

EXPRESSÃO ISOENZIMÁTICA DURANTE O PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ TRATADAS COM TIAMETOXAM

Cristiane Deuner¹, Andreia da Silva Almeida¹, Adilson Jauer², Lilian Madruga de Tunes¹, Geri Eduardo Meneghello¹

¹Departamento de Fitotecnia, PPG em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil. (cdeuner@yahoo.com.br)

²Dr. Syngenta Proteção de Cultivos LTDA. Londrina, PR, Brasil.

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

O produto tiametoxam atua como potencializador, permitindo maximizar a expressão do vigor das sementes. As isoenzimas são produtos da expressão gênica e altamente influenciadas pelo ambiente, pois os genes que controlam sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos, ou ainda sob um determinado estímulo. O presente trabalho objetivou avaliar a expressão de isoenzimas em plântulas de arroz, provenientes de sementes tratadas com tiametoxam. Foram utilizadas três cultivares: BR IRGA 424, Puitá, BR IRGA 428. As sementes foram tratadas com as seguintes doses de tiametoxam: 0,0; 100; 200; 300; 400 mL por 100 kg⁻¹ de sementes. As isoenzimas foram extraídas de plântulas coletadas cinco dias após a semeadura. Avaliou-se a expressão das isoenzimas: Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT), Fosfatase Ácida (FAC) e Esterase (EST). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência, e a intensidade de cada banda eletroforética. Os resultados mostram que a enzima GOT não apresentou diferenças na intensidade de bandas com o aumento da dose de tiametoxam. Já nas isoenzimas EST e FAC há um aumento na intensidade de bandas com as doses de tiametoxam. A presença/ausência das bandas variou conforme a cultivar.

PALAVRAS-CHAVE - esterase, glutamato oxalacetato transaminase, fosfatase ácida, *Oryza sativa* L.

ISOENZYMES DURING GERMINATION OF RICE SEED TREATED WITH THIAMETHOXAM

ABSTRACT

The Thiamethoxan product acts as enhancer, allowing to maximize the expression of seed vigor. Isoenzymes are products of gene expression and highly influenced by the environment, because the genes that control their expression are manifested in certain stages of development and in specific organs and tissues, or under a particular stimulus. This study aimed to evaluate the expression of isozymes in rice seedlings, from seeds treated with thiamethoxam. Three cultivars were used: BR IRGA 424, Puita, BR IRGA 428 The seeds were treated with the following doses of

tiametoxam: 0.0; 100; 200; 300; 400 mL per 100 kg of seed⁻¹. Isoenzymes were extracted from seedlings collected five days after sowing. We evaluated the expression of isozymes: Glutamate Oxalacetate Transaminase (GOT), Acid Phosphatase (FAC) and Esterase (EST). Interpretation of results was based on visual analysis of electrophoresis gels, taking into account the presence/absence, and the intensity each electrophoretic band. The results indicate that GOT for the enzyme showed no differences in band intensity with increasing dose of tiametoxam. As for the EST isoenzymes, FAC, there is an increase in intensity of bands with different doses of tiametoxam. The presence/absence of bands varied according to the cultivar.

KEYWORDS - acid phosphatase, esterase, glutamate oxalacetate transaminase, *Oryza sativa* L.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos cereais mais importantes do mundo, tendo grande importância econômica, principalmente nos países em desenvolvimento (FIDELIS et al., 2010). No Brasil, foram cultivados na safra 2013/2014 aproximadamente 2,5 milhões de hectares de arroz, sendo os Estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) os maiores produtores, com 66 e 8% da produção nacional, respectivamente (CONAB, 2014). Atualmente, o arroz é a segunda cultura mais importante do RS, ficando atrás somente da soja (IRGA, 2012).

Existem diversos princípios ativos de inseticidas disponíveis no mercado, sendo um deles o tiametoxam que tem demonstrado efeitos positivos como o aumento da expressão do vigor, acúmulo de fitomassa, alta taxa fotossintética e raízes profundas. Outros pesquisadores também obtiveram estes resultados como ALMEIDA et al., (2009, 2010; 2011) com sementes de cenoura e de arroz, LAUXEN et al. (2010) em sementes de algodão, CARVALHO et al. (2011) em sementes de soja e CARVALHO et al. (2014) em sementes de feijão.

