

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM SEMENTES DE MILHO CAUSADAS PELO AO ENVELHECIMENTO ACELERADO¹

Maria Cristina Mingues Spinola^{2,5}; Silvio Moure Cícero^{3*}; Murilo de Melo⁴

²*Pós-Graduada do Depto. de Produção Vegetal - USP/ESALQ.*

³*Depto. de Produção Vegetal - USP/ESALQ.*

⁴*Depto. de Ciências Biológicas/CEBTEC - USP/ESALQ, C.P. 9 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.*

⁵*Bolsista FAPESP.*

*Autor correspondente <smcicero@carpa.ciagri.usp.br>

RESUMO: Para avaliar possíveis alterações bioquímicas (análises eletroforéticas de proteínas totais e das isoenzimas peroxidase, fosfatase ácida e malato desidrogenase) e fisiológicas (germinação e vigor) que ocorrem nas sementes de milho durante a permanência das mesmas nas condições recomendadas na metodologia do teste de envelhecimento acelerado (41°C e 100% UR), foi realizada a presente pesquisa. Utilizaram-se sementes de milho, híbrido AG122, provenientes de quatro lotes. Os períodos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de permanência das sementes na incubadora (envelhecimento acelerado) definiram os tratamentos. As alterações nos perfis isoenzimáticos (fosfatase ácida e peroxidase) detectadas nas sementes, a partir do período 72h de envelhecimento acelerado, revelaram o provável efeito deteriorativo provocado pela exposição das sementes às condições do teste, independentemente da qualidade do lote, apesar de a maioria dos testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes não terem sido sensíveis para detectar tal efeito.

Palavras-chave: *Zea mays*, eletroforese, germinação, vigor

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS IN CORN SEEDS DUE TO ACCELERATED AGING

ABSTRACT: In order to evaluate biochemical (total protein, acid phosphatase, peroxidase and malate dehydrogenase electrophoresis) and physiological (germination and seed vigor) alterations occurring during corn seed accelerated aging (41°C and 100%UR), four corn seed lots of the double hybrid (AG122) were submitted to zero, 24, 48, 72, 96 and 120 hours of accelerated aging. The biochemical assays carried out (isozyme electrophoretical patterns of acid phosphatase e peroxidase) are more sensitive than the physiological test used to monitorate corn seed physiological quality deterioration during corn seed accelerated aging.

Key words: *Zea mays*, electrophoresis, germination, vigour

INTRODUÇÃO

O objetivo fundamental de um sistema organizado de produção de sementes é a obtenção de material de alta qualidade genética, física, fisiológica e sanitária, permitindo que as características superiores dos cultivares obtidos pela pesquisa, sejam transferidas aos agricultores.

A qualidade fisiológica das sementes é máxima por ocasião da maturidade; a partir deste momento processos degenerativos começam a ocorrer. Essas alterações, que podem ser de natureza física, fisiológica ou bioquímica, caracterizam a deterioração, sendo a perda da capacidade germinativa uma das suas consequências finais.

A detecção da deterioração de sementes por intermédio de testes de vigor pode ser entendida como componente importante na avaliação da qualidade fisiológica, contribuindo na solução de problemas da indústria de sementes, tal como o armazenamento. Dentro deste contexto, o teste de envelhecimento acelerado foi desenvolvido para avaliar o potencial relativo de

armazenamento de lotes de sementes. Este teste destaca-se por apresentar, dentro de um mesmo laboratório, alto grau de padronização e reprodutibilidade, tanto em termos de metodologia de execução como interpretação dos resultados obtidos (Delouche, 1976; Association of Official Seed Analysts, 1983; Krzyzanowski & Miranda, 1990).

O principal desafio das pesquisas sobre testes de vigor está na identificação de parâmetros relacionados à deterioração das sementes, que precedam a perda da capacidade germinativa. Dentro desta idéia destaca-se a técnica da eletroforese de proteínas, que pode possibilitar a detecção dos estádios iniciais da deterioração, através da atividade de enzimas associadas com a degradação e oxidação de substâncias de reserva bem como biosíntese de novas substâncias.

