

DELACYR DA SILVA BRANDÃO JUNIOR

ELETROFORESE DE PROTEÍNA E ISOENZIMA NA AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO

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

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho



LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996

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

Brandão Junior, Delacyr da Silva

Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho / Delacyr da Silva Brandão Junior. -- Lavras : UFLA, 1996.
110 p. : il.

Orientador: Maria Laene Moreira de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) - UFLA;
Bibliografia.

1. Milho - Semente. 2. Eletroforese. 3. Deterioração. 4. Isoenzima. 5. Proteína. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1521

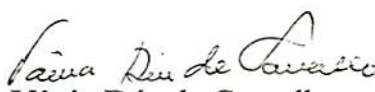
DELACYR DA SILVA BRANDÃO JUNIOR

**ELETROFORESE DE PROTEÍNA E ISOENZIMA NA AVALIAÇÃO DA
QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO**

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

APROVADA em 28 de Agosto de 1996


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


Prof^a. Dr^a. Vânia Déa de Carvalho


Prof^a. Dr^a. Maria Laene Moreira de Carvalho
Orientadora

À Deus;

" àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo
quanto pedimos, ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós,
a Ele seja a glória, na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações,
para todo o sempre. Amém". (Efésios 3: 20-21)

Aos meus pais (Delacyr e Célia Brandão),

irmãs, avó, cunhados e sobrinhos
pelo amor, carinho, apoio e amizade,

OFEREÇO.

À minha noiva Adriana,
pelo amor, ajuda e incentivo e
ao seus pais, pela grande amizade,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras - UFLA;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos;

À Professora Maria Laene Moreira de Carvalho, pela excelente orientação, apoio, sugestões e amizade;

Aos Professores Maria das Graças G.C. Viera e José da Cruz Machado, pelo apoio incentivo, amizade e colaboração;

Aos professores Vânia Déa de Carvalho, Dulcinéia de Carvalho e Daniel Furtado Ferreira, pelas sugestões durante a codução desse estudo;

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Sementes (DAG-UFLA), Andréia, Ana Lúcia, Beth, Elsa e Jairo e do Laboratório de Patologia de Sementes (DFS-UFLA), Cleusa e Míriam, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho;

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA, pelo apoio e colaboração;

Aos amigos do curso de Pós-graduação, pelo incentivo e amizade;

Aos estudantes Kalinca, Marcelo e Benito, pela ajuda e amizade;

Aos irmãos da II-Igreja Presbiteriana de Lavras e da Comunidade Evangélica Sara Nossa Terra, pelas orações e convivência;

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS (APÊNDICE).....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Deterioração de Sementes.....	3
2.2 Eletroforese de Proteína e Isoenzima.....	9
2.3 Detecção de Alterações Protéicas e Isoenzimáticas Durante o Processo de Deterioração de Sementes.....	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
4 CAPÍTULO I Variações Eletroforéticas de Proteínas e Isoenzimas Relativas a Deterioração de Sementes de Milho Envelhecidas Artificialmente.....	26
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
4.1 INTRODUÇÃO.....	27
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.2.1 Qualidade das Sementes.....	29
4.2.1.1 Qualidade física das sementes.....	29
4.2.1.2 Qualidade sanitária das sementes.....	30
4.2.1.3 Qualidade fisiológica das sementes.....	31
4.2.1.3.1 Análise eletroforética.....	33
4.2.2 Procedimento Estatístico.....	35

	Página
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.3.1 Análises Eletroforéticas.....	45
4.4 CONCLUSÕES.....	61
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
5 CAPÍTULO II Viabilidade do Uso da Eletroforese na Avaliação Fisiológica e Sanitária de Sementes de Milho Envelhecidas Artificialmente.....	68
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvi
5.1 INTRODUÇÃO.....	69
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
5.2.1 Procedimento Estatístico.....	71
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.4 CONCLUSÕES.....	97
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
APÊNDICE.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Valores médios obtidos da avaliação de diferentes testes da qualidade fisiológica de sementes de milho de duas cultivares, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	37
2	Valores médios obtidos na avaliação da qualidade física e sanitária de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento artificial . UFLA, Lavras - MG, 1996.....	40
3	Efeito dos diferentes tempos de envelhecimento artificial, sobre a qualidade fisiológica de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	40
4	Intervalo de confiança de 95% para valor predito dentro de cada teste de qualidade fisiológica nos diferentes tempos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	41

Tabela

Página

5	Resumo da análise de variância dos dados obtidos da quantificação de proteínas extraídas pelos três métodos (Tris, Sobrenadante e "Pellet") das sementes das cultivares AG-122 e C-901, submetidas aos diferentes tempos de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	47
6	Efeito dos diferentes tratamentos fitossanitários na condutividade elétrica de sementes de milho da cultivar C - 901. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito do tempo de envelhecimento sobre a germinação de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 detectada pelo teste de primeira contagem. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	42
2	Efeito do envelhecimento artificial sobre a viabilidade de sementes de milho detectada pelos testes padrão de germinação (TPG), tetrazólio potencial de germinação (TZ - PG) e emergência em canteiro (Emergência). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	42
3	Efeito do tempo de envelhecimento sobre o vigor de sementes de milho avaliadas através dos testes de tetrazólio vigor (TZ - Vigor) teste de frio (T.F.) e envelhecimento acelerado (E.A.). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	43
4	Efeito do tempo de envelhecimento sobre o índice de velocidade de emergência de sementes de milho. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	43

Figura		Página
5	Efeito dos diferentes tempos de envelhecimento artificial sobre a condutividade elétrica de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	44
6	Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	44
7	Padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Penicillium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	54
8	Padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Penicillium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	54

Figura		Página
9	Padrões eletroforéticos de proteínas totais de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Penicillium</i> spp (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	55
10	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Penicillium</i> spp (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, revelados para álcool desidrogenase (ADH). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	56
11	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Penicillium</i> spp (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, revelados para glutamato desidrogenase (GDH). UFLA, Lavras - MG. 1995.....	56
12	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Penicillium</i> spp (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, revelados para sorbitol desidrogenase (SDH). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	57

Figura		Página
13	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Peniculium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento articial, revelados para malato desidrogenase (MDH). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	57
14	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Peniculium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento articial, revelados para peroxidase (PO). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	58
15	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Peniculium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento articial, revelados para fosfatase ácida (ACP). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	58
16	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Peniculium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento articial, revelados para glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	59

Figura		Página
17	Padrões isoenzimáticos de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Peniculium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento articial, revelados para esterase (EST). UFLA, Lavras - MG, 1995.....	59
18	Zimogramas de isoenzimas de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>Peniculium spp</i> (P), <i>Fusarium moniliforme</i> (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes períodos de envelhecimento articial. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	60
19	Efeito do tempo de envelhecimento artificial no percentual de germinação de sementes de milho da cultivar C-901 submetidas a diferentes tratamentos avaliadas pelos testes padrão de germinação, primeira contagem (PCG) e teste envelhecimento acelerado. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	80
20	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinação (TPG) de sementes de milho da cultivar AG-122, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	80

Figura		Página
21	Efeito do tempo de envelhecimento artificial sobre a primeira contagem de germinação de sementes de milho da cultivar AG-122 tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	81
22	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinação, pelo teste de envelhecimento acelerado de sementes de milho da cultivar AG-122 tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA - Lavras, 1996.....	82
23	Efeito de tempo de envelhecimento artificial na emergência em canteiro de sementes de milho, tratadas com fungicida, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	82
24	Efeito do tempo de envelhecimento artificial no índice de velocidade de emergência de sementes de milho tratadas com fungicidas, desinfestadas superficialmente com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	83
25	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinação, pelo teste frio de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	83

Figura		Página
26	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinação, pelo teste de frio de sementes de milho da cultivar C-901 tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	83
27	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade pelo teste de tetrazólio potencial de germinação de sementes de milho da cultivar AG-122, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas, UFLA, Lavras - MG, 1996.....	84
28	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade pelo teste de tetrazólio potencial de germinação de sementes de milho da cultivar C-901, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas, UFLA, Lavras - MG, 1996.....	84
29	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade, pelo teste de tetrazólio vigor, de sementes de milho da cultivar, AG-122, tratadas com fungicida, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG. 1996.....	84

Figura		Página
30	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade, pelo teste de tetrazólio vigor, de sementes de milho da cultivar, C-901, tratadas com fungicida, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	86
31	Efeito do tempo de envelhecimento artificial sobre a condutividade elétrica de sementes de milho da cultivar AG-122, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	86
32	Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pela “blotter test” em sementes de milho da cultivar AG-122 não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	87
33	Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar C-901 não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	87

Figura		Página
34	Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar AG-122 tratadas com fungicida. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	88
35	Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar C-901 tratada com fungicida. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	88
36	Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar AG-122, desinfestadas superficialmente com hipoclorito. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	89
37	Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar C-901, desinfestadas superficialmente com hipoclorito. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	89
38	Efeito do tempo de envelhecimento artificial na incidência de dano mecânico de sementes de milho AG-122, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	90

Figura		Página
39	Efeito de tempo de envelhecimento artificial na incidência de dano mecânico de sementes de milho, tratadas com fungicida, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	90
40	Padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos e ao envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	91
41	Padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de sementes de milho da cultivar C-901, submetidas a diferentes tratamentos e ao envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	91
42	Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para esterase (EST). UFLA, Lavras - MG, 1996.....	92
43	Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C-901, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para esterase (EST). UFLA, Lavras - MG, 1996.....	92

Figura		Página
44	Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para peroxidase (PO). UFLA, Lavras - MG, 1996.....	93
45	Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C-901, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para peroxidase (PO). UFLA, Lavras - MG, 1996.....	93
46	Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para sorbitol desidrogenase (SDH). UFLA, Lavras - MG, 1996.....	94
47	Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C-901, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para sorbitol desidrogenase (SDH). UFLA, Lavras - MG, 1996.....	94
48	Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para sorbitol desidrogenase (SDH). UFLA, Lavras - MG, 1996.....	95
49	Zimogramas de isoenzimas de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes tratamentos e envelhecidas artificialmente. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	96

LISTA DE TABELAS (APÊNDICE)

Tabela	Página
1	Resumo da análise de variância dos dados obtidos de avaliações da qualidade fisiológica de sementes de milho, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1996.....
	107
2	Resumo da análise de variância dos dados obtidos de avaliações da qualidade de sementes de milho, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1996.....
	107
3	Resumo da análise de variância dos dados obtidos da determinação do teor de umidade das sementes de milho antes do envelhecimento e do exame de infestação de sementes de milho, submetidas a diferentes tempos de envelhecimentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.....
	108
4	Resumo de análises de variância dos dados obtidos de avaliações da qualidade fisiológica de sementes de milho, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.....
	109
5	Resumo das análises de variância dos dados obtidos de avaliações de vigor de sementes de milho, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.....
	110

Tabela

Página

6	Resumo da análise de variância dos dados obtidos da avaliação da qualidade física e sanitária de sementes de milho, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.....	110
---	---	-----

RESUMO

BRANDÃO JR, Delacyr da Silva. Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho. Lavras-MG, UFLA, 1996. 110p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).*

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Patologia e Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, objetivando a seleção de frações de extração de proteína e sistemas de enzimas que permitissem visualizar variações nos padrões eletroforéticos de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração fisiológica e microbiana.

Na primeira fase do experimento foram utilizadas sementes híbridas das cultivares AG-122 e C-901 envelhecidas artificialmente (42°C e 100% UR), por períodos de 0, 48, 96 e 144 horas. Após o envelhecimento as sementes tiveram seu perfil determinado pelos testes de germinação, primeira contagem, emergência, envelhecimento acelerado, teste frio, sanidade, e determinações de danos mecânicos e sementes infestadas.

Para extrações de proteínas das sementes foram testados os tampões Tris-HCl (62,5mM Tris, 2,3% SDS, 5% β mercaptoetanol, pH 6,8), Hepes sobrenadante (100mM, Hepes, pH 7,0) e Hepes "pellet" (50mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β mercaptoetanol, pH 6,8). Na detecção de polimorfismo em proteína, foi utilizada eletroforese (SDS - PAGE) em gel 12,5%, e Tris-glicina + SDS, pH 8,9 como sistema tampão gel/eletrodo.

* Orientadora: Maria Laene Moreira de Carvalho: Membros da Banca: Maria das Graças G. C. Vieira e Vânia Déa de Carvalho

Para avaliação da atividade enzimática, foi utilizado tampão de extração (0,2 M Tris, 0,1% β mercaptoetanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG, 1 mM EDTA) e géis de poliacrilamida (separador 7,5%/concentrador 4,5%) com sistema tampão gel/eletrodo Tris-glicina, pH 8,9.

Os resultados obtidos na primeira fase revelaram que variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de milho. O extrator Hepes proporciona melhor resolução na avaliação do nível de deterioração de semente e as enzimas glutamato-oxaloacetato transaminase e sorbitol desidrogenase, podem ser consideradas promissores marcadores bioquímicos para avaliação de qualidade de sementes de milho em estádios iniciais de deterioração.

Na segunda fase do experimento realizada com o objetivo de verificar variações eletroforético de enzimas e proteínas de semente de milho com diferentes níveis de deterioração fisiológica e sanitária, foram utilizadas sementes dos dois híbridos, tratadas com fungicida thiabendazole, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. Estas subamostras foram então envelhecidas artificialmente por períodos de 0, 24, 48, e 72 horas. O perfil destas sementes foi determinado pelos mesmos testes aplicados na primeira etapa do trabalho, e nas análises eletroforéticas foi utilizada a fração de extração Hepes sobrenadante (proteína solúvel) e os sistemas de enzimas sorbitol desidrogenase (SDH), peroxidase (PO), esterase (EST) e fosfatase ácida (ACP).

Foi observado que os sistemas enzimáticos, fosfatase ácida e peroxidase podem atuar como marcadores bioquímicos para a avaliação da deterioração de sementes de milho, enquanto que a enzima sorbitol desidrogenase possibilita a detecção de estádios iniciais de deterioração. O uso de marcadores bioquímicos permite avaliar sensíveis diferenças relacionadas a ação de microorganismos associados ao processo de deterioração de sementes de milho.

GOT
e
sub

ACP
PO

ABSTRACT

Electrophoresis Of Protein And Isoenzyme In The Evaluation Of The Quality Of Corn Seeds.

The present work was undertaken in the Laboratories of Seed Pathology and Seed Analysis at the Universidade Federal de Lavras UFLA - MG, aiming at the selection of fractions of protein extraction and enzyme systems which allow to detect variations in the electrophoretic patterns of corn seeds with different levels of physiological and microbiological deterioration.

In the first phase of the experiment, artificially aged hybrid seeds of the cultivars AG-122 and C-901 (42°C and 100% RU), for periods of 0, 48, 96 and 144 hours were utilized. After ageing, the seeds had their profile determined by the tests of germination, first count, emergence, accelerated aging, cold test, health test and determinations of mechanical damage and infested seeds.

For extraction of seeds proteins, the buffers Tris-HCl (62,5mM Tris, 2,3% SDS, 5% β mercaptoethanol, pH 6,8), supernatant Hepes (100mM Hepes, pH 7,0) and pellet Hepes (50mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β mercaptoethanol, pH 6,8). In the detection of polymorphism in protein, 12,5% gel eletrophoresis (SDS-PAGE) and Tris-glycine + SDS, ph 8.9. as a buffer gel/ eletrode system were utilized.

For evaluation of enzymatic activity, Tris extraction buffler (0,1% β mercaptoethanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG, 1mM EDTA) and polyacrilamide gels (separator 7,5%/concentrator 4,5%) with a gel buffer/Tris glycine electrode, pH 8,9 were employed.

The results obtained in the first phase revealed that eletrophoretic variations of proteins and isoenzymes are associated with the deterioration process of corn seeds. The extrator Hepes furnishes better resolution in the evaluation of the deterioration level of seed and the enzymes glutamate-oxilacetate transaminase and sorbitol desidrogenase, may be considered promissing biochemical markers for evaluating quality of corn seeds in the early deterioration stages.

In the second phase of the experiment, accomplished with the objective to observe electrophoresis variations of enzymes and proteins of corn seeds with different levels of physiological and health quality, seeds of the two hybrids were utilized, treated with the fungicide thiabendazole, desinfested with hypochloride and not treated. These subsamples were then artificially aged for periods of 0, 24, 48 and 72 hours. The profile of these seeds was determined by the same tests appled in the first step of the work and in electrophoretical analysis, the fraction of supernatant Hepes extraction (soluble protein) and the enzymes systems sorbitol desidrogenase (SDH), peroxidase (PO), sterase (EST) and acid phosphatase (ACP) was utilized.

It was found that enzymatic systems, phosphatase acid and peroxidase may act as biochemical markers for evaluation of the deterioration of corn seeds, while the enzyme sorbitol desidrogenase, enables the detection of early deterioration stages. The use of biochemical markers allows to evaluate small differences related to the action of microorganisms associated with the process of corn seed deterioration.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de sementes de alta qualidade na instalação de lavouras de milho é fundamental para a obtenção de alta produtividade agrícola; no entanto, durante o processo produtivo ou mesmo no armazenamento as sementes estão sujeitas a uma série de fatores que podem afetar sua qualidade.

Os mecanismos pelos quais as sementes perdem sua viabilidade, durante o armazenamento, ainda não são devidamente conhecidos, muito embora altas temperaturas e umidades relativas do ar sejam as principais responsáveis pelo aumento da velocidade de deterioração. Diversos métodos têm sido utilizados para determinar o nível e a causa da deterioração das sementes, mas os testes atuais apresentam limitações no sentido de serem na maioria das vezes onerosos, ou demandarem um longo tempo para sua realização, podendo mesmo serem ineficientes em algumas situações específicas.

A detecção correta da qualidade das sementes e a obtenção de resultados confiáveis e rápidos podem auxiliar em programas de controle de qualidade de empresas produtoras de sementes de milho, permitindo o monitoramento da qualidade durante o processo produtivo, eliminando custos e preservando a qualidade das sementes produzidas.

As primeiras mudanças deteriorativas que afetam a qualidade das sementes têm sido atribuídas a vários processos bioquímicos, como denaturação de biomoléculas e acumulação de substâncias tóxicas, em adição a queda da integridade de membranas (Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991).

Recentemente técnicas envolvendo proteínas e enzimas têm sido utilizadas na avaliação de alterações bioquímicas nas sementes durante o processo de deterioração. Apesar de existirem ainda necessidades de muitos estudos nessa área, as técnicas eletroforéticas têm-se mostrado promissoras para avaliação da qualidade das sementes, com vantagem como requererem pequena quantidade de amostras e permitirem análise simultânea de diversos lotes, além de conferirem rápida separação com alta resolução.

Visando a determinar alterações bioquímicas resultantes do processo de deterioração de sementes de milho, buscou-se com o presente trabalho selecionar isoenzimas e frações de extração de proteínas que permitam verificar variações de perfis eletroforéticos em sementes com diferentes níveis de deterioração; e a possibilidade da utilização de padrões protéicos e isoenzimáticos como indicadores da qualidade fisiológica e sanitária.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Deterioração de Semente

A deterioração de semente é um processo degenerativo contínuo que se inicia no estágio de maturidade fisiológica e continua até a perda da viabilidade e morte da semente. A extensão das mudanças que ocorrem neste processo depende principalmente do período de tempo e condições de armazenamento, podendo resultar na redução da emergência final e baixo desenvolvimento das plantas no campo, com conseqüente queda na qualidade e na produtividade das lavouras (Dell'Aquila, 1987; Bingham, Harris e MacDonald, 1994).

Diversas teorias sobre as causas da deterioração têm sido propostas, mas as causas reais e seus mecanismos ainda permanecem obscuros (Zhang et al., 1994). Para Roberts (1973); isto se deve ao grande volume de alterações citológicas e metabólicas detectadas no processo, o que torna difícil o estabelecimento das primeiras causas ou mesmo a identificação de causa e efeito de uma resposta deteriorativa específica.

Delouche e Baskin (1973), em estudos de envelhecimento artificial de sementes de milho, afirmaram que o processo de deterioração se inicia com a desorganização de membranas e perda de sua integridade.

Segundo Tyagi (1992), a perda da integridade de membrana está diretamente associada ao mecanismo de envelhecimento de semente. Deste modo, quando embebida em água, as sementes deterioradas apresentam uma maior lixiviação de compostos solúveis, sendo esta liberação proporcional ao estado de desorganização das membranas, princípio este adotado pelo teste de condutividade elétrica para avaliação de vigor de sementes.

Para Villiers (1973), o mecanismo de degeneração das membranas ocorre com a produção de radicais livres na cadeia dos ácidos graxos insaturados na presença de oxigênio.

Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), detectaram em sementes de milho envelhecidas artificialmente um aumento no total de ácidos graxos e na atividade de fospolipase A, e uma grande queda em fosfolipídios totais. Desde que os fosfolipídios são os principais componentes da membrana e que a enzima fospolipase A atua sobre estes fosfolipídeos e libera ácidos graxos, isto sugere que no envelhecimento da semente ocorre perda de fosfolipídeos de membrana e subsequente peroxidação de lipídeos.

A peroxidação de lipídios afeta consideravelmente a integridade das membranas, exercendo um importante papel na deterioração e reduzindo a longevidade de sementes armazenadas sobre condições naturais (khan et al.,1996).

Lin (1988) estudou alterações nos lipídios das membranas de sementes de feijão e de milho, durante o envelhecimento. Observou o autor a ocorrência, em feijão, de peroxidação e hidrólises dos lipídios e verificou que a detecção do ácido fosfatídico pode ser um sensível indicador da perda de vigor. Em milho os estudos não se mostraram tão conclusivos.

A lipoxigenase (LOX) é uma classe de enzimas que se acredita contribuir na peroxidação de lipídios e geração de ácidos graxos. Todavia, Trawatha, Tekrony e Hildebrand (1995), em estudos com atividades de enzima determinaram que a inativação de uma ou duas das três

isoenzimas Lox não alteraram a armazenabilidade de sementes de soja. À medida que a viabilidade e vigor das sementes declinaram durante o armazenamento, verificou-se um aumento concomitante em conteúdo de ácidos graxos livres e formação de E-2-Hexenal para todos os genótipos estudados. Entretanto, Giraldo e Le-Mestre (1992) demonstraram, através de análise de ESR (Electron Spin Resonance), que o nível de radicais livres não pode ser um bom índice para avaliação de viabilidade de sementes de trigo.

Cherry e Skadsen (1983) e Aguilar et al. (1991) sugerem que a perda de viabilidade de sementes é acompanhada por redução na capacidade de sintetizar proteínas devido ao declínio de componentes como ribossomo, RNA mensageiros e alterações ao nível de transcrição e tradução com o envelhecimento das sementes.

Dentre as proteínas, as enzimas desempenham um importante papel na evolução da deterioração de sementes e sua atividade pode ser um indicativo da perda de qualidade.

Para McGee (1983), a desnaturação de enzimas e inativação dos ácidos nucléicos e membranas não funcionais estão ligadas a danos cromossômicos que podem levar à diminuição na eficiência metabólica de organelas, células e órgãos devido ao aumento de uso e à elevação nos níveis de mutações somáticas com o aumento de idade do tecido, acarretando aumento de mutações indesejáveis que conduzem a disfunções metabólicas.

Vázquez *et al.* (1988) e Vázquez, Montiel e Vázquez-Ramos (1991), verificaram a diminuição da atividade da DNAPolimerase e da DNALigase no processo de deterioração artificial de semente de milho.

Estando várias enzimas associadas ao processo de duplicação do DNA na divisão celular e sendo o DNA constituinte dos cromossomos, base para a formação dos RNAs, e estes responsáveis pela síntese protéica, a constatação das alterações no metabolismo do DNA ajuda a

compreender fatos como os observados por Cheah e Osborne (1978) e McGee (1983) de quebra de cromossomos durante o armazenamento de sementes, bem como a quebra de RNA (Ghosh, Adhikary e Banerjee, 1981); portanto, incapacidade de sintetizar proteínas (Cherry e Skadsen, 1983; Aguilar et al., 1992). Em consequência da redução de enzimas atuantes no processo germinativo, acontece uma germinação mais lenta ou a perda da viabilidade.

Além da importância das enzimas associadas ao processo de duplicação do DNA, a diminuição na atividade de enzimas removedoras de peróxidos pode contribuir com o processo de deterioração. Segundo Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), esta diminuição na atividade de enzimas removedoras de peróxido pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de O_2 e radicais livres sobre ácido graxos insaturados de membrana e a produção de produtos de peroxidação de lipídios secundários. Alguns autores (Nkang, 1988; Basavarajappa et al., 1991; Jeng e Sung 1994;) verificaram em sementes envelhecidas artificialmente um declínio na atividade da peroxidase e de outras enzimas removedoras de peróxido (superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase) com o aumento do tempo de envelhecimento

James (1967) afirma que os processos relacionados com a deterioração de sementes têm como causa primária a existência da respiração que provoca alterações na estrutura protéica, causando inativação enzimática e surgimento de mutações.

A diminuição da atividade respiratória, durante o processo deteriorativo, sugerido por Wilson e McDonald (1986), ocorre pela quebra do gradiente protônico necessário para manter o acoplamento respiratório. Para os autores, a membrana da mitocôndria (organela responsável pela respiração celular), por ser rica em lipídios insaturados e devido à presença de cristas, apresenta mais intensamente peroxidação desses lipídios, o que acaba por interferir com taxas respiratórias.

Para Murray (1984), o efeito negativo da deterioração de sementes sobre taxas respiratórias induz a um atraso na degradação de reservas, prejudicando o desenvolvimento do embrião. Esse atraso tem sido atribuído a um escasso desenvolvimento mitocondrial durante as primeiras fases da germinação (Morahashi, Bewley e Yeng, 1981), a falta de hidrólises enzimáticas (Rodríguez, 1991) e/ou a oxidação de metabólitos derivados de hidrólises de reserva (Woodstock, Furrman e Solomons, 1984).

A respiração aeróbica não é o único fator que afeta a deterioração de sementes. Zhang et al. (1994) verificaram, através do metabolismo anaeróbico, que a produção de compostos voláteis pela semente pode ser um importante fator que acelera o processo de deterioração. Segundo os autores, o acetaldeído teve o maior efeito danoso independente da umidade relativa e temperatura do ambiente de armazenamento, enquanto o etanol causou deterioração de sementes somente em condição de umidade relativa alta. Vantoai, Fausey e McDonald Jr, (1987) afirmam que no metabolismo anaeróbico o piruvato, primariamente produzido através da glicólise, é convertido para acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o acetaldeído é então reduzido para etanol pela álcool desidrogenase

Alguns autores (Barton, 1985; Cherry e Skadsen, 1983;) destacam a ação de fungos como importante fator no processo de deterioração de sementes. Berjak (1987) cita que consideráveis mudanças bioquímicas ocorrem em sementes infectadas como resultado de atividades fúngicas.

Os fungos associados às sementes e grãos são classificados como fungos de campo e de armazenamento. Dentre os fungos de armazenamento destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* pelos danos causados à semente durante o armazenamento.

Christensen e Lopez (1963) verificaram a perda total do poder germinativo de semente de milho inoculadas com fungos de armazenamento, enquanto que sementes não inoculadas mantiveram a porcentagem de germinação durante o armazenamento.

Alguns fungos de campo podem manter-se viáveis por anos em sementes armazenadas. Armolik et al. (1956) citado por Barton (1985) verificaram que sementes de cevada inoculadas com *Fusarium moniliforme* apresentaram uma maior aceleração do processo deteriorativo durante o armazenamento do que aquelas inoculadas com espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. O *Fusarium* causou os piores danos às sementes armazenadas e provocou os maiores efeitos deletérios.

Von Pinho (1991) em trabalho com conservação de sementes de milho com incidência de *Fusarium moniliforme*, encontrou resultados superiores de germinação no teste de frio após seis meses de armazenamento. Sugere a autora que com o decorrer do tempo de armazenamento este fungo poderia tornar-se menos agressivo, dando, assim, condições para a semente manifestar seu potencial de germinação.

O fungo *Fusarium moniliforme* induz sintomas como podridão do colmo e da espiga, podendo ainda sobreviver no interior das sementes causando podridão de sementes devido à destruição do embrião antes da ocorrência da germinação, como também a morte de plântulas antes e após a emergência (Balmer, 1978).

Berjak (1987), trabalhando com sementes de milho envelhecidas artificialmente, verificou que a redução no vigor e na germinação das sementes ocorre antes mesmo que apareçam sinais externos indicadores da invasão por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e que certas alterações ultra-estruturais, características do processo deteriorativos, aparecem mais precocemente em

sementes infectadas do que nas não infectadas. Cita ainda a autora a existência de alterações ultra-estruturais que podem caracterizar processo deteriorativo por atividade fúngica.

Segundo Cherry e Skadsen (1983), as mudanças fisiológicas e estruturais no processo deteriorativo ocorrem independentes dos microorganismos, mas estes aumentam notadamente o nível de deterioração da estrutura celular.

Os diversos estudos relacionados a deterioração de sementes envolvem o armazenamento destas por períodos prolongados ou não, dependendo das condições de como foram armazenadas e onde o foram. A aceleração do processo de deterioração pode ser conseguida com o envelhecimento artificial das sementes.

Segundo Lin (1988), o envelhecimento artificial de semente utilizando altas temperaturas e umidades, permite que mudanças na qualidade, que usualmente levariam meses ou anos, ocorram em poucos dias ou semanas.

