álcool desidrogenase, catalase, esterase, malato desidrogenase e superóxido dismutase apresentam-se polimórficos e estáveis em sementes de cultivares de milho com diferentes níveis de qualidade.

Pela enzima peroxidase é possível diferenciar a cultivar de feijão Carioca das demais. No entanto, este padrão mostra-se instável em sementes com baixa qualidade fisiológica.

Dentre as cultivares de soja, a Conquista pode ser diferenciada das demais pelos sistemas enzimáticos superóxido dismutase e diaforase e a BRS-154 pela esterase, em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. Para a cultivar Liderança, observa-se alteração dos padrões eletroforéticos da enzima diaforase em sementes deterioradas.

É possível a identificação de cultivares de algodão por meio das isoenzimas diaforase e malato desidrogenase, independentemente da qualidade fisiológica das sementes. No entanto, os sistemas esterase e superóxido dismutase apresentam-se monomórficos para as mesmas cultivares de algodão estudadas.

Proteínas resistentes ao calor são eficientes na separação de cultivares de milho.

Padrões de proteínas resistentes ao calor utilizadas na separação de cultivares de milho são estáveis, mesmo em sementes com diferentes níveis de qualidade.

Padrões de proteínas resistentes ao calor em cultivares de soja, feijão e algodão se apresentam monomórficas, independente do nível de deterioração das sementes.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, D. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetics diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA technique and comparative analysis with pedigree data. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 265-273, Sept. 1995.

AGUERO, C. O. P. **Padrões eletroforéticos de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2002. 36 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1991. 371 p.

BILGEN, G.; DOMIR, I.; MARQUARD, R. Study on the identification of genetic constitution by means of isoenzyme electrophoresis in maize. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 19, n. 2, p. 95-102, 1995. CD-ROM. CAB Abstracts 1996-7/98.

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GEE, H.; CÔME, D. Water content raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 2, p. 463-472, June 1999.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.

BLOOG, D.; IMRIE, B. C. Starch gel eletrophoresis for soybean cultivar identification. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v. 10, n. 1, p. 19-24, 1982.

BONOW, S. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz**. 2004. 125 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BONOW, S. **Caracterização e Análise de Pureza Varietal em Genótipos de Oryza sativa L. através de isoenzimas**. 1999. 44 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BONOW, S.; AUGUSTIN, E.; FRANCO, D. F.; PETERS, J. A.; TERRES, A. L. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, Brasília, v. 36, n. 2, p. 291-300, fev. 2001.

BRANDÃO JUNIOR, D. E. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRANDÃO JUNIOR, D. E. **Marcadores de Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro**. 2000. 144 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília n. 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudanças. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

CARDOSO, E. T.; NEDEL, J. L. Padrões eletroforéticos de cultivares de trigo indicadas para a região sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 203-209, mar./abr. 2002.

COCA, M.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, n. 3, p. 479-492, June 1994.

COELHO, A. S. G. **BOOT - Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distância/similaridade genéticas através do procedimento de bootstrap, versão 3.0**. Goiânia, GO: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2001.

COOKE, F. J. The standardization of electrophoresis methods for variety identification. In: ISTA SYMPOSIUM, 1998, Leningrad. **Proceeding...** Leningrad, 1998. p. 14-27.

COOKE, R. J. The characterization and identification of crop cultivars by eletrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 5, n. 2, p. 59-72, 1984.

DEROCHER, A. E.; VIERLING, E. Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 93-102, Jan. 1994.

FARIA, R. V. A. M. **Maturação de sementes de milho: aspectos físicos, bioquímicos e fisiológicos**. 2003. 129 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45.; 2000, São Carlos. **Programas e resumos....**São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.

GALAU, G. A.; JAKOBSEN, K. S.; HUGHES, D. W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 81, n. 2, p. 280-288, Feb. 1991

GOMES, M. de S.; VON PINHO, É. V. R.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, M. G. G. C. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho, **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p 7-17, 2000.

GRATAPAGLIA, D.; FERRERA, M. E. Proteção de cultivares por análise de DNA. **Anuário ABRASEM**, Brasília, p. 44-50, 1996.

GUIMARÃS, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.)**. 2000. 180 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HAGIWARA, W. E.; SANTOS, J. B.; CARMO, S. L. M. Use of RAPS to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1,n. 4, p. 355-362, Oct./Dec. 2001.

HENDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos na identificação de nove linhagens de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 281-286, fev. 1982.

HISIEH, M. H.; CHEN, J. T.; JINN, T. L.; CHEN, Y. M.; LIN, C. Y. A class of soybean low molecular weight heat shock proteins, immunological study and quantification. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1279-84, Aug. 1992.

IMOLESI, A. S.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, M. G. G. C.; CORRÊA, R. S. B. Efeito da adubação nitrogenada em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 17-24, 2001.

IMOLESI, A. S. **Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho**. 1999. 57 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 377-403, 1996.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 44 p.

INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS –UPOV. **Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (Glycine max (L.) Merrill)** Genebra, 1998. 12 p.

KERMODE, A. R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 75-95, June 1997.

KIANG, Y. T.; GORMAN, M. B. Soybean. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**, Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 295-328.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.

KONAREV, V. G. Proteins in cultivar identification. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, ISTA, 3., 1987, Leningrad. **Proceedings...** Leningrad: ISTA, 1988. p. 9-14.

MANN, R. S. **Diversidade do complexo colletotrichum e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares.** 2002. 146 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MANSFIELD, M. A.; KEY, J. L. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 4, p. 1007-1017, Aug. 1987.

MARCON, G. **Eletroforese no estudo genético das plantas:** revisão. Piracicaba: ESALQ, 1986. 45 p.

