

ENZIMAS REMOVEDORAS DE RADICAIS LIVRES E PROTEÍNAS *LEA* ASSOCIADAS À TOLERÂNCIA DE SEMENTES DE MILHO À ALTA TEMPERATURA DE SECAGEM¹

STTELA DELLYZETE VEIGA FRANCO DAROSA², ÉDILA VILELA RESENDE VON PINHO³, ELISA SERRANEIRA VIEIRA⁴, RUBEN DELLY VEIGA⁵, ADRIANO DELLY VEIGA⁶

RESUMO – Sementes de milho tornam-se tolerantes à dessecação à medida que secam naturalmente no campo e, após a maturidade fisiológica, pré-secagem a 35°C pode induzir tolerância à temperatura de secagem de 50°C. Nesse trabalho, sementes da cultivar BRS-3060, colhidas com teor de água de 42,2%, submetidas a períodos crescentes de pré-condicionamento apresentaram tolerância crescente à temperatura de 50°C, até atingirem o teor de água de 25,9%, quando exibiram o máximo desempenho fisiológico, avaliado por meio de testes de germinação, vigor e atividade de enzimas α -amilase. O presente trabalho teve o objetivo de investigar o padrão eletroforético de enzimas removedoras de radicais livres e de proteínas *lea*, em sementes tolerantes e intolerantes a alta temperatura de secagem. As atividades das enzimas removedoras superóxido dismutase, peroxidase e catalase, foram detectadas em hipocótilos de plântulas após cinco dias de germinação e a atividade de proteínas *lea* detectada em eixos embrionários. Os resultados permitiram concluir que a tolerância de sementes de milho à temperatura de 50°C está associada à atividade da enzima catalase e pouco relacionada à atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase. Proteínas *lea* estavam ausentes em sementes de milho intolerantes e sua presença foi associada ao desempenho fisiológico das sementes tolerantes.

Termos para indexação: *Zea mays*, tolerância à dessecação, peroxidase, superoxidase, catalase.

FREE RADICAL-SCAVENGING ENZYMES AND *LEA* PROTEINS ASSOCIATED TO MAIZE SEED TOLERANCE TO HIGH DRYING TEMPERATURE.

ABSTRACT – Maize seeds assume desiccation tolerance as they dry naturally during maturation and pre drying at 35°C after their physiological maturity can induce tolerance to artificial drying at 50°C. Seeds of ‘BRS-3060’ harvested with 42,2% water content and submitted to increased periods of pre-conditioning, showed enhanced tolerance to 50°C until 25,9% water content when they reached maximum physiological performance. Seed quality was evaluated by germination and vigor tests and α -amilase enzyme activity. Seeds tolerant and not-tolerant to drying at 50°C were investigated by means of electrophoretic standards of free radical-scavenging enzymes and *lea* proteins. The scavenger activity enzyme superoxide dismutase, peroxidase and catalase was detected in 5-day old seedling hypocotyl and *lea* protein was detected in embryonic axes. The results showed that maize seeds tolerant to 50°C are associated to catalase enzyme activity but are less related to superoxide dismutase and peroxidase enzymes activities. *Lea* proteins were not present in maize seeds non tolerant to desiccation and their presence was associated to the physiological performance of tolerant seeds.

Index terms: *Zea mays*, desiccation tolerance, peroxidase, superoxidase, catalase.

¹ Submetido em 08/03/2004. Aceito para publicação em 10/09/2004.

² Pesquisador Dr., Embrapa Café, CEPECAFÉ, UFLA/DAG, CP 37, CEP 37.200-000, Lavras, MG. sttelaveiga@uflabr

³ Professor Dr., UFLA, Departamento de Agricultura, CP 37, CEP 37200-000, Lavras, MG. edila@ufla.br

⁴ Agrônoma Dr., COODETEC, Dep. de Biotecnologia, Cascavel, PR. esneira@coodetec.com.br

⁵ Professor Dr., UFLA, Departamento de Ciências Exatas, CP 37, CEP 37.200-000, Lavras, MG.

⁶ Estudante do curso de Agronomia da Universidade Federal de Lavras.