O tiametoxam reduz o tempo para estabelecimento da cultura no campo, diminuindo os efeitos negativos de competição com plantas daninhas ou por nutrientes essenciais presentes no solo (CATANEO et al., 2008). Em sementes de trigo o tiametoxam (60 mL 100 kg⁻¹ de sementes) proporcionou melhor germinação, maior velocidade de germinação e maior massa fresca e seca, para sementes do cultivar Quartzo (HOSSSEN et al., 2014). Ainda, conforme CARVALHO et al. (2011), o tiametoxam aumenta a atividade enzimática, aumentando a síntese de aminoácidos precursores de novas proteínas e a síntese endógena de hormônios vegetais, gerando aumentos significativos na produção.

As isoenzimas são produtos da expressão gênica, altamente influenciadas pelo ambiente, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos, ou ainda sob um determinado estímulo (RAMÍREZ et al., 1991). O termo isoenzima faz referência às diferentes formas moleculares (alelos) que uma determinada enzima pode apresentar, porém, reagindo sempre com o mesmo substrato (MARKET & MOLLER, 1959). De acordo com MUNIZ et al. (2007), a avaliação da expressão de isoenzimas pode se constituir em importante ferramenta na avaliação da qualidade das sementes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de isoenzimas em plântulas de arroz, provenientes de sementes tratadas com tiametoxam.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes e no Laboratório de Biosementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, no período de abril a maio de 2014. Utilizaram-se três cultivares de arroz: BR IRGA 424, Puitá e BR IRGA 428. As sementes foram tratadas com o produto comercial Cruiser 350, contendo 35 gramas de ingrediente ativo de tiametoxam por litro de produto. Os tratamentos consistiram em seis doses: Tratamento 1 - sementes não tratadas; Tratamento 2 – 100 mL de produto 100 kg⁻¹ de semente; Tratamento 3 – 200 mL de produto 100 kg⁻¹ de semente; Tratamento 4 – 300 mL de produto 100 kg⁻¹ de semente e Tratamento 5 – 400 mL de produto 100 kg⁻¹ de semente.

A calda (produto + água destilada) foi aplicada com o auxílio de uma pipeta graduada, no fundo de um saco plástico transparente e espalhada pelas paredes do mesmo até uma altura de 15 cm. O volume de calda utilizado foi de 0,6 L 100 kg⁻¹ de sementes.

A qualidade fisiológica dos cultivares foi determinada pelo teste de germinação. Para tanto, quatro repetições de 50 sementes foram semeadas em rolos de papel e acondicionadas em germinador regulado a 25 °C, segundo as Regras para Análise de Sementes-RAS (BRASIL, 2009). O material vegetal (plântulas) a ser utilizado para extração de proteínas foi coletado no quinto dia após as sementes terem sido submetidas ao teste de germinação.

Dez plântulas coletadas aleatoriamente foram maceradas em gral de porcelana sobre cubos de gelo, para cada um dos quatro cultivares estudados. De cada uma das amostras, 200 mg do extrato vegetal foram colocados em tubo *ependorf* acrescidos de solução extratora (tampão do gel + 0,15% de 2-mercaptoetanol) na proporção 1:2 (p/v). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando 20 µL de cada amostra, em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Três aplicações (repetições) para cada uma das amostras foram realizadas. Os padrões enzimáticos foram analisados pelo sistema de tampões, descrito por SCANDALIOS (1969). Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas verticais mantidas em câmara fria com temperatura entre 4 e 6 °C. As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 10 V cm⁻¹, até que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse 9 cm do ponto de aplicação. Os géis foram revelados, para os sistemas enzimáticos glutamato oxalacetato transaminase (GOT), fosfatase ácida (FAC) e esterase (EST), conforme SCANDALIOS (1969) e ALFENAS (1998). Os géis de eletroforese foram fixados em solução 5:5:1, de água destilada: metanol ácido acético.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. As médias obtidas foram submetidas à análise de regressão pelo sistema de análise estatística WinStat v1.0 (MACHADO & CONCEIÇÃO, 2003). A interpretação dos resultados das isoenzimas foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração à presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas, comparando-se as diferentes doses e cultivares utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que sementes de arroz, cultivares BR IRGA 424, BR IRGA 428 e Puitá tratadas com tiametoxam apresentaram desempenho superior, em relação aos valores obtidos no tratamento 1 (sem aplicação de tiametoxam),