MARCOS FILHO, F.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade de sementes.** Piracicaba: FEALQ, 1987. 230 p

MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes; tissue; antogenetic, and species specific patters. **Proceeding of the National Academy Sciencies United States of America**, Washington, v. 45, n. 5, p. 453-463, 1959.

MOONS, A.; BAUW,G.;PRINSEN, E.; VAN MONTAGU, M.; VAN DER STRAETEN, D. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant indica rice varieties. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 1, p. 177-186, Jan. 1995

MOSS, D. W. **Isoenzymes.** London: Capman & Hall, 1982.

MURPHY, R. W.; SITES, J. W. JR.; BUTH, D. G. et al. Proteins I: isozyme electroforesis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. **Molecular systematics.** Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

PADILHA, L. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho sob diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, 2002

PEIRCE, L. C.; BREWBAKER, J. L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **HortScience**, Alexandria, v. 8, n. 1, p. 17-22, Feb. 1973.
PERROTA, C.; TREGLIA, A. S.; MITA, G.; GIANGRANDE, E.; RAMPINA, P.; RONGA, G.; SPANO, G.; MARMIROLI, N. Analysis of mRNAs from

ripening wheat seeds: the effect of high temperature. **Journal of Cereal Science**, London, v. 27, n. 2, p. 127-132, Mar. 1998.

PINTO, L. R.; SADER, B.; LEMOS, V. G. M. Identificação bioquímica de cultivares de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill) através da eletroforese em gel de poliacrilamida. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 96-100, 1995.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; ARANATES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 185-193, June 2002.

RIBEIRO, U. P. **Condicionamento fisiológico de sementes de algodão: efeitos sobre a germinação, vigor, atividade enzimática e armazenabilidade**. 2000. 79 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2. 11. New York, 1992. 470 p.

ROSSETTO, C. A. V.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre os métodos de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 123-131, jan./jun. 1995.

ROVERI JOSÉ, S. C. B.; VON PINHO, E. V. R.; SALGADO, K. C.; VON PINHO, R. G. Identificação de cultivares de milho por meio de proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2004.

ROVERI JOSÉ, S. C. B. **Tolerância a alta temperatura de secagem de sementes de milho**. 2003. 149 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SALGADO, K. C. de C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SATTERS, J. R.; ABDEL-GHANY, A.; ELBAGOURY, O. et al. Soybean seed deterioration and response to priming; changes in specific enzyme activities in

extracts from dry and germinating seed. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 33-41, Mar, 1994.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; MIZOGUCHI, T.; URAO, T.; KATAGIRI, T.; NAKASHIMA, K.; ABE, H.; ICHIMURA, K.; LIU, Q.; NANJYO, T.; UNO, Y.; IUCHI, S.; SEKI, M.; ITO, T.; HIRAYAMA, T.; MIKAMI, K. Molecular responses to water stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 111, n. 1102, p. 345- 351, June 1998.

SILVA, E. A. A. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleótilos de milho em associação com microorganismos**. 1997. 88 p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; RUMJANEK, N. G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 33-41, 2003.

SMITH, J. S. C.; REGISTER III, J. C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 285-293, June 1998.

SUN, W.; MOTANGU, M. V.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimica Biophysica Acta**, Paris, v. 1577, n. 1, p. 1-9, 2002.

THOMANN, E. B.; SOLLINGER, J.; WHITE, C.; RIVIN, C. J. Accumulation of group 3 embryogenesis abundant preteins in *Zea mays* embryos. Roles of abscisic acid and the viviparous-1 gene product. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 2, p. 607-614, June 1992

TORGGLER, M. G.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p. (Monografias,1)

TREGLIA, A.; SPANO, G.; RAMPINO, P.; GIANGRANDE, E.; NOCCO, G.; MITA, G.; DI FONZO, N.; PERROTA, C. Identification by *in vitro* translation and northern blot analysis of heat shock mRNAs isolated from wheat seeds exposed to different temperatures during ripening. **Journal of Cereal Science**, London, v. 30, n. 1, p. 33-38, July 1999.

VANTOAI, T. T.; FAUSEY, N. R.; McDONALD JR, M. B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, Dodrecht, v. 102, n. 1, p. 33-39, 1987.

VIEIRA, E. S. N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. 2000. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG.

VIEIRA, M. G. G. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium Hirsutum* L.)**. 1996. 114 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

VIERLING, E. The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. **ACTA Physiologiae Plantarum**, Krakou, v. 19, n. 4, p. 539-547, 1997.

VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 579-620, 1991.

VON-PINHO, E. V. R. **Conseqüências da autofecundação indesejável na produção de sementes híbridas de milho**. 1995. 130 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

WALTERS, C.; RIED, J. L.; SIMMONS, M. K. W. Heat-soluble proteins extractes from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 125-134, June 1997.

WALTERS, E. R.; LEE, G. J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, Combridge, v. 47, n. 296, p. 325-338, Mar. 1996.

WEHMEYER, N.; HERNANDEZ, L. D.; FINKELSTEIN, R. R.; VIERLING, E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 747-757, Oct. 1996.

WHITE, C. N.; PROEBSTING, W. M.; HEDDEN, P.; RIVIN, C. J. Gibberellins and seed development in maize. I . Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. **Plant Physiology**, Rockville, v. 1222, n. 4, p. 1081-1088, Apr. 2000

XU, D.; DUAN, X.; WANG, B.; HONG, B.; HO, T-H. D.; WU, R. . Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 1, p. 249-257, Jan. 1996.

ZUR NIEDEN ,V.; NEUMANN, D.; BUCKA, A.; NOVER, L. Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. **Planta**, Berlin, n. 3, p. 530-538, June 1995.