



ARTIGO

Desempenho de sementes, vigor e expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob efeito da restrição hídrica

Tiago Pedó¹, Emanuela Garbin Martinazzo^{2*}, Tiago Zanatta Aumonde³ e Francisco Amaral Villela^{3,4}

Recebido: 1 de maio de 2013

Recebido após revisão: 18 de novembro de 2014

Aceito: 9 de março de 2015

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2626>

RESUMO: (Desempenho de sementes, vigor e expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob efeito da restrição hídrica). O trabalho objetivou avaliar o desempenho fisiológico de sementes e a expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob restrição hídrica. Para a simulação da restrição hídrica, as sementes de teosinto foram submetidas aos potenciais osmóticos de 0,0; -0,3; -0,6 e -0,9 MPa induzida por polietilenoglicol 6000. Foram avaliados a germinação, a primeira contagem do teste de germinação, o comprimento e a massa da matéria seca de parte aérea e raiz, a expressão das isoenzimas malato-desidrogenase, glutamato-oxalacetato-transaminase, esterase e fosfatase ácida. A diminuição do potencial osmótico a partir -0,3 MPa prejudicou o processo germinativo e o crescimento inicial das plântulas. A restrição hídrica em sementes de teosinto afeta negativamente o desempenho de plântulas, fato que possivelmente mantém relação com a alteração da expressão dos diferentes sistemas isoenzimáticos.

Palavras-chave: *Euchlaena mexicana*, estresse hídrico, esterase, crescimento inicial.

ABSTRACT: (Performance of seeds, vigor and isoenzyme expression in teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) seedlings under the water restriction effect). This study aimed to evaluate seed physiological performance and isoenzyme expression in seedlings of teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) under water restriction. For water restriction simulation, teosinto seeds were subjected to osmotic potentials of 0.0, -0.3, -0.6 and -0.9 MPa induced by polyethylene glycol 6000. We evaluated: germination; first count of the germination test; length and mass of both shoot and root dry matter; and expression of isoenzymes malate dehydrogenase, glutamate oxaloacetate transaminase, esterase and acid phosphatase. The decreased osmotic potential from -0.3 MPa impaired germination and early seedling growth. Fluid restriction in teosinto seeds negatively affects seedling performance, which may be related to alteration in expression of the isoenzymatic systems.

Keywords: *Euchlaena mexicana*, water stress, esterase, initial growth.

INTRODUÇÃO

O teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) é uma Poaceae anual de verão que apresenta alto perfilhamento e rebrote após o corte, possui composição nutritiva similar ao milho e apresenta-se como alternativa de cultivo sob condições ambientais desfavoráveis. É uma espécie amplamente utilizada como pastagem para bovinos de leite, sendo grande a ocorrência de sementes salvas pelos agricultores, que comercializam o excedente da sua produção (Motta & Maia 1999). Este fato colabora para a baixa qualidade fisiológica das sementes e o inferior desempenho de plântulas.

O cultivo de espécies forrageiras de verão é sujeito a variações ambientais, principalmente ao déficit hídrico. A baixa disponibilidade de água para embebição da semente durante o processo germinativo reflete-se na diminuição da velocidade de processos fisiológicos relacionados à retomada do crescimento do embrião (Moraes & Menezes 2003). Tal condição de meio ambiente pode refletir-se na redução da velocidade e do percentual de germinação, resultando na desuniformidade do estande de plântulas

(Silva *et al.* 2011), na diminuição do crescimento pela redução da turgescência celular ou provocar a redução da viabilidade e do vigor das sementes (Fanti & Perez 2004).

Além disso, a restrição hídrica pode conduzir à elevação na produção de radicais livres, afetar o padrão de expressão de isoenzimática e reduzir a seletividade de membranas celulares, afetando diferentes processos envolvidos no metabolismo de plântulas (Malone *et al.* 2007, Henning *et al.* 2010). O estudo da expressão isoenzimática durante o crescimento inicial de plântulas é importante por possibilitar a melhor compreensão do efeito da restrição hídrica sobre a retomada do crescimento do embrião (Peske *et al.* 2012).

