

Irrigação por aspersão e expressão isoenzimática em plântulas de soja

Felipe Koch¹, Lucian Alex dos Santos¹, Geison Rodrigo Aisenberg¹, Guilherme Menezes Salau², Tiago Pedó³, Francisco Amaral Villela³ e Tiago Zanatta Aumonde³

¹Pós-Graduando pelo programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes – FAEM/UFPEL. Campus Universitário, CEP 96001-970, Pelotas, RS (felipe.koch@hotmail.com; lucian.santos@agronomo.eng.br; geisonaisenberg@hotmail.com) ²Graduando em Agronomia na FAEM/UFPEL. (guilherme.m.salau@gmail.com) ³Professor, Dr. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes – FAEM/UFPEL. (tiago.pedo@gmail.com; tiago.aumonde@gmail.com; francisco.villela@ufpel.edu.br)

Resumo - O trabalho teve como objetivo avaliar a expressão isoenzimática de sementes de soja produzidas com e sem irrigação. Para a coleta de material vegetal foram utilizados três lotes de sementes produzidos com irrigação por aspersão e mais três lotes produzidos sem irrigação. As plântulas foram coletadas a partir do teste de frio e de germinação, no oitavo dia após semeadura. Foi avaliada, em parte aérea e raízes, a expressão das isoenzimas esterase, peroxidase e glutamato oxalacetato transaminase. A intensidade e a expressão da esterase foi modificada de forma distinta na parte aérea das plântulas originadas de sementes produzidas com irrigação e sem irrigação. Em raízes houve expressão de uma banda em plântulas provenientes dos testes de frio e germinação. Em plântulas provenientes do teste de frio, a peroxidase apresentou expressão nas raízes, entretanto, demonstrou baixa intensidade de expressão na parte aérea. Já em plântulas do teste de germinação, houve expressão de duas bandas em raízes e uma banda em parte aérea. A glutamato oxalacetato transaminase, determinada na parte aérea das plântulas, expressou, no teste de frio duas bandas e naquelas do teste de germinação, uma banda. Em raízes, foi observada discreta intensidade de bandas e ocorrência de uma banda no teste de frio, em plântulas sob influência ou não da irrigação. Plântulas provenientes de sementes produzidas com irrigação possuem maior número e intensidade de bandas para esterase, enquanto, a glutamato oxalacetato transaminase apresenta maior intensidade de bandas na parte aérea das plântulas originadas de sementes sob influência da irrigação.

Palavras-chave: *Glycine max*, pivô-central, peroxidase, esterase, qualidade fisiológica.

Sprinkler irrigation and isoenzymes expression in soybean seedlings

Abstract - The study aimed to evaluate the isoenzymes expression of soybean seeds produced with and without irrigation. For the collection of plant material were used three lots of seeds produced with sprinkler irrigation and three batches produced without irrigation. Seedlings were collected from the cold test and the germination on the eighth day after sowing. Was evaluated in shoots and roots, the expression of esterase isoenzymes, peroxidase and glutamate oxaloacetate transaminase. The intensity and expression esterase has been modified differently in shoots of seedlings originated from seeds produced with and without irrigation. In roots were expression of a band in seedlings from the cold tests and germination. In seedlings during the cold test, peroxidase showed expression in the roots, however, demonstrated low intensity of expression in the shoot. Already in the germination test seedlings, there were two bands in roots and shoots in a band expression. The glutamate oxaloacetate transaminase, determined in shoots of seedlings, expressed in the cold test two bands and those of the germination test, a band. By analyzing the roots was observed discrete bands intensity and occurrence of a band in the cold test in seedlings under the influence or no irrigation. Seedlings from seeds produced with irrigation have a higher number and intensity of bands for esterase while glutamate oxaloacetate transaminase has a higher intensity of bands in shoots of seedlings originated from seeds under the influence of irrigation.

Keywords: *Glycine max*, center pivot, peroxidase, esterase, physiological quality.

Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é pertencente à família Fabaceae, possui elevada importância no cenário agrícola nacional, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial, com produção de aproximadamente 96 milhões de toneladas e produtividade média de cerca de 3 t ha⁻¹. No Rio Grande do Sul, a produção é de aproximadamente 15 milhões de toneladas e produtividade média em torno de 2,8 t ha⁻¹ (Conab, 2016).

A utilização de irrigação é favorável ao desenvolvimento da planta e a qualidade fisiológica das sementes. Para isso, o suprimento de água deve ser abundante durante o período vegetativo e a formação das sementes (Peske et al., 2012). Condições de baixa disponibilidade de água no solo ou de deficiência hídrica podem resultar na formação de compostos tóxicos que afetam diferentes processos do metabolismo das sementes e plântulas, afetando deste modo, o padrão de expressão isoenzimática (Malone et al., 2007; Henning et al., 2010).

As isoenzimas são produtos da expressão gênica, altamente influenciados pelo ambiente e pelo manejo. Isto se deve ao fato de que genes que controlam a sua expressão são manifestados em determinados estádios do desenvolvimento, órgãos e tecidos específicos, ou ainda, sob um determinado estímulo (Ramírez et al., 1991). A isoenzima esterase está envolvida em reações de hidrólise de ésteres e desempenha papel importante no metabolismo de lipídeos (Santos et al., 2005). As peroxidases possuem ação de proteção antioxidativa, sendo caracterizadas durante a germinação das sementes, assim como, nos estágios de crescimento (Menezes et al., 2004). Assim, a avaliação do perfil eletroforético de isoenzimas pode ser usada como uma importante ferramenta de avaliação da qualidade de sementes (Muniz et al., 2007). Neste sentido, a avaliação da expressão de isoenzimas constitui ferramenta no monitoramento da deterioração e do desempenho fisiológico de sementes e plântulas, visto que, a integridade e o metabolismo celular estão relacionados com grande variedade de enzimas e proteínas estruturais de cada espécie (Santos et al., 2005). Sendo assim, podem auxiliar na caracterização do efeito de nível de água no solo sobre qualidade de sementes e no desempenho fisiológico de plântulas de soja.

O trabalho teve como objetivo avaliar a expressão isoenzimática de plântulas de soja produzidas com e sem irrigação.

Material e Métodos

As sementes foram produzidas em uma empresa produtora de sementes no noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, nas coordenadas geográficas 28° 12' S e 53° 28' W e sob clima temperado chuvoso, conforme classificação de Köppen. As análises foram realizadas no laboratório de Fisiologia de Sementes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas.

Foram empregadas sementes de soja, provenientes de área não irrigada e de área irrigada com pivô central, sendo utilizada a cultivar BMX Turbo na safra 2011/12. Os tratamentos consistiram de três lotes para cada sistema de fornecimento de água (com irrigação por aspersão e sem irrigação), e dois sistemas de fornecimento de água. Para a coleta de material vegetal para a avaliação da expressão isoenzimática em plântulas foram utilizados três lotes de sementes produzidos sob irrigação por aspersão e mais três lotes produzidos sem irrigação, estas amostras foram obtidas nos seguintes testes:

Teste de Germinação (G): realizado em quatro amostras de quatro subamostras de 50 sementes, dispostas para germinar em rolos formados por três folhas de papel *germitest*, umedecidas com água

destilada na quantidade 2,5 vezes a massa seca do papel seco. Os rolos foram transferidos para câmara de germinação tipo BOD sob temperatura de 25 °C e período luminoso de 12h. No oitavo dia após a semeadura foram coletadas 10 plântulas para a determinação das isoenzimas.

Teste de frio: realizado em quatro amostras de quatro subamostras de 50 sementes dispostas para germinar em rolos formados por três folhas de papel *germitest*, umedecidas com água destilada em quantidade 2,5 vezes a massa do papel seco. Após a semeadura, os rolos foram mantidos em câmara de germinação do tipo BOD a temperatura de 10°C, pelo período de cinco dias (Krzyzanowski et al., 1999). Decorrido o tempo, foram transferidas para câmara do tipo BOD sob temperatura de 25°C, conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), decorridos oito dias, coletou-se dez plântulas para determinação das isoenzimas.