Gutiérrez *et al.* (1993), estudando alterações no metabolismo do DNA de sementes de vários híbridos de milho, observaram que alterações de atividades enzimáticas (DNA polimerase e da DNA ligase) ocorrem em condições de envelhecimento natural ou artificial através de elevação da temperatura e da umidade do ambiente.

2.2. Eletroforese de Proteína e Isoenzima

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, através da migração em um meio suporte e tampões adequados sob a influência de um campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para

polo positivo e moléculas com carga positiva migram para polo negativo (Alfenas et al., 1991; Westermeier et al., 1993).

Embora os princípios desta técnica já fossem conhecidas desde o século passado, somente a partir de 1926 ela teve um grande impulso, quando Sammer conseguiu isolar e cristalizar a enzima urease, demonstrando que enzimas e proteínas são moléculas que podem ser purificadas. Markert (1983).

Diferentes meios suportes foram trabalhados visando á caracterização de proteínas, através da mobilidade eletroforética; destes meios destaca-se a eletroforese em gel de Poliacrilamida - PAGE introduzida em 1950 (Anti, 1991) pela sua praticidade e por propiciar alta resolução.

Segundo Carraro (1990), a técnica SDS-PAGE pela qual o dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico, se liga às regiões hidrofóbicas de proteínas para separar a maioria em suas unidades componentes, e faz com que as proteínas percam seu efeito de carga específica, separando-se devido às suas diferenças de pesos moléculares, está entre as técnicas que permitem melhor resolução de bandas, tornando possível a avaliação em nível qualitativo (ausência/presença) e quantitativo (diferença de concentração dos polipeptídeos existentes em uma amostra.

Após a separação física no gel, as proteínas são detectadas através de procedimentos de coloração apropriados, formando padrões de bandas. Até mesmo 0,1mg de uma proteína apresenta uma faixa distinta quando corada com coomassie blue. Proteínas com massas diferindo em cerca de 2% (diferença de cerca de 10 aminoácidos) podem geralmente ser distinguidas (Westermeier et al., 1993).

Segundo Alfenas et al. (1991), a resolução em geis de poliacrilamida foi melhorada com a introdução, na década de sessenta, do sistema descontínuo, em que dois sistemas de geis, gel separador e gel concentrador, e de solução tampão dos geis (Tris - HCL) diferente daquele dos eletrodos (Tris - glicina) são utilizados. Enquanto no gel concentrador as moléculas de proteína concentram-se numa banda estreita e compacta, no gel separador elas se separam de acordo com seus respectivos tamanhos moleculares (peneiramento molecular).

Comparando com as outras técnicas, a eletroforese em gel de poliacrilamida requer somente pequena quantidade de amostra, permite a análise simultânea de diversas amostras e confere rápida separação com alta resolução (Boulter, Thurman e Derbyshire, 1976). Eletroforese tem tido grande aplicação no estudo de proteínas com respeito a regulação genética e bioquímica, propriedades físico-químicas, ortogenia, especificidade e papel fisiológico, entre outras.

Uma grande vantagem dessa técnica é a reprodutibilidade de resultados, o que é conseguido desde que não haja mudanças na metodologia eletroforética, os extratos sejam preparados de um modo comum, a partir de órgãos comparáveis em um mesmo estágio de desenvolvimento, e que sejam submetidos à eletroforese de uma maneira idêntica (Verneti, 1983).

Segundo Alfenas et al. (1991), um dos maiores problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas é a presença de compostos fenólicos liberados durante a trituração de tecido. Tais fenóis, quando descompartimentalizados, são prontamente oxidados a quinonas por enzimas da própria semente. Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam as enzimas e/ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas. O

conteúdo de lipídeos no endosperma, temperatura, tipo de solvente utilizado e interações entre proteínas também podem afetar quantitativamente a extração (Tsai, 1983).

Além de efetuar a extração à baixa temperatura, estabilizadores de atividade enzimática podem ser adicionados ao tampão de extração visando melhorar a resolução de certas enzimas.

As proteínas do grão de milho podem ser separadas, quanto a sua solubilidade, em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (Osborne e Mendel, 1914). As albuminas são solúveis em água e as globulinas são extraídas em soluções salinas diluídas. Várias dessas albuminas e globulinas são enzimas e contribuem com 6% das proteínas totais. As proteínas extraídas com soluções alcoólicas são as prolaminas (zeínas), sendo que estas são as principais proteínas de reservas da semente de milho e perfazem aproximadamente 47,5% das proteínas totais do grão. As demais proteínas que permanecem insolúveis após a extração das albuminas, globulinas e prolaminas são as glutelinas. Estas podem ser extraídas com soluções ácidas ou alcalinas diluídas (Formasieri Filho, 1992; Guimarães, 1994).

Vários procedimentos de extrações têm sido publicados, todos baseados na solubilidade de proteínas em solvente orgânico. A extração dos vários tipos de proteínas em um único solvente é incompleta, sendo recuperadas várias frações e, dependendo da presença ou ausência de agentes redutores, várias proteínas podem ou não vir a ser extraídas pelo mesmo solvente (Lopes, 1993).

A fração zeína (principal proteína de reserva do grão de milho), quando separada eletroforéticamente no sistema SDS-PAGE, apresenta quatro grupos distintos: alfazeínas de 19 e 22 KD, gama-zeína de 16 e 27 KD, beta-zeínas de 14 KD e delta-zeína de 10 KD (Larkins et al., 1989).

Para eletroforese de isoenzimas não se utiliza o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) no sistema para que não haja desnaturação das enzimas, pois estas são identificadas no gel por reação de coloração baseada em sua atividade catalítica (Gottlieb, 1977).

O termo isoenzima foi proposto por Markert e Moller (1959), para descrever formas moleculares múltiplas de uma mesma enzima, que ocorre num mesmo organismo e com afinidade pelo mesmo substrato. Estas formas têm usualmente semelhante, se não idênticas propriedades enzimáticas, mas pequenas diferenças na sequência de aminoácidos (Bonde, Micales e Peterson, 1993).

As isoenzimas podem se originar de três diferentes fenômenos genéticos e bioquímicos:

a) diferentes alelos de um mesmo locus; b) múltiplos loci codificando para uma mesma enzima e c) modificações pós translacionais e formação de isoenzimas secundárias (Bonde, Micales e Peterson, 1993).

A análise da variação isoenzimática aproxima-se da variação genética, uma vez que os polipeptídeos são dependentes das sequências de nucleotídeos nos seus genes codificantes.

2.3. Detecção de alterações protéicas e isoenzimáticas durante o processo de deterioração de sementes.

Segundo Bragantini (1985), embora já existam diversas técnicas utilizando atividades protéicas e enzimáticas como medidas de viabilidade das sementes, somente algumas das muitas enzimas envolvidas no processo têm sido investigadas.

Carraro (1990) afirma que a eletroforese, através da detecção de alterações na composição protéica e de enzimas específicas, pode ser eficiente ferramenta para o acompanhamento da qualidade das sementes durante o armazenamento.

Chauhan, Gopinathan e Babu (1985) verificaram em seus estudos sobre variações eletroforéticas de proteínas e enzimas de soja e cevada, que as bandas de proteínas e enzimas podem atuar como marcadores moleculares na avaliação a qualidade de sementes. De acordo com o autor, perfis eletroforéticos de proteínas e enzimas das sementes bastante envelhecidas, parecem com o daquelas sementes vigorosas e com 24 a 48 horas de germinação, o que sugere que sementes envelhecidas passaram por todas as mudanças bioquímicas necessárias para o processo de germinação, resultando na perda da viabilidade. Citam ainda os autores que a presença de um grande número de bandas em sementes secas indica que existe uma atividade de genes que controlam o início da germinação e também a expressão de várias outras características fenotípicas durante o processo de envelhecimento.

Dell'Aquila (1994) demonstrou que padrões de proteínas de sementes de trigo foram alterados quando estas foram submetidas ao envelhecimento artificial. Em semente de girassol (Reuzean, Goffner e Cavalie, 1992) e de algodão (Varier e Dadlani, 1992), os padrões de bandas de proteínas solúveis não foram afetados pela envelhecimento natural.

Bilia (1992), estudando o comportamento de sementes de milho híbrido durante o armazenamento, verificou através de análise eletroforética que a região de expressão protéica similar à proteína de peso molecular 43 KD (ovoalbumina) e a posição R4 da expressão do gene de esterase são possíveis marcas moleculares relacionadas a alterações metabólicas das sementes em processo de deterioração.

Throneberry e Smith (1955) observaram uma correlação positiva entre viabilidade de sementes de milho e atividade da enzima álcool desidrogenase. A álcool desidrogenase atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Vantoai, Fausey e McDonald, 1987). Em estudos de efeitos de voláteis endógenos no processo de deterioração de sementes, Zang et al. (1994) verificaram que a produção de acetaldeído pelas sementes durante o armazenamento poder ser um importante fator que acelera a deterioração.

A enzima glutamato desidrogenase está presente apenas na mitocôndria, e se localiza na matriz mitocondrial, sendo uma enzima alostérica, complexa, catalisando a deaminação oxidativa do glutamato, formando amônia e α cetoglutarato. A amônia pode ser recuperada e reutilizada na síntese dos aminoácidos. Embora a amônia e o α cetoglutarato sejam catalisados pela mesma enzima, o uso de duas coenzimas (NAD e NADPH) diferentes, pela glutamato desidrogenase, possibilita a regulação independente da deaminação do glutamato e da aminação do α cetoglutarato (Lehninger, 1992). Desde que esta enzima atua na oxidação de aminoácidos (proteínas de reserva) fornecendo energia para as células (ciclo do ácido cítrico) e/ou na redução do α cetoglutarato para síntese de aminoácidos, pode ela ter um importante papel na germinação de sementes.

Já a sorbitol desidrogenase é uma enzima oxiredutora que catalisa a reação de remoção de termos de hidrogênio do monossacarídeo sorbitol possibilitando a degradação deste monossacarídeo e obtenção de energia para célula, a exemplo dos resultados obtidos por Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991); a perda de atividade de desidrogenase em sementes envelhecidas pode estar associada a seus níveis baixos de produção de ATP e a uma taxa reduzida de ATP e GTP dependente da síntese de proteína.

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 através da membrana mitocondrial e fixação do CO_2 nas plantas (Conn e Stumpf, 1980). Satters et al. (1994), em estudos com sementes de soja, observaram que a atividade da isoenzima malato desidrogenase foi a menos afetada pelos tratamentos de envelhecimento.

A glutamato oxaloacetato transaminase participa da reação específica de transferência de aminogrupos de um aminoácido ao ácido α cetoglutarato para formar o ácido glutâmico e produzir o cetoácido, e reage em diferentes velocidades, com aproximadamente todos os outros aminoácidos protéicos, em uma reação reversível. Essas reações ocorrem sobretudo no citoplasma e o ácido glutâmico, ao qual a membrana mitocondrial é permeável, entra na matriz, onde pode ser novamente transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase. Esta é portanto uma enzima atuante no processo de degradação e síntese de proteínas (Conn e Stumpf, 1980), apresentando um importante papel na germinação de sementes. Utilizando técnicas eletroforéticas, Chauhan, Gopinathan e Babu (1985) observaram em soja e cevada um aumento do número de bandas da glutamato oxaloacetato transaminase com o envelhecimento das sementes. Segundo os autores, essas mudanças no número de bandas são devidas a um aumento na atividade metabólica que ocorre com a evolução do processo de deterioração.

GOT
T de
do

A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de esteres. Bilia (1992) verificou em sementes de milho, com 8 meses de armazenamento, a supressão da atividade da esterase da posição R_4 . Segundo a autora, tal fato pode ser explicado pela inibição, por compostos orgânicos e carbamatos, da síntese de esterase da região R_4 com a deterioração da semente. Satters et al. (1994), trabalhando com sementes de soja, observaram a perda de 77% da

atividade de duas esterases após 48 h de envelhecimento e o aumento da atividade total desta enzima com o envelhecimento.

Chauhan, Gopinathan e Babu (1985) verificaram, em sementes de soja e cevada, que os padrões de bandas de esterase não estavam uniformemente presentes nos diferentes tratamentos referentes aos tempos de envelhecimento artificial e que o número de bandas aumentou com o tempo de envelhecimento, além do que algumas bandas eram específicas a uma idade particular de tratamento.

A peroxidase é uma enzima removedora de peróxido e a perda de sua atividade pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de O_2 e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana, o que provoca a degeneração de suas membranas e o comprometimento de seu vigor. Nkang (1988) Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) e Jeng e Sung (1994) verificaram um aumento da peroxidação de lipídios com a evolução da deterioração de sementes.

A fosfatase ácida participa em reações de hidrólise de esteres, podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana, provocando a peroxidação destes lipídios. Rajagopal e Sen - Mandi (1992) observaram alta atividade desta enzima em embriões de sementes de arroz envelhecidas artificialmente quando comparadas com embriões de sementes envelhecidas naturalmente e não envelhecidas.

Estes resultados contradizem os obtidos com cevada (Chauhan, Gopinathan e Babu, 1985), e soja (Jeng e Sung, 1994; Chauhan, Gopinathan e Babu, 1985) nos quais a atividade da fosfatase ácida decresceu com o aumento do envelhecimento.

Trabalhando com sementes de milho, Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) obtiveram resultados conflitantes em relação ao aumento de peroxidação de lipídios e diminuição de atividade da enzima fosfatase ácida.

As alterações nos padrões eletroforéticos durante o processo de deterioração, podem ser afetadas pela ação de microorganismos associados às sementes. Isto é devido a várias enzimas terem sua produção e/ou atividade alterada em resposta a presença de microorganismos (Leite e Pascholati, 1995).

Na infecção e colonização o microorganismo pode se valer da produção de uma variedade de enzima que atua na degradação dos componentes de parede celular, membranas e de reserva, além da produção de hormônios e substâncias tóxicas visando promover a penetração da hifa infectiva não hospedeiro (Amorim, 1995; Pascholati, 1995) e o hospedeiro interagindo com o fungo, lança mão de seus mecanismos de defesa. A princípio, ocorrem modificações fisiológicas e bioquímicas através da ativação e/ou do bloqueio de determinadas atividades celulares, uma verdadeira batalha metabólica. Posteriormente, mudanças morfológicas visíveis poderão surgir em decorrência dessas alterações (Pascholati, 1995).

Cherry (1978), trabalhando com semente de amendoim, observou decréscimo em proteínas solúveis e diferenças em zimogramas de esterase, leucina-aminopeptidase, fosfogluconato, álcool desidrogenase, fosfatase ácida e alcalina de sementes infectadas com *Aspergillus flavus* em relação as não infectadas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AGUILAR, R.; REYMOSO, E., ALBORES, M.; SANCHEZ-DE JIMENEZ, E. Changes in protein synthesis in embryonic axes after long term storage of maize seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.4, p.191-198, Dec. 1992.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I; BRUCE, W; PASSADOS, G.C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF,1991. 292p.

AMORIM, L. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: _____. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.234-243.

ANTI, A.B. **Caracterização de linhagens de soja e feijão através de eletroforese**. Piracicaba: ESALQ, 1991. 133p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

BALMER, E. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1978. p. 480-504.

BARTON, L.V. **Seed Preservation and longevity**. New Delhi: IBS. 1985. 216p.

→ BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n.2, p. 279-286, 1991.

- BERJAK, P. Stored seeds: The problems caused by micro-organisms (With particular reference to the fungi) In: NASSER, L.C.; WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. **Seed Pathology**. International advance course, proceedings. Brasília: Informativo Abrates, 1987. p. 38-50.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BILIA, D.A.C. **Comportamento de sementes de milho híbrido precoce e normal durante o armazenamento**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- BINGHAM, I.J.; HARRIS, A.; MACDONALD, L. A comparative study of radicle and coleoptile extension in maize seedlings from aged and unaged seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n.1, p. 127-139, 1994.
- BONDE, M.R.; MICALES, J. A.; PETERSON, G.L. The use of isozyme analysis for identification of plant - pathogenic fungi. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.10, p. 561-968, Oct. 1993.
- BOULTER, D.; THURMAN, D.A.; DERBYSHIRE, E. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 66, n.1, p. 27 - 36, Jan. 1976.
- BRAGANTINI, C. **Conservação de Sementes**. Brasília: MEC, 1985, 18p. (Módulo 7, Sementes: Curso de Especialização por tutoria à distância).
- CARRARO, D.M. **Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (Zea mays L.)**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 121p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- CHAUHAN, K.P.S., GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**. Zurich, v.13, n.3, p.629-41, 1985.
- CHEAH, K. S.; OSBORN, D. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing sye seed. **Nature**, London, v.272, n.5654, p. 593 - 599, Apr. 1978.

*CHERRY, J.H.; SKADSEN, R.W. Nucleid acid and protein metabolism during seed deterioration. In: McDONALD JR, M.D.; NELSON, C.J. **Physiology of seed deterioration**, CSSA, 1983. Cap.4, p.65 - 87. (Special Publication, 11).

CHERRY, J.P. Enzymes as quality indicators in edible plant tissues. In: _____. HULTIN, H.O.; MILNER, M. **Post harvest Biology and Biotechnology**. Wetport: Food and Nutrition Press, 1978. 462p.

CHRISTENSEN; LOPEZ. F. L. C. Pathology of stored seeds. **Proceeding of the International Seed Testing Association**. Copenhagen, v.28, n.4, p.701-711, 1963.

CONN, E. C.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451p.

DELL'AQUILA, A. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.3, p.293-298, Sept. 1994.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relativestorability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.427-452, 1973.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

GHOSH, B.; ADHIKARY, J.; BANERJEE, N.C. Changes of some metabolites in rice seeds during ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, n. 1, p. 468-73, 1981.

GIRALD, J.; LE MESTRE, M. Lack of relationship betwsen free radical levels determined by ESR tecnique and viability of wheat seeds. **Sciences de la vie**, v.314, n.9, p.417-422, 1992.

GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. **Annals of The Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.64, n.2, p.161-180, 1977.

GUIMARÃES, C. T. **Caracterização de populações indígenas de milho (Zea mays L.) que apresentam grãos opacos**. Viçosa: UFV, 1994. 69p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).

GUTIÉRREZ, M. G.; CRUZ, F.; MORENO, J.; GONZÁLEZ - HERNÁNDEZ, V. A.; VÁZQUEZ - RAMOS, J.M. Natural and artificial seed ageing in maize: germination and DNA synthesis. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.4, p.279-285, Dec. 1993.

JAMES, E. Preservation of seeds stocks: **Advances in Agronomy**, London, v.19, p.87-106, 1967.

JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n.3, p. 531-539, 1994.

KHAN, M. M.; HENDRY, G. A. F., ATHERTON, N. M.; VERTUCCI - WALTERS, C. W. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light - promoted process. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n.3, p. 101-107, Sep. 1996.

LARKINS, B.A.; WALLACE, J.C.; GALILI, G.; LENDING, C.R.; KAWATA, E.E. Structural analysis and modification of maize storage proteins. **Development Industrial Microbiology**, New York, v.30, p.203-209, 1989.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Palo: Sarvier, 1992, 725p.

LIN, S.S. Efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica da semente de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.10, n.3, p.59-67, 1988.

LOPES, M. A. **Genetic and biochemical characterization of the maize mutants floury-2 and modified opaque-2**. Tucson: University of Arizona, 1993. 269p. (Tese - Doutorado em Genética).

MARKERT, C.L. Biology of isozymes. In: MARKERT, C.L. (ed.). **Isozymes**. New York: Academic Press, 1983. p.1-9.

MARKERT, C.L. e MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenic, and species especific patterns. **Biochemistry**, New York, v.45, p.753-763, 1959.

McGEE, D.C. Introduction. In: Symposium on Deterioration mechanisms in seeds. Introduction - **Phytopatology**, St. Paul, v.73, n.2, p.314-317, 1983.

- * MORAHASHI, Y., BEWLEY, J.D.; YEUNG, E.C. Biogenesis of mitochondria in peanut cotyledons. Influence of the axis. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 32, n.127, p.605-613. 1981.
- * MURRAY, D.R. Axis - Cotyledon relationships during reserve mobilization. In: MURRAY, D.R. **Seed Physiology**, New York: Academic Press, 1984. n.2. 295p.
- NKANG, A. Some aspects of the biochemical basis of viability of loss in stored gukfoylia monostylis seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, n.2, p.247-260, 1988.
- OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B. Nutritive properties of protein of maize kernel. **Journal Biology Chemistry**, Madson, v.18, p.1-16, 1914.
- PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo. In: _____. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.343-364.
- RAJAGOPAL, A.S.M.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.2, p.21-222, 1992.
- REUZEAN, C.; GOFFNER, D.; CAVALIE, G. Relation between protein composition and germination capacity of sunflower seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.4, p.223-230, Dec. 1992.
- RODRÍGUEZ, P.M. **Actividad de a-amilasa en aleuomas de semillas de trigo deterioradas**. México: UNAM, 1991. 87p. (Tesis - Maestría en Ciências).
- * ROBERTS, E.H. Loss of viability: utrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.529-545, 1973.
- SHATTERS JR., ABDEL-GHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: Changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.33-41, Marc. 1994.
- THRONEBERRY, G.O., SMITH, F.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. **Plant Physiology**, New York, v.30, n.4, p.337, Jul. 1955.

- TRAWATHA, S.E.; TEKRONY, D.M.; HILDEBRAND, D.F. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. **Crop Science**, Madison, v.35, n.3, p. 862-868, May/Jun.1995.
- TSAI, L.Y. Genetics of storage protein in maize, In: JANICK, J. (ed.). **Plant breeding reviews**. Westport: AVI. Publishing, 1983. v.1, p.103-138.
- * TYAGI, C.S. Evaluating viability and vigour in soybean seed with automatic seed analyzer. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.687-694, 1992.
- VANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; McDONALD JR, M.B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, New York, v. 102, n.1, p. 33-39, 1987.
- VARIER, A.; DADLANI, M. Effects of ageing on profiles of soluble protein of cotton and esterase isoenzymes of pearl millet seeds. **Indian Journal of Plant Physiology**, London, v.35, n.2, p.145-151, 1992.
- * VÁZQUEZ, E.; MONTIEL, F.; VÁZQUEZ - RAMOS, J.M. DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seed to loss of germinability. **Seed Science Research**, Wallingford, v.1, p.269-273, 1991.
- VÁZQUEZ - RAMOS, J.M.; LÓPEZ, S.; VÁZQUEZ, E.; MURILLO, E. DNA integrity and DNAPolymerase activity in deteriorated maize embryo axes. **Journal of Plant Physiology**, London, v.133, p.600-604, 1988.
- VERNETTI, F. J. (Coord.). **Soja: genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. v.2, 736 p.
- * VILLIERS, T.A. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. In: HEYDECKER, W. **Seed Ecology**. Nottingham: ISA, Pennsylvania State University Press, 1973. p.265-88.
- VON PINHO, E.V.R. **Influência do Tamanho da semente e do Tratamento fungicida e inseticida na preservação da Qualidade de sementes de milho durante o Armazenamento e seu Comportamento no campo**. Lavras: ESAL, 1991. 112p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).

WESTERMEIER, R.; BARNES, N.; GRONAU-CZY BOLKA, S. et al. **Electrophoresis in practice: a guide to theory and practice**. New York: VCH, 1993. 227p.

WILSON JR., D.O.; MCDONALD JR., M. B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.14, n.2, p.269-300, 1986.

* WOODSTOCK, L. W., FURRMAN, K.; SOLOMONS, T. Changes in respiratory metabolism during ageing in seeds an isolated axes of soybean. **Plant Physiology**, New York, v.25, n.1, p.15-26, May. 1984.

—> ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FURIHATA, Y.; NAKAMAR, Y.; ESASHI, Y. A mechanisn of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.49-56, Mar. 1994.

4 CAPÍTULO I

**Variações Eletroforéticas de Proteínas e Isoenzimas Relativas a Deterioração
de Sementes de Milho Envelhecidas Artificialmente.**

RESUMO

Brandão Jr, Delacyr da Silva. **Variações eletroforéticas de proteína relativas a deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente.** Lavras-MG, 1996. 110p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Análise e Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, com o objetivo de selecionar frações de extração de proteínas e sistemas de isoenzimas que permitissem visualizar variações em perfis eletroforéticos de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração. Foram utilizados dois lotes de sementes das cultivares AG-122 e C-901 envelhecidas artificialmente em mini-câmaras adaptadas, sob ambiente de 42°C e 100% UR, por períodos de zero, 48, 96 e 144 horas. Após o envelhecimento, as sementes tiveram seu perfil determinado pelos testes de germinação, primeira contagem, emergência, envelhecimento acelerado, teste de frio, condutividade elétrica, sanidade, exame de sementes infestadas, detecção de danos mecânicos e do grau de umidade.

Para extrações de proteína das sementes foram testados os tampões Tris-HCl para proteína total, Hepes sobrenadante para proteína solúvel e Hepes "pellet" para extração da fração de proteína de armazenamento.

Na análise isoenzimática, os géis foram revelados para os sistemas; desidrogenases (álcool, glutamato, malato e sorbitol desidrogenase), que participam na atividade respiratória da semente; glutamato-oxaloacetato transaminase, devido a sua participação no processo de síntese e degradação de aminoácidos e outras enzimas ligadas a processos de alterações de fosfolípidos de membrana (esterase, peroxidase e fosfatase ácida).

Os resultados obtidos revelaram que variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de milho. O extrator Hepes proporciona melhor resolução na avaliação do nível de deterioração de semente e as enzimas glutamato - oxaloacetato transaminase e sorbitol desidrogenase, podem ser consideradas promissores marcadores bioquímicos para avaliação de qualidade de sementes de milho em estádios iniciais de deterioração.

ABSTRACT

Electrophoretical Variations of Protein Relative ToThe Deterioration of Artificially Aged Corn Seeds.

The present work was developed in the laboratories of Seed Analysis and Seed Pathology at the Universidade Federal de Lavras, with the purpose of screening protein extracting fractions and isoenzyme systems would allow to detect variations in electrophoretical profiles of corn seeds with different levels of deterioration. Two lots of seeds of the cultivars AG-122 and C-901 artificially aged in adapted mini chambers, under a conditions of 42°C and 100% RU, for periods of 0, 48, 96 and 144 hours. After aging, the seeds had their profile determined by the tests of germination, first count, emergence, accelerated aging, cold test, electrical conductivity, health test, exame of infested seeds, detection of mechanical damage and of moisture degree.

For the extraction of seed protein, the buffers Tris - Hcl for total protein, supernatant Hepes for soluble protein and “pellet” Hepes for extraction of the fraction storage protein were tested.

In the isoenzymatic analysis the gels were revealed for the systems; desidrogenases (alcohol, glutamate, malate and sorbitol desidrogenase), which took part in the respiratory activity of the seed; glutamate-oxilacethate transaminase, due to their participation in the process of aminoacid synthesis and degradation and of other enzymes linked to processes of changes of membrane phospholipids (sterase, peroxidase and acid phosphatase).

The results obtained revealed that the electrophoretical variations of proteins and isoenzymes are associated with the deteriorative process of corn seeds. The extractor Hepes offers better resolution in the evaluation of the level of deterioration of seeds and the enzymes glutamate-oxalacethate transaminase and sorbitol desidrogenase may be considered promissing biochemical markers for evaluating of quality of corn seeds in early deterioration stages.

4.1 INTRODUÇÃO

A perda da viabilidade da semente, com a evolução do seu processo deteriorativo, pode estar relacionada a alterações bioquímicas que conduzem a um comprometimento de suas atividades metabólicas.

Algumas mudanças deteriorativas geram desorganização e perda da integridade de membrana (Delouche e Baskin, 1973; Villiers, 1973; Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Tyagi, 1992; Khan et al., 1996), redução na capacidade de sintetizar proteínas e ácidos nucleicos (Cherry e Skadsen, 1983; Aguilar et al., 1991; Roberts, 1973; Bray e Dasgupta, 1976), danos na taxa respiratória (Murray, 1984; Morahashi, Bewley e Yeng, 1981; Pradet, 1982; Woodstock, Furrman e Solomons, 1984; Cruz-García et al., 1995), além de danos no metabolismo de DNA (Cheach e Osborne, 1978; McGee, 1983; Vázquez, Montiel e Vázquez-Ramos, 1991; Coello e Vázquez-Ramos, 1996).

Variações eletroforéticas na composição protéica e de enzimas específicas, podem ser uma eficiente ferramenta na determinação de mudanças bioquímicas resultantes do processo deteriorativo. (Chauhan, Gopinathan e Babu, 1985; Carraro, 1990).

Cada alteração na composição protéica e/ou na atividade enzimática dos diferentes processos metabólicos da semente detectada pela técnica de eletroforese pode servir como um marcador molecular indicativo da perda de qualidade.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de selecionar frações de extração de proteínas e sistemas de isoenzimas que permitam verificar variações de perfil eletroforético em sementes de milho com diferentes níveis de deterioração, e de verificar a possibilidade da utilização de padrões protéicos e isoenzimáticos como indicadores da qualidade fisiológica de sementes.

4.2 Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido nos Laboratórios de Sanidade e Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras (MG), no período de julho à dezembro de 1995.