Priestley (1986), associou a perda de algumas formas de isoenzimas tais como, a peroxidase, fosfatase acida, desidrogenase, esterase e aminopeptidase com o envelhecimento severo de um grupo de espécie de sementes.

¹Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à USP/ESALQ - Piracicaba, SP.

Chauhan et al. (1985), estudando variação eletroforética de proteínas e enzimas de soja e cevada em relação a qualidade das sementes, observou que bandas de proteínas e enzimas (esterases, fosfatase e transaminases) funcionam como marcas moleculares na avaliação da qualidade. Também, Vieira (1996), encontrou como promissores indicadores do estágio de deterioração de sementes de algodoeiro as variações eletroforéticas de proteínas e das enzimas glutamato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, enzima málica, peroxidase e 6-fosfogluconato.

Os perfis eletroforéticos de proteínas mostram grande número de polipeptídeos possíveis de serem analisados, possibilitando a identificação de grupos característicos e suas alterações com o envelhecimento e eventos fisiológicos. 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 (Carraro, 1990).

Embora existam na literatura trabalhos que estudem os efeitos do teste de envelhecimento acelerado nas sementes, poucos evidenciaram tais efeitos em termos de alterações proteicas e enzimáticas.

Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar possíveis alterações bioquímicas, através de análises eletroforéticas e fisiológicas, através dos testes de germinação e de vigor, que ocorrem nas sementes de milho, devidas a permanência das mesmas nas condições recomendadas para o teste de envelhecimento acelerado (100% UR do ar, 41°C).

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes e no Campo Experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e no Centro de Biotecnologia (CEBETC) da Universidade de São Paulo, ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

Foram utilizadas sementes de milho, híbrido duplo (AG122), representadas por 4 lotes de sementes tratadas como uma mistura de fungicida e inseticida, fornecidas pela Empresa Agroceres.

Os tratamentos consistiram em submeter as sementes a 6 períodos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) de permanência das sementes em incubadora tipo BOD, nas condições do teste de envelhecimento acelerado (100% UR do ar, 41°C). Para tanto, utilizaram-se, de cada lote, sementes suficientes para uma distribuição de uma camada uniforme sobre uma tela de alumínio fixado no interior de uma caixa plástica tipo "gerbox", funcionando como compartimento individual (mini-câmara). No interior dessas mini-câmaras foram adicionados 40 mL de água e, em seguida, os gerbox adaptados foram transferidos para a BOD regulada a 41°C, onde permaneceram durante os diferentes períodos dos tratamentos.

Após a remoção das sementes da BOD, determinou-se o teor de água (método da estufa à 105 + 3°C por 24 horas (Brasil, 1992)), atingido pelas sementes nos diferentes períodos de envelhecimento acelerado. A seguir, uma quantidade de sementes foi reservada para imediato preparo das amostras a serem utilizadas nas análises bioquímicas e outra quantidade mantida em condições controladas (60%UR e 20°C) até atingirem peso constante, visando a uniformização do teor de água das sementes em todos os tratamentos, para posterior condução dos testes utilizados para avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

A avaliação do potencial fisiológico consistiu-se das seguintes análises:

Para o teste de Germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote para cada tratamento. Efetuou-se a semeadura das sementes em rolo de papel-toalha da marca Germitest, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e colocados para germinar em germinador regulado à temperatura constante de 25°C. As avaliações foram efetuadas aos quatro e sete dias após a instalação do teste, de acordo com os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e o resultado expresso em porcentagem média de plântulas normais.

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado adotando-se a metodologia recomendada pelo Comitê de Vigor da Association of Official Seed Analysts/AOSA (1983) e descrita por Marcos Filho et al. (1987). Para tanto, utilizou-se, de cada lote, sementes suficientes para uma distribuição de uma camada uniforme sobre uma tela de alumínio fixado no interior de uma caixa plástica tipo "gerbox", funcionando como compartimento individual (mini-câmara). No interior dessas mini-câmaras foram adicionados 40 mL de água e, em seguida, os "gerbox" adaptados foram transferidos para uma incubadora regulada a 41°C onde permaneceram por um período de 96 horas. Após esse período, quatro repetições de 50 sementes foram submetidas ao teste de germinação e após quatro dias, foi realizada a avaliação, computando-se a porcentagem de plântulas normais por tratamento.