As isoenzimas são altamente influenciadas pelo ambiente (Malone *et al.* 2007), sendo importantes para a avaliação do vigor das sementes sobre diferentes condições de meio (Henning *et al.* 2010, Veiga *et al.* 2010). Além disso, catalisam reações envolvidas na produção de energia (Veiga *et al.* 2010), na defesa contra estresses ambientais, sejam bióticos ou abióticos.

Desse modo, o presente trabalho objetivou avaliar

1. Engenheiro Agrônomo, MSc Doutorando em C&T de Sementes, UFPel. Bolsista Capes, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

2. Bióloga, Mestre em Ciências pela Faculdade de Agronomia, UFLA) e Doutora em Fisiologia Vegetal pela UFPel. Bolsista PNPd CAPES, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

3. Departamento de Fitotecnia e Programa de Pós-Graduação em C&T de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel. Pelotas, RS, Brasil.

4. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

* Autor para contato. E-mail: emartinazzo@gmail.com

o desempenho fisiológico de sementes e a expressão isoenzimática em plântulas de teosinto sob efeito da restrição hídrica.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no laboratório de Fisiologia de Sementes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Foram utilizadas sementes de um acesso de teosinto em condições, físicas, fisiológicas e sanitárias apropriadas para a semeadura, produzidas conforme recomendações para a cultura. As sementes foram colhidas, submetidas ao processo de secagem artificial em estufa e beneficiadas, sendo posteriormente armazenadas em condições de câmara fria e seca.

A dormência das sementes foi superada conforme recomendações de Motta & Maia (1999). Os tratamentos consistiram em quatro potenciais osmóticos: zero (0,0 g L⁻¹); -0,3 MPa (151,4 g L⁻¹); -0,6 MPa (223,7 g L⁻¹); e -0,9 MPa (279,3 g L⁻¹), estabelecidos a partir de testes preliminares por meio de soluções compostas por água destilada e diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG-6000) e empregando-se a relação massa e volume (m/v).

Para a avaliação do efeito do déficit hídrico sobre o desempenho fisiológico das sementes e a expressão isoenzimática em plântulas de teosinto foram efetuadas as seguintes análises:

Teste de germinação (G): realizado em quatro repetições, cada uma composta de quatro amostras de 50 sementes, dispostas para germinar em rolos formados por três folhas de papel germitest, umedecidas com as soluções de diferentes potenciais osmóticos, com volume de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos foram transferidos para câmara de germinação tipo BOD a 25 °C e período luminoso de 12 h. Os rolos foram colocados dentro de sacos de polietileno e fechados com atilhos de borracha. As avaliações foram efetuadas aos sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais, conforme recomendações expressas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil 2009).

Primeira contagem de germinação (PC): conduzida conjuntamente ao teste de germinação e avaliada aos quatro dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, conforme indicado pelas Regras para Análises de Sementes (Brasil 2009).

Comprimento da parte aérea (C_{PA}) e da radícula das plântulas (C_R): obtidos a partir de quatro amostras de 10 plântulas, coletadas aleatoriamente, ao final do teste de germinação. O comprimento de parte aérea foi obtido pela medida da distância entre a inserção da porção basal da radícula e o ápice da parte aérea, enquanto o comprimento de radícula foi mensurado pela medida da distância entre a parte apical e basal da radícula. Os resultados foram expressos em mm órgão⁻¹.

Massa da matéria seca de parte aérea (W_{PA}) e das raízes das plântulas (W_R): obtida pela aferição da massa de quatro amostras de 10 plântulas, coletadas aleatoriamente, ao final do teste de germinação. As plântulas foram acondicionadas em envelopes de papel pardo e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada sob temperatura de 70 °C, até massa constante. Os resultados foram expressos em miligramas por órgão (mg órgão⁻¹).