Foram utilizadas sementes de milho das cultivares AG-122, produzidas pela Empresa de Sementes Agrocere, provenientes de Patos de Minas (MG) e C-901 produzidas pela Empresa de Sementes Cargill, provenientes de Santa Helena de Goiás (GO). A cultivar AG -122 é um híbrido duplo, precoce (864 U.C.), porte médio, de grão semidentado amarelo, enquanto a cultivar C-901 é um híbrido simples super-precoce (790 U.C.), porte baixo de grão semidentado amarelo.

Após expurgo, as amostras de sementes das duas cultivares foram homogeneizadas, divididas em subamostras e envelhecidas artificialmente à temperatura de 42°C e 100% UR, conforme método do gerbox adaptado, descrito por Tao (1980), pelos períodos de zero, 48, 96 e 144 horas, a fim de se obter amostras com diferentes níveis de qualidade.

Foram selecionadas frações de extração de proteína (total, solúvel e de armazenamento) e sistemas de revelação de isoenzimas que possibilitassem a visualização de alterações de padrões eletroforéticos em sementes de milho com diferentes níveis de qualidade. Para a verificação do nível de qualidade, após o envelhecimento artificial, as sementes foram submetidas a avaliações de qualidade física, sanitária e fisiológica através dos seguintes testes e determinações:

4.2.1. Qualidade das Sementes

4.2.1. 1. Qualidade física das sementes

- Determinação do grau de umidade

Foi efetuada pelo método da estufa $105^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, utilizando-se duas repetições para cada cultivar, conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em percentagem média por cultivar.

- Identificação de sementes com injúrias mecânicas.

Para identificação das sementes danificadas foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes imersas em solução do corante Amaranth a 0,1%, durante 2 minutos. Após esse período as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas quanto a presença de danos através da verificação de áreas coloridas pelo corante. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes injuriadas.

4.2.1.2. Qualidade sanitária das sementes

- Exame de sementes infestadas

Para este teste foram utilizadas 2 repetições de 100 sementes cada, examinadas quanto a presença de ovo, larva, lagarta, pupa, inseto adulto ou orifício provocado por este. O exame das sementes foi feito individualmente, com secção longitudinal. Para facilitar a execução dos cortes, as sementes foram imersas em água pelo período de 24 horas, segundo Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

- Teste de sanidade

O teste de sanidade foi conduzido pelo método do papel de filtro com congelamento, conforme metodologia descrita por Neergaard (1977).

Oito repetições de 25 sementes por amostra, foram acondicionadas em caixa gerbox contendo 2 folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada. A seguir, as caixas contendo as sementes foram incubadas em ambiente controlado, temperatura de

20±2°C, em regime de alternância de luz negra e escuro em ciclos de 12 horas. Após as primeiras 24 horas de incubação, as sementes foram mantidas em freezer à temperatura de -18 a -20°C por 24 horas e posteriormente colocadas no ambiente de incubação até completar 7 dias, quando então foram avaliadas. A identificação dos patógenos foi efetuada com o auxílio de lupa estereoscópica, de acordo com as características morfológicas de seu crescimento sobre as sementes e através de lâminas feitas do mesmo material e examinadas ao microscópio composto.

4.2.1.3. Qualidade fisiológica das sementes

- Teste padrão de germinação

O teste de germinação foi realizado com quatro subamostras de 50 sementes para cada uma das quatro repetições dos tratamentos, semeados em papel toalha no sistema rolo, umedecido com água na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos contendo as sementes foram mantidos em germinador regulado à temperatura constante de 25°C. As avaliações foram feitas seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

- Primeira contagem de germinação

A primeira contagem de germinação foi efetuada aos 4 dias após semeadura, computando-se as plântulas normais conforme metodologia descrita por Popinigis (1985).

- Teste de envelhecimento artificial

Com quatro subamostras de 50 sementes, para cada uma das quatro repetições dos tratamentos, o teste de envelhecimento artificial foi instalado pelo o método do gerbox adaptado, descrito por Tao (1980) à temperatura de 42°C em estufa incubadora por 96h. Após esse período foi efetuado o teste de germinação como descrito anteriormente, com contagens de plântulas normais aos 7 dias após semeadura.

- Teste de frio

O teste de frio foi conduzido com quatro repetições de 100 sementes de cada tratamento e instalado em caixas plásticas (60x30x10cm) contendo uma mistura de areia e solo proveniente de área cultivada com milho, nas proporções respectivas, em peso, 2:1. Foi adicionada água até que fosse atingida 60% da capacidade de campo de substrato.

As caixas contendo as sementes permaneceram em câmara fria (10°C) por sete dias e, posteriormente, foram mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 25°C por sete dias, quando foi avaliada o percentual de plântulas imersas.

- Teste de tetrazólio

Para a realização deste teste foram utilizadas 8 repetições de 25 sementes, por tratamento, pré condicionadas em água por 16 horas à temperatura de 25°C. Após este período, as sementes foram seccionadas longitudinalmente com auxílio de uma lâmina e imersas em solução de cloreto 2,3,5, trifenil tetrazólio à 0,1%. As sementes permaneceram submersas nesta solução por um período de 4 horas à uma temperatura de 25°C em ambiente escuro, quando então foram lavadas em água corrente e submetidas à avaliação.

Para a avaliação das sementes seguiu-se a metodologia descrita por Kryzanowski (1991), onde foi feita a classificação das sementes pelo sistema de notas de 1 a 8. Na categoria de 1 a 3 computaram-se as sementes vigorosas, de 1 a 5 foram enquadradas as sementes viáveis e nas classes 6 a 8 as sementes mortas. Os resultados do teste foram expressos em porcentagem.

- Teste de condutividade elétrica

O teste foi efetuado com 25 sementes escolhidas com auxílio de 1 lupa (10x) aparentemente isentas de danos mecânicos, e posteriormente pesadas com precisão de 0,01g. A seguir as sementes foram, colocadas em copos plásticos contendo 75ml de água deionizada. Permanecendo em embebição à temperatura constante de 25°C. Decorridas 24 horas, foi efetuada a leitura de condutividade elétrica da solução, utilizando condutivímetro marca Digimed modelo CD 21A. Os resultados obtidos foram expressos em micro-mhos por grama.

- Índice de velocidade de emergência

A determinação do índice de velocidade de emergência foi efetuada em canteiros, contendo uma mistura de areia+terra na proporção de 1:1; previamente desinfestada com brometo de metila. Utilizou-se 4 repetições de 50 sementes/amostras semeadas manualmente, em linhas de um metro de comprimento, à profundidade de 3 cm. No decorrer do teste foram realizadas regas diárias. A velocidade de emergência foi determinada anotando-se o número de plântulas com mais de 2 cm de comprimento emergidas a cada dia a partir da data de início da emergência até a completa estabilização do estande. O índice de velocidade de emergência foi estabelecido segundo critérios de Maguirre (1962).

- Emergência em canteiro

O teste de emergência em canteiro foi conduzido conjuntamente com o índice de velocidade de emergência, com contagem única, das plântulas emergidas, aos 21 dias após semeadura conforme recomendações de Popinigis (1985).

4.2.1.3.1. Análise eletroforética

Foram efetuadas análises eletroforéticas de proteínas e isoenzimas das sementes e dos fungos de maior incidência nas sementes. Para análise eletroforética de proteínas e isoenzimas foram utilizadas amostras de 100 sementes liofilizadas e trituradas a frio em moinho refrigerado. O pó obtido foi armazenado em freezer a -18°C .

Os fungos presentes nas sementes (*Aspergillus flavus*, *Penicillium spp*, *Fusarium moniliforme*), detectados pelo "blotter test", foram isolados em meio BDA e mantidos por 7 dias sob regime de alternância de luz e escuro em ciclos de 12 horas à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após este período, um disco do meio com o micélio do fungo foi transferido para meio líquido sob agitação (Millis et al., 1992). Foram efetuadas as curvas de crescimento dos fungos segundo descrição de Alfenas et al. (1991).

Após o período de incubação o micélio foi coletado a vácuo, liofilizado e macerado em nitrogênio líquido. O pó micelial obtido foi armazenado em freezer a -18°C .

Para a avaliação das frações de extração de proteína foram utilizadas sementes, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento artificial e cultura axênica dos fungos. Para extração de proteína foram testados os seguintes métodos de fracionamento:

= Extração de proteína total

Foram utilizados 50mg do pó da semente moída no qual foi adicionado 950 μ l do tampão de extração (62,5mM Tris, 2,3% SDS, 5% β mercaptoetanol e pH 6,8) e 50 μ l de β mercaptoetanol em tubo eppendorf. Em seguida os tubos foram agitados em Vortex de 10 em 10 minutos por 1 hora à temperatura ambiente, centrifugados à 6000xg por 10 minutos e recolhido o sobrenadante.

= Extração de proteína solúvel

Foram utilizadas 200mg do pó da semente moída e 1000 μ l de tampão de extração(100mM Hepes e pH 7,0) em tubo eppendorf. Os tubos de reação foram incubados em gelo por 20 minutos sob constante agitação. Em seguida foram centrifugados a 14000xg a 4°C por 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e a este foi adicionado um volume igual de tampão Tris (50mMTris, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β me e pH 6,8) duas vezes concentrado.

= Extração da proteína do "pellet" (armazenamento)

Ao "pellet" da reação de extração de proteína solúvel adicionou-se 1000 μ l de tampão de extração Tris (1x). As amostras foram fervidas por 5 minutos, centrifugadas a 14000xg a 4°C por 5 minutos e recolhidos os seus sobrenadantes.

A avaliação da extração da fração de proteína foi feita sob eletroforese SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8.9.

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

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

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

Na análise isoenzimática, a extração foi efetuada adicionando a 100 mg do pó da semente e ou ao pó micelial 200 μ l do tampão de extração (0,2M Tris, 0,1% β mercaptoetanol, 0,4% PVP, 0,4% PEG, 1mM EDTA). O homogeneizado foi incubado em gelo por 24 horas e centrifugado a 14000 xg a 4°C por 60 minutos. Posteriormente 20 μ l do sobrenadante de cada tratamento foram aplicados nos géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador). As corridas foram desenvolvidas a 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador. Após as corridas os géis foram revelados para os sistemas isoenzimáticos: álcool desidrogenase (ADH), glutamato desidrogenase (GDH), malato desidrogenase (MDH), sorbitol desidrogenase (SDH), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP) e peroxidase (PO), de acordo com metodologia descrita por Alfenas et al. (1991) em função das suas participações nos processos de deterioração das sementes.

4.2.2. Procedimento Estatístico

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x4) com 4 repetições, com exceção da determinação do grau de umidade, onde foram utilizadas 2 repetições.

Os dados percentuais foram transformados em $\text{arc. sen } \sqrt{x/100}$, sendo realizada análise de variância para todos os parâmetros analisados, menos para análise eletroforética.

Para comparação entre médias dos híbridos dentro dos tempos de envelhecimento, foi utilizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para comparação do efeito dos tempos de envelhecimento sobre os híbridos foi empregado o estudo de regressão polinomial.

4.3 Resultados e Discussão

O resumo da análise de variância dos dados obtidos nas avaliações da qualidade fisiológica de sementes de milho (Tabela 1A e 2A) revelou efeitos significativos de cultivares, à exceção dos parâmetros índice de velocidade de emergência, teste de frio, tetrazólio potencial de germinação e *Aspergillus flavus*. As avaliações efetuadas pelo teste de frio e dano mecânico não detectaram efeito significativo para o fator tempo de envelhecimento e em relação a interação cultivares x tempo de envelhecimento; apenas os testes condutividade elétrica e primeira contagem de germinação mostraram efeitos significativos.

Os testes determinantes da qualidade fisiológica, com exceção de tetrazólio viabilidade, índice de velocidade de emergência e teste de frio, detectaram ser o lote da cultivar C-901 de qualidade estatisticamente superior em relação ao lote da cultivar AG-122 (Tabela 1).

Pode ser observada ainda pelos testes uma diminuição significativa (Tabela 4) através do uso do intervalo de confiança da viabilidade das sementes com o aumento do tempo de envelhecimento (Figuras 1 a 4), sendo consideradas de qualidade superior as sementes não envelhecidas, seguidas pelas sementes envelhecidas por 48, 96 e 144 horas, respectivamente. Este resultado permite concluir que os tempos de envelhecimento foram suficientes para obtenção de lotes de diferentes níveis de qualidade.

TABELA 1 - Valores médios obtidos da avaliação de diferentes testes da qualidade fisiológica de sementes de milho de duas cultivares, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1995.

CULTIVARES	TESTES						
	Germinação Padrão(%)	Emergência Canteiro(%)	Envelhecimento Acelerado(%)	Teste de Frio(%)	Tetrazólio Vigor(%)	Tetrazólio Germinação(%)	Velocidade Emergência
C-901	76.3 a	74.9 a	29.0 a	51.5 a	64.4 a	71.6 a	3.32 a
AG-122	64.8 b	68.1 b	17.9 b	36.8 b	55.4 b	67.2 a	3.11 a
Coef. de Variação	5.45	5.88	14.95	10.40	8.96	7.65	9.97

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade

Para o grau de umidade antes do envelhecimento artificial, não houve diferença significativa pelo teste F entre as cultivares utilizadas (Tabela 1). Marcos Filho, Cícero e Silva (1987) ressaltam a importância de que, para se obter em resultados confiáveis neste teste, é necessária a uniformização do grau de umidade das sementes antes do início deste, uma vez que, quanto mais úmidas estiverem, maiores serão os efeitos deletérios deste envelhecimento.

Quanto ao dano mecânico, a cultivar C-901 apresentou uma maior incidência quando comparada com a cultivar AG-122 (Tabela 2). Apesar dos danos mecânicos contribuírem para a redução de viabilidade de sementes (Bewley e Black, 1985), a maior incidência destes na cultivar C-901 não implicou em sua menor viabilidade, quando comparada com a cultivar AG-122, como mostra a Tabela 1. Isto pode ser explicado, uma vez que o efeito do dano pode ser afetado pela sua localização e intensidade (Carvalho et al., 1994; Brandão Jr et al., 1995), parâmetros estes não considerados na avaliação efetuada neste trabalho.

Os resultados obtidos para qualidade sanitária revelam a maior incidência nas sementes de três espécies de fungos: *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp*, *Fusarium moniliforme*.

As cultivares estudadas não diferiram entre si, pelo teste F, quanto a incidência de *Aspergillus flavus* e apresentaram diferença significativa quanto a *Penicillium spp* e *Fusarium moniliforme* (Tabela 2A), sendo que a cultivar C-901 teve uma maior média de incidência de *Penicillium spp*, enquanto a cultivar AG-122 apresentou uma maior incidência de *Fusarium moniliforme* (Tabela 2).

Tanto as espécies de *Aspergillus spp* como as de *Penicillium spp* exercem um importante papel no processo deteriorativo, durante o armazenamento de sementes (Neergaard, 1977; Berjak, 1987; Moreno-Martinez et al., 1994), causando reduções parciais e/ou totais da viabilidade, descoloração, apodrecimento e aquecimento da massa de sementes, com consequente

aumento da taxa de respiração e com isso um aumento da velocidade de deterioração. (Machado, 1988; Wetzel, 1987). Já o *Fusarium moniliforme* é um patógeno de campo, transmitido pela semente (Machado, 1988) e pode causar podridão desta antes da germinação, ou morte prematura de plântulas (Barton, 1985; Von Pinho, 1991; Carvalho, 1992).

Com o envelhecimento das sementes, foi observado pela Figura 6 um aumento da incidência de *Aspergillus flavus* e uma diminuição da de *Penicillium spp* e *Fusarium moniliforme*, independente da cultivar utilizada (Tabela 2A). Isto pode ser explicado pelas condições de alta temperatura e umidade a que foram submetidas as sementes durante o envelhecimento artificial, favorecendo o desenvolvimento do *Aspergillus flavus*.

Quanto á infestação das sementes por pragas de armazenamento, pode ser observado pela Tabela 2 que apesar das duas cultivares diferirem entre si, pelo teste F quanto a incidência destes insetos, as percentagens de ocorrência foram extremamente baixas, com a cultivar C-901 não apresentando infestação e a AG-122 apresentando infestação média inferior a 0,5%.

TABELA 2 - Valores médios obtidos na avaliação da qualidade física e sanitária de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras-MG, 1995.

CULTIVARES	Dano Mecânico(%)	<i>Penicillium spp</i> (%)	<i>Fusarium moniliforme</i> .(%)	Sementes Infestadas (%)
C-901	61.8 a	46.6 a	26.6 b	0.0 b
AG-122	41.8 b	31.9 b	36.7 a	0.4 a
CV(%)	4.95	21.77	20.74	80.00

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não deferiram entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3 - Efeito dos diferentes tempos de envelhecimento artificial, sobre a qualidade fisiológica de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901. UFLA, Lavras - MG, 1995.

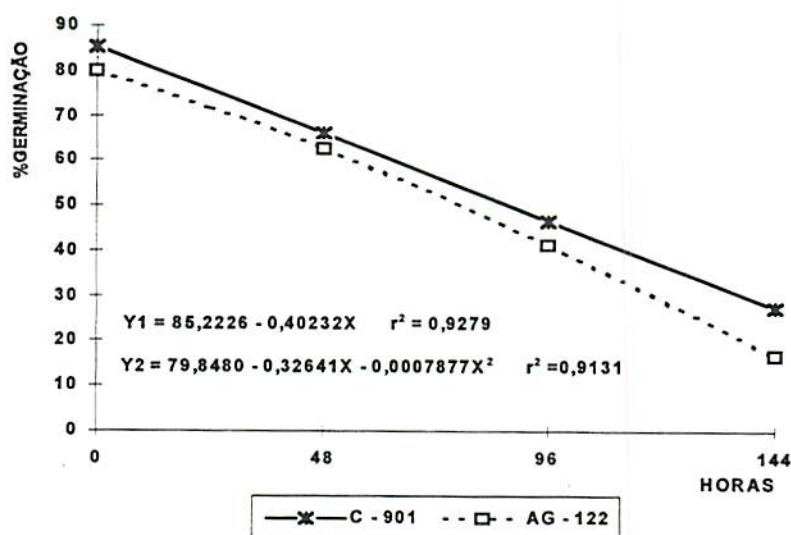
HORAS	CULTIVARES	TESTES	
		Primeira contagem(%)	Condutividade elétrica(μmhos/g)
0	C-901	98.1 a	16.00 a
	AG-122	94.6 b	11.75 a
48	C-901	92.7 a	15.75 a
	AG-122	90.6 a	12.25 a
96	C-901	39.5 a	21.50 b
	AG-122	27.2 b	30.25 a
144	C-901	24.4 a	31.25 b
	AG-122	11.4 b	46.00 a
Coef. de variação(%)		4.64	15.18

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 4 - Intervalo de confiança de 95% para valor predito dentro de cada teste da qualidade fisiológica, nos diferentes tempos de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Horas	TESTES					
	Germinação Padrão(%)	Tetrazólio Germinação(%)	Envelhecimento Acelerado(%)	Teste de Frio(%)	Tetrazólio Vigor(%)	Emergência em Canteiro (%)
0	99.8 [98.8; 99.9]	99.8 [99.0; 99.8]	56.9 [47.3; 65.4]	78.4 [72.1; 84.2]	99.4 [97.0; 100.0]	99.5 [96.3; 99.8]
48	85.1 [81.9; 88.1]	84.3 [79.7; 88.5]	33.6 [28.1; 39.4]	60.8 [55.2; 62.2]	78.5 [73.0; 83.4]	87.7 [81.2; 93.0]
96	53.8 [49.4; 58.1]	52.1 [46.0; 58.1]	14.3 [10.3; 18.7]	34.7 [29.4; 40.1]	39.9 [33.7; 46.1]	58.0 [49.0; 66.8]
144	20.6 [15.5; 26.2]	18.8 [12.2; 26.5]	2.4 [0.4; 6.0]	8.4 [4.8; 12.9]	7.6 [3.3; 13.4]	19.4 [11.0; 29.7]

Horas	TESTES			
	Velocidade de Emergência(índice)	Primeira Contagem de Germinação (%)		Condutividade Elétrica (µmhos/g)
		AG-122	C-901	
0	5.3 [4.6; 5.9]	94.6 [90.1; 97.8]	98.1 [95.1; 99.7]	10.8 [3.7; 17.8]
48	4.3 [3.8; 4.8]	90.6 [86.4; 94.1]	92.7 [89.0; 95.7]	15.2 [9.8; 20.6]
96	2.7 [2.2; 3.2]	27.2 [21.6; 33.3]	39.5 [33.2; 46.0]	27.3 [21.9; 32.7]
144	0.6 [0.0; 1.3]	11.4 [6.5; 17.5]	24.4 [17.4; 32.2]	47.0 [39.9; 54.0]



FIGURAS 1. Efeito do tempo de envelhecimento sobre a germinação de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, detectada pelo teste de primeira contagem. UFLA, Lavras - MG, 1995.

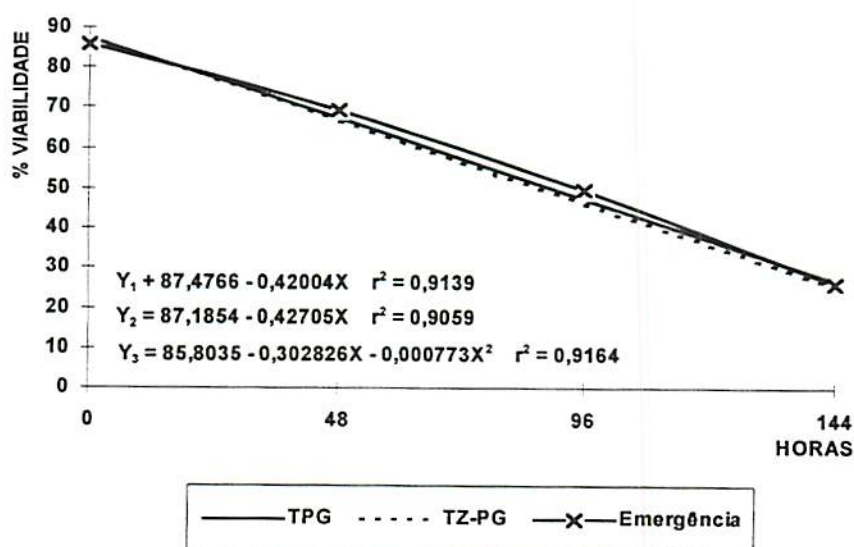


FIGURA 2. Efeito do envelhecimento artificial sobre a viabilidade de sementes de milho detectada pelos testes padrão de germinação (TPG), tetrazólio potencial de germinação (TZ - PG) e emergência em canteiro (Emergência). UFLA, Lavras - MG, 1995.

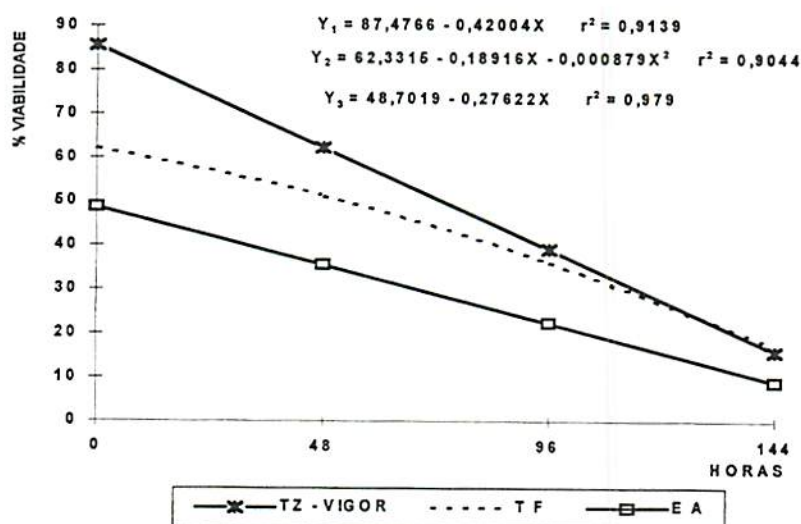


FIGURA 3. Efeito do tempo de envelhecimento sobre o vigor de sementes de milho avaliadas através dos testes de tetrazólio vigor (TZ - VIGOR) teste de frio (TF) e envelhecimento acelerado (EA). UFLA, Lavras - MG, 1995.

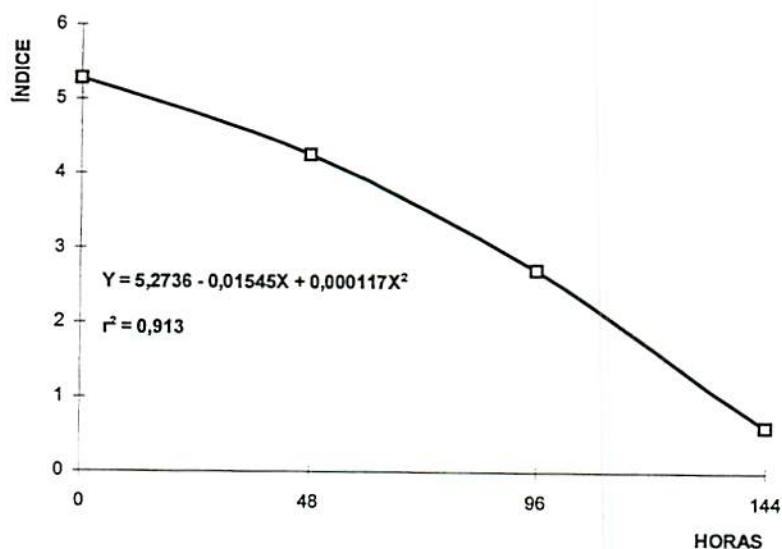


FIGURA 4. Efeito do tempo de envelhecimento sobre o índice de velocidade de emergência de sementes de milho. UFLA, Lavras - MG, 1995.

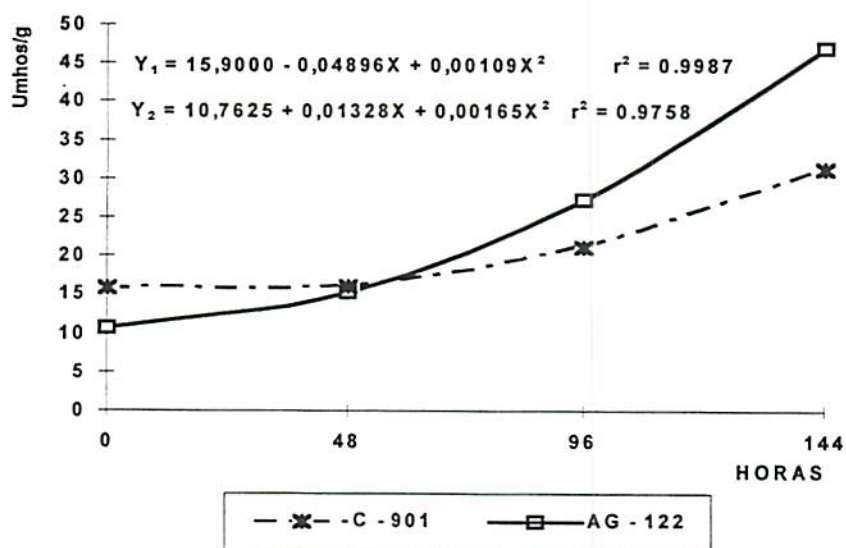


FIGURA 5. Efeito dos diferentes tempos de envelhecimento artificial sobre a condutividade elétrica de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901. UFLA, Lavras - MG, 1995.

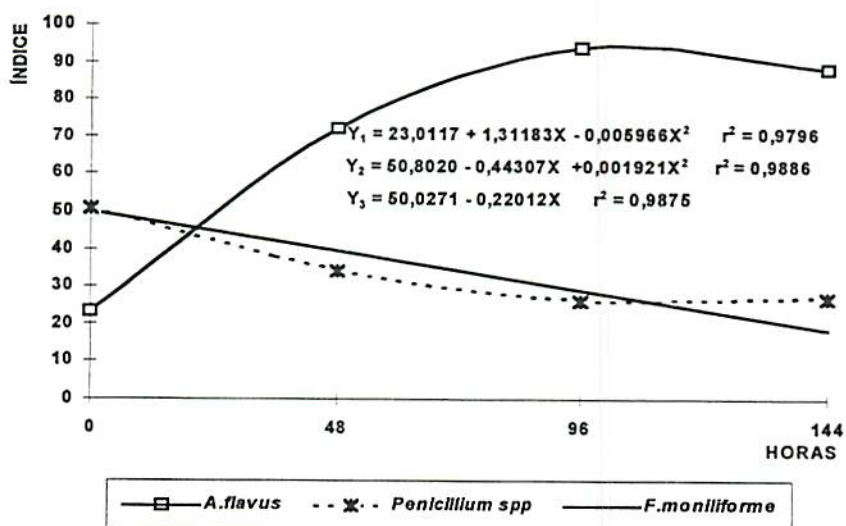


FIGURA 6. Efeito do tempo de envelhecimento na recuperação de microorganismos pelo "blotter test" em sementes de milho. UFLA, Lavras - MG, 1995.

4.2.1.3.1 Análises Eletroforéticas

- Proteínas

Os resultados da análise de variância (Tabela 5) para a quantificação de proteína pelo método Bradford, (1976) não demonstraram significância para nenhum dos 3 métodos de extração utilizados. (Tris, Hepes sobrenadante, Hepes "pellet").