O teste de frio com terra foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por lote para cada tratamento e instalado em caixas plásticas (60 X 30 X 10 cm) contendo uma mistura de areia e terra proveniente de área recentemente cultivada com milho, nas proporções respectivas em peso, de 2:1. Após a semeadura, foi adicionada água no substrato até que o mesmo atingisse 60% da capacidade de retenção. As caixas contendo as sementes permaneceram em câmara fria (10°C) por sete dias e posteriormente mantidas em ambiente de laboratório por mais sete dias, quando as plântulas emersas foram contadas e os resultados expressos em porcentagem média de plântulas emersas por tratamento.

Para o teste de emergência de plântulas em campo foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote para cada tratamento. As sementes foram distribuídas em sulco com 2 m de comprimento, 0,03 m de profundidade e a distância entre sulcos de 0,30 m. A avaliação foi efetuada aos 14 dias após a semeadura, determinando-se a porcentagem médias de plântulas emergidas por parcela (Marcos Filho et al. 1987).

O teste de condutividade elétrica foi realizado conforme a recomendação do Comitê de Vigor da Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1983) descrito por Loeffler et al. (1988). Foram utilizadas e pesadas quatro repetições de 50 sementes, previamente escolhidas para remoção daquelas com o pericarpo danificado, por lote para cada tratamento. Após a pesagem de cada amostra, as sementes foram transferidas para copos plásticos contendo 75 mL de água destilada e mantidas sob temperatura de 25°C, durante 24 horas. Decorrido esse período, a condutividade elétrica da solução foi determinada através de condutivímetro e os valores médios para cada parcela foram expressos em micromho por centímetro por grama de sementes.

A análise de variância para os parâmetros fisiológicos analisados foi realizada separadamente para cada teste, segundo delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, onde a comparação entre as médias dos lotes e dos diferentes períodos de envelhecimento acelerado foi efetuada através do teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Os dados referentes ao grau de umidade não foram submetidos à análise estatística; os demais, com exceção da condutividade elétrica, foram transformados em $\sqrt{x/100}$.

A avaliação das alterações bioquímicas foi feita realizando-se, a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida para proteínas totais e para as isoenzimas peroxidase, fosfatase ácida e malato desidrogenase, conforme descritas a seguir:

Para o preparo das amostras foram utilizadas aproximadamente 40 sementes, previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 1%, por amostra de cada tratamento foram trituradas e as proteínas de 500 mg de sementes moídas foram extraídas por maceração em 1,5 mL de tampão TRIS 0,1 M - pH 7,0 a temperatura de 0 a -5 °C. Os extratos foram centrifugados à 10.000g, por 15 minutos à 5 °C e o sobrenadante utilizado como fonte de proteína e enzimas.

O teor de proteínas nas amostras foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976), com as leituras da densidade ótica a 595nm feitas em espectrofotômetro HITACHI, modelo U3210, tendo como padrão albumina de soro bovino.

A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontinuo (7,0% gel de separação e 4,0% gel de concentração). em cubas tipo Protean II, por um período aproximado de 4 horas à 4°C,

sob uma tensão de aproximadamente 100V e corrente de 15mA. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina 0,5M em pH 8,9.

Alíquotas das amostras contendo 100 e 200µg de proteína foram aplicados nos géis de proteína totais e de isoenzimas respectivamente.

Após a corrida eletroforética os géis foram corados de forma específica para detecção das proteínas totais (Paccola-Meirelles et al., 1988) e das enzimas malato desidrogenase (Vallejos, 1983), fosfatase ácida (Vallejos, 1983) e peroxidase (Graham et al., 1964)

A avaliação dos perfis eletroforéticos obtidos foi realizada com base na presença ou ausência de bandas bem como na intensidade das mesmas. Para tanto, foram calculados os coeficientes de mobilidade relativa (RF), com base na razão entre a distância de migração da proteína e a distância de migração do corante marcador da frente do tampão (azul de bromofenol).