Expressão isoenzimática: foram coletadas 10 plântulas por repetição, coletadas aleatoriamente, após o final do teste de germinação. A expressão das isoenzimas malato-desidrogenase, glutamato-oxalacetato-transaminase, esterase e fosfatase ácida foi determinada pelo sistema de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. Para isso, as plântulas foram maceradas separadamente em gral de porcelana, em banho de gelo. Após, 200 mg do macerado de cada amostra foi transferido para tubos de microcentrífuga e acrescidos de solução extratora (Borato de lítio 0,2 M a pH 8,3 + Tris Citrato + 0,2 M a pH 8,3) + 0,15% de 2-mercaptoetanol na proporção 1:2 (m/v) e a eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, aplicando-se 20 µL de cada amostra, conforme metodologia (Malone *et al.* 2007). Os sistemas de coloração utilizados foram os descritos por Scandális (1969) e Alfenas (1998).

O delineamento experimental foi blocos casualizados com quatro repetições. Os dados de germinação e crescimento inicial foram submetidos à análise de variância e se significativo a 5%, realizou-se análise de regressão. Para a expressão isoenzimática, a interpretação dos resultados foi por análise visual dos géis, presença ou ausência e intensidade de expressão das bandas (Peske *et al.* 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes restrições hídricas simuladas por polietilenoglicol afetaram o desempenho de sementes e a expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (Figs. 1 e 2). A germinação e a primeira contagem do teste de germinação apresentaram valores de 74 e 22 %, respectivamente, com posterior redução a partir do potencial osmótico de -0,3 MPa. O menor percentual de germinação foi observado no potencial osmótico de -0,9 MPa, com redução de 73 % (Fig. 1A). O efeito do polietilenoglicol sobre a redução da germinação de sementes é explicado pelo seu elevado peso molecular e a alta viscosidade somada à baixa taxa de difusão de O₂ (Braccini *et al.* 1996). Além disso, a baixa disponibilidade hídrica constitui fator que influencia negativamente no processo respiratório, na mobilização de reservas, na atividade enzimática hidrolítica e na ativação de diferentes processos fisiológicos relacionados à germinação e ao vigor (Peske *et al.* 2012).

O comprimento de parte aérea e de raiz ajustaram-se ao modelo quadrático e foram obtidos elevados coeficientes de determinação (R² = 0,93 e R² = 0,98). O comprimento de ambas as estruturas vegetais mostrou tendência de

redução a partir de 0,0 MPa, sendo mais afetado a partir de -0,3 MPa (Fig. 1B). A redução do crescimento pode ser explicada pelo fato de o alongamento e a síntese de