Os perfis eletroforéticos das proteínas totais (Tris), solúveis (Hepes sobrenadante) e de armazenamento (Hepes "pellet") de *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp*, *Fusarium moniliforme* e sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas aos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas de envelhecimento estão apresentados nas Figuras 7, 8, 9, respectivamente.

Para as três metodologias de extração foi verificada uma diminuição no número e na intensidade de bandas com o aumento do tempo de envelhecimento, sendo estas alterações mais intensas a partir de 96 horas de envelhecimento. Estes resultados confirmam os verificados por Bilia (1992), que observou através de análise eletroforética uma diminuição da intensidade de coloração de bandas de proteínas totais do endosperma de sementes de milho, durante o armazenamento, com alterações verificadas preferencialmente na expressão de proteínas de peso molecular similar a 43 KD (ovoalbumina). Vale ressaltar que as maiores mudanças ocorreram nas proteínas solúveis, ao passo que nas proteínas de armazenamento houve apenas diminuição na intensidade de bandas, o que vai de encontro aos resultados de Chauhan, Gopinathan e Babu (1985), os quais observaram em sementes secas de soja e cevada desaparecimento de bandas de alto peso molecular e aparecimento de bandas de menor peso molecular, em função, segundo os autores, da ação de fungos de armazenamento.

No método Hepes “pellet” (Figura 9) pode ser observada a presença de bandas relativas a proteínas de reservas e de caráter enzimático. As bandas de proteína de reserva sofreram alterações apenas na sua intensidade com o aumento do tempo de envelhecimento, e consequente diminuição da viabilidade das sementes (Figuras 1 a 4). Este resultado confirma a afirmativa de Côme (1983), na qual não parece ser possível atribuir à redução de viabilidade a degradação ou exaustão de reservas de sementes.

TABELA 5 - Resumo das análises de variâncias dos dados obtidos da quantificação de proteínas extraídas pelos diferentes métodos (Tris, Sobrenadante e “Pellet”) das sementes das cultivares AG - 122 e C - 901, submetidas aos diferentes tempos de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1995.

CAUSAS		QUADRADOS MÉDIOS		
DA		PROTEÍNA (mg/μl)		
VARIAÇÃO	GL	Tris	Sobrenadante	“Pellet”
Cultivar	1	0.015460	0.403005	0.405599
Tempo	3	0.147078	0.358193	0.110366
Cul. x Tem.	3	0.163997	0.159570	0.271456
Resíduo	16	0.159899	0.289191	0.246304
Média Geral		5.1587	2.1337	3.6083
Coef. de Variação (%)		7.751	25.203	13.754

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.

A verificação de que as alterações ocorrem nas bandas relativas as proteínas solúveis reforçam o trabalho de Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), os quais observaram um decréscimo de 50% no conteúdo de proteína solúvel em água, em sementes de milho envelhecidas artificialmente por 96 horas.

- Isoenzimas

Os perfis isoenzimáticos de *A. flavus*, *Penicillium spp*, *Fusarium moniliforme* e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas aos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas de envelhecimento, revelaram (Figura 10 a 17) para a álcool desidrogenase (ADH), glutamato desidrogenase (GDH), malato desidrogenase (MDH), sorbitol desidrogenase (SDH) e peroxidase (PO), uma diminuição do número e/ou da intensidade das bandas com o aumento do tempo de envelhecimento artificial. Já os zimogramas do grupo das hidrolases apresentaram um aumento do número de bandas e a diminuição da intensidade de uma dessas bandas para a esterase, enquanto a fosfatase ácida só apresentou atividade de banda a partir do tempo de 96 horas de envelhecimento.

Destas enzimas, apenas a esterase, fosfatase ácida, peroxidase e malato desidrogenase apresentaram atividade para os fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp* e *Fusarium moniliforme*, sendo que a fosfatase não mostrou atividade para *Fusarium* e a peroxidase não apresentou atividade para *Aspergillus*.

Em relação aos resultados obtidos de qualidade fisiológica todos os testes detectaram uma perda da viabilidade das sementes com o aumento do tempo de envelhecimento. Alguns autores

correlacionaram alterações nos padrões eletroforéticos dessas isoenzimas com a viabilidade de semente. (Chauhan, Gopinathan e Babu, 1995; Bilia, 1992; Vieira, 1996).

No presente estudo foi verificada uma diminuição da intensidade de banda da álcool desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1.) (Figura 10) com o aumento do tempo de envelhecimento. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Throneberry e Smith (1955), que observaram uma correlação positiva entre viabilidade de sementes de milho e atividade de álcool desidrogenase.

A álcool desidrogenase atua no metabolismo anaeróbico de plantas, reduzindo o acetaldeído a etanol (Vantoai, Fausey e McDonald Jr, 1987). Em estudos de efeitos de voláteis endógenos no processo de deterioração de sementes Zhang et al. (1994) verificaram que 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. Com a diminuição da atividade de álcool desidrogenase a semente fica mais susceptível à ação deletéria do acetaldeído justificando com isto a perda da sua viabilidade.

A glutamato desidrogenase (GDH-EC 1.4.1.3) (Figura 11) apresentou uma diminuição da intensidade de banda com o aumento do envelhecimento nas sementes da cultivar C-901 e perda da atividade a partir de 96 horas de envelhecimento na cultivar AG 122. Satters et al. (1994) obtiveram resultados semelhantes com sementes de soja que apresentaram uma redução de 17% na atividade da GDH após 48 horas de envelhecimento e quase perda total da atividade após 96 horas. Verificaram ainda os autores uma recuperação da atividade desta enzima em tratamento de embebição para sementes envelhecidas por 48 horas, mas não para as envelhecidas por 96 horas.

A Glutamato desidrogenase está presente apenas na mitocôndria, em cuja matriz mitocondrial ela se localiza, sendo uma enzima alostérica, complexa, catalisando a deaminação oxidativa do glutamato, formando amônia e α cetoglutarato. A amônia pode ser recuperada e

reutilizada na síntese dos aminoácidos. Embora ambos os substratos sejam catalisados pela mesma enzima, o uso de duas coenzimas (NAD e NADPH) diferentes, pela glutamato desidrogenase, possibilita a regulação independente da deaminação do glutamato e da aminação do α cetoglutarato (Lehninger, 1992).

Desde que esta enzima atua na oxidação de aminoácidos (proteínas de reserva), fornecendo energia para as células (ciclo de Krebs) e/ou na redução do α cetoglutarato para síntese de aminoácidos, pode ela ter um importante papel na germinação de sementes fornecendo energia para o processo, ou aminoácidos para o desenvolvimento do embrião. A correlação entre redução da atividade da glutamato desidrogenase, (Figura 11) e a perda da qualidade fisiológica das sementes detectados pelos demais testes (Figura 1 a 5), vêm fortalecer essa hipótese. Vale ressaltar, no entanto, que as mudanças em atividade dessa enzima só ocorreram quando as sementes apresentavam uma taxa de germinação em torno de 50%.

Outra desidrogenase estudada foi a sorbitol (Figura 12), que é uma enzima oxiredutora que catalisa a reação de remoção de termos de hidrogênio do monossacarídeo sorbitol possibilitando a degradação deste monossacarídeo e obtenção de energia para célula. A exemplo dos resultados obtidos por Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), verificou-se um decréscimo gradual na atividade dessa enzima nas sementes de milho com o aumento do tempo de envelhecimento, sendo que, para a cultivar AG-122, esse decréscimo ocorreu a partir de 48 horas de envelhecimento, enquanto que, para C-901, a partir de 96 horas. Os autores afirmam que a perda de atividade de desidrogenase em sementes envelhecidas pode estar associada com seus níveis baixos de produção da ATP e uma taxa reduzida de ATP e GTP dependente da síntese de proteína.

Quanto a malato desidrogenase, os resultados deste trabalho (Figura 13) mostraram presença da banda MDH₁ para as duas cultivares, apenas para sementes envelhecidas

artificialmente pelo período de 144 horas. Para as outras isoenzimas da malato desidrogenase os padrões permaneceram praticamente inalterados. Satters et al. (1994), em estudos com sementes de soja, observaram que a atividade da isoenzima malato desidrogenase foi a menos afetada pelos tratamentos de envelhecimento.

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 através da membrana mitocondrial e fixação do CO_2 nas plantas.

Para glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT-EC 2.6.1.1.) a GOT₁ diminuiu a intensidade de coloração da banda para a cultivar AG-122 (Figura 14), a partir de 144 horas de envelhecimento artificial, e para a cultivar C-901, a partir de 96 horas. A GOT₂ para a cultivar AG-122 diminuiu a intensidade do tempo zero para 96 horas, quando então perdeu atividade. Já para a cultivar C-901 a GOT₂, perdeu uma banda do tempo zero para o tempo 48 horas a partir do qual essa isoenzima perdeu totalmente atividade. Esses resultados detectaram pequenas perdas na qualidade fisiológica das sementes (quedas percentuais em torno de 10%) detectadas pelos demais testes (Figura 1 a 5). Estes resultados diferiram dos obtidos por Chauhan, Gopinathan e Babu (1985), que observaram em soja e cevada um incremento no número de bandas com o envelhecimento das sementes. Segundo os autores essas mudanças no número de bandas são devido a um aumento na atividade metabólica com o processo de deterioração. A glutamato oxaloacetato transaminase participa da reação específica de transferência de aminogruppo de um aminoácido ao ácido α cetoglutarato para formar o ácido glutâmico e produzir o cetoácido, e reage em diferentes velocidades, com aproximadamente todos os outros aminoácidos protéicos, em uma reação reversível. Essas reações ocorrem sobretudo no citoplasma e o ácido glutâmico, ao qual a membrana mitocondrial é permeável, entra na matriz, onde pode ser novamente

transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase. Esta é, portanto, uma enzima importante no processo de degradação e síntese de proteínas (Conn e Stumpf, 1980), apresentando um importante papel na germinação de sementes, o que vem confirmar os resultados obtidos por este trabalho.

Pelo zimograma da esterase (EST-EC 3.1.1.1.1.) (Figura 15), em uma enzima envolvida em reações de hidrólise de esteres, observa-se uma diminuição da intensidade de um grupo de bandas e um aumento do número das demais bandas com o envelhecimento artificial. O aparecimento de bandas com o envelhecimento da sementes provavelmente ocorreu pela ação deteriorativa de microorganismos uma vez que bandas características de *Penicillium spp* e *Aspergillus flavus* foram revelados para a cultivar AG-122 com 144 horas de envelhecimento artificial. Bilia (1992) verificou em sementes de milho, com 8 meses de armazenamento, a supressão da atividade da esterase da posição R₄. Segundo a autora, tal fato pode ser explicado pela inibição por compostos orgânicos e carbamatos da síntese de esterase da região R₄ com a deterioração da semente. Satters et al., 1994, trabalhando com sementes de soja, observaram a perda de 77% da atividade de duas esterases após 48 h de envelhecimento e o aumento da atividade total dessa enzima com o envelhecimento. Chauhan, Gopinathan e Babu (1985), trabalhando com sementes de soja e cevada, verificaram que os padrões de bandas de esterase não estavam uniformemente presentes nos diferentes tratamentos referente aos tempos de envelhecimento artificial e que o número de bandas aumentou com o tempo de envelhecimento, e que algumas bandas eram específicas para determinado estágio de envelhecimento. Estes resultados demonstram que os padrões isoenzimáticos da esterase apresentam bandas características do processo de deterioração.

Os padrões isoenzimáticos da peroxidase (PO-EC 1.1.1.17.) (Figura 16) variaram em número e intensidade de bandas, havendo uma diminuição com o aumento do tempo de envelhecimento das sementes nas duas cultivares. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Nkang (1988) Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) e Jeng e Sung (1994), os quais verificaram um aumento da peroxidação de lipídios com a evolução da deterioração de sementes. Isto pode ser explicado pelo fato de a peroxidase ser uma enzima removedora de peróxido e a perda de sua atividade podem tornar a semente mais sensível aos efeitos de O_2 e radicais livres sobre ácidos graxos insaturados de membrana, o que provoca a degeneração destas e o comprometimento do vigor.

A fosfatase ácida (ACP-EC 3.1.3.2) (Figura 17) apresentou atividade a partir de 96 horas de envelhecimento para as duas cultivares estudadas e um aumento na intensidade de banda no tempo de 144 horas de envelhecimento. Estes resultados contradizem os obtidos com cevada (Chauhan, Gopinathan e Babu, 1985), e soja (Jeng e Sung, 1994; Chauhan, Gopinathan e Babu, 1985), nos quais a atividade da fosfatase ácida decresceu com o aumento do envelhecimento e estão de acordo com os de Rajagopal e Sen-Mandi (1992), que observaram alta atividade desta enzima em embriões de sementes de arroz envelhecidas artificialmente quando comparada com embriões de sementes envelhecidas naturalmente e não envelhecidas.

Trabalhando com sementes de milho, Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991) obtiveram resultados conflitantes em relação ao aumento de peroxidação de lipídeos e diminuição de atividade da enzima fosfatase ácida. Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), Nkang (1988), Lin (1988), Jeng e Sung (1994) relatam um aumento da peroxidação de lipídios com o envelhecimento da semente e uma vez que a fosfatase ácida atua na peroxidação de lipídios, os resultados

verificados por esses autores reforçaram os obtidos por este trabalho, podendo o aumento da peroxidação de lipídios ser explicado por um aumento da atividade da fosfatase ácida.

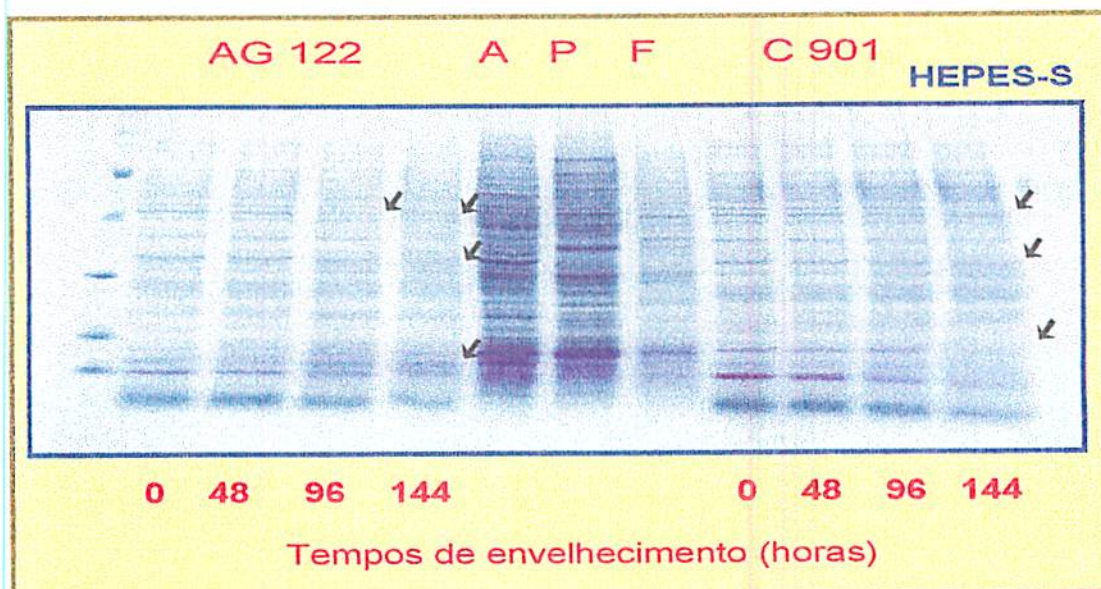


FIGURA 7. Padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium spp* (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes período de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1995.

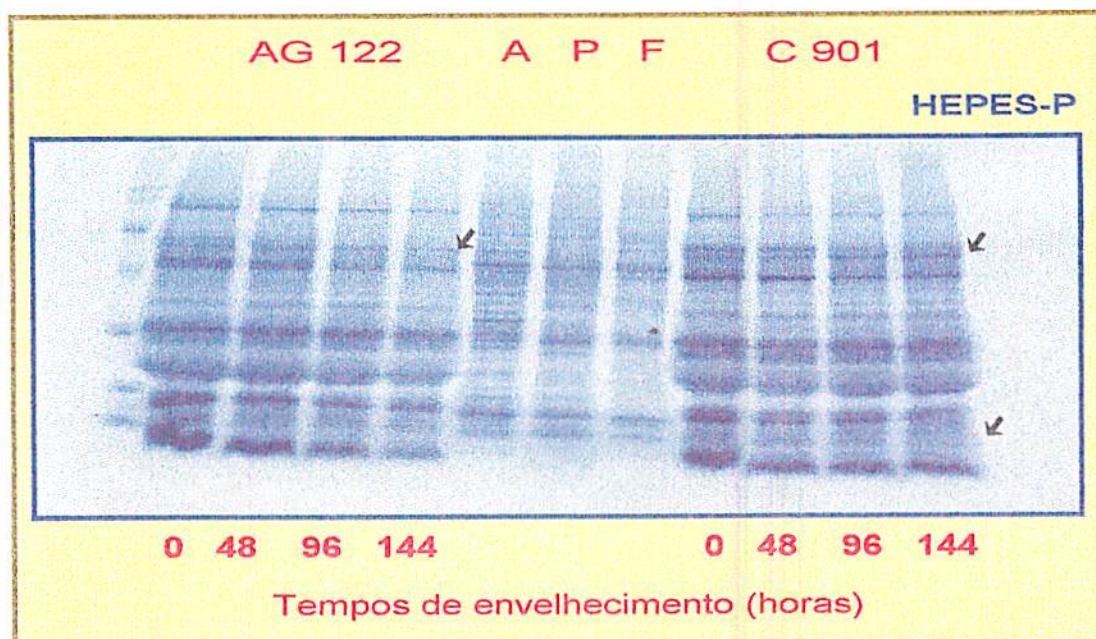


FIGURA 8. Padrões eletroforéticos de proteínas de reserva de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium spp* (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes período de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1995.

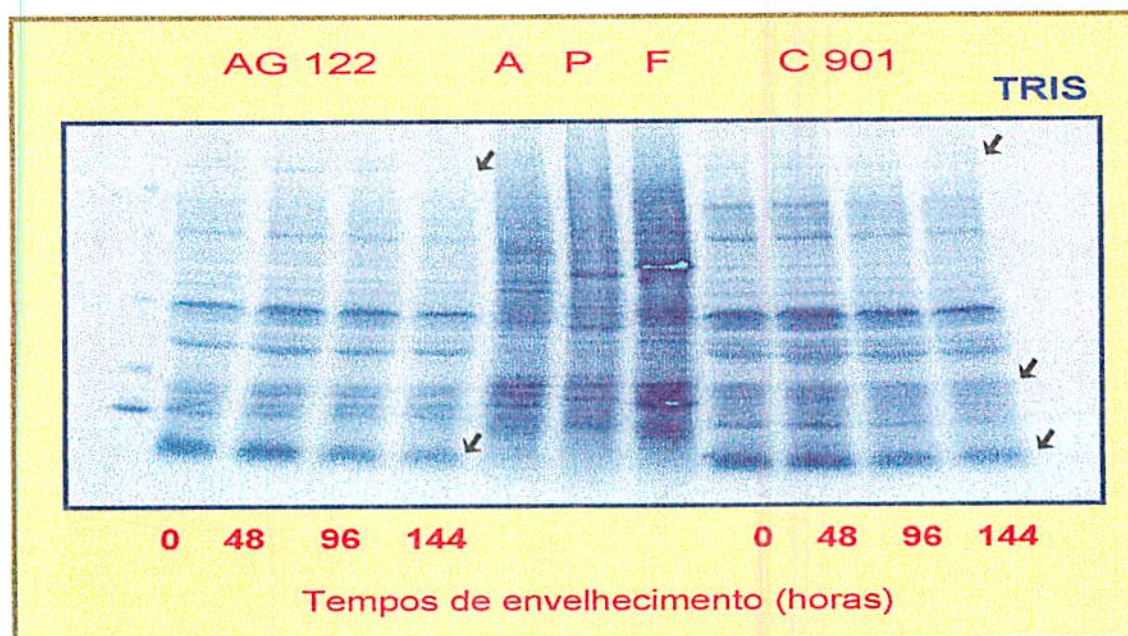


FIGURA 9. Padrões eletroforéticos de proteínas totais de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium spp* (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes período de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1995.

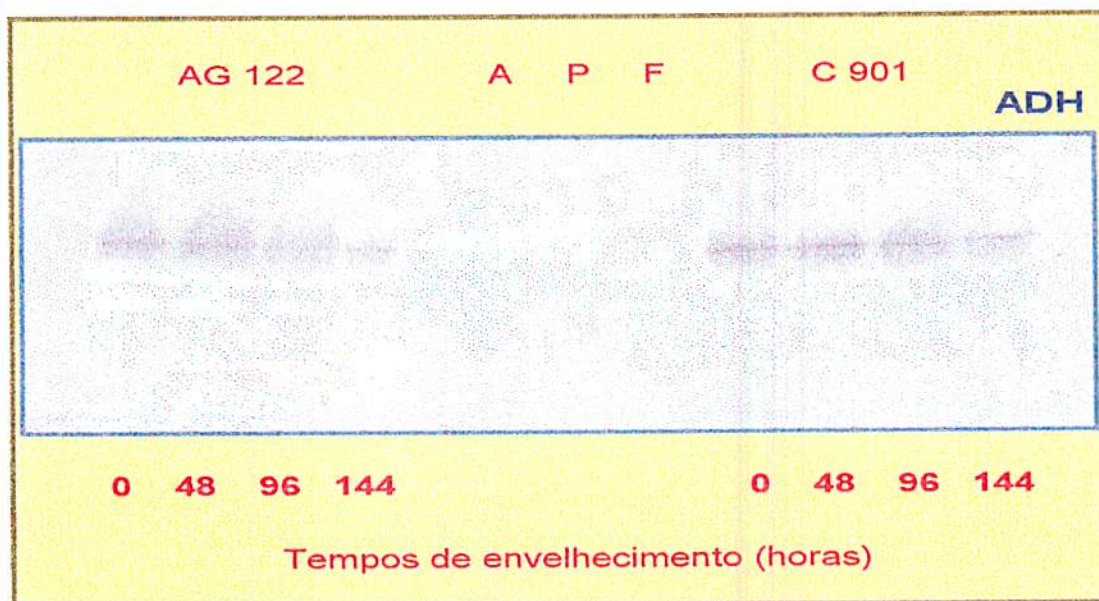


FIGURA 10. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para álcool desidrogenase (ADH). UFLA, Lavras - MG, 1995.

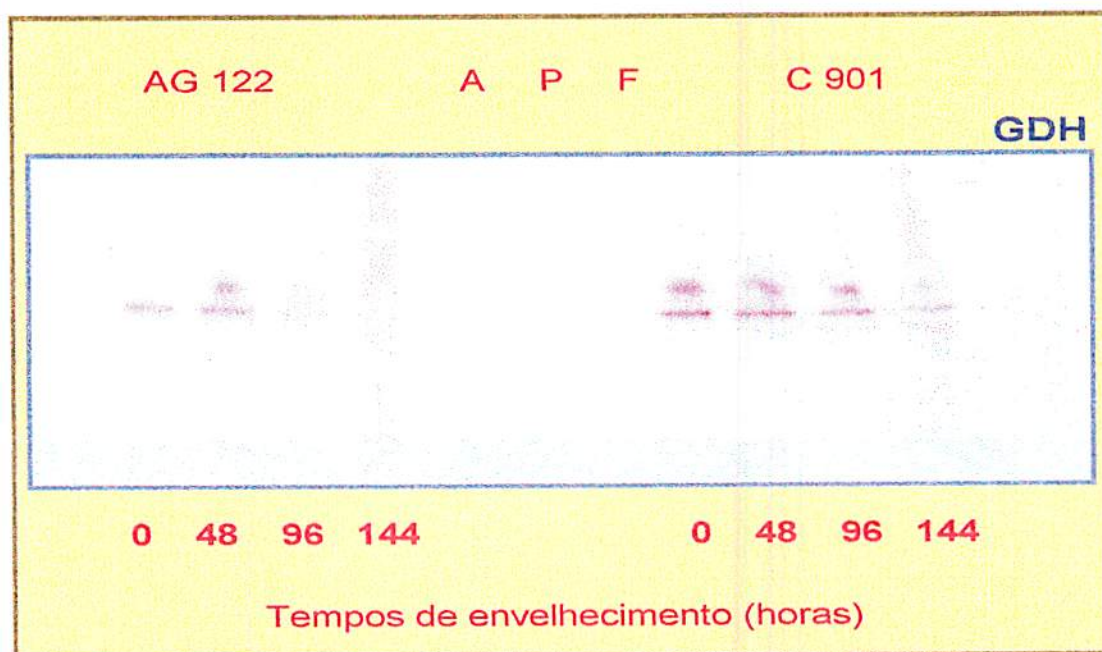


FIGURA 11. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para glutamato desidrogenase (GDH). UFLA, Lavras - MG, 1995.

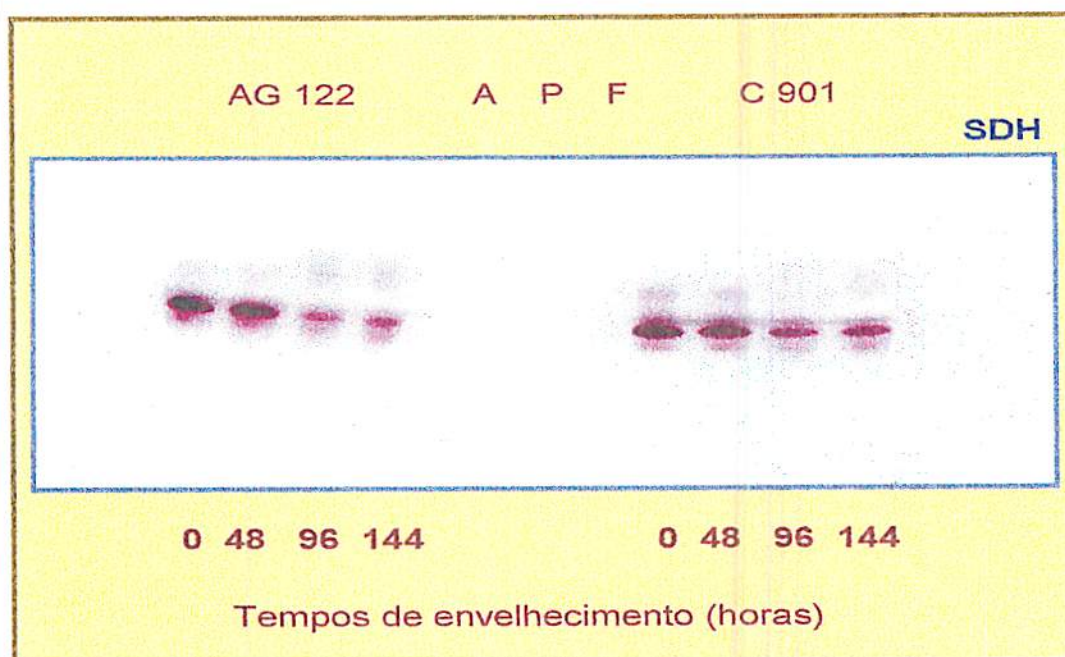


FIGURA 12. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para sorbitol desidrogenase (SDH). UFLA, Lavras - MG, 1995.

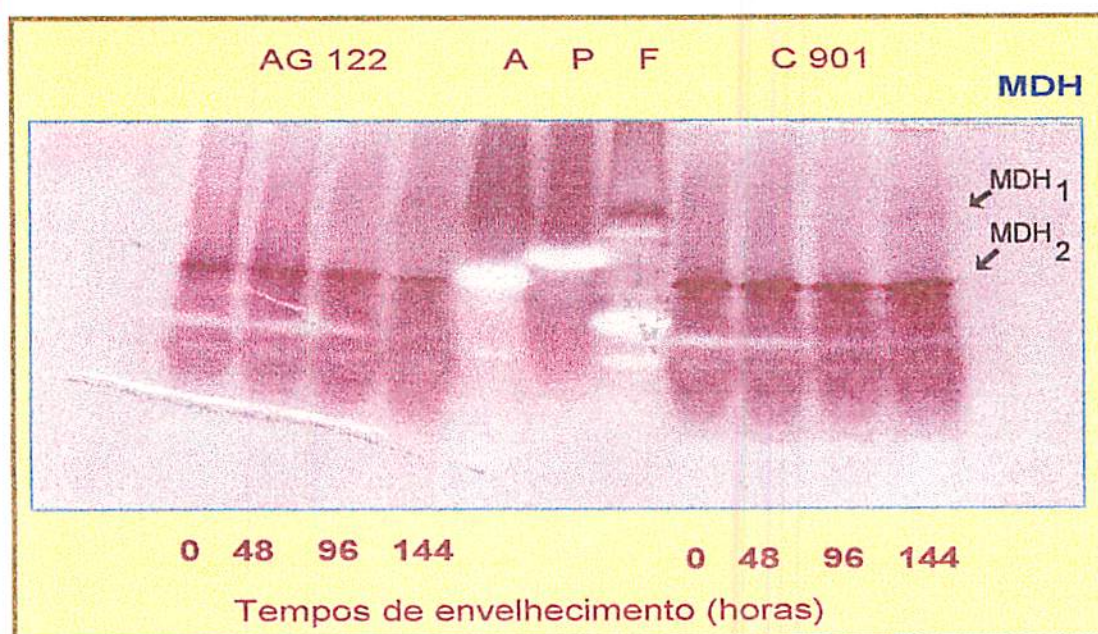


FIGURA 13. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para malato desidrogenase (MDH). UFLA, Lavras - MG, 1995.