Foi realizado também análise sanitária das sementes, pelo teste de sanidade em papel de filtro, com o objetivo de averiguar, mesmo após a desinfecção com hipoclorito de sódio à 1%, a incidência de patógenos que poderiam interferir nas análises bioquímicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se o teor de água das sementes antes do envelhecimento acelerado, período 0h (TABELA 1), pode-se constatar, relativa uniformidade do grau de umidade entre os lotes, o que é considerado uma premissa para se obter resultados confiáveis neste teste, uma vez que segundo Marcos Filho et al. (1987), quanto maior o teor de água das sementes, maiores serão os efeitos deletérios deste teste.

Após a exposição das sementes aos diferentes períodos de envelhecimento acelerado, observou-se aumento nos teores de água à medida que os períodos aumentavam, tendendo a estabilização nos últimos períodos de permanência na câmara. Para se proceder as avaliações fisiológicas comparativas entre os períodos, houve a necessidade de uniformização dos teores de água das sementes nos diferentes períodos. Após a tentativa de uniformização, as mesmas permaneceram na faixa de 9,5 a 15,5% (TABELA 2).

Os resultados da maioria dos testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes (TABELA 2)

TABELA 1 - Valores médios dos teores de água (%), das sementes de milho, (híbrido AG 122), após os períodos de envelhecimento acelerado.

LOTES	Períodos de Envelhecimento					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
L1	9,7	16,3	17,0	19,6	21,0	22,4
L2	9,7	16,0	17,5	19,8	21,3	21,7
L3	10,0	16,2	18,1	19,8	21,4	21,8
L4	9,5	16,6	18,5	20,0	21,7	23,1

TABELA 2 - Valores médios do teor de água das sementes após uniformização e dos testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes de milho (híbrido AG 122), referentes aos períodos (0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h) de permanência das mesmas nas condições do teste de envelhecimento acelerado.

lotes	Teor de água (%)						lotes	Germinação (%)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h		0h	24h	48h	72h	96h	120h
L1	9,7	13,0	12,5	14,9	14,4	14,1	L1	99 Aa ¹	96 Ba	92 BCa	93 BCa	84 CDa	75 Db
L2	9,7	12,7	13,3	14,8	15,0	13,6	L2	98 Aa	97 Aa	92 ABa	94 ABa	91 ABa	85 Bab
L3	10,0	13,3	13,9	14,8	15,2	13,3	L3	99 Aa	96 ABa	97 ABa	96 ABa	90 BCa	85 Cab
L4	9,5	13,2	14,5	14,7	15,5	14,8	L4	100 Aa	93 Ba	92 Ba	92 Ba	88 Ba	86 Ba
	CV (%)							4,6	5,8	6,2	4,7	5,2	5,7
lotes	Envelhecimento acelerado (%)						lotes	Frio com terra (%)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h		0h	24h	48h	72h	96h	120h
L1	86 Aa	82 Ab	82 Aa	78 Aa	78 Aa	55 Bb	L1	92 Aa	86 Aab	85 Aa	89 Aa	89 Aab	83 Aab
L2	91 Aa	93 Aa	75 Ba	80 Ba	77 Ba	81 Ba	L2	95 Aa	92 Aa	92 Aa	92 Aa	93 Aa	89 Aa
L3	85 ABa	91 Aab	85 ABa	85 ABa	85 ABa	81 Ba	L3	94 Aa	90 Aa	87 ABa	89 ABa	85 ABab	77 Bb
L4	85 ABa	88 Aab	84 ABa	86 ABa	81 ABa	72 Ba	L4	80 Ab	78 Ab	72 Ab	74 Ab	77 Ab	77 Ab
CV (%)	6,5	5,3	5,8	6,3	6,2	5,4	CV (%)	6,5	6,2	6,2	5,2	7,3	6,5
lotes	Emergência de plântulas em campo (%)						lotes	Condutividade elétrica (µmhos/cm/g sementes)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h		0h	24h	48h	72h	96h	120h
L1	98 Aa	96 Aa	90 ABa	90 ABa	90 ABa	86 Ba	L1	19 Ac	21 Ac	19 Ac	18 Ac	18 Ac	20 Ac
L2	98 Aa	94 Aa	92 Aa	96 Aa	92 Aa	92 Aa	L2	14 Aab	14 Aab	13 Aab	14 Ab	13 Aab	13 Aab
L3	98 Aa	96 Aa	92 Aa	90 Aa	88 Aa	92 Aa	L3	16 Abc	16 Ab	14 Ab	14 Ab	16 Abc	16 Ab
L4	90 Aa	94 Aa	88 Aa	92 Aa	92 Aa	88 Aa	L4	11 Aa	12 Aa	10 Aa	10 Aa	10 Aa	11 Aa
CV (%)	2,6	1,8	2,0	2,8	2,8	2,6	CV (%)	10,6	9,8	6,1	8,9	13,1	8,2