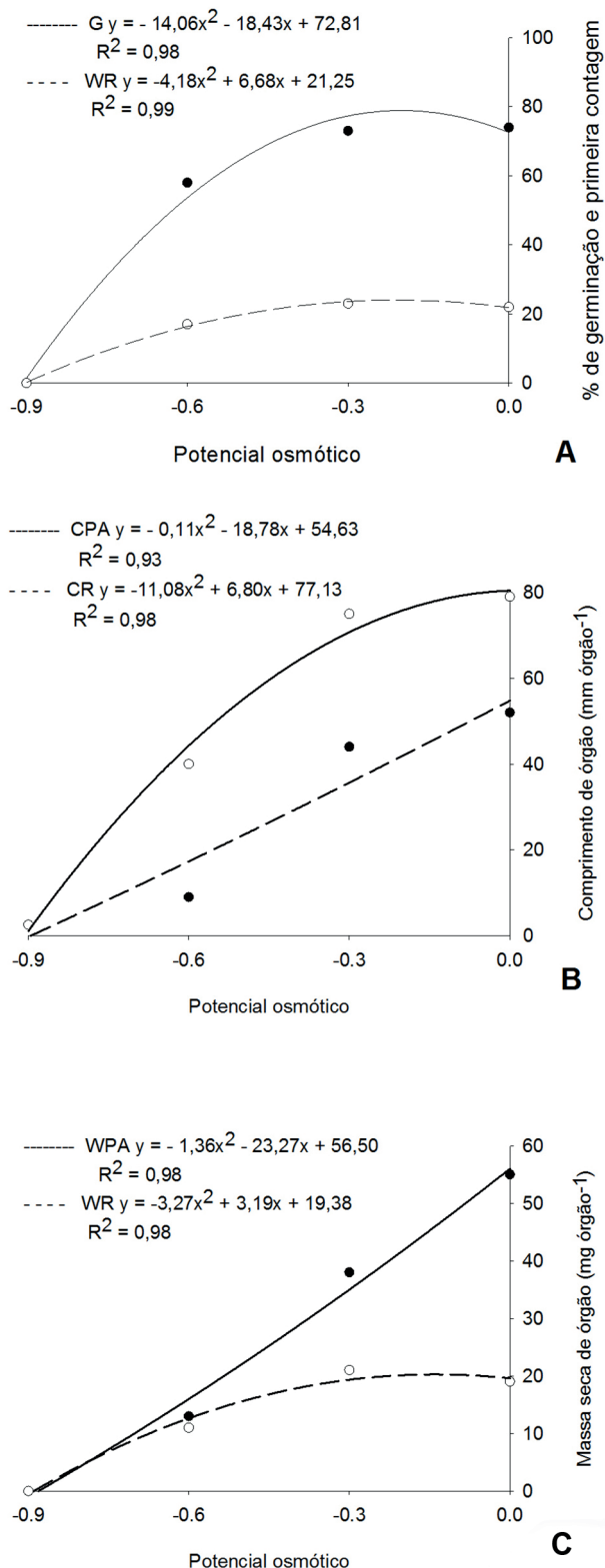


Figura 1. Qualidade fisiológica de sementes e crescimento inicial de plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob ação de diferentes potenciais osmóticos. A. Germinação (●) e primeira contagem da germinação (○). B. Comprimento da parte aérea (○) e radícula (●). C. Massa seca da parte aérea (●) e radícula (○).

parede celular serem altamente sensíveis ao déficit hídrico, e pelo decréscimo na turgescência celular (Silva *et al.* 2011). Ao estudarem o efeito do déficit hídrico em sementes de soja, Moraes & Menezes (2003), observaram redução do comprimento de plântula abaixo do potencial osmótico de -0,01 MPa.

A massa da matéria seca de parte aérea e de raiz também apresentou redução com o decréscimo do potencial osmótico (Fig. 1C). Tendência de diminuição mais acentuada do crescimento de parte aérea e raiz ocorreram em potenciais osmóticos abaixo de -0,3 MPa. A redução da massa seca de plântulas em função da restrição hídrica, possivelmente, é decorrente do retardamento de processos fisiológicos de hidrólise e mobilização das reservas. Ainda, pode estar relacionada à produção de radicais livres potencialmente causadores da peroxidação de lipídeos, a qual ocasiona a degradação de membranas celulares e o extravasamento exacerbado de eletrólitos (Greggains *et al.* 2000). Ao estudarem o efeito do déficit hídrico induzido em sementes de milho-pipoca, Moterle *et al.* (2006) observaram redução na massa seca das plântulas, de forma semelhante ao verificado no presente trabalho. Vale ressaltar que o potencial osmótico de -0,9 MPa inibiu a germinação visível, não permitindo a formação de plântulas.

A expressão da isoenzima esterase foi modificada de forma distinta pelos diferentes potenciais osmóticos (Fig. 2A). Houve aumento da intensidade e do número de bandas com a redução do potencial osmótico da solução. Esta isoenzima está envolvida na hidrólise de ésteres e desempenha papel importante no metabolismo de lipídeos (Imolesi *et al.* 2001), podendo o aumento da intensidade das bandas nos menores potenciais osmóticos, estar associado ao possível aumento na peroxidação de lipídeos, provocando dano às membranas celulares e afetando a expressão do vigor das sementes, conforme evidenciado na primeira contagem de germinação (Fig. 1A).

Por outro lado, a isoenzima fosfatase ácida apresentou similar expressão de bandas em plântulas sobre todos os potenciais osmóticos (Fig. 2B). Esta enzima é importante por atuar na mobilização do fosfato inorgânico durante o processo de germinativo (Granjeiro *et al.* 2008), sendo, portanto, importante durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas. Devido a similar expressão isoenzimática em todos os potenciais hídricos, é possível que o efeito deletério ocasionado pela baixa disponibilidade de água durante o processo germinativo, não mantenha relação à expressão da isoenzima fosfatase ácida.