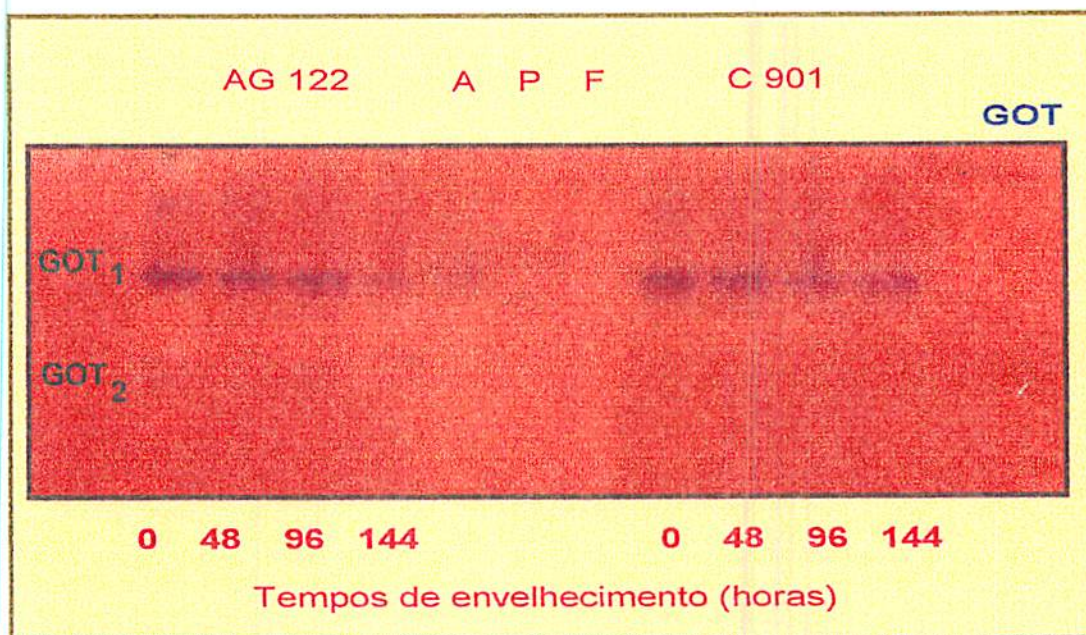


FIGURA 14. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para glutamato-oxalacetato transaminase (GOT). UFLA, Lavras.- MG, 1995.

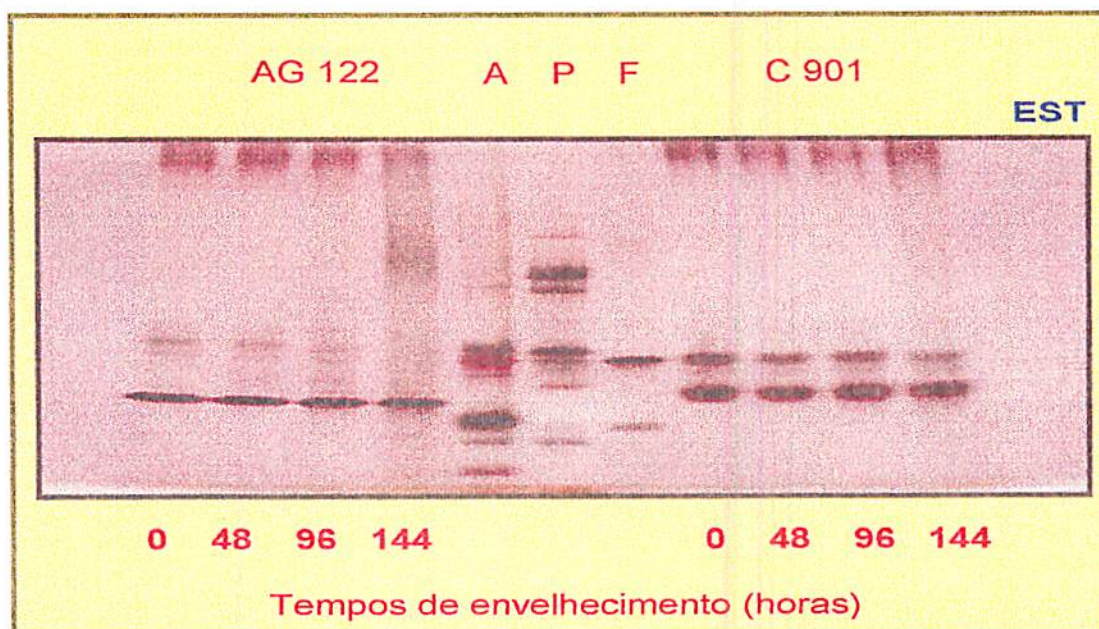


FIGURA 15. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para esterase (EST). UFLA, Lavras - MG, 1995.

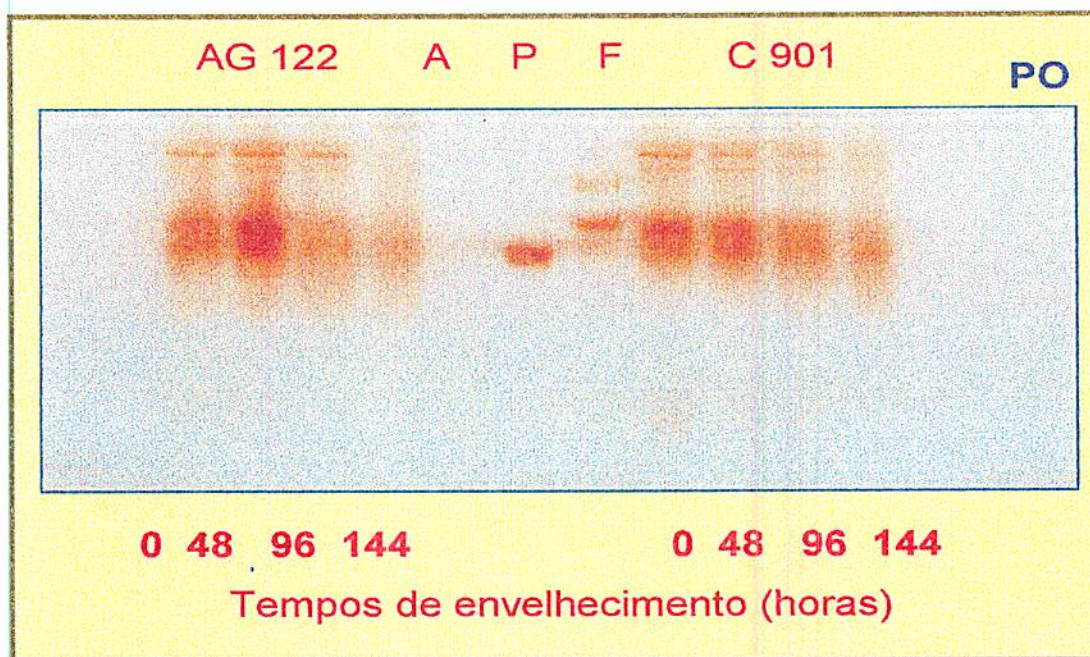


FIGURA 16. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para peroxidase (PO). UFLA, Lavras - MG, 1995.

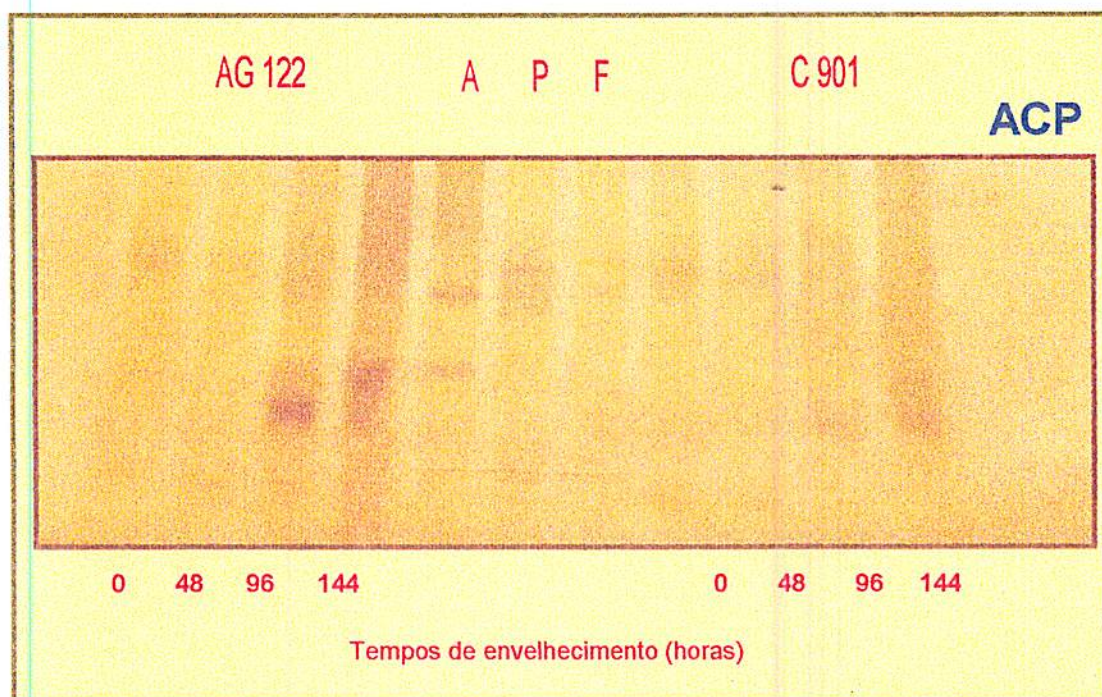
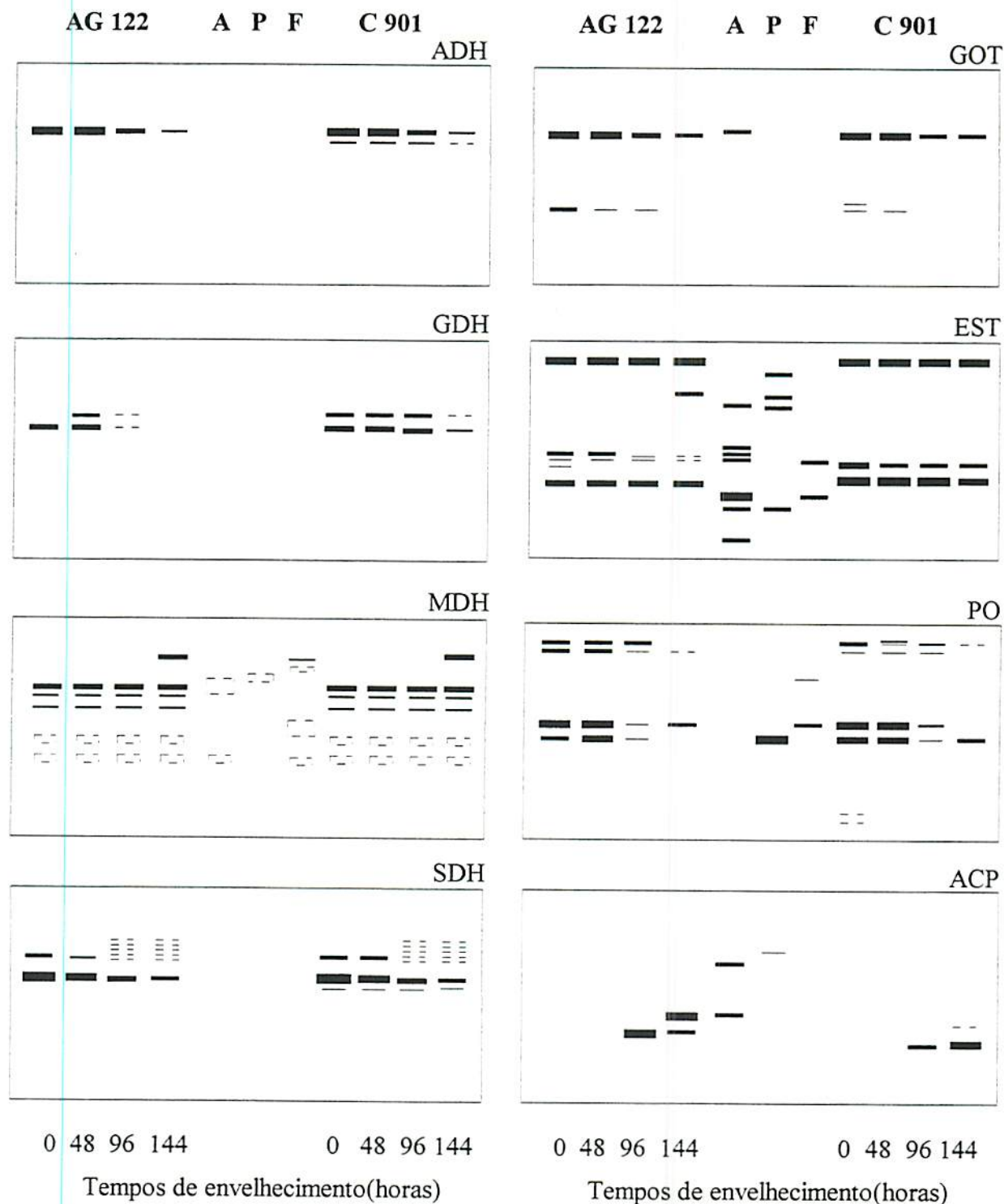


FIGURA 17. Padrões isoenzimáticos de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901 submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial, reveladas para fosfatase ácida (ACP). UFLA, Lavras - MG, 1995.

FIGURA 18. Zimogramas de isoenzimas de *Aspergillus flavus* (A), *Penicillium* spp (P), *Fusarium moniliforme* (F) e de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes períodos de envelhecimento artificial. UFLA, Lavras-MG, 1995.



4.4 CONCLUSÕES

- Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de milho.
- O extrator de proteínas solúveis Hepes, proporciona melhor resolução na avaliação do nível de deterioração de sementes de milho.
- As enzimas, glutamato-oxaloacetato transaminase e sorbitol desidrogenase, podem ser considerados promissores marcadores bioquímicos para avaliação de qualidade de sementes de milho em estádios iniciais de deterioração.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, R.; REYMOSO, E., ALBORES, M.; SANCHEZ-DE JIMENEZ, E. Changes in protein synthesis in embryonic axes after long term storage of maize seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, n.4, p.191-198, Dec. 1991.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I; BRUCE, W; PASSADOS, G.C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF,1991. 292p.
- BARTON, L.V. **Seed Preservation and longevity**. New Delhi: IBS. 1985. 216p.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n.2, p. 279-286, 1991.
- BERJAK, P. Stored seeds: The problems caused by micro-organisms (With particular reference to the fungi) In: NASSER, L.C.; WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. **Seed Pathology**. International advance course, proceedings. Brasília: Informativo Abrates, 1987. p. 38-50.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BILIA, D.A.C. **Comportamento de sementes de milho híbrido precoce e normal durante o armazenamento**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n.1, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO JR, D.S.; DINIZ, A.R.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; OLIVEIRA, J.A. Avaliação de danos mecânicos e seus efeitos na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Informativo Abrates**, Brasília, v.5, n.2, p.128, ago. 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1992. 365p.

BRAY, C. M.; DASGUPTA, D. J. Ribonucleic acid synthesis and loss of viability in pea seed. **Planta**, n.132, p.103-108, 1976.

CARRARO, D.M. **Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho** (*Zea mays* L.). Piracicaba: ESALQ, 1990. 121p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

CARVALHO, M.L.M. **Refrigeração e qualidade de sementes de milho armazenadas em pilhas com diferentes embalagens**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 98p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)

CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; OLIVEIRA, J.A.; AMARAL, E.A.; GARCIA, D.S. Utilização de corantes na determinação de danos mecânicos em sementes de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 20, Goiânia, 1994. **Anais...** Goiânia: ABMS, EMGOPA, CNPMS/EMBRAPA, UFG, EMATER-GO, 1994. p.220.

CHAUHAN, K.P.S., GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**. Zurich, v.13, n.3, p.629-41, 1985.

CHEAH, K. S.; OSBORN, D. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing sye seed. **Nature**, London, v.272, n.5654, p. 593 - 599, Apr. 1978.

CHERRY, J.H.; SKADSEN, R.W. Nucleid acid and protein metabolism during seed deterioration. In: McDONALD JR, M.D.; NELSON, C.J. **Physiology of seed deterioration**, CSSA, 1983. cap.4, p.65-87. (Special Publication, 11).

COELLO, P; VÁZQUEZ - RAMOS, M. Maize DNA polymerase 2 (an α -type enzyme) suffers mayor damage after seed deterioration. **Seed Science Research**, Wallingford, v.6, n.1, p.1-7, Mar. 1996.

- CÔME, D. Post harvest physiology of seeds as related to quality and germinability. In: _____. LIERMANN, M. **Post Harvest**, phylogy and crop preservation. New York: Plenum Press, 1983. Cap.2. p.142-165.
- CONN, E. C.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451p.
- CRUZ-GARCIA, F. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V.A.; MOLINA-MORENO J.; VÁZQUEZ-RAMOS, J.M. Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating maize. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n.2, p. 477-486, 1995.
- DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relativestorability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.427-452, 1973.
- JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Techology**, Zurich, v. 22, n.3, p. 531-539, 1994.
- KHAN, M. M.; HENDRY, G. A. F., ATHERTON, N. M.; VERTUCCI - WALTERS, C. W. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light - promoted process. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n.3, p. 101-107, Sept0. 1996.
- KRYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. O teste de vigor. **Informativo Abrates**, Brasília,v.2, n.1, p.20-27, Mar.1991.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Palo: Sarvier, 1992, 725p.
- LIN, S.S. Efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica da semente de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.10, n.3, p.59-67, 1988.
- MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fudamentos e aplicações**. Brasília: Ministério da Educação; Lavras; ESAL/FAEPE, 1988. 107p.
- MAGUIRRE, J.D. Speed of germination - aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, Mar./Apr. 1962.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes.** Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

McGEE, D.C. Introduction. In: Symposium on Deterioration mechanisms in seeds. Introduction - **Phytopatology**, St. Paul, v.73, n.2, p.314-317, 1983.

MILLIS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporoides* isolates using PCR. **Fems Microbiology Letters**, v.98, p.137-144, 1992.

MORAHASHI, Y., BEWLEY, J.D.; YEUNG, E.C. Biogenesis of mitochondria in peanut cotyledons. Influence of the axis. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 32, n.127, p.605-613. 1981.

MORENO-MARTINEZ, E.; VAZQUEZ-BADILLO, M.E.; NAVARRETE, R.; RAMIREZ-GONZALEZ, J. Effect of fungi and chemical treatment on viability of mayze and barley seeds with different storage characteristics. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, n.3, p. 541-549, 1994.

MURRAY, D.R. Axis - Cotyledon relationships during reserve mobilization. In: MURRAY, D.R. **Seed Physiology**, New York: Academic Press, 1984. v.2. 295p.

NEERGAAR, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 1977. 1191p.

NKANG, A. Some aspects of the biochemical basis of viability of loss in stored gukfoylia monostylis seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, n.2, p.247-260, 1988.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

PRADET, A. Oxidative phosphorylation in seeds during the initial phases of germinatin In: _____. KHAN, A. A. **The physiology and biochemiotry of seed development, dormancy and germination**. New York: Elsevier Biomedical Press, 1982. p.347-369.

RAJAGOPAL, A.S.M.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embriyos. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.2, p.21-222, 1992.

- ROBERTS, E.H. Loss of viability: ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.529-545, 1973.
- SHATTERS JR., ABDEL-GHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: Changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.33-41, Marc. 1994.
- TAO, K.L.J. Vigor "referee" Test for soybean and corn. **The Newsletter of the Association of Official Seed Analysts**, Mississippi, v.54, n.1, p.40-58, 1980.
- THRONEBERRY, G.O., SMITH, F.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. **Plant Physiology**, New York, v.30, n.4, p.337, Jul. 1955.
- TYAGI, C.S. Evaluating viability and vigour in soybean seed with automatic seed analyzer. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.20, n.3, p.687-694, 1992.
- VANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; McDONALD JR, M.B. Anaerobic metabolism enzymes as markers of flooding stress in maize seeds. **Plant and Soil**, New York, v. 102, n.1, p. 33-39, 1987.
- VÁZQUEZ, E.; MONTIEL, F.; VÁZQUEZ - RAMOS, J.M. DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seed to loss of germinability. **Seed Science Research**, Wallingford, v.1, p.269-273, 1991.
- VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**. Lavras: UFLA, 1996. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- VILLIERS, T.A. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. In: HEYDECKER, W. **Seed Ecology**. Nottingham: ISA, Pennsylvania State University Press, 1973. p.265-88.
- VON PINHO, E.V.R. **Influência do Tamanho da semente e do Tratamento fungicida e inseticida na preservação da Qualidade de sementes de milho durante o Armazenamento e seu Comportamento no campo**. Lavras: ESAL, 1991. 112p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).

WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. Seed pathology international advance course, proceeding. **Informativo Abrates**, Brasília, v.1, n.1, p.38-50, 1987.

WOODSTOCK, L. W., FURRMAN, K.; SOLOMONS, T. Changes in respiratory metabolism during ageing in seeds an isolated axes of soybean. **Plant Physiology**, New York, v.25, n.1, p.13-26, May. 1984.

ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FURIHATA, Y.; NAKAMAR, Y.; ESASHI, Y. A mechanisn of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, n.1, p.49-56, Mar. 1994.

5 CAPÍTULO II

Viabilidade do Uso da Eletroforese na Avaliação de Qualidade Fisiológica e Sanitária de Sementes de Milho Envelhecidas Artificialmente.

RESUMO

Brandão Jr, Delacyr da Silva. Viabilidade da uso da eletroforese na avaliação de qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho envelhecidas artificialmente. Lavras-MG, UFLA, 1996. 110p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

O objetivo deste trabalho, foi determinar variações nos padrões eletroforéticos de proteína isoenzimas de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração fisiológica e sanitária. Para tanto, foram utilizados dois lotes de sementes das cultivares AG-122 e C-901, onde as sementes de cada lote, foram divididas e submetidas aos tratamentos de desinfestação superficial, tratamento com fungicida e não tratada, para obtenção de diferentes níveis de associações patógeno-hospedeiro. Após as sementes serem envelhecidas artificialmente em mini-câmaras adaptadas, sob ambiente de 42°C e 100% UR, por períodos de zero, 24, 48 e 72 horas, foram submetidas a testes para determinação da qualidade fisiológica, física e sanitária.

Para análise eletroforética de proteína e isoenzimas, foram utilizadas a fração de extração de proteína solúvel (Hepes sobrenadante) e os sistemas isoenzimáticos esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (PO) e sorbitol desidrogenase (SDH), em função de suas participações no metabolismo da semente.

Os resultados obtidos revelaram os sistemas enzimáticos, fosfatase ácida e peroxidase podem atuar como marcadores bioquímicos para a avaliação da deterioração de sementes de milho enquanto que a enzima sorbitol desidrogenase possibilita a detecção de estádios iniciais de deterioração. O uso de marcadores bioquímicos permite avaliar sensíveis diferenças relacionadas a ação de microorganismos associados ao processo de deterioração de sementes de milho.

ABSTRACT

Viability of The Use Electrophoresis Use In The Evaluation of Physiological And Healt Quality of Artificially Aged Corn Seeds.

The goal of this work was to establish variations in the electrophoretical patterns of protein isoenzymes of corn seeds with different levels of physiological and microbiologycol deterioration. Two lots of seeds of the cultivars AG-122 and C-901 were utilized; the seeds from each lot, were divided and submitted to fee-treotmente with hypochlocite, fungicide treatment and untreated, for obtaining different levels of pathogen-host association. Following the seed artificially ageing in adaptemini-chamber under, conditions of 42°C and 100% RU, for periods of 0, 24, 48 and 72 hours, the seeds were submitted to tests for determining physiological, physical and nealth quality.

For the electrophoretical analysis of proteins and isoenzymes, the fraction of soluble protein extraction (supernadant Hepes) and the systems sterase isoenzymatics (EST), acid phosphatase (ACP), peroxidase (PO) and desidrogenase sorbitol (SD H), were utilized.

The results obtained revealed that the enzymatic systems, acid phosphatase and peroxidase may act as biochemical markers for evaluation of the deterioration of corn seeds whereas the enzyme sorbitol desidrogenase enables the detection of early steps of deterioration. The use of biochemical markers allows to evaluate swall differences related to the action of microorganisms associated with the process of deterioration of corn seeds.

5.1 INTRODUÇÃO

Durante a evolução do processo deteriorativo de sementes de milho, podem ocorrer alterações das suas atividades metabólicas, com reflexos em seus padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas.

As principais transformações degenerativas nos processos bioquímicos geralmente ocorrem antes que se verifique o declínio na capacidade de germinação (Delouche e Baskin, 1973; Matthews, 1981). A técnica eletroforética pode permitir a detecção de diferentes níveis de deterioração de sementes, cuja manifestação precede a queda do poder germinativo.

Apesar das mudanças deteriorativas ocorrerem independentes da associação de microorganismos com as sementes, a infecção destas por fungos aumenta consideravelmente o nível de deterioração da estrutura celular (Cherry e Skadsen, 1983). Assim, certas alterações nos padrões eletroforéticos, características do processo deteriorativo, aparecem mais precocemente em sementes infectadas do que nas não infectadas. Existem ainda modificações nestes padrões, característicos de processos deteriorativos por atividade fúngica (Cherry, 1978; Berjak, 1987).

O presente estudo foi desenvolvido visando determinar variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas de sementes de milho com diferentes níveis de deterioração fisiológica e sanitária.

5.2 Material e Métodos

Os estudos foram conduzidos nos Laboratórios de Sanidade e Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras (MG) no período de janeiro à maio de 1996.

As sementes utilizadas foram das cultivares AG-122 e C-901, provenientes dos mesmos lotes do experimento anterior. Após homogeneização, as sementes de cada lote foram divididas em 3 porções de 10,0 kg e submetidas aos tratamentos de desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos, tratamento com o fungicida thiabendazole (Tecto 600) na dose de 60g/100 kg de sementes e não tratadas, a fim de se verificar a influência da presença de patógenos nas mudanças dos padrões eletroforéticos de semente de milho com diferentes níveis de deterioração.

O processo deteriorativo foi simulado através do envelhecimento artificial das sementes (42°C, 100% U.R.) pelo método do gerbox adaptado descrito por Tao (1980), pelos períodos de tempo de zero, 24, 48 e 72 horas, para obtenção de pequenas diferenças nos níveis de qualidade dos tratamentos.

Para se conhecer o nível de deterioração, as sementes, após o envelhecimento artificial foram submetidas aos testes para avaliações da qualidade física (determinação do grau de umidade e identificação de sementes com injúrias mecânicas), sanitária (exame de sementes infestadas e teste de sanidade) e fisiológica (teste padrão de germinação, primeira contagem de germinação, teste de envelhecimento artificial, teste de frio, teste de tetrazólio, teste de condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência, emergência em canteiro e análise eletroforética), conforme metodologias descritas no item 4.2.1. Para análise eletroforética foi adotada a metodologia de extração de proteína solúvel (Hepes sobrenadante) e os sistemas isoenzimáticos esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (PO) e sorbitol desidrogenase (SDH).

5.2.1. Procedimento Estatístico

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x3x4) com 4 repetições. Os fatores estudados foram: duas cultivares (AG-122 e C-901), três tratamentos de sementes (sementes desinfestadas superficialmente com hipoclorito, sementes tratadas com fungicida e sementes não tratadas) e quatro tempos de envelhecimentos (zero, 24, 48 e 72 horas).

Os dados percentuais foram transformados em $\text{arc. sen } \sqrt{x/100}$ e submetidos a análise de variância para todos os parâmetros analisados.

Para comparação entre médias dos híbridos e médias dos tratamentos dentro dos tempos de envelhecimento, foi utilizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para comparação do efeito dos tempos de envelhecimento sobre os híbridos e sobre os tratamentos foi empregado o estudo de regressão polinomial.

5.3 Resultados e Discussão

Pelos quadros de análise de variância (Tabela 4A, 5A e 6A), pode ser observada interação significativa entre cultivares x tratamentos x tempo de envelhecimento para todos os parâmetros utilizados na avaliação da qualidade das sementes, com exceção para índice de velocidade de emergência e emergência em canteiro. Para esses dois parâmetros foram observados efeitos significativos da interação cultivar x tempo, e tratamentos x tempo de envelhecimento.

No desdobramento tratamento x tempo de envelhecimento dentro da cultivar AG-122 só não houve significância para os parâmetros testes de frio (Tabela 4A) e dano mecânico (Tabela 6A). Em relação a cultivar C-901 foi observado efeito significativo da interação tratamento x tempo de envelhecimento para todos os parâmetros avaliados, com exceção para TPG, primeira contagem, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica.

Os testes para avaliação da qualidade fisiológica mostraram, no geral (Figuras 19 a 31), uma maior redução da viabilidade das sementes envelhecidas por 72 horas. As sementes da cultivar AG-122, tratadas com fungicida, apresentaram menor perda de viabilidade com o aumento do tempo de envelhecimento artificial, quando comparadas às sementes não tratadas e desinfestadas com hipoclorito.