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

mostraram que, o lote 1 revelou-se como lote de qualidade inferior aos demais lotes analisados e o 2 como de qualidade superior.

Pelo comportamento dos lotes de sementes em relação aos diferentes períodos de permanência das sementes nas condições do teste de envelhecimento acelerado, observa-se que poucos foram os testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes que revelaram sensibilidade após os diferentes períodos de permanência das sementes nas condições do teste de envelhecimento acelerado e quando apresentavam, eram observadas nos maiores períodos.

Pela análise sanitária, não foi constatado incidência de patógenos que pudessem interferir nas análises bioquímicas e nem no desempenho das sementes, possivelmente devido ao tratamento fungicida e a desinfecção prévia com hipoclorito de sódio à 1% que as sementes receberam.

Em relação à análise eletroforética, pode ser observado, pelas TABELAS 3, 4 e 5, que dentre as enzimas avaliadas, a peroxidase e a fosfatase ácida, apresentaram diminuição do número e/ou intensidade das bandas com o aumento do tempo de envelhecimento acelerado. Por outro lado, nos perfis eletroforéticos da enzima malato desidrogenase, não foram constatadas alterações com o aumento do período de envelhecimento acelerado.

A malato desidrogenase (MDH), a enzima que manteve seus padrões isoenzimáticos inalterados com o avanço do processo deteriorativo das sementes pelo envelhecimento acelerado (TABELA 3), catalisa a conversão 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 outros compartimentos celulares, geralmente é de natureza constitutiva com atividade não limitante em todas as organelas e no citoplasma. Por se tratar de uma enzima importante na respiração celular, o aumento do número (expressão em diferentes compartimentos celulares) e ou intensidade de coloração (indução da atividade da enzima) das bandas nos perfis eletroforéticos observados por Brandão Junior (1996) em sementes de milho envelhecidas por 144 horas e por Vieira (1996) em sementes de algodão quando submetidas aos maiores períodos de envelhecimento, pode ser devido ao aumento da respiração que ocorre em sementes que se encontram em processo de deterioração avançada, uma vez que as enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de qualidade reduzida (Shatters et al., 1994). Na mesma pesquisa, Shatters et al. (1994) observaram que em sementes de soja, a atividade da enzima malato desidrogenase foi a menos afetada pelos tratamentos de envelhecimento. Portanto, é de se supor que o período de

TABELA 3 - Ocorrência (intensidade e valores de Rf) das bandas da Isoenzima malato desidrogenase (MDH), de sementes de milho (híbrido AG122), referentes aos diferentes períodos de permanência das mesmas nas condições do teste de envelhecimento acelerado (EA).