Determinação da expressão isoenzimática: a partir das 10 plântulas coletadas no oitavo dia após a semeadura, nos testes de germinação e de frio, determinou-se a expressão das isoenzimas esterase, peroxidase e glutamato oxalacetato transaminase, pelo sistema de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. Para isso, as plântulas foram separadas em parte aérea e raiz e 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 0,2M a pH 8,3+Tris Citrato+0,2M à pH 8,3) +0,15% de 2-mercaptoetanol na proporção 1:2 (m/v). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, aplicando-se 20µL de cada amostra e os sistemas de coloração utilizados foram àqueles descritos por Scandális (1969) e Alfenas (1998).

O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados, em fatorial 3 x 2 (três lotes x com e sem irrigação). Para a análise dos resultados de expressão isoenzimática, adotou-se metodologia de interpretação por análise visual dos géis, presença ou ausência e intensidade de expressão das bandas.

Resultados e Discussão

A intensidade e a expressão da isoenzima esterase foi modificada de forma distinta na parte aérea das plântulas originadas de semente produzidas com irrigação e não irrigadas, provenientes dos testes de frio (Figura 1a) e de germinação (Figura 1b). Houve aumento na intensidade e no número de bandas da esterase (EST1 e EST2), tanto em parte aérea de plântulas provenientes do teste de frio quanto àquelas provenientes do teste de germinação, quando as sementes foram produzidas utilizando irrigação por aspersão em relação àquelas produzidas sem irrigação. Em raiz primária houve apenas a expressão

de uma banda (EST1) em plântulas provenientes dos testes de frio e de germinação.

A esterase está envolvida em reações de hidrólise de ésteres e desempenha papel importante no metabolismo de lipídeos (Santos et al., 2005), como por exemplo, nos fosfolipídeos totais de membrana (Henning et al., 2009). Com a perda da viabilidade das sementes, estas apresentam redução no número e intensidade de expressão das bandas de esterase (Brandão Junior et al., 1999). Desse modo, o aumento da expressão desta isoenzima pode manter relação a sua maior atividade, podendo sementes de qualidade superior, apresentar maior eficiência nos processos bioquímicos, aos quais está relacionada, resultando em melhor desempenho fisiológico no processo germinativo.

A isoenzima peroxidase teve a expressão do número e da intensidade das bandas em plântulas originadas de semente produzidas com irrigação e não irrigadas diferenciada para plântulas provenientes do teste de frio (Figura 1c) e de plântulas provenientes do teste de germinação (Figura 1d). No teste de frio, a peroxidase apresentou expressão na raiz primária das plântulas, contudo ao ser avaliada na parte aérea, apresentou baixa intensidade de expressão e apenas uma banda (PO1). Entretanto, quando analisada em plântulas do teste de germinação, esta isoenzima expressou duas bandas (PO1 e PO2) em raiz e uma banda (PO1) na parte aérea, tanto de plântulas originadas de sementes produzidas sob irrigação quanto daquelas não irrigadas.