Cabe ressaltar que para o teste de condutividade elétrica das sementes da cultivar AG-122 (Figura 31), pode ser observada uma diminuição da condutividade para sementes envelhecidas

pelo período de 24 horas, uma retomada próxima dos níveis iniciais da condutividade para as sementes envelhecidas por 48 horas e um aumento substancial da condutividade elétrica para sementes envelhecidas por 72 horas. Este resultado sugere que o envelhecimento pelo período de 24 horas possivelmente provocou um envigoração das sementes; segundo Bewley e Black (1985), a organização molecular das membranas das sementes, após embebição, é estabilizada em função da relação entre os componentes membranais e absorção da água. As sementes envelhecidas por 24 horas tiveram provavelmente, seu sistema de membrana reorganizado, o que justifica a menor liberação de exudatos para a solução.

Os demais testes de avaliação da qualidade fisiológica mostraram uma tendência a confirmar os resultados do teste de condutividade elétrica, à exceção do teste de envelhecimento acelerado que, para sementes da cultivar C-901 (Figura 19), apresentou uma redução gradativa da sua viabilidade com o aumento do envelhecimento, independente do tratamento aplicado. Para cultivar AG-122 (Figura 22), a viabilidade da semente reduziu à razão de 14,15% cada 24 horas de envelhecimento nas sementes desinfestadas superficialmente com hipoclorito, 7,28% para as não tratadas e 4% para as sementes tratadas com fungicidas.

Os resultados dos padrões isoenzimáticos da cultivar AG-122, parecem estar de acordo com os resultados apresentados pelos demais testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes. A cultivar C-901 não teve seus padrões enzimáticos alterados nos tratamentos e tempos de envelhecimento estudados, exceção feita à enzima sorbitol desidrogenase, que apresentou alteração no seu perfil enzimático para as duas cultivares.

Pode ser observado pela Figura 46 que no tempo de 24 horas de envelhecimento, tempo este em que ocorreu um provável envigoração das sementes da cultivar AG-122, apareceu no zimograma da sorbitol desidrogenase uma nova banda, a qual foi perdendo atividade, de forma

diferencial, em função do tratamento a que foram submetidas as sementes, à medida que se aumentou o período de envelhecimento. No caso específico da cultivar C-901, em que não foi detectado esse possível envigoramento pelo teste de condutividade, também não foi observado aumento do número de bandas (Figura 47), aumento este que poderia caracterizar um envigoramento da semente. Entretanto, pode ser observado no zimograma da sorbitol desidrogenase para cultivar C-901, o desaparecimento de uma banda no tempo de 72 horas de envelhecimento, nas sementes não tratadas, e uma diminuição da intensidade para sementes tratadas, sendo que, para sementes desinfestadas a intensidade das bandas era menor e estas não sofreram alteração no seu perfil, provavelmente por já estarem em um estágio de deterioração mais avançado, o que pode ser confirmado pelos resultados do teste de condutividade elétrica (Tabela 6).

Para Marcos Filho (1994) a resposta das sementes ao envelhecimento artificial depende, entre outros fatores do período em que estas ficam expostas a elevados teores de água e altas temperaturas.

Segundo este autor, à medida que ocorre a absorção de água o metabolismo da semente pode ser alterado levando as sementes (desnaturação de proteínas - queda nos açúcares redutores, nas proteínas solúveis, nos teores de carboidratos totais, aumento do teor de ácidos graxos, desestabilização da atividade enzimática) com a embebição, e ocorrendo no interior da semente diversas mudanças físico-químicas, como aumento da taxa respiratória, formação de enzimas, crescimento e diferenciação de tecidos (Popinigis 1977).

O aumento da taxa respiratória durante a deterioração das sementes poderia afetar a ativação de enzimas, como a sorbitol desidrogenase, a qual segundo Murray et al., 1994, é uma enzima que pela via glicolítica está intimamente relacionada a atividade respiratória. Os resultados

do experimento parecem confirmar essa hipótese, já que houve alterações de bandas nos zimogramas da sorbitol desidrogenase, dependendo do tempo de exposição e do tratamento sanitário a que foram submetidas as sementes. Esta hipótese pode ser reforçada pelos resultados da atividade da fosfatase ácida nos últimos períodos de envelhecimento para a cultivar AG-122 (Figura 48) e nenhuma atividade para a cultivar C-901. A fosfatase ácida é uma hidrolase envolvida em reações de esteres, que pode atuar sobre fosfolípidos de membrana, tendo como consequência a peroxidação de lipídios (Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991). No presente trabalho foi detectado um substancial aumento na condutividade elétrica do exsudato das sementes com o envelhecimento artificial somente para a cultivar AG-122, o que indica existir uma provável relação entre atividade dessa enzima com a degradação de membranas e consequente perda de eletrólitos pela semente. Roberts (1973) cita a preponderância de enzimas hidrolíticas, dentre elas as fosfatases presentes nos lisossomos, em terem sua atividade incrementada com a perda de viabilidade, o que levanta a possibilidade sugerida por estudos de ultraestrutura de Berjak (1987) e Villiers (1973), os quais indicam que a ruptura de lisossomo pode estar envolvida com a perda de viabilidade. Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), encontraram um significativo incremento no total de ácidos graxos livres para sementes deterioradas e, segundo os autores, isto pode ser devido a atividade catalítica de enzimas estereolíticas.

Por outro lado, pelo fato de a fosfatase ácida ter apresentado atividade para os fungos envolvidos neste estudo *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 17) e não ter apresentado atividade para a cultivar C-901 (Figura 49), não se sabe até que ponto essa peroxidação ocorre em função da atividade de enzimas do fungo ou das sementes, e até que ponto essa resposta diferencial entre cultivares está ligada ao sistema associação patógeno-hospedeiro, permitindo ou impedindo o avanço do micélio do fungo (Pascholati, 1995; Amorim, 1995; Agrawal, 1988). Brandstrom

(1974) e Zscheile (1974), citados por Cherry (1978), detectando diferenças no zimograma de fosfatase ácida de sementes infectadas por fungos. Reforçando a suposta resposta diferencial das duas cultivares, no sistema associação patógeno-hospedeiro e peroxidação de lipídeos, pode ser observado pelos zimogramas das Figuras 44 e 45, que a peroxidase, uma enzima “scavenger” (Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Jeng e Sung, 1994), ou seja, removedora de peróxido, perde atividade após o envelhecimento das sementes da cultivar AG-122 por 72 horas (Figura 44) e não apresenta atividade alterada para a cultivar C-901 (Figura 45). Isto sugere que, quando o hospedeiro apresenta atividade para essa enzima, parece existir um sistema de defesa (remoção de peróxidos) mais eficiente.

Provavelmente, essa variação de resposta para cultivares tenha sido devido à resposta diferencial existente entre espécies e mesmo entre cultivares de uma mesma espécie, ao sistema deteriorativo patógeno-hospedeiro. Segundo Pascholati (1995), as substâncias produzidas nas células do hospedeiro, antes ou após a infecção pelo patógeno, constituem o principal fator para a resistência na interação patógeno-hospedeiro. Reforçando estes resultados, pode ser observada a mesma tendência nos padrões isoenzimáticos dos zimogramas da esterase (Figuras 42 e 43). Apesar da esterase ser uma enzima envolvida em relação de hidrólise de esteres e desempenhar papel chave no metabolismo de lipídios, ponto importante no processo deteriorativo de sementes, parece que essa atividade está bastante ligada a resposta diferencial patógeno/hospedeiro. Foi observado que a cultivar AG-122 apresentou alterações no perfil isoenzimático (Figura 42), ao passo que a cultivar C-901 teve seu padrão isoenzimático inalterado (Figura 43). Pode ser observado que para todos os tratamentos da cultivar AG-122, houve uma tendência de desaparecimento de uma banda, no tempo de envelhecimento artificial por 72 horas. Esses resultados se correlacionam positivamente com os encontrados pelos testes de condutividade

elétrica e com os zimogramas apresentados pelas enzimas fosfatase ácida (ACP) e sorbitol desidrogenase (SDH), e negativamente com atividade de peroxidase (PO). Parece que este fato esteja mais relacionado à ação de *Aspergillus* nas sementes, que apresentou um aumento de sua incidência nos diferentes tratamentos com o envelhecimento.

Os diferentes tratamentos a que foram submetidas as sementes das duas cultivares não garantiram um eficiente controle da incidência de fungos pelas mesmas, apresentando estas uma variação na ocorrência de *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* com o aumento do tempo de envelhecimento nas cultivares AG-122 e C-901. As sementes que não receberam tratamento apresentaram uma maior incidência inicial de fungos, sendo que, para os três tratamentos, houve um aumento da presença de *A. flavus* e uma diminuição de *F. moniliforme* com o envelhecimento artificial. Quanto ao *Penicillium spp*, as sementes não tratadas apresentaram uma diminuição de sua incidência com o envelhecimento.

O tratamento de sementes com fungicida apresentou um eficiente controle do *Aspergillus* para sementes das duas cultivares até o período de 24 horas de envelhecimento. Após este período houve um aumento gradual da incidência desse fungo. A ocorrência de *Penicillium spp* nas sementes tratadas reduziu-se para menos da metade quando comparada com sementes não tratadas, mas apresentou uma tendência de aumento com o envelhecimento na cultivar C-901. Já para cultivar AG-122 houve uma ligeira diminuição da incidência de *Penicillium* até o período de 24 horas de envelhecimento, sendo que com aumento do envelhecimento a incidência desse fungo aumentou, chegando a dobrar após 72 horas. Quanto ao controle do *Fusarium*, o fungicida se mostrou ineficiente.

No tratamento de desinfestação superficial com hipoclorito pode ser observado um controle apenas inicial do fungo *Aspergillus flavus* nas sementes das duas cultivares e uma

redução na incidência do *Penicillium spp*, permanecendo esta incidência praticamente inalterada com o aumento do envelhecimento artificial nas sementes cultivar AG-122.

Nas sementes da cultivar C-901 o *Penicillium* mostrou uma tendência de queda até o período de 24 horas de envelhecimento. Após este período houve um aumento na incidência desse fungo e, a partir de 48 horas de envelhecimento, apresentou uma nova queda, mostrando com isto uma grande variação de sua incidência com o aumento do tempo de envelhecimento.

Independente do tratamento sanitário empregado, que possibilitou alterações na incidência de patógenos sobre as sementes, foi verificada pelos testes de qualidade fisiológica uma perda de vigor, sobretudo no tempo de 72 horas de envelhecimento.

Vale ressaltar, no entanto, que para as duas cultivares, houve redução no potencial de germinação (Figura 19 e 20) e vigor (Figuras 19 a 31) com o aumento do tempo de envelhecimento. Para a cultivar AG-122, o tratamento fitossanitário afetou a resposta das sementes à deterioração à medida que houve o aumento do tempo de envelhecimento do passo que para as semente da C-901, a resposta deteriorativa não dependeu do tratamento fitossanitário. Pode ser observado que, para a cultivar AG-122, essa resposta diferencial para tratamento sanitário ocorreu no tempo de 72 horas, quando foram detectadas maiores incidências de fungos, principalmente *Aspergillus*, e alterações nos zimogramas das enzimas estudadas. Tanto assim que a cultivar C-901, a qual apresentou resposta diferencial à associação patógeno-hospedeiro em relação a cultivar AG-122, não teve sua deterioração afetada pelo tratamento sanitário.

Esses resultados sugerem que o processo deteriorativo apresentado por essa cultivar (C-901) não foi ocasionado pela ação de microorganismos e que no caso da cultivar AG-122, a ação desses ocorreu a partir de 72 horas de envelhecimento, quando esta apresentou alteração na atividade da peroxidase, enzima atuante no sistema de defesa das sementes para evitar a formação

de peróxido (enzima “scavenger”) e teve, principalmente para semente não tratada, o processo deteriorativo altamente incrementado reduzindo a germinação para 48%. Pode ser verificado que a sorbitol desidrogenase (Figura 46 e 47), dentre os sistemas enzimáticos estudados, foi a única enzima que apresentou seus padrões alterados para as duas cultivares, com o aumento do tempo de envelhecimento. Isto sugere que, quando o processo de deterioração não está associado diretamente com a ação de microorganismos e seus efeitos não estejam relacionados com a na desestruturação do sistema de membrana, outras enzimas relacionadas com o processo deteriorativo podem ter suas atividades alteradas, motivo pelo qual trabalhos como os de Hendry et al.(1992), Girald e Le-Mestre (1992), Harman e Mattick (1976), Francis e Coolbear (1988), Hailstones e Smith (1988), Pearce e Samad (1980), entre outros, que associam perda de viabilidade com deterioração de membranas e exaustão de reservas, têm-se mostrado inconclusivos e divergentes (Hendry, 1993).

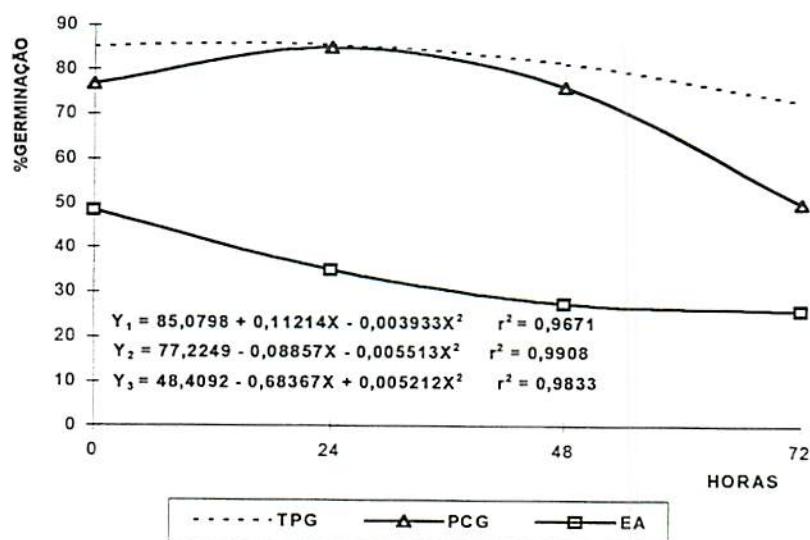


FIGURA 19. Efeito do tempo de envelhecimento artificial no percentual de germinação de sementes de milho da cultivar C-901, submetidas a diferentes tratamentos avaliados pelos testes padrão de germinação, primeira contagem (PCG) e teste de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1996.

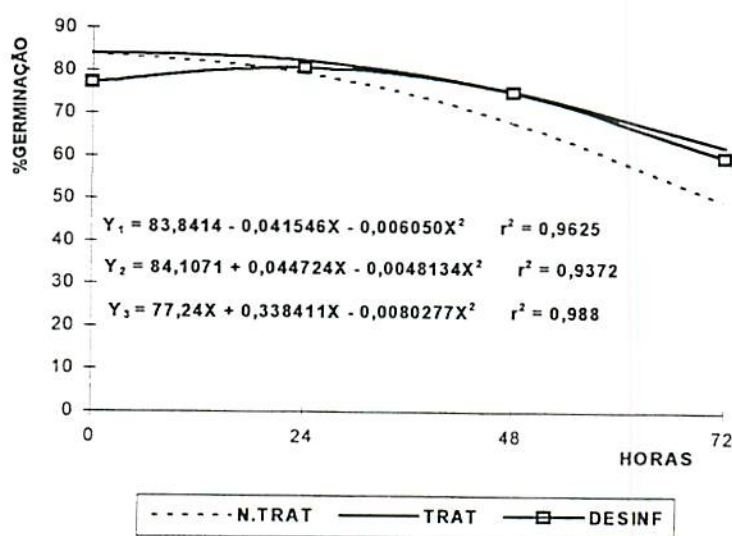


FIGURA 20. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinação (TPG) sementes de milho da cultivar AG-122, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

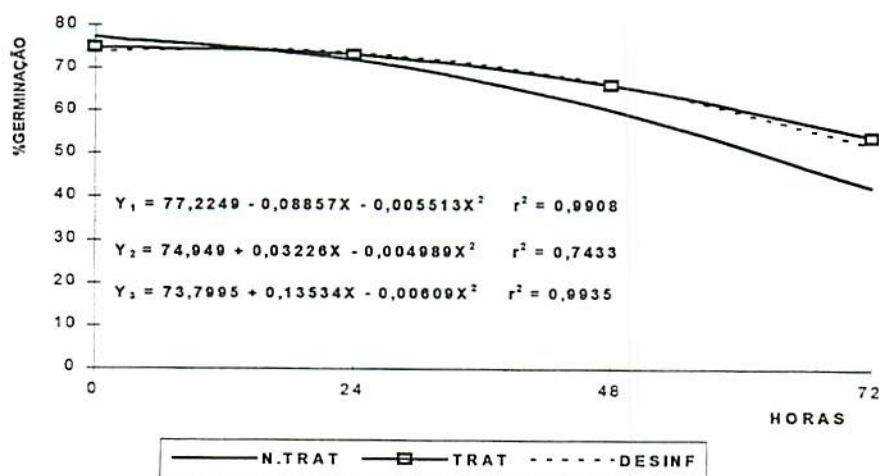


FIGURA 21. Efeito do tempo de envelhecimento artificial sobre a primeira contagem de germinação de sementes de milho da cultivar AG-122 tratadas com fungicidas desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996

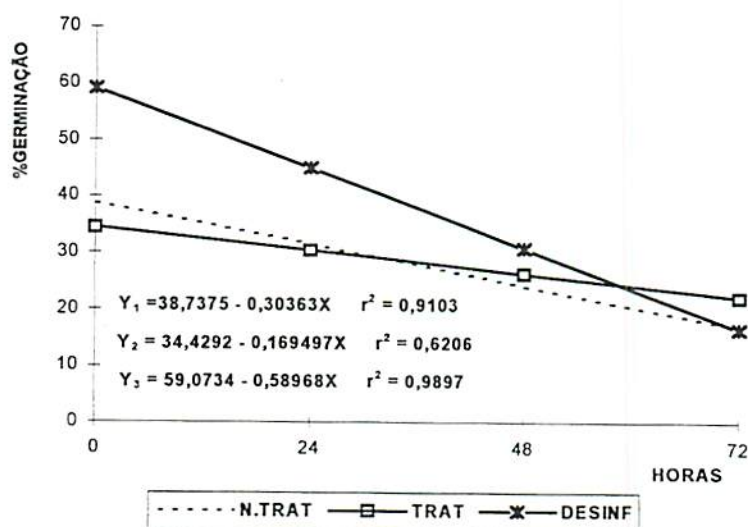


FIGURA 22. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinabilidade, pelo teste de envelhecimento acelerado de sementes de milho da cultivar AG-122 tratadas com fungicida, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

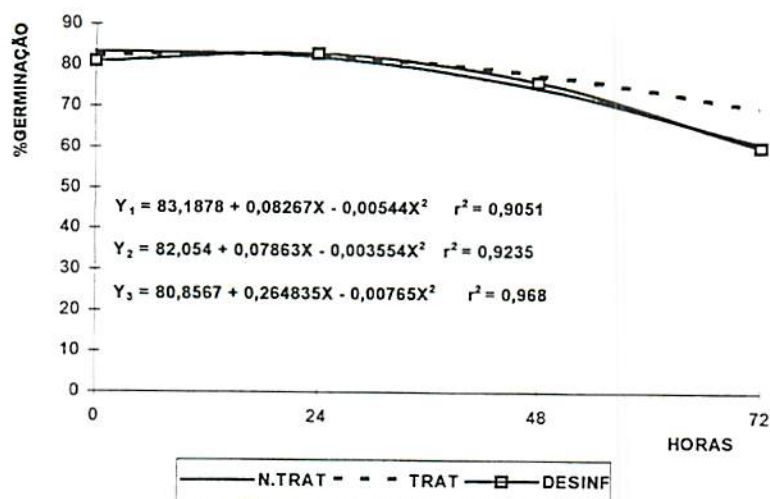


FIGURA 23. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na emergência em canteiro de sementes de milho, tratados com fungicida, desinfestadas superficialmente com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

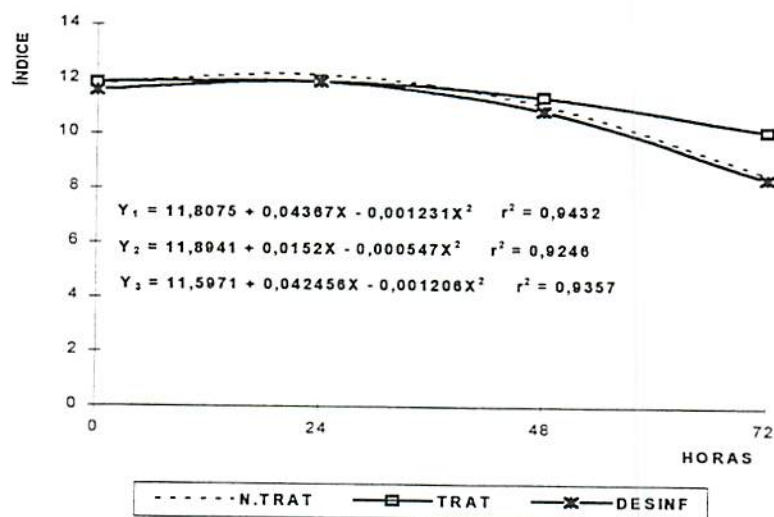


FIGURA 24. Efeito do tempo de envelhecimento artificial no índice de velocidade de emergência de sementes de milho tratadas com fungicidas, desinfestadas superficialmente com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1995.

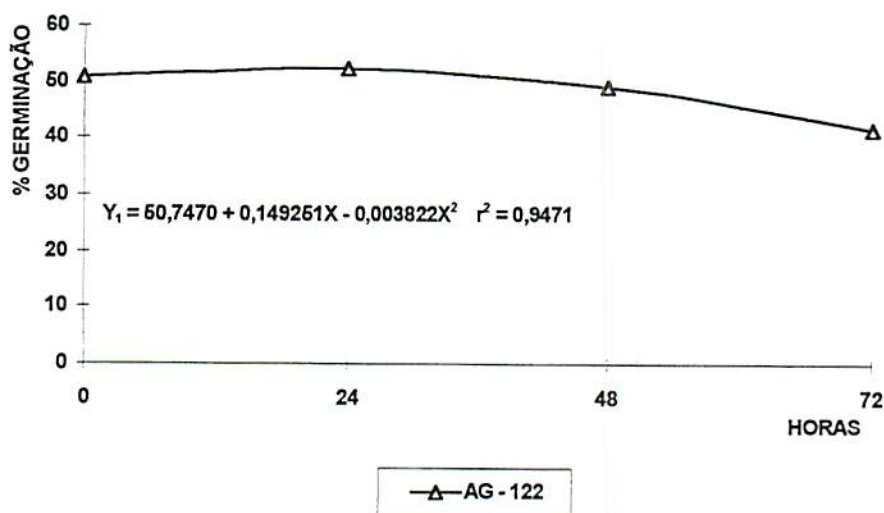


FIGURA 25. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinação, pelo teste frio de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.

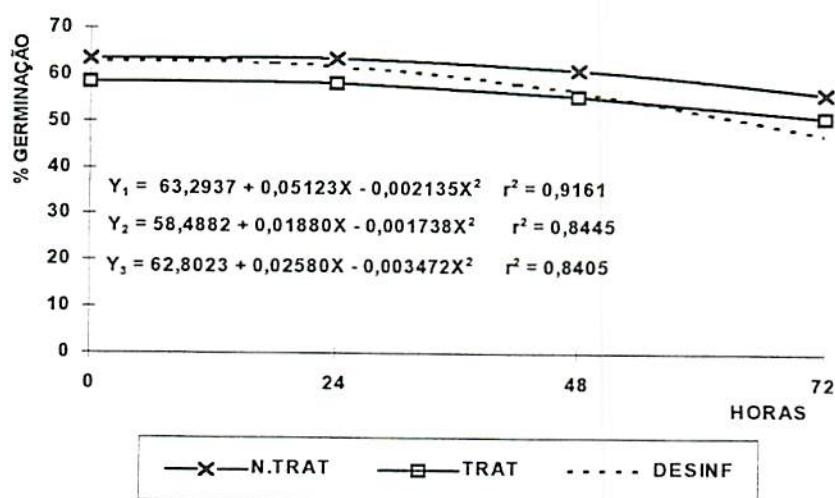


FIGURA 26. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na germinação pelo teste de frio, de sementes de milho da cultivar C-901, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratada. UFLA, Lavras - MG, 1996.

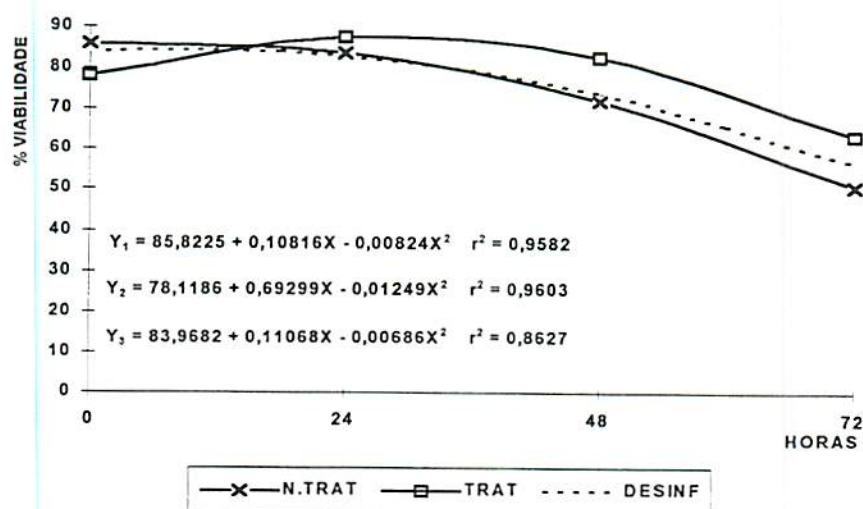


FIGURA 27. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade pelo teste de tetrazólio potencial de germinação de sementes de milho da cultivar AG-122, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

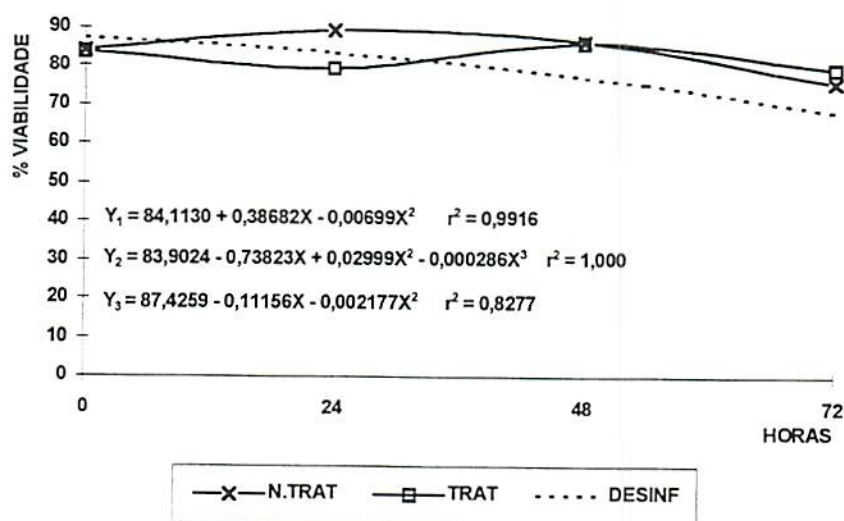


FIGURA 28. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade pelo teste de tetrazólio potencial de germinação de sementes de milho da cultivar C-901, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

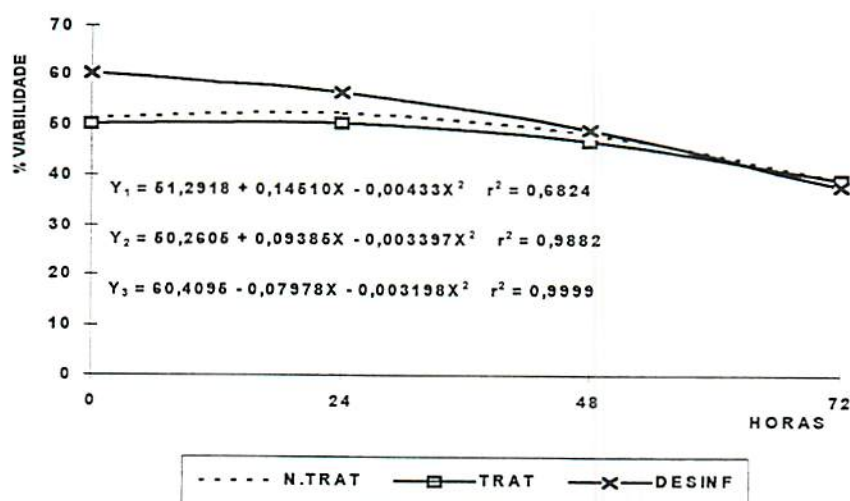


FIGURA 29. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade, pelo teste de tetrazólio vigor, de sementes de milho da cultivar AG-122, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

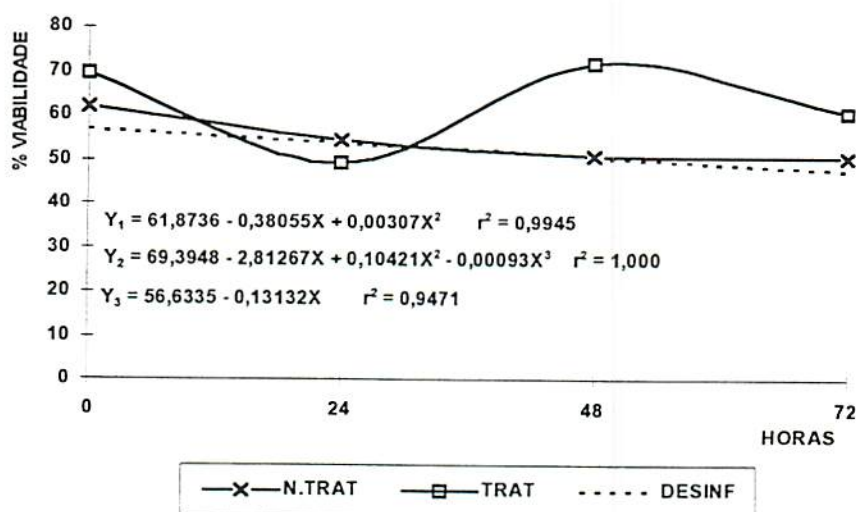


FIGURA 30. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na viabilidade, pelo teste de tetrazólio vigor, de sementes de milho da cultivar C-901, tratadas com fungicidas, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

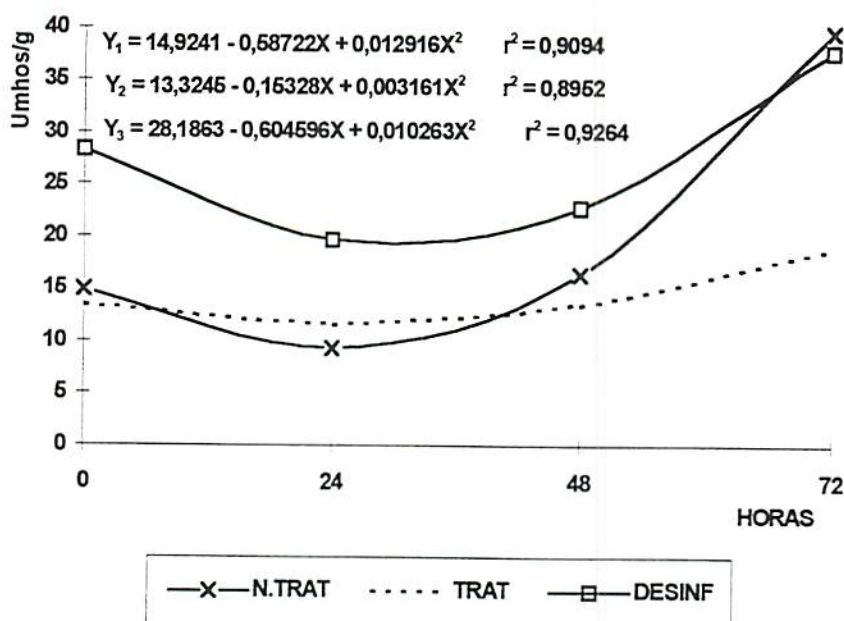


FIGURA 31. Efeito do tempo de envelhecimento artificial, sobre a condutividade elétrica de sementes de milho da cultivar AG-122, tratadas com fungicidas desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

TABELA 6. Efeito dos diferentes tratamentos fitossanitários na condutividade elétrica de sementes de milho da cultivar C-901. UFLA, Lavras, 1996.