MDH	Número de bandas				
	1	2	3	4	5
	Valores de Rf				
Tratamentos	0,46	0,48	0,53	0,56	0,58
0h de EA					
lote 1	= ¹	=	=	=	=
lote 2	=	=	=	=	=
lote 3	=	=	=	=	=
lote 4	=	=	=	=	=
24h de EA					
lote 1	=	=	=	=	=
lote 2	=	=	=	=	=
lote 3	=	=	=	=	=
lote 4	=	=	=	=	=
48h de EA					
lote 1	=	=	=	=	=
lote 2	=	=	=	=	=
lote 3	=	=	=	=	=
lote 4	=	=	=	=	=
72h de EA					
lote 1	=	=	=	=	=
lote 2	=	=	=	=	=
lote 3	=	=	=	=	=
lote 4	=	=	=	=	=
96h de EA					
lote 1	=	=	=	=	=
lote 2	=	=	=	=	=
lote 3	=	=	=	=	=
lote 4	=	=	=	=	=
120h de EA					
lote 1	=	=	=	=	=
lote 2	=	=	=	=	=
lote 3	=	=	=	=	=
lote 4	=	=	=	=	=

¹(= presença de banda)

120 horas de envelhecimento acelerado empregado no presente estudo pode não ter sido suficiente para ocasionar alterações metabólicas suficientes para provocar alterações nos perfis eletroforéticos desta enzima.

A fosfatase ácida, uma das enzimas que apresentaram decréscimo no número e ou intensidade de bandas com o envelhecimento acelerado, é uma hidrolase que participa em reações de hidrólise de esteres, podendo atuar sobre fosfolipídeos de membrana, provocando a peroxidação destes lipídeos. Roberts (1973) cita a preponderância de enzimas hidrolíticas terem a sua atividade

TABELA 4 - Ocorrência (intensidade e valores de Rf) das bandas da Isoenzima fosfatase ácida (FA), de sementes de milho (híbrido AG122), referentes aos diferentes períodos de permanência das mesmas nas condições do teste de envelhecimento acelerado (EA).

FA	Número de bandas	
	1	2
	Valores de Rf	
Tratamentos	0,03	0,08
0h de EA		
lote 1	= ¹	=
lote 2	*	*
lote 3	=	=
lote 4	=	=
24h de EA		
lote 1	=	=
lote 2	*	*
lote 3	=	=
lote 4	=	=
48h de EA		
lote 1	=	=
lote 2	*	*
lote 3	*	*
lote 4	*	*
72h de EA		
lote 1	x	x
lote 2	x	x
lote 3	x	x
lote 4	x	x
96h de EA		
lote 1	x	x
lote 2	x	x
lote 3	x	x
lote 4	x	x
120h de EA		
lote 1	x	x
lote 2	x	x
lote 3	x	x
lote 4	x	x

¹(= presença de banda, * banda de menor intensidade, X ausência de banda)

incrementada com a perda da viabilidade. Entretanto, como pode ser observado na TABELA 4, esta enzima mostrou-se com menos atividade nos períodos 0h e 24h de envelhecimento acelerado para o lote 2, considerado pelos testes determinantes da qualidade fisiológica como lote de qualidade superior em relação aos outros lotes analisados, porém no período 48h de envelhecimento acelerado, a redução de intensidade das bandas foi, também, observada nos lotes 2, 3 e 4 e o desaparecimento por completo das referidas bandas foi constatado para todos os lotes a partir do período 72h de envelhecimento acelerado.

TABELA 5 - Ocorrência (intensidade e valores de Rf) das bandas da Isoenzima peroxidase (PRX), de sementes de milho (híbrido AG122), referentes aos diferentes períodos de permanência das mesmas nas condições do teste de envelhecimento acelerado (EA).