Houve aumento da intensidade de banda da malato-desidrogenase com redução do potencial osmótico (Fig. 2C). A malato-desidrogenase atua na catalização da reação de malato a oxaloacetato no ciclo de Krebs (Imolesi *et al.* 2001), sendo responsável pelo fornecimento de energia ao catalisar a conversão dos triacilgliceróis armazenados em glicose e em outros metabólitos essenciais para o processo germinativo e para o crescimento inicial de plântulas. O incremento na expressão da malato-desidrogenase com a diminuição do potencial osmótico

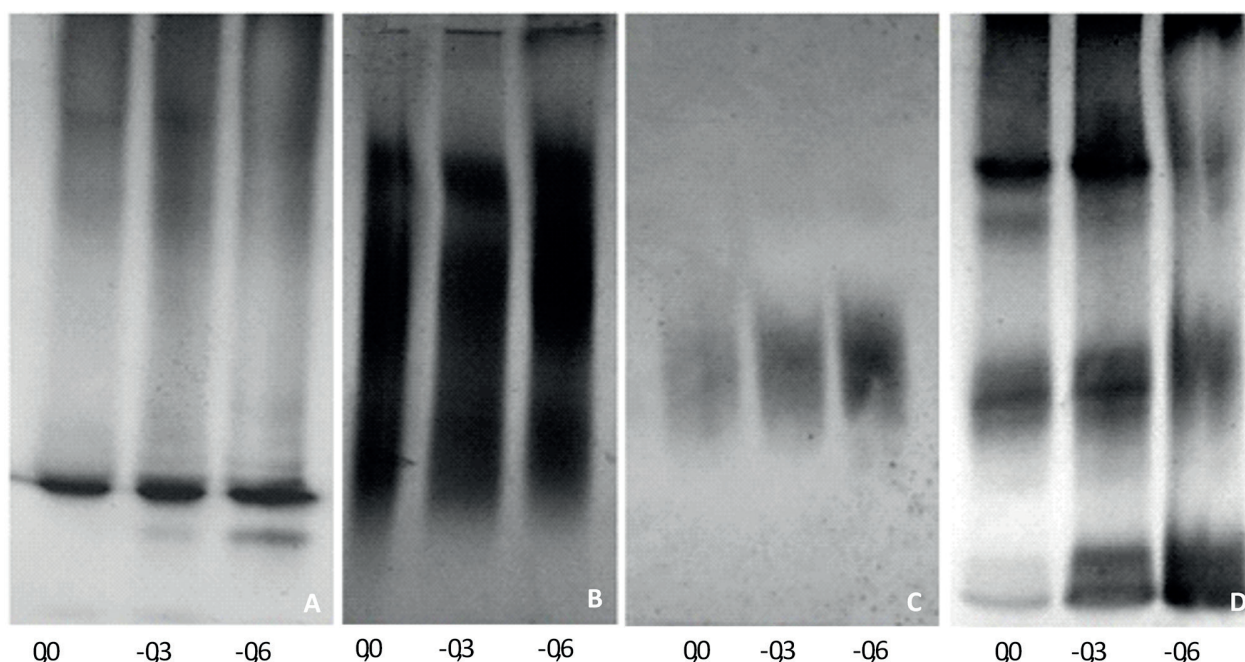


Figura 2. Expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob ação de diferentes potenciais osmóticos (MPa). A. Esterase. B. Fosfatase ácida. C. Malato-desidrogenase. D. Glutamato-oxalacetato-transaminase.

não descarta a possibilidade da redução da expressão do vigor em sementes de teosinto manter relação à menor atividade desta enzima, pois pode haver expressão sem haver atividade enzimática.

A isoenzima glutamato-oxalacetato-transaminase expressou-se de forma diferenciada de acordo com o potencial osmótico (Fig. 2D). Em todos os potenciais osmóticos utilizados houve a expressão de mais de uma banda, ocorrendo à intensificação de uma terceira banda no potencial -0,3 MPa. Esta isoenzima está relacionada ao metabolismo do nitrogênio, à síntese protéica durante o processo de retomada do crescimento do embrião (Malone *et al.* 2007).