TRATAMENTOS	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA
	(μ mhos/g)
Desinfestadas	22.39 a
Tratadas	15.31 b
não tratadas	14.73 b

Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

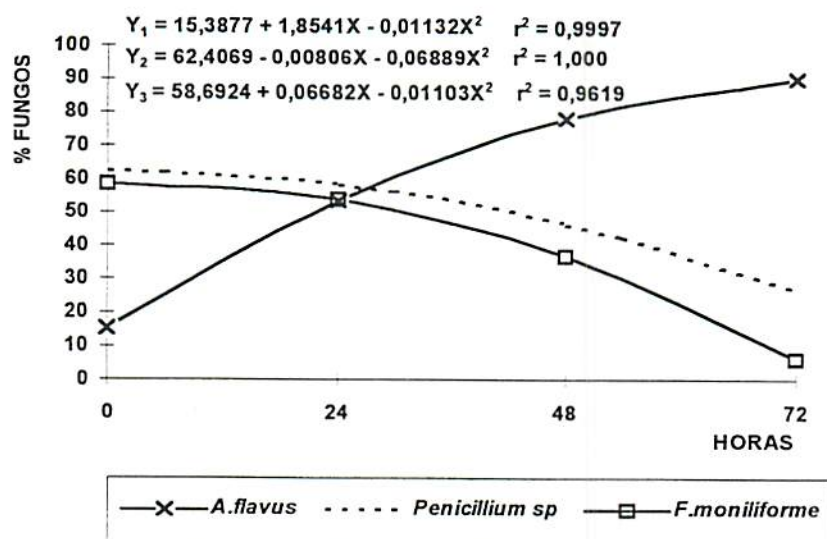


FIGURA 32. Efeito do tempo de envelhecimento, na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar AG-122 não tratada. UFLA, Lavras - MG, 1996.

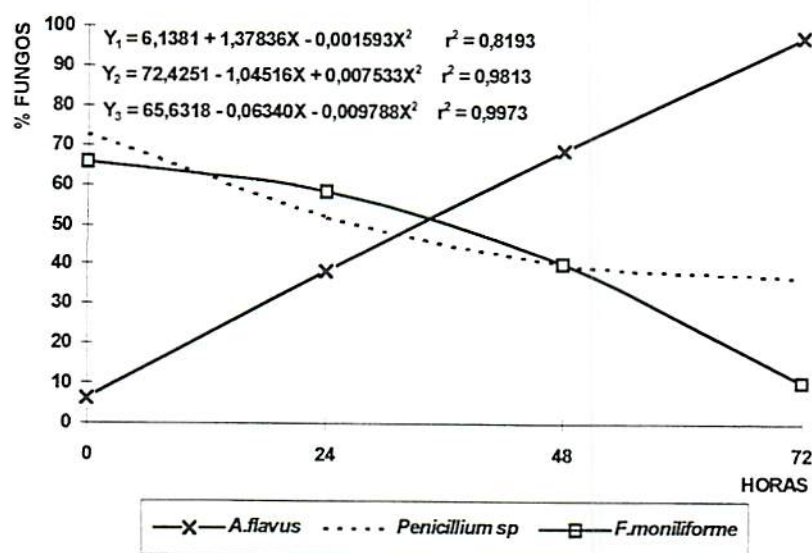


FIGURA 33. Efeito do tempo de envelhecimento, na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar C-901 não tratada. UFLA, Lavras - MG, 1996.

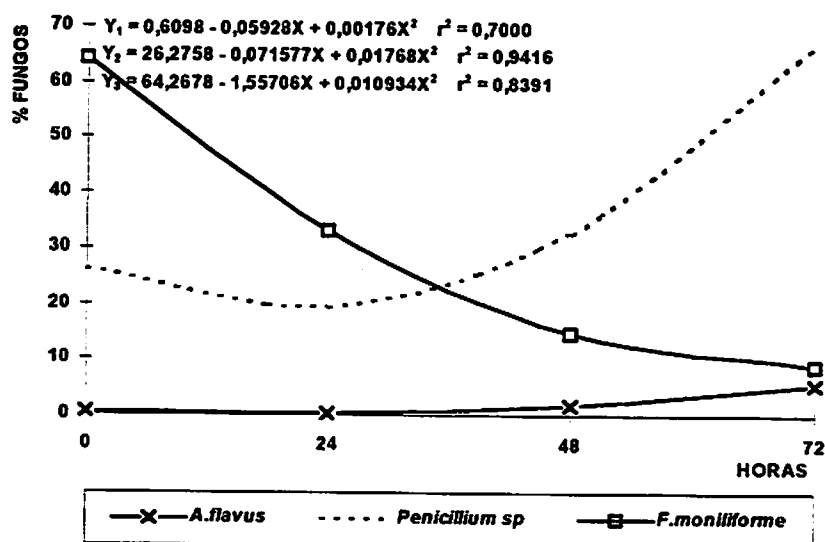


FIGURA 34. Efeito do tempo de envelhecimento, na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar AG-122 tratadas com fungicida. UFLA, Lavras - MG, 1996.

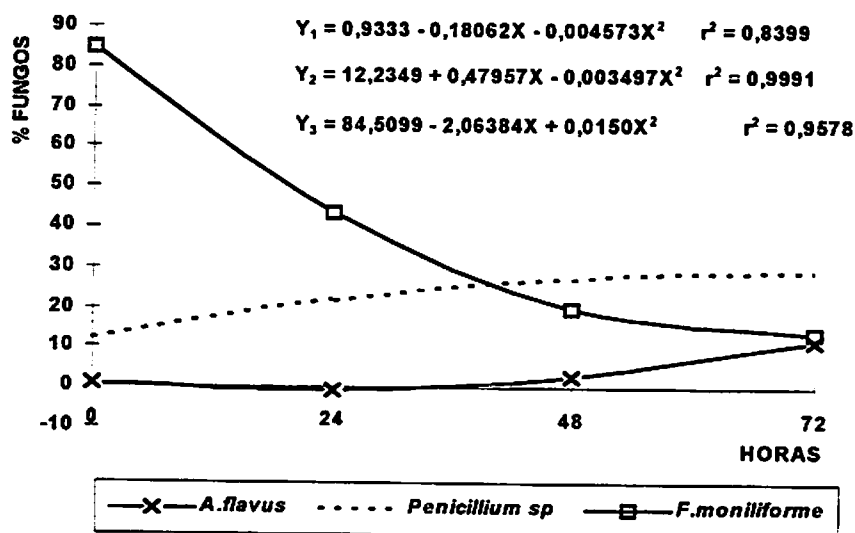


FIGURA 35. Efeito do tempo de envelhecimento, na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar C-901 tratadas com fungicida. UFLA, Lavras - MG, 1996.

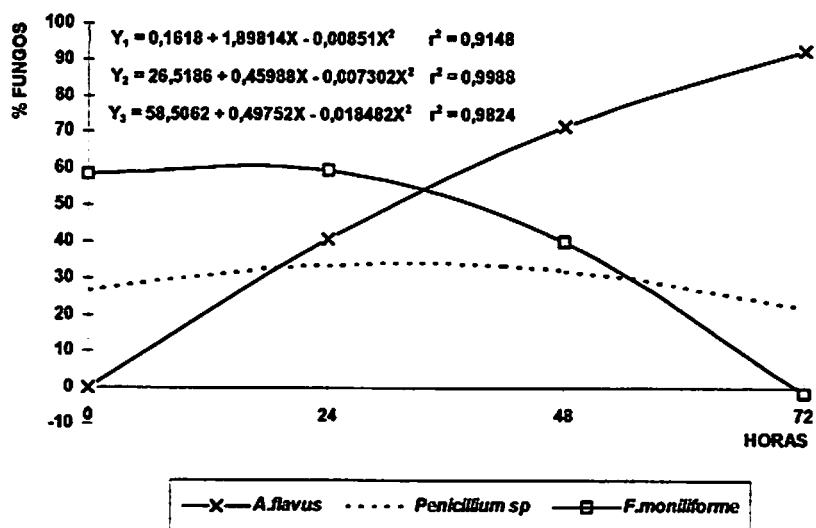


FIGURA 36. Efeito do tempo de envelhecimento, na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar AG-122 desinfetada superficialmente com hipoclorito. UFLA, Lavras - MG, 1996.

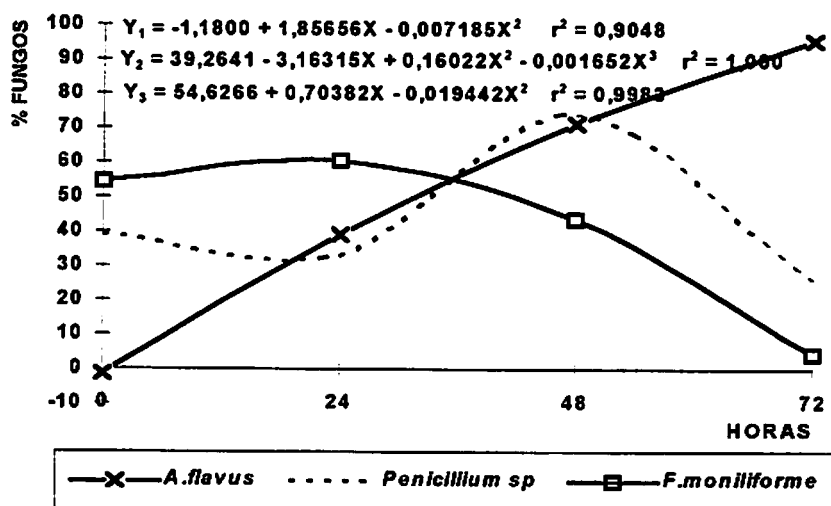


FIGURA 37. Efeito do tempo de envelhecimento, na recuperação de microorganismos pelo “blotter test” em sementes de milho da cultivar C-901 desinfetada superficialmente com hipoclorito. UFLA, Lavras - MG, 1996.

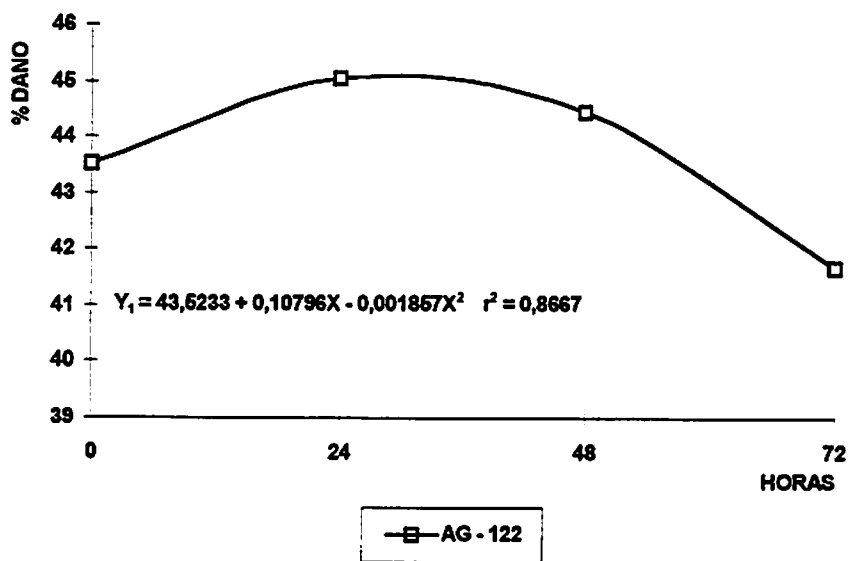


FIGURA 38. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na incidência de dano mecânico de sementes de milho AG-122, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.

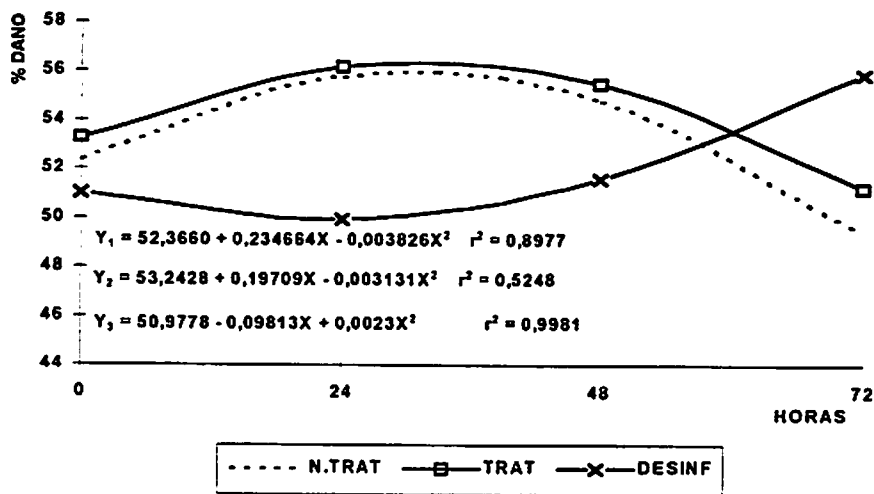


FIGURA 39. Efeito do tempo de envelhecimento artificial na incidência de dano mecânico de sementes de milho, tratadas com fungicida, desinfestadas com hipoclorito e não tratadas. UFLA, Lavras - MG, 1996.

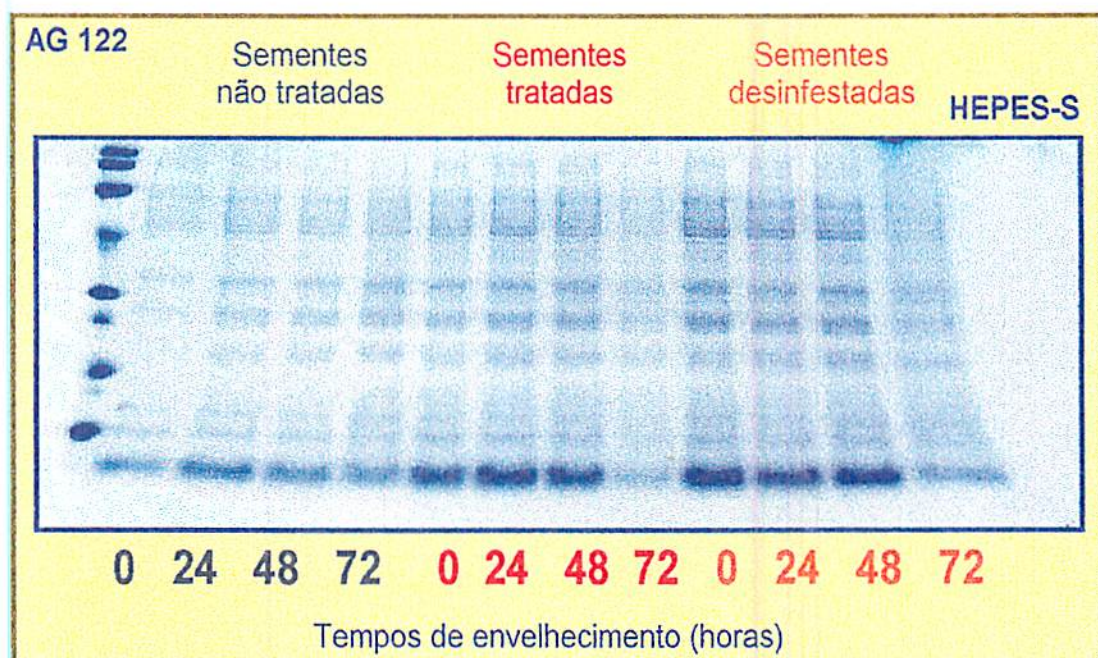


FIGURA 40. Padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, e ao envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1996.

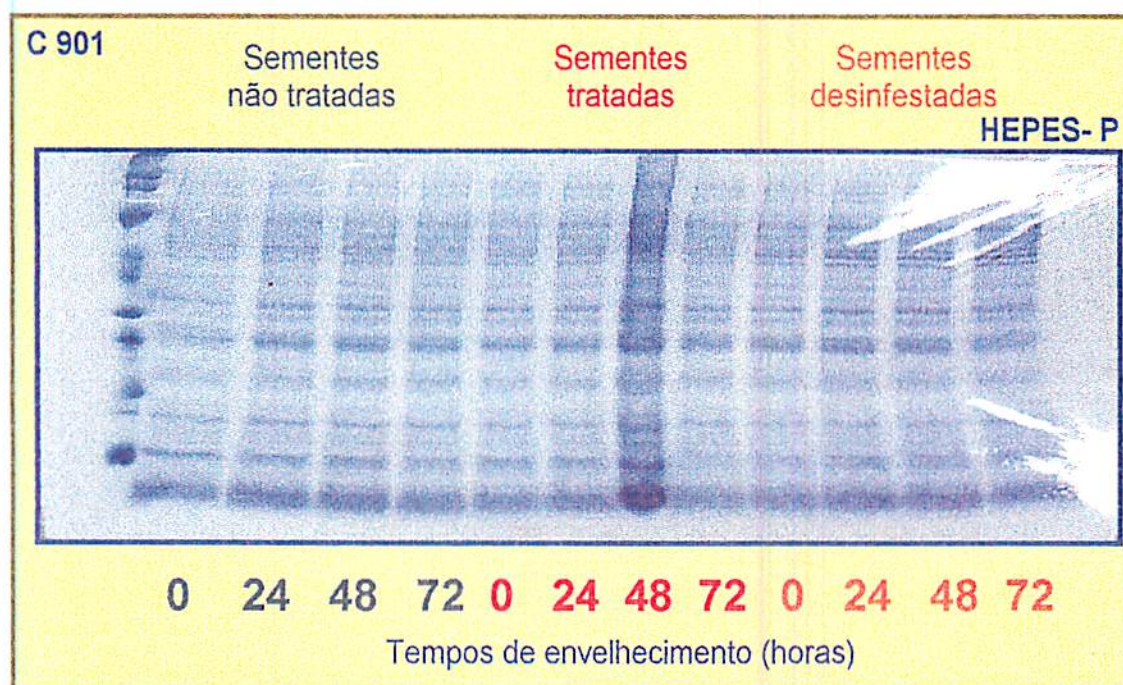


FIGURA 41. Padrões eletroforéticos de proteínas solúveis de sementes de milho da cultivar C - 901, submetidas a diferentes tratamentos, e ao envelhecimento artificial. UFLA, Lavras - MG, 1996.

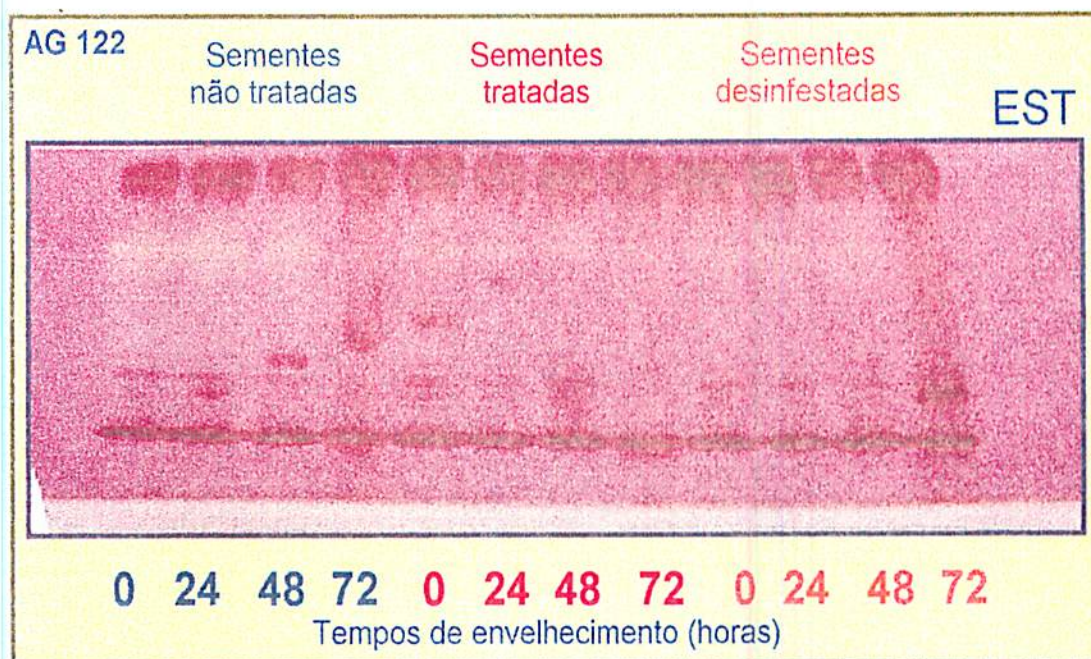


FIGURA 42. Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para esterase (EST). UFLA, Lavras - MG, 1996.

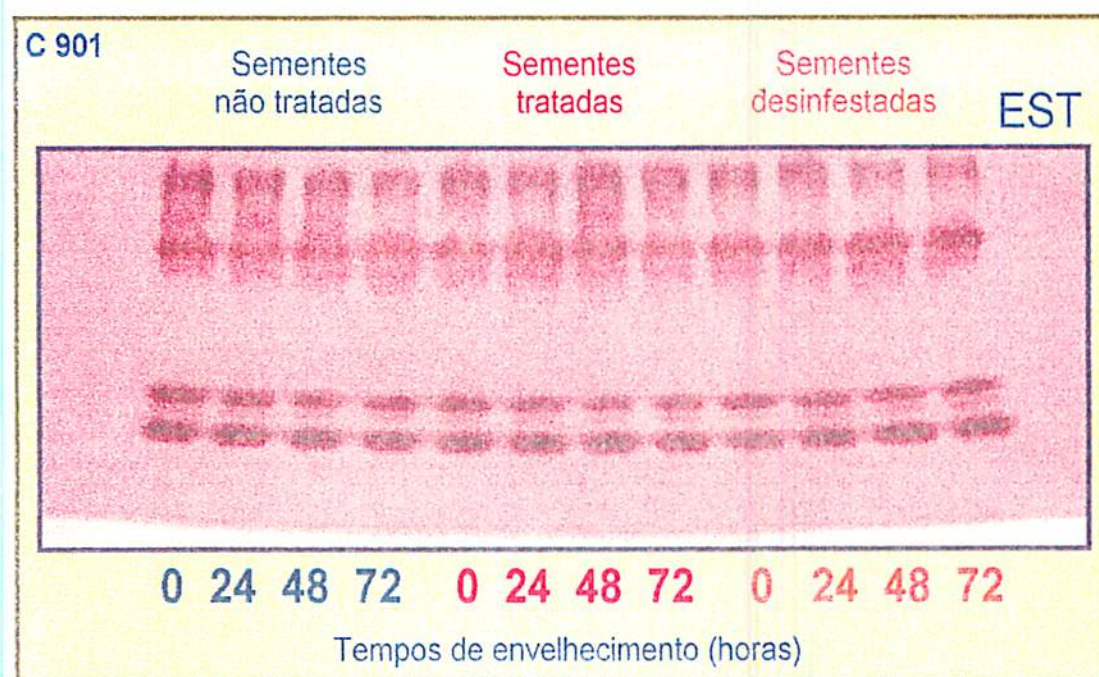


FIGURA 43. Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C - 901, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para esterase (EST). UFLA, Lavras - MG, 1996.

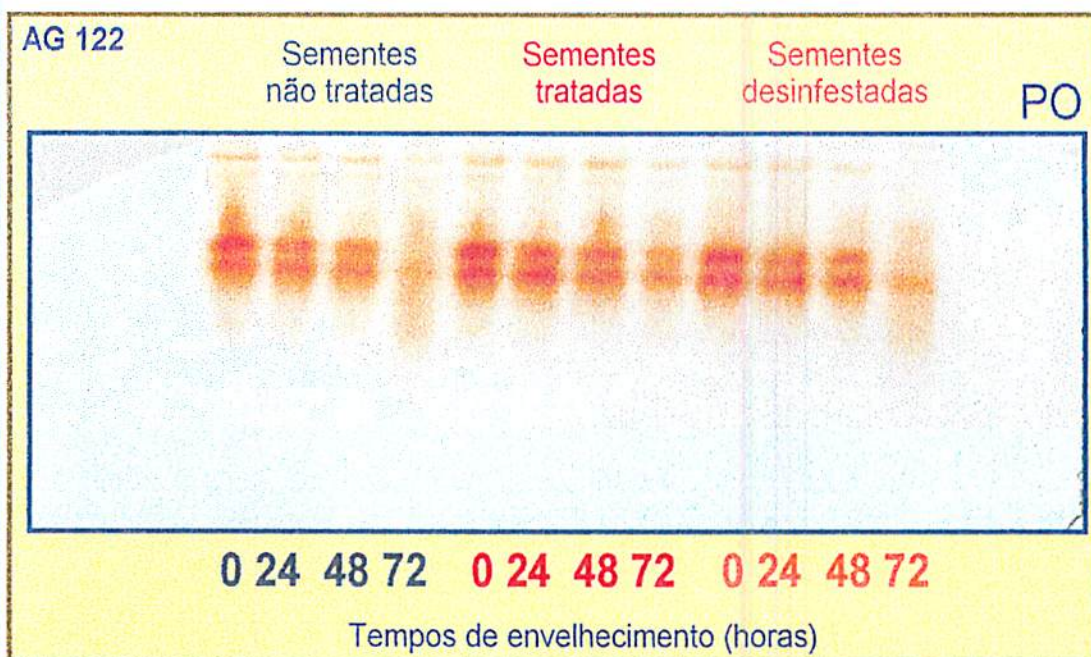


FIGURA 44. Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para peroxidase (PO). UFLA, Lavras - MG, 1996.