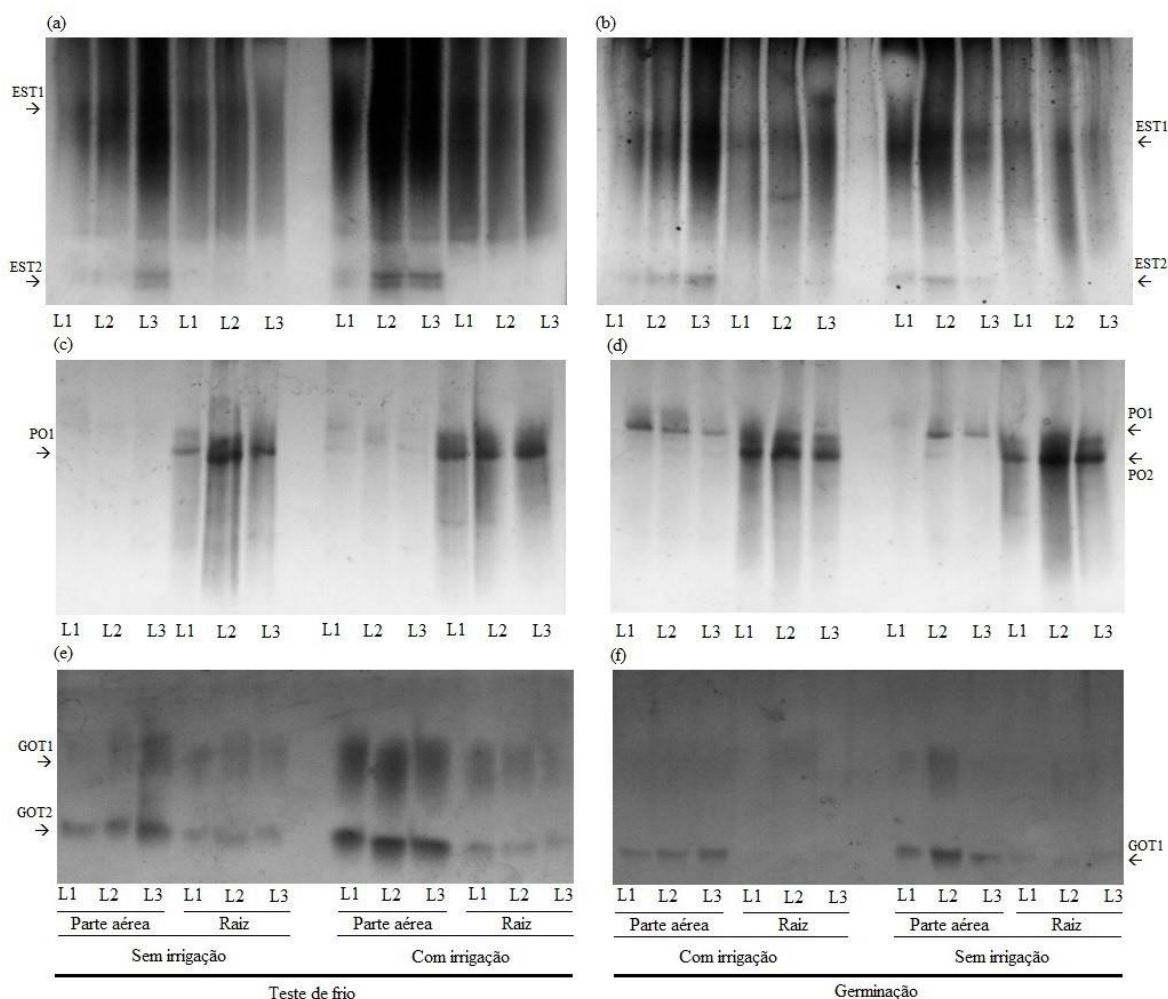


Figura 1. Expressão isoenzimática em parte aérea e raízes de plântulas de soja coletadas ao final dos testes de frio e de germinação de três lotes de sementes (L1, L2 e L3) produzidos com e sem irrigação. Sendo: esterase (a, b), peroxidase (c, d) e glutamato oxalacetato transaminase (e, f).

As enzimas peroxidases podem ser associadas ao mecanismo de defesa vegetal frente à formação de compostos tóxicos formados durante situação de estresse vegetal e atuam na redução do nível de peróxido de hidrogênio, um versátil oxidante, cujo acúmulo resulta na peroxidação de lipídeos e altera

a permeabilidade e a seletividade de membranas celulares (Rossi & Lima, 2001), fato que colabora para a redução do vigor de sementes. Nesse sentido, pesquisas demonstram existência de correlação positiva entre o decréscimo da viabilidade das

sementes e a redução da atividade das peroxidases (Oliveira, 2011).