variando apenas a intensidade desta diferença devido à dose utilizada em cada tratamento. Sendo que nas doses mais altas observou-se redução na porcentagem de germinação, provavelmente causada por efeito fitotóxico do produto (Figura 1). Vale destacar que empregando a dose de 100 mL de produto kg^{-1} de sementes, conforme o cultivar, houve aumento de 11% na germinação, quando comparado à dose zero.

Estudando sementes de aveia branca, BARRETO et al. (2013), verificaram que o tratamento das sementes com tiametoxam na dose de 200 mL estimula maiores porcentagens de germinação nos cultivares URS Taura e Dilmasul. Em sementes de aveia-preta ALMEIDA et al. (2012) observaram que a dose de 280 mL de tiametoxam por 100 kg^{-1} de sementes mostrou-se mais eficiente em melhorar o desempenho fisiológico das sementes.

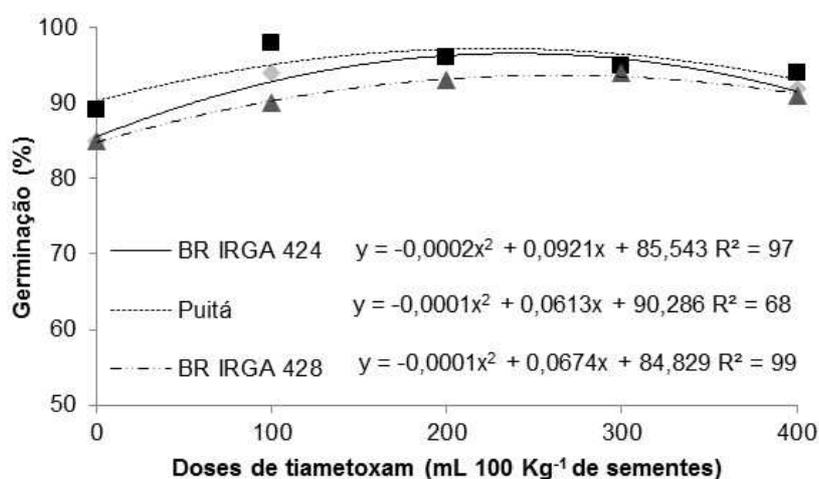


FIGURA 1. Germinação de três cultivares de sementes de arroz, tratadas com diferentes doses de tiametoxam.

Na análise dos três sistemas enzimáticos utilizados foi possível visualizar que houve variação significativa na intensidade da expressão isoenzimática conforme o cultivar e dose de tiametoxam utilizada (Figuras 2, 3 e 4). Analisando os perfis eletroforéticos do sistema glutamato oxalecetato transaminase (GOT) (Figura 2), nas três cultivares ocorreu a expressão da enzima em dois alelos e o produto tiametoxam não impediu a expressão da enzima. Esta enzima é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o ciclo de Krebs ou redução do α -cetoglutarato para a síntese de novos aminoácidos, como fonte de energia ao embrião em desenvolvimento (VIEIRA et al., 2009).

De acordo com BRANDÃO JUNIOR et al. (1999) e TUNES (2010), a GOT participa no processo de degradação e síntese de aminoácidos apresentando um importante papel na germinação de sementes. Em função desta enzima estar diretamente envolvida no metabolismo do nitrogênio, é possível que variações ocorram à medida que acontece a síntese e degradação de aminoácidos, durante o processo de germinação. A enzima GOT tem uma participação, fundamental no metabolismo protéico, não somente durante a germinação, mas, durante todo o ciclo de vida da planta.