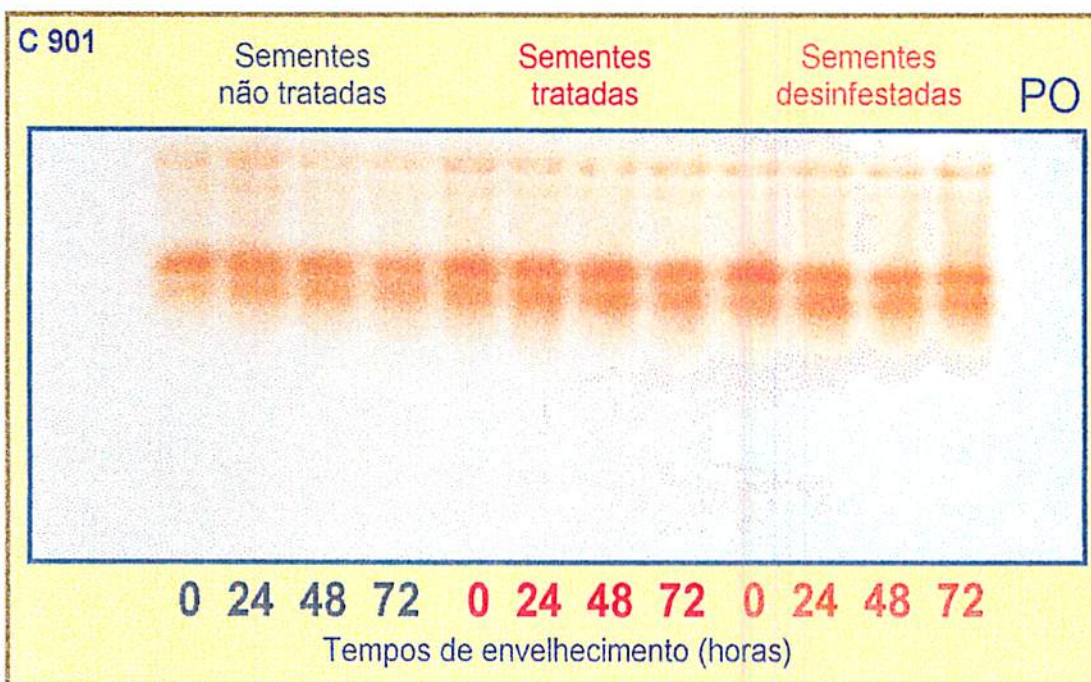


FIGURA 45. Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C - 901, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para peroxidase (PO). UFLA, Lavras - MG, 1996.

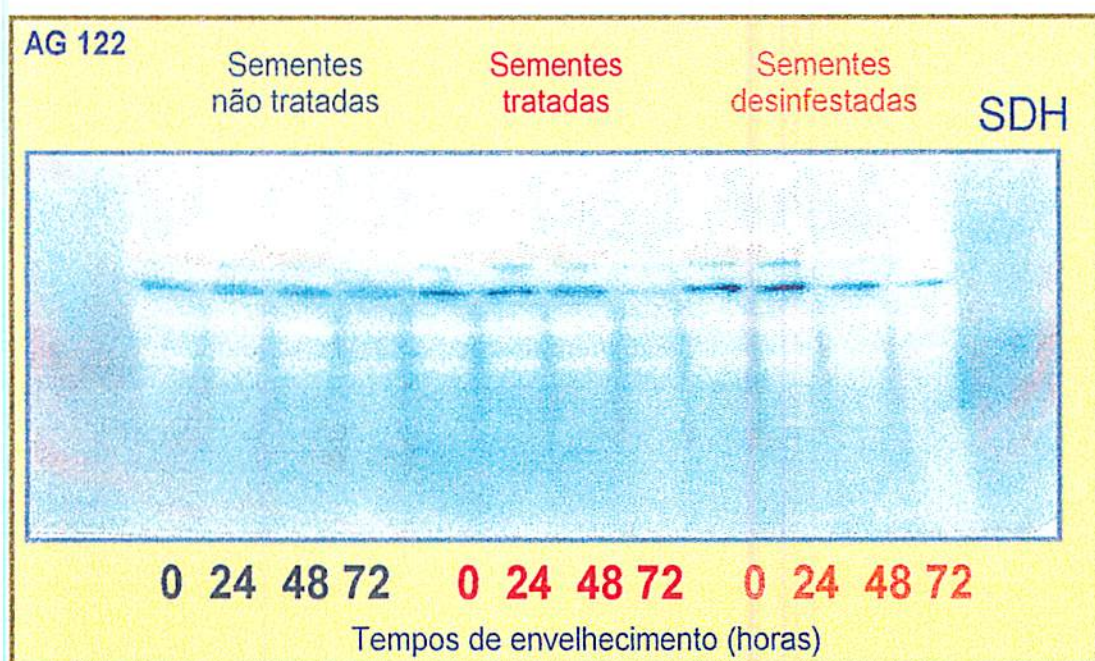


FIGURA 46. Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para sorbitol desidrogenase (SDH). UFLA, Lavras - MG, 1996.

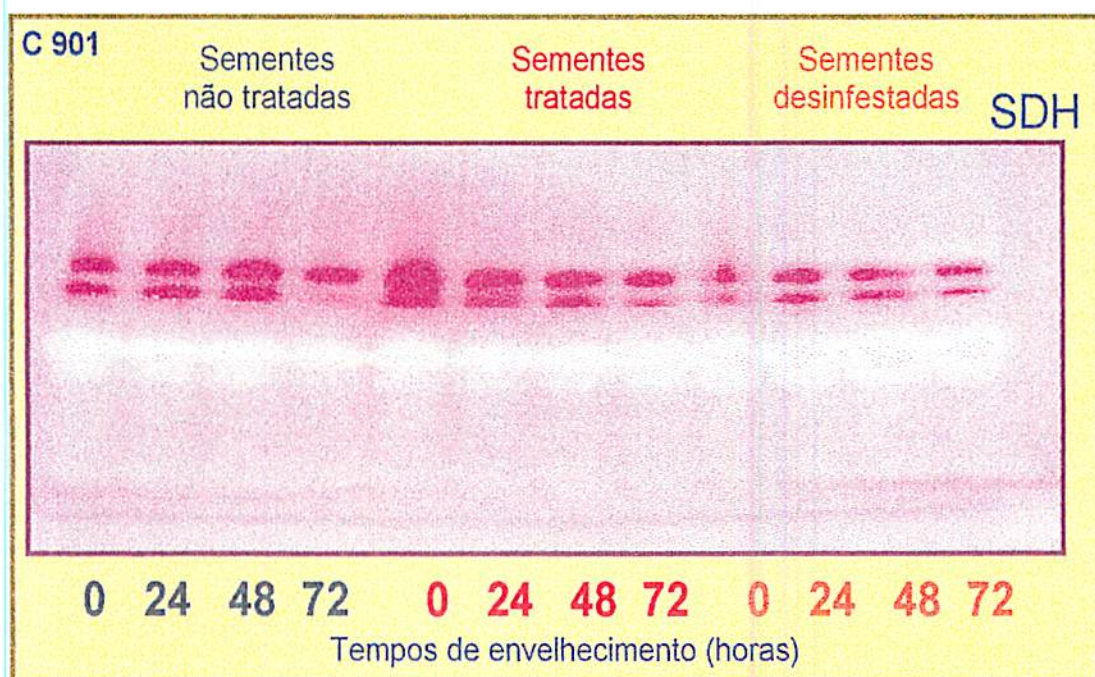


FIGURA 47. Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar C -901, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para sorbitol desidrogenase (SDH). UFLA, Lavras - MG, 1996.

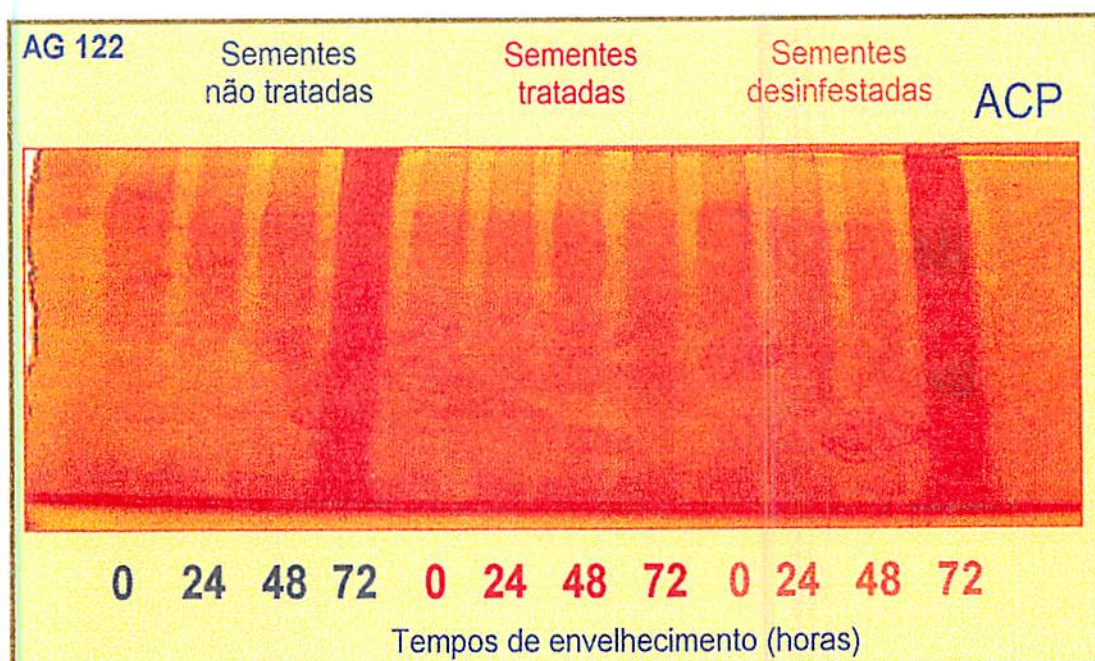
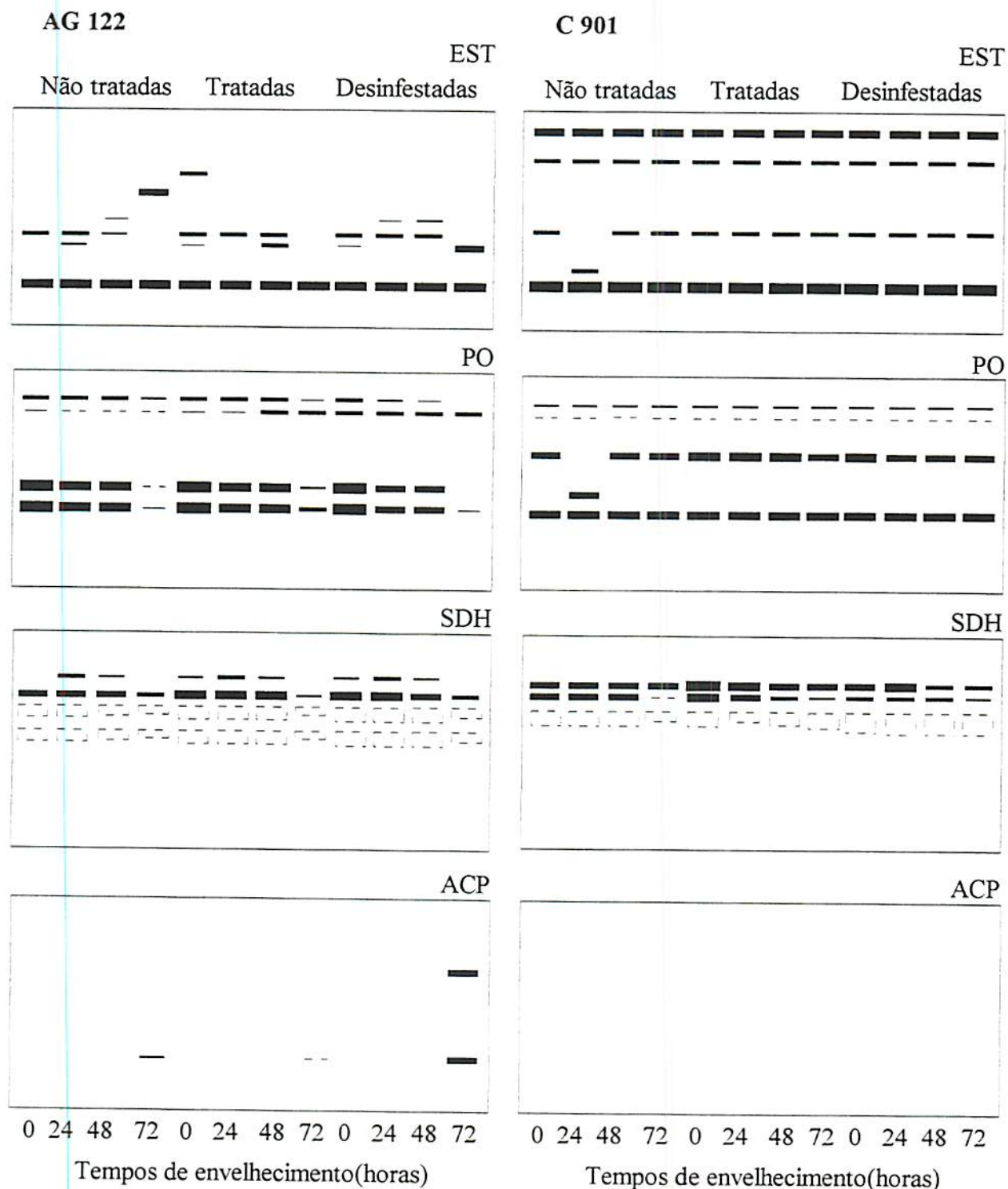


FIGURA 48. Padrões isoenzimáticos de sementes de milho da cultivar AG-122, submetidas a diferentes tratamentos, envelhecidas artificialmente e reveladas para fosfatase ácida (ACP). UFLA, Lavras - MG, 1996.

FIGURA 49. Zimogramas de isoenzimas de sementes de milho das cultivares AG-122 e C-901, submetidas a diferentes tratamentos e envelhecimento artificial. UFLA, Lavras-MG, 1996.



5.4 CONCLUSÕES

- Os sistemas enzimáticos, fosfatase ácida e peroxidase podem atuar como marcadores bioquímicos para a avaliação da deterioração de sementes de milho, enquanto que a enzima sorbitol desidrogenase possibilita a detecção de estádios iniciais de deterioração.
- O uso de marcadores bioquímicos permite avaliar sensíveis diferenças relacionadas à ação de microorganismos associados ao processo de deterioração de sementes de milho.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P.K. Seed deterioration during storage. In: _____. AGRAWAL, P.K. **Proceedings of The International Congress of Plant Physiology**. New Delhi, p.15-20, 1988
- AMORIM, L. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: _____. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.234-243.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n.2, p. 279-286, 1991.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- BERJAK, P. Stored seeds: The problems caused by micro-organisms (With particular reference to the fungi) In: NASSER, L.C.; WETZEL, M.M.; FERNANDES, J.M. **Seed Pathology**. International advance course, proceedings. Brasília: Informativo Abrates, 1987. p. 38-50.
- CHERRY, J.H.; SKADSEN, R.W. Nucleid acid and protein metabolism during seed deterioration. In: McDONALD JR, M.D.; NELSON, C.J. **Physiology of seed deterioration**, CSSA, 1983. Cap.4, p.65 - 87. (Special Publication, 11).
- CHERRY, J.P. Enzymes as quality indicators in edible plant tissues. In: _____. HULTIN, H.O.; MILNER, M. **Post harvest Biology and Biotechnology**. Wetport: Food and Nutrition Press, 1978. 462p.

- DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relativestorability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.427-452, 1973.
- HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevit. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n.3, p. 141-153, Sept. 1993.
- HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.M.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quersus robur* L. **New Phytologist**, Cambridge, v.122, n.2, p.273-279, Oct. 1992
- JENG, T.L.; SUNG, J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Techology**, Zurich, v. 22, n.3, p. 531-539, 1994.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado In. **Testes de vigor em sementes**. Vieira, R.D.; Carvalho N.M. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.89-92.
- MATTHEWS, S. Evaluation of techniques for germinationand vigour studies. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.9, n. 2, p. 543-551, 1981.
- MURRAY R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL V.W. **Harper: Bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1994. 763p.
- PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo. In: _____. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.343-364.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.
- ROBERTS, E.H. Loss of viability: utrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.529-545, 1973.
- TAO, K.L.J. Vigor "referee" Test for soybean and corn. **The Newsletter of the Association of Official Seed Analyts**, Mississipi, v.54, n.1, p.40-58, 1980.

VILLIERS, T.A. Ageing and the longevity of seeds in field conditions. In: HEYDECKER, W. **Seed Ecology**. Nottingham: ISA, Pennsylvania State University Press, 1973. p.265-88.

Considerações Gerais

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que as variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas estão associadas ao processo deteriorativo de sementes de milho. As três frações de extração de proteínas permitiram verificar que pode ocorrer uma diminuição no número e na intensidade de bandas com o aumento do tempo de envelhecimento das sementes, sendo estas alterações mais intensas a partir de 96 horas. Vale ressaltar que as maiores mudanças ocorreram nas proteínas solúveis sendo o extrator Hepes o que proporcionou a melhor resolução na avaliação do nível de deterioração de semente de milho. Resultados semelhantes foram encontrados por Chauhan, Gopinathan e Babu (1985) que observaram redução do número de bandas de proteínas de alto peso molecular.

Quanto aos diferentes sistemas enzimáticos estudados os da enzima sorbitol desidrogenase (SDH) e glutamato - oxaloacetato transaminase (GOT), revelaram ser promissores marcadores bioquímicos para avaliação de qualidade de sementes de milho em estádios iniciais de deterioração, já que conseguiram detectar alterações no perfil eletroforético de sementes que, submetidas aos diferentes testes de avaliação fisiológica, mostraram variações mínimas no seu vigor.

Com relação ao resultados da segunda etapa, os diferentes tratamentos sanitários a que foram submetidas as sementes das duas cultivares não garantiram um eficiente controle da incidência de fungos nas mesmas, apresentando estas uma variação na ocorrência de *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp* e *Fusarium moniliforme* com o aumento do tempo de envelhecimento nas cultivares AG-122 e C-901. As sementes que não receberam tratamento sanitário apresentaram uma maior incidência inicial de fungos sendo que de modo geral houve um aumento da presença de *A. flavus* e uma diminuição de *F. moniliforme* com o aumento do tempo envelhecimento artificial, independente do tratamento a que foram submetidas as sementes.

O tratamento de sementes com fungicida apresentou um eficiente controle do *Aspergillus flavus* para sementes das duas cultivares até o período de 24 horas de envelhecimento. Após este período houve um aumento gradual da incidência deste fungo. A ocorrência de *Penicillium spp* nas sementes tratadas reduziu para menos da metade quando comparada com sementes não tratadas.

Confirmando os resultados obtidos por Kock et al. (1995), o tratamento com o fungicida Thiabendazole não diminuiu a incidência de *Fusarium moniliforme* nas sementes de milho.

Independente do tratamento sanitário empregado, que possibilitou alterações na incidência de patógenos sobre as sementes, foi verificada pelos testes de qualidade fisiológica uma perda de germinação e vigor, sobretudo no tempo de 72 horas de envelhecimento, para as duas cultivares. Entretanto para a cultivar AG-122, o tratamento sanitário afetou a resposta das sementes à deterioração a medida que houve o aumento do tempo de envelhecimento, ao passo que, para as semente da cultivar C-901 a resposta deteriorativa não dependeu do tratamento sanitário. Pôde ser observado que para a cultivar AG-122 essa resposta diferencial para tratamento sanitário, ocorreu no tempo de 72 horas, quando foram detectadas maiores incidências de fungos nas sementes,

principalmente *Aspergillus flavus*, e alterações nos zimogramas das enzimas estudadas. A cultivar C-901, a qual apresentou resposta diferencial à associação patógeno-hospedeiro em relação a cultivar AG-122 não teve sua deterioração afetada pelo tratamento sanitário.

Esses resultados sugerem que a evolução do processo deteriorativo apresentado por essa cultivar (C-901) não foi ocasionada pela ação de microorganismos.

Os resultados dos padrões isoenzimáticos da cultivar AG-122, parecem estar de acordo com os resultados apresentados pelos demais testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes, que mostraram maior deterioração a partir de 72 horas, quando foi observada a diminuição da atividade da peroxidase e um aumento da atividade da fosfatase ácida. Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), Nkang (1988), Lin (1988), Jeng e Sung (1994) relatam um aumento da peroxidação de lipídios com o envelhecimento da semente e uma vez que a fosfatase ácida atua na peroxidação de lipídios, os resultados verificados por esses autores reforçaram os obtidos por este trabalho, podendo o aumento da peroxidação de lipídios ser explicado por um aumento da atividade da fosfatase ácida. A cultivar C-901 não teve seus padrões enzimáticos alterados nos tratamentos e tempos de envelhecimento estudados, exceção feita a enzima sorbitol desidrogenase.

Dentre os sistemas enzimáticos estudados, a sorbitol desidrogenase foi a única enzima que apresentou seus padrões alterados para as duas cultivares, com o aumento do tempo de envelhecimento. Isto sugere que, quando o processo de deterioração não está associado diretamente com a ação de microorganismos e seus efeitos não estejam relacionados com a na desestruturação do sistema de membrana, outras enzimas relacionadas com o processo deteriorativo podem ter suas atividades alteradas, motivo pelo qual trabalhos como os de Hendry et al.(1992), Giraldo e Le-Mestre (1992), Harman e Mattick (1976), Francis e Coolbear (1988),

Hailstones e Smith (1988), Pearce e Samad (1980), entre outros, que associam perda de viabilidade com deterioração de membranas e exaustão de reservas, têm-se mostrado inconclusivos e divergentes (Hendry, 1993).

Provavelmente, essa variação de resposta para cultivares tenha sido devida a resposta diferencial existente entre espécies e mesmo cultivares de uma mesma espécie, ao sistema deteriorativo patógeno-hospedeiro. Esses resultados permitem indicar o uso de marcadores bioquímicos na detecção de sensíveis diferenças, relacionadas a ação de microorganismos associados ao processo de deterioração de sementes de milho. Todavia, para obtenção de conclusões mais seguras, sugere-se a continuidade de estudos nesta linha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S.** Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n.2, p. 279-286, 1991.
- CHAUHAN, K.P.S., GOPINATHAN, M.C.; BABU, C.R.** Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**. Zurich, v.13, n.3, p.629-41, 1985.
- HENDRY, G.A.F.** Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n.3, p. 141-153, Sept. 1993.
- JENG, T.L.; SUNG, J.M.** Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially aged peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n.3, p. 531-539, 1994.
- KOCH, E.F.A.; CASTELANI, R.F.; MORAES, M.H.D.; ZAMBON, S.** Avaliação da eficiência de fungicidas no tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Informativo Abrates**, Brasília, v.5, n.2, p.145, ago. 1995.
- LIN, S.S.** Efeito do período de armazenamento na lixiviação eletrolítica dos solutos celulares e qualidade fisiológica da semente de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.10, n.3, p.59-67, 1988.
- NKANG, A.** Some aspects of the biochemical basis of viability of loss in stored gukfoylia monostylis seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.16, n.2, p.247-260, 1988.

APÊNDICE

TABELA 1A- Resumo da análise de variância dos dados obtidos de avaliações da qualidade fisiológica de sementes de milho, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1995.

CAUSAS DA VARIÇÃO		QUADRADOS MÉDIOS						
	G.L.	Germinação Padrão(%)	Primeira Contagem(%)	Emergência Canteiro(%)	Envelhecimento Acelerado(%)	Teste de Frio(%)	Tetrazólio Vigor(%)	Tetrazólio Germinação(%)
Cultivar	1	418.79824**	313.61732**	151.02132**	455.05742**	580.19389	222.77739**	61.13953
Tempo	3	5930.36866**	5932.42118**	5784.99477**	2394.02634**	3435.72977	7901.46875**	6184.16647**
Cul. X Tem.	3	25.52746	20.68556*	19.18871	12.44614	3.43872	19.43405	11.52174
Resíduo	24	9.72444	6.08755	11.53776	18.56632	18.73943	20.68592	18.65291
Média Geral		57.23381	53.12511	57.76918	28.81432	41.62100	50.75326	56.4379
Coef. de Variação (%)		5.449	4.644	5.880	14.954	10.401	8.961	7.652

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 2A- Resumo da análise de variância dos dados obtidos de avaliações da qualidade de sementes de milho, submetidas a diferentes tempos de envelhecimento. UFLA, Lavras - MG, 1995.

CAUSAS DA VARIÇÃO		QUADRADOS MÉDIOS					
	G.L.	Velocidade Emergência	Condutividade Elétrica(μmhos/g)	Dano Mecânico(%)	Aspergillus flavus(%)	Penicillium spp(%)	Fusarium moniliforme(%)
Lote	1	0.34032	124.03125	1065.71812**	0.56124	596.94349**	311.80605*
Tempo	3	36.02675**	1111.03125	3.90998	8483.93373**	1229.29707**	1507.32271**
Lote x tempo	3	0.18708	174.94792	5.61011	9.16246	100.30497	70.20820
Resíduo	24	0.10289	12.28125	5.19962	16.91893	71.03114	50.23480
Média Geral		3.21562	23.094	46.04727	69.351	38.712	34.178
Coef. de Variação(%)		9.975	15.175	4.952	5.931	21.771	20.737

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 3A - Resumo da análise de variância dos dados obtidos da determinação do teor de umidade das sementes de milho antes do envelhecimento e do exame de infestação de sementes de milho, submetidas a diferentes tempos de envelhecimentos. UFLA, Lavras - MG, 1995.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		Teor de umidade(%)	Sementes Infestadas(%)
Cultivar	1	0.20153	51.46576**
Tempo	3	0.60500*	7.54831
Cul. x tem.	3	0.06728	7.54831
Resíduo	8	0.10086	2.05863
Média Geral		19.931	1.763
Coef. de Variação(%)		1.593	80.000

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 4A - Resumo de análises de variância dos dados obtidos de avaliações da qualidade fisiológica de sementes de milho, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.

QUADRADOS MÉDIOS									
CAUSAS DA VARIAÇÃO		G.L.	Germinação	Primeira	Envelhecimento	Teste de	Tetrazólio	Tetrazólio	Condutividade
			Padrão(%)	Contagem(%)	Acelerado(%)	Frio(%)	Vigor(%)	Germinação(%)	Elétrica(µmhos/g)
Cultivar	1	1556,96473**	1015,33349**	681,58626**	2087,81706**	1453,57717**	1340,89216**	192,66667**	
Trat./C ₁	2	137,72627**	78,98281**	511,00157**	97,27388**	80,99147**	101,53794**	672,62060**	
Trat./C ₂	2	61,04488**	91,99070**	74,42531*	119,22705**	517,69216**	99,52601**	290,68550**	
Tempo/C ₁	3	1596,43903**	1727,93476**	1448,91546**	274,69255**	603,77505**	2075,10096**	876,00587**	
Tempo/C ₂	3	433,35581**	2877,22080**	1187,04192**	315,74999**	286,06877**	281,28801**	14,95217	
Trat. X tem/C ₁	6	67,38687**	73,26661**	233,48170**	12,21581	48,60186**	100,39788**	132,00614**	
Trat. X tem/C ₂	6	5,75494	22,70150	44,40603	24,88319*	161,41453**	122,49230**	3,92235	
Resíduo	72	11,920521	11,24757	30,59353	10,09246	14,86479	20,26284	6,58333	
Média Geral		77,16086	68,7109	33,99088	53,07905	52,44767	78,861	18,479	
Coef. de variação (%)			4,475	4,887	16,272	5,985	7,351	5,712	13,885
			* Significância ao nível de 5% de probabilidade.						
			** Significância ao nível de 1% de probabilidade.						
			C ₁ - AG 122						
			C ₂ - C901						

TABELA 5A - Resumo das análises de variância dos dados obtidos de avaliações de vigor de sementes de milho, submetidas a diferentes tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 1996.

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS	
		Emergência em Canteiro(%)	Velocidade de Emergência(índice)
Cultivar	1	1440.11271**	20.56284**
Tratamento	2	74.65346	3.47742**
Tempo	3	1980.65245**	46.47220**
Cul. X Trat.	2	36.27915	0.18091
Cult. X Tem.	3	251.13580**	8.49158**
Trat. X Tem.	6	59.16247*	1.68843**
Cul. X Trat. X Tem.	6	27.49535	0.25673
Resíduo	72	24.41570	0.22138
Média Geral		75.96077	10.97656
Coef. de Variação(%)		6.505	4.287

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 6A - Resumo da análise de variância dos dados obtidos da avaliação da qualidade física e sanitária de sementes de milho, submetidas a diferentes tratamento. UFLA, Lavras - MG, 1995.

CAUSAS DA VARIÇÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		Dano Mecânico(%)	<i>Aspergillus flavus</i> (%)	<i>Penicillium spp</i> (%)	<i>Fusarium moniliforme</i> (%)
Cultivar	1	2118.73766**	75.71091**	17.20822	730.86212**
Trat./C ₁	2	81.22066**	15406.25273**	1604.49857**	409.38890**
Trat./C ₂	2	14.99203	12402.96594**	3266.97954**	48.6031
Tempo/C ₁	3	29.96414*	7688.89535**	45.94934	7657.24024**
Tempo/C ₂	3	15.05466	10863.78519**	756.59905**	7854.16804**
Trat. x tem./C ₁	6	12.59462	1898.52914**	1489.73010**	484.51191**
Trat. x tem./C ₂	6	43.42467**	2241.622823**	1195.51012**	708.21647**
Resíduo	72	9.78718	15.62180	44.69716	29.70356
Média Geral		48.3631	36.6779	38.0024	38.8541
Coef. de variação(%)		6.469	10.776	17.593	14.027

* Significância ao nível de 5% de probabilidade.

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.

C₁ - AG 122

C₂ - C901