A isoenzima glutamato oxalacetato transaminase, na parte aérea das plântulas, expressou duas bandas no teste de frio (GOT1 e GOT2) e naquelas do teste de germinação, uma banda (GOT1) (Figura 1d e 1e). A maior intensidade de bandas foi observada na parte aérea das plântulas originadas de sementes produzidas sob irrigação comparativamente às não irrigadas. Na análise das raízes foi observada baixa intensidade e a expressão de uma banda (GOT1) para àquelas provenientes do teste de frio e ausente em plântulas provenientes do teste de germinação, para as plântulas originadas de sementes produzidas sob irrigação e não irrigadas.

A glutamato oxalacetato transaminase está relacionada diretamente com o metabolismo do nitrogênio, atuando na oxidação de aminoácidos com vistas ao fornecimento de energia para o ciclo de Krebs ou para a redução do α -cetogluturato, voltada à biossíntese de novos aminoácidos destinados ao crescimento do embrião (Malone et al., 2007). Além disso, esta isoenzima apresenta atuação substancial no metabolismo protéico, não apenas durante o processo geminativo das sementes, mas sim, ao longo de toda a vida da planta (Malone et al., 2007). Neste sentido, qualquer evento biótico ou abiótico que afete a expressão e a atividade da isoenzima glutamato oxalacetato transaminase, pode influenciar na quantidade de energia disponível à retomada do crescimento do embrião, assim como, na formação de aminoácidos e na síntese proteica, influenciando o desempenho de sementes e plântulas.

Conclusões

1. Plântulas provenientes de sementes produzidas com irrigação atingem maior intensidade e demonstram maior número de bandas da isoenzima esterase.

2.A isoenzima glutamato oxalacetato transaminase apresenta maior intensidade de bandas na parte aérea das plântulas que são originadas de sementes produzidas com irrigação.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil.

Referências

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

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, safra 2015/16**, v.3, n.4, 2016. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2016. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf. Acesso:25/01/2016.

BRANDÃO-JUNIOR, D.S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.114-121, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNAD/CLAV, 398p, 2009.

HENNING, F.A.; MERTZ, L.M.; ZIMMER, P. D.; TEPLIZKY, M. D. F. Qualidade fisiológica, sanitária e análise de isoenzimas de sementes de aveia-preta tratadas com diferentes fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.3, p.63-69, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n3/a07v31n3.pdf>

HENNING, F.A.; MERTZ, L.M.; JACOB JUNIOR, E.A.; MACHADO, R.D.; FISS, G.; ZIMMER, P.D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, v.69, n.3, p.727-734, 2010. <http://www.scielo.br/pdf/brag/v69n3/26.pdf>

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; MENEGHELLO, G.E.; CASTRO, M.A.S.; PESKE, S.T. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.61-67, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222007000100009>

MENEZES, S.M.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A. Detecção de soja geneticamente

modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p. 150-155, 2004.

MUNIZ, F.R.; CARDOSO, M.G.; PINHO, E.V.R.V.; VILELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 195-204, 2007.

OLIVEIRA, A. dos S. **Alterações no potencial fisiológico de sementes de algodão no armazenamento**. 2011. Tese (doutorado). 124p. Universidade Federal de Lavras.

PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGUELLO, G.E. **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**, 3ed, 2012. 573p.

RAMÍREZ, H.; CALDERON, A.; ROCCA, W. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: ROCCA, W.; MROGINSKI, L. (Ed). **Cultivo**

de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. p.825-856. 1991.

ROSSI, C.; LIMA, G.P.P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, n.58, v.1, p.197-199, 2001. <http://www.scielo.br/pdf/sa/v58n1/a30v58n1.pdf>

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.104-114, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222005000100013>

SCANDÁLIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v.3, n.1, p.37-79, 1969. <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00485973?LI=true>.