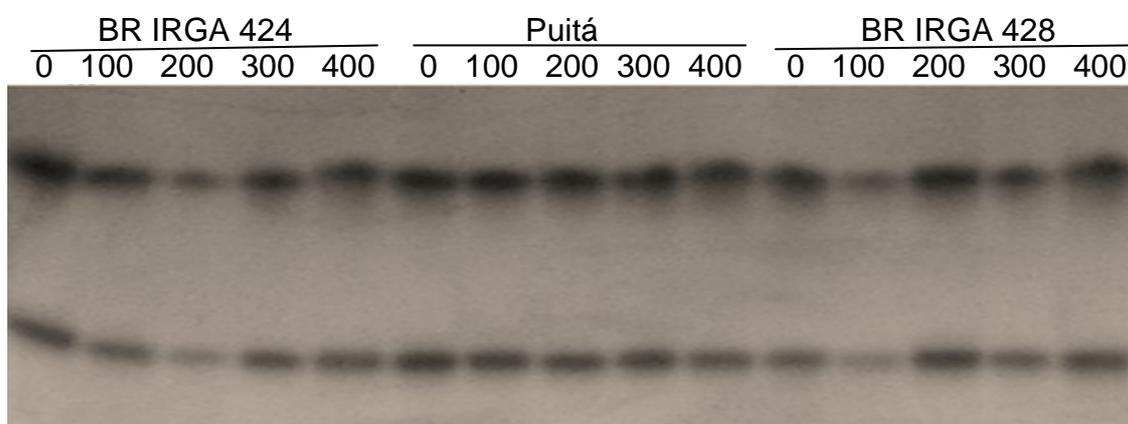


FIGURA 2. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Glutamato Oxalecetato Transaminase em três cultivares de sementes de arroz em função da dose de tiametoxam.

A enzima fosfatase ácida (Figura 3), também se expressou em dois alelos, sendo que para o cultivar BR IRGA 424 ocorreu uma maior expressão nas doses zero (sem produto), 300 e 400 mL 100 kg⁻¹ de sementes. Já no cultivar Puitá a expressão foi menor na dose de 400 mL. Para o cultivar BR IRGA 428 observou-se maior expressão nas doses zero, 200 e 400 mL 100 kg⁻¹ de sementes. Essa enzima participa em reações de hidrólise de ésteres e pode provocar a peroxidação dos fosfolípidos de membranas. Segundo CAMARGO et al. (2000) está envolvida também na manutenção do fosfato celular e sua atividade pode afetar o metabolismo do fosfato em sementes, como os níveis de ATP e nucleotídeos.

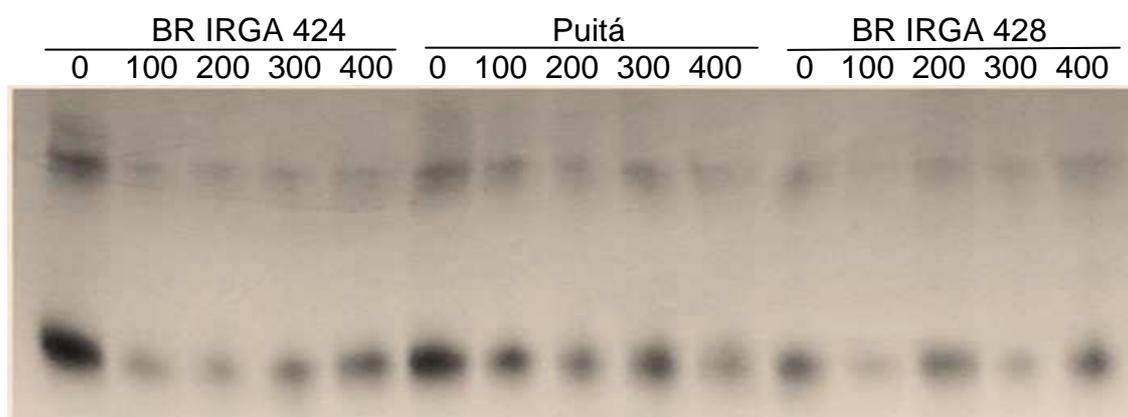


FIGURA 3. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Fosfatase Ácida em três cultivares de sementes de arroz em função da dose de tiametoxam.