PRX	Número de bandas										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Valores de Rf										
Tratamentos	0,03	0,08				0,21	0,28	0,33	0,37	0,45	
0h de EA											
lote 1	= ¹	=	X	X	X	*	=	=	=	X	X
lote 2	=	=	X	X	X	*	=	=	=	X	X
lote 3	=	=	X	X	X	=	=	+	=	X	X
lote 4	=	=	X	X	X	*	=	=	=	X	X
24h de EA											
lote 1	=	=	X	X	X	*	=	=	=	X	X
lote 2	=	=	X	X	X	*	=	=	=	X	X
lote 3	=	=	X	X	X	=	=	+	=	X	X
lote 4	=	=	X	X	X	*	=	=	=	X	X
48h de EA											
lote 1	=	=	X	X	X	=	=	=	=	X	X
lote 2	=	=	X	X	X	=	=	=	=	X	X
lote 3	=	=	X	X	X	=	=	+	=	X	X
lote 4	=	=	X	X	X	=	=	=	=	X	X
72h de EA											
lote 1	*	*	X	X	X	=	=	=	=	X	X
lote 2	*	*	X	X	X	=	=	=	=	X	X
lote 3	*	*	X	X	X	=	=	=	=	X	X
lote 4	*	*	X	X	X	=	=	=	=	X	X
96h de EA											
lote 1	*	X	X	X	X	=	=	=	=	=	X
lote 2	*	X	X	X	X	=	=	=	=	=	X
lote 3	*	X	X	X	X	=	=	=	=	=	X
lote 4	*	X	X	X	X	=	=	=	=	=	X
120h de EA											
lote 1	X	X	X	X	X	=	=	=	=	*	X
lote 2	X	X	X	X	X	=	=	=	=	*	X
lote 3	X	X	X	X	X	=	=	=	=	*	X
lote 4	X	X	X	X	X	=	=	=	=	*	X

¹(= presença de banda, * banda de menor intensidade, + banda de maior intensidade, X ausência de banda)

Portanto, a atividade dessa enzima, correlacionou-se negativamente, com os prováveis efeitos deteriorativos provocados pelo envelhecimento acelerado nas sementes a partir do período de 72h. Apesar dos resultados estarem em desacordo com os encontrados por Rajagopal & Sen-Mandi (1992), que observaram alta atividade desta enzima em embriões de sementes de arroz envelhecidas artificialmente e por Brandão Junior (1996), em que a atividade da enzima foi observada a partir de 96 horas de envelhecimento, eles reforçam os obtidos com cevada, soja (Chauhan et al., 1985) e amendoim (Jeng & Sung, 1994), nos quais a atividade da fosfatase ácida decresceu com o aumento do envelhecimento.

Pela análise da TABELA 5, podem ser observados também mudanças nos padrões isoenzimáticos da peroxidase com o aumento do tempo de envelhecimento acelerado das sementes. A partir do período de 72h de envelhecimento acelerado foi observado que os padrões das bandas desta isoenzima, revelam-se semelhantes para os diferentes lotes, ocorrendo diminuição da intensidade de coloração de algumas bandas que tenderam a desaparecer nos períodos subsequentes.

A atividade dessa enzima, correlacionou-se negativamente com os resultados detectados pelos testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes. Por ser a peroxidase uma das enzimas "scavenger"

(Basavarajappa et al., 1991; Jeng & Sung, 1994), ou seja removedora de peróxido, a perda da atividade dessa enzima pode, parcialmente, esclarecer porque sementes envelhecidas acumulam mais peróxidos. Os resultados deste trabalho reforçam os de Basavarajappa et al. (1991), Jeng & Sung (1994), os quais verificaram aumento da peroxidação de lipídeos com a evolução da deterioração das sementes. Outros autores, a exemplo de Abdul-Baki & Anderson (1972) encontraram também relação entre a

atividade das peroxidases com a viabilidade de sementes.

Em relação aos perfis eletroforéticos de proteínas totais, referentes aos extratos de sementes de milho que foram submetidas aos diferentes períodos de envelhecimento acelerado, pode ser observado nas TABELAS 6a e 6b, que o número de bandas foi mantido, havendo o desaparecimento de três bandas, que diferiram quanto a posição entre os períodos (0h, 24h, 48h) e (72h, 96h e 120h). Estes resultados estão em desacordo com

TABELA 6a - Ocorrência (intensidade e valores de Rf) das bandas de proteínas totais, de sementes de milho (híbrido AG 122), referentes aos períodos (0h, 24h e 48h) de permanência das mesmas nas condições do teste de envelhecimento acelerado (EA).