A análise conjunta dos dados quantitativos de germinação e vigor demonstram o efeito negativo da restrição hídrica no processo de germinação e no crescimento da parte aérea e da raiz. O déficit hídrico ocasionou alterações na expressão isoenzimática, o que pode ter refletido no pior desempenho das sementes e plântulas de teosinto sob menores potenciais hídricos. Assim, abaixo de -0,3 MPa ocorreu a redução mais drástica na massa seca e no alongamento da parte aérea, provavelmente pela perda de eficiência em diferentes processos fisiológicos em função da menor disponibilidade de água para hidrólise de assimilados e para a translocação de metabólitos destinados à retomada do crescimento do embrião.

CONCLUSÃO

A restrição hídrica, promovida em potenciais osmóticos inferiores a -0,3 MPa, altera a expressão isoenzimática e prejudica o desempenho fisiológico de sementes e em plântulas de teosinto.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. 1998. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV. 574p.
- BRACCINI, A.L., RUIZ, H.A., BRACCINI, M.C.L & REIS, M.S. 1996. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzidos por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. *Revista Brasileira de Sementes*, 18(2): 10-16.
- BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília: SNAD/CLAV. 398 p.
- FANTI, S.C. & PEREZ, S.C.J.G.A. 2004. Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(9): 903-909.
- GRANJEIRO, P.A., VERÍSSIMA, C.F & AOYAMA, H. 2008. Uso da fosfatase ácida como biomarcador durante a germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis*). *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, 5(3): 307-322.
- GREGGAINS, V., FINCH-SAVAGE, W.E., QUICK, W.P. & ATHERTON, N.M. 2000. Metabolism induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist stored recalcitrant seeds of contrasting species. *New Phytologist*, 148: 267-276.
- HENNING, F.A., MERTZ, L.M., JACOB JUNIOR, E.A., MACHADO, R.D., FISS, G. & ZIMMER, P.D. 2010. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. *Bragantia*, 69(3): 727-734.
- IMOLESI, A.S., PINHO, É.V.R.V., PINHO, R.G.V., VIEIRA, M.G.G.C. & CORRÊA, R.S.B. 2001. Efeito da adubação nitrogenada em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, 23(1): 17-25.
- MALONE, G., ZIMMER, P.D., MENEGHELLO, G.E., CASTRO, M.A.S. & PESKE, S.T. 2007. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. *Revista Brasileira de Sementes*, 29(1): 61-67.
- MORAES, G.A.F. & MENEZES, N.L. 2003. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. *Ciência Rural*, 33(2): 219-226.
- MOTTA, W.A. & MAIA, M.S. 1999. Condições para o teste de germina-

- ção de sementes de teosinto (*Zea mexicana* Schrader). *Revista Brasileira de Sementes*, 21(1): 264-268.
- MOTERLE, L.M., LOPES, P.C., BRACCINI, A.L. & SCAPIM, C.A. 2006. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de cultivares de milho-pipoca submetidas ao estresse hídrico e salino. *Revista Brasileira de Sementes*, 28(3): 169-176.
- PESKE, S.T., VILLELA, F.A. & MENEGHELLO, G.E. (Eds.). 2012. *Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos*. 3 ed. Pelotas: UFPel. 573 p.
- SCANDÁLIOS, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics*, 3: 37-79.
- SILVA, M.C.C., MEDEIROS, A.F.A., DIAS, D.C.F.S., ALVARENGA, E.M., COELHO, F.S. & BRAUN, H. 2011. Efeito do estresse hídrico e térmico na germinação e no vigor de sementes de cenoura. *Idesia*, 29(3): 39-44.
- SYROS, T., YUPSANIS, T., ZAFIRIADIS, H. & ECONOMOU, A. 2004. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology*, 161: 69-77.
- VEIGA, A.D., PINHO, É.V.R.V., VEIGA, A.D., PEREIRA, P.H.A.R., OLIVEIRA, K.C. & PINHO, R.G.V. 2010. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(4): 953-960.