Na enzima esterase (Figura 4), ocorreu à expressão em dois alelos, sendo que para o cultivar BR IRGA 424 ocorreu a presença das bandas com maior

intensidade nas doses zero e 100 mL 100 kg⁻¹ de sementes. Já no cultivar Puitá a expressão foi semelhante em todas as doses, exceto na de 200 mL onde sua expressão foi um pouco inferior. Nos cultivares BR IRGA 428 a maior expressão da enzima foi nas doses 200 e 400 mL kg⁻¹ de sementes. Esta enzima é constituída por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas com uma ampla gama de substratos específicos.

PADILHA et al. (2001) verificaram um aumento da intensidade das bandas para os estresses mais drásticos em sementes de milho e TUNES et al. (2010), analisaram avanço no número de bandas desta enzima em sementes de soja. Alterações nos padrões da EST evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos que podem contribuir para redução na germinação das sementes, pois esta é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídeos (PESKE et al., 2012). PEREIRA et al. (2010) avaliando sementes de milho tratadas com inseticidas não observaram diferenças nos padrões enzimáticos tanto nas sementes não tratadas como nas tratadas com tiametoxam.

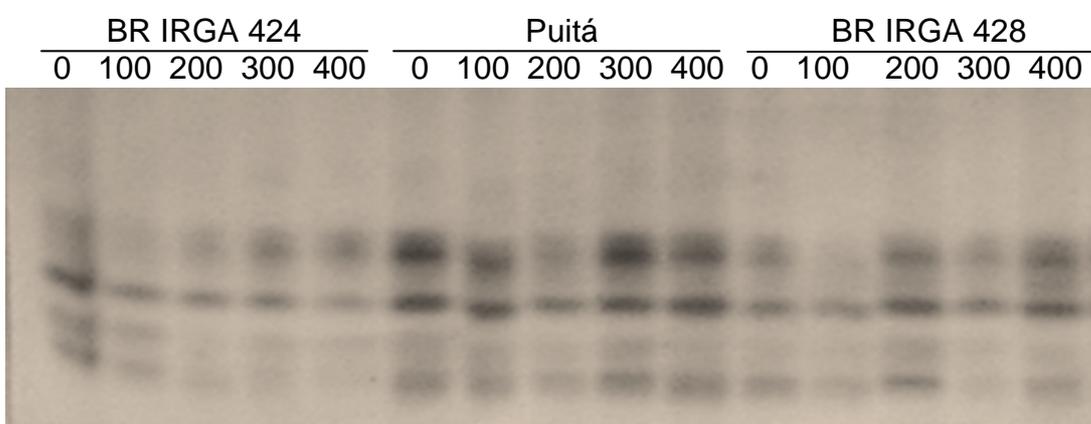


FIGURA 4. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Esterase, em três cultivares de sementes de arroz em função da dose de tiametoxam.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que, dependendo do sistema enzimático utilizado, existe uma diferenciação de proteínas. Em função disso, a análise conjunta de vários sistemas isoenzimáticos é recomendável por permitir verificar modificações que ocorrem no interior das sementes quando submetidas a algum tipo de tratamento durante seu desenvolvimento (TUNES et al., 2010).

CONCLUSÃO

O produto tiametoxam não afeta negativamente a expressão dos sistemas enzimáticos estudados.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, A.S.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G.E.; LAUXEN, L.R.; DEUNER, C.; Desempenho fisiológico de sementes de aveia-preta tratadas com tiametoxam. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1619-1628, 2012.

ALMEIDA, A. S.; CARVALHO, I.; DEUNER, C.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A. Bioativador no desempenho fisiológico de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 3, 2011.

ALMEIDA, A.S.; CARVALHO, I.; DEUNER, C.; VILLELA, F.A.; TILLMANN, M.A.A. Bioativador no desempenho fisiológico de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). In: XXII Seminário Panamericano de Semilhas, Assunção. **Anais**, XXII Seminário Panamericano de Semilhas, 2010. p. 158.

ALMEIDA, A.S.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; PINHO, M.S. Bioativador no desempenho fisiológico de sementes de cenoura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 87-95, 2009.