Prot. Total	Número de bandas																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	Valores de Rf																						
Tratamentos	0,02	0,04	0,07	0,10	0,12	0,15	0,18	0,22	0,23	0,25	0,27	0,29	0,35	0,38	0,42	0,44	0,50	0,54	0,59	0,63	0,71	0,77	0,87
0h de EA																							
lote 1	= ¹	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 2	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 3	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 4	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
24h de EA																							
lote 1	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 2	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 3	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 4	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
48h de EA																							
lote 1	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 2	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 3	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X
lote 4	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	X	=	=	X	X

¹(= presença de banda, X ausência de banda)

TABELA 6b - Ocorrência (intensidade e valores de Rf) das bandas de proteínas totais, de sementes de milho (híbrido AG 122), referentes aos períodos (72h, 96h e 120h) de permanência das mesmas nas condições do teste de envelhecimento acelerado (EA).

Prot. Total	Número de bandas																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	Valores de Rf																						
Tratamentos	0,02	0,04	0,07	0,10	0,12	0,15	0,18	0,22	0,23	0,25	0,27	0,29	0,35	0,38	0,42	0,44	0,50	0,54	0,59	0,63	0,71	0,77	0,87
72h de EA																							
lote 1	x ¹	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 2	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 3	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 4	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
96h de EA																							
lote 1	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 2	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 3	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 4	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
120h de EA																							
lote 1	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 2	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 3	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
lote 4	X	=	=	=	X	=	=	=	=	X	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

¹(= presença de banda, X ausência de banda)

os observados por Basavarajappa et al. (1991), Varier & Dadlani (1992) e Vieira (1996), que encontraram decréscimo no número de bandas nos perfis eletroforéticos das proteínas de sementes envelhecidas artificialmente.

Portanto, para este híbrido (AG122), verifica-se que as alterações nos perfis isoenzimáticos (fosfatase ácida e peroxidase) detectados nas sementes a partir do período 72h de envelhecimento acelerado, se relacionaram com o provável efeito deteriorativo provocado pela exposição das sementes às condições do teste de envelhecimento acelerado, independentemente da qualidade dos lotes, apesar da maioria dos testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes, aparentemente não terem sido sensíveis o suficiente para detectar o efeito deteriorativo provocado pelo envelhecimento acelerado e, quando detectado, era observado nos períodos mais longos de tratamento.

CONCLUSÃO

As alterações eletroforéticas das isoenzimas fosfatase ácida e peroxidase foram mais efetivas do que os testes utilizados para avaliação da qualidade fisiológica, em indicar o provável efeito deteriorativo que o teste de envelhecimento acelerado provoca nas sementes de milho.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWISK, T.T. (Ed.) **Seed Biology**: germination control, metabolism and pathology. New York: Academic Press, 1972. v.2, p.283-315.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln: AOSA, 1983. 93p. (Contribution,32)
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seeds Science and Technology**, v.19, p.279-286, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRANDÃO JUNIOR, D.E. Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho Lavras, 1996. 110p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras

- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- CARRARO, D.M. Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1990. 121p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- 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**, v.13, p.629-641, 1985.
- DELOUCHE, J.C. Standardization of vigor tests. **Journal of Seed Technology**, v.1, p.75-86, 1976.
- GRAHAM, R.C.; LUNDHOLM, U.; KARNOVSKI, M.J. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.13, p.150-152, 1964.
- JENG, T.L.; SUNG J.M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxidase scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, v.22, p.531-539, 1994.
- KRZYZANOWSKI, F.C.; MIRANDA, Z.F.S. Relatório do Comitê de Vigor da ABRATES. **Informativo ABRATES**, v.1, p.7-25, 1990.
- LOEFFLER; T.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal Seed Technology**, v.12, p.37-53, 1988.
- MARCOS FILHO; J. CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba, FEALQ, 1987. 230p.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. **Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. 54p.
- PRIESTLEY, D.A. **Seed ageing**. New York: Comstock Publication Association, 1986.
- RAJAGOPAL, A.S.M.; SEN-MANDI, S. Studies on acid alkaline phosphatase in age rice embryos. **Seed Science and Technology**, v.20, p.215-222, 1992.
- ROBERTS, E.H. Loss of viability, ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, v.1, p.529-545, 1973.
- SHATTERS, R.G.JR.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S.H. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, v.4, p.33-41, 1994.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.469-516.
- 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**, v.35, p.145-151, 1992.
- VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras, 1996. 114p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras

Recebido em 02.09.99