BARRETO, B.; CHAGAS, H.L.; TUNES, L.M. de; RUFINO, C. de A.; FONSECA, D. A.R.; KONZEN, L.H.; VILLELA, F.A. Resposta de sementes de aveia branca tratadas com tiametoxam expostas a baixas temperaturas no teste de germinação. In: XXXIII Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia. **Anais...** Pelotas, RS, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, MAPA/ACS, 2009. 395p.

BRANDÃO JÚNIOR, D.S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, p.114-120, 1999.

CARVALHO, N.L.; PERLIN, R.S.; COSTA, E.C. Tiametoxam em tratamento de sementes. **Revista Eletrônica do PPGEAmb-CCR/UFSM**, v.2, n.2, p. 158-175, 2011.

CARVALHO, L.S.M. de J. de; RODRIGUES, H.C.S.; MENEGHELLO, G.E.; ALMEIDA, A. da S.; NAVROSKI, R. Desempenho fisiológico de sementes de feijão tratadas com produto bioativador. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - v.10, n.18; p. 1163-1172, 2014.

CAMARGO, M.L.P.; AMARGO, M.L.P.; MORI, E.S.; DE MELLO, E.J.; ODA, S.; LIMA, G.P. Atividade enzimática de sementes envelhecidas artificial e naturalmente. **Ciência Florestal**, v. 10, p. 113-122, 2000.

CATANEO, A.C. Ação do Tiametoxam (Thiametoxam) sobre a germinação de sementes de soja (*Glycine Max*. L.): Enzimas envolvidas na mobilização de reservas e na proteção contra situação de estresse (deficiência hídrica, salinidade e presença de alumínio). In: GAZZONI, D.L. (Eds.) **Tiametoxam: uma revolução na agricultura brasileira**. Petrópolis. Ed. Vozes. p.123-192. 2008.

CONAB. 2014. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 1 - Safra 2013/14, n. 11- Décimo primeiro levantamento, Brasília, ago. 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_agosto_2014.pdf> Acesso em: agosto de 2014.

FIDELIS, R.R.; OLIVEIRA, T.C. de; LUI, J.J.; RODRIGUES, A.M.; BARROS, H.B.; CANCELLIER, E.L. Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas a estresse de nitrogênio. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 531-538, 2010.

HOSSEN, D. de C.; CORRÊA JÚNIOR, E. dos S.; GUIMARÃES, S.; NUNES, U.R.; GALON, L. Tratamento químico de sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2014.

IRGA. Instituto Rio Grandense de Arroz. Disponível em: <www.irga.org.br> Acesso em outubro de 2014.

LAUXEN, L.R.; VILLELA, F.A.; SOARES, R.C. Desempenho fisiológico de sementes de algodão tratadas com tiametoxam. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p.61-68, 2010.

MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **Sistema de análise estatística para Windows**. WinStat. Versão 2.0. UFPel. 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000112&pid=S0101-3122200400010002000008&lng=pt

MARKET, C.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 45, p. 753-763, 1959.

MUNIZ, F. R.; CARDOSO, M. G.; PINHO, É. 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.

PADILHA, L.; VIEIAR, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p. 198-204, 2001.

PEREIRA, E. de M.; SILVA, L.H.C.; OLIVEIRA, J.A.; PEREIRA, L.A.; VON PINHO, É.V. de R.; DELLY, A.V.; NASCIMENTO, V.E. Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Sementes de Milho Tratadas com Inseticidas e Armazenadas. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2010. Disponível em: <http://www.abms.org.br/cn_milho/trabalhos/0024.pdf>. Acesso em: agosto de 2014.

PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G.E. (Eds.). **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**. 3. ed. Pelotas: UFPel, 2012. 573 p.

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

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

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v. 3, p. 37-39, 1969.

TUNES, L.M.; PEDROSO, C.D.; MENEGHELLO, G.E.; CASTRO, M.A.S.; BARROS, A.C.S.A.; BADINELLI, P.G.; MUNIZ, M.F.B. Perfil enzimático em sementes de cevada em resposta a diferentes concentrações salinas. **Interciencia**, v. 35, p. 369-373, 2010.

VIEIRA, E.S.N.; VON PINHO, E.V.R.; CARVALHO, M.G.G.; SILVA, P.A. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 86-94, 2009.