INTRODUÇÃO

Sementes ortodoxas de angiospermas adquirem tolerância à dessecação no final do processo de maturação, quando seu teor de água é reduzido e o embrião sobrevive num estado de quiescência metabólica por um período variável com a espécie (Bewley e Black, 1985). A sensibilidade à dessecação é um fenômeno fisiológico complexo e envolve uma série de mecanismos deletérios e/ou protetores dependendo das condições da dessecação (Li e Sun, 1999). Diversas alterações podem ocorrer nas sementes durante a dessecação, tais como, mudanças na composição relativa de fosfolipídios de membranas (Chen e Burris, 1991; Wolkers et al., 1998), acúmulo de carboidratos solúveis como sacarose e oligossacarídeos (Bochicchio et al., 1994 e 1996; Horbowicz e Obendorf, 1994; Vertucci e Farrant, 1995; Brenac et al., 1997; Wolkers et al., 1998; Rosa, 2000), síntese de proteínas *lea* (*late embryogenesis accumulated*) (Blackman et al., 1991; Blackman et al., 1992; Thomann et al., 1992; Leprince et al., 1993; Blackman et al., 1995) e a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres (Leprince et al., 1990a, 1990b, 1993, 1994a, 1994b e 1995; Sun e Leopold, 1997; Nkang et al., 2000; Greggains et al., 2001). Estas mudanças podem conferir graus variados de tolerância à dessecação nas sementes, em função da intensidade com que os mecanismos de proteção são impostos.

Tem sido sugerido que a perda de viabilidade durante a secagem de diversas sementes sensíveis à dessecação é acompanhada por um aumento na peroxidação de lipídios e acúmulo de radicais livres (Seranatna et al., 1987; Leprince et al., 1990a; Hendry, 1993; Finch-Savage et al., 1996; Finch-Savage et al., 1994). Esses radicais livres podem reagir com peróxidos de hidrogênio, produzindo oxigênio singleto e radical hidroxil (OH^\cdot), tóxicos às células (Hendry, 1993) e capazes de danificar constituintes celulares, tais como, proteínas, DNA's e membranas (Hoekstra et al., 1996).

Os radicais livres acumulam porque sistemas removedores não são efetivos em organismos desidratados (Hendry, 1993). Segundo Hoekstra et al. (1996), a atividade de radicais livres pode ser atenuada por removedores e pela presença do citoplasma no estado vítreo em sementes. As sementes, de uma maneira geral, são bem providas de moléculas antioxidantes e sistemas removedores, tais como, os solúveis em lipídios (isômeros de tocoferol-vitamina E e β -caroteno) ou os solúveis em água (ácido ascórbico-vitamina C e glutatone).

Segundo Nkang et al. (2000), é possível que a atividade

e estrutura de certas enzimas ou proteínas estruturais, em sementes sensíveis à dessecação, sejam permanentemente alteradas pela secagem, resultando em perda de atividade biológica. Enzimas removedoras de radicais livres, como glutatone redutase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase podem reduzir os produtos tóxicos resultantes do ataque de radicais livres, antes que os danos possam ocorrer, segundo os mesmos autores.

Em estudos sobre tolerância à dessecação de sementes de *Telfairia occidentalis*, cucurbitacea sensível à dessecação, Nkang et al. (2000), concluíram que um aumento no nível de hidroperóxidos pode estar associado ao declínio da viabilidade das sementes e que a peroxidação pode ocorrer com a desidratação das sementes, sendo afetada pela temperatura de secagem e taxa de dessecação. Li e Sun (1999), investigando a sensibilidade à dessecação e atividade de enzimas removedoras de radicais livres em sementes de *Theobroma cacao*, também sensíveis à dessecação, encontraram altas correlações negativas entre a atividade de superóxido dismutase e a viabilidade das sementes.

Em sementes de milho, o acúmulo de radicais livres bem como a intensificação da peroxidação de lipídios e de-esterificação de fosfolipídios foram associadas à perda de tolerância à dessecação (Leprince et al., 1994a, 1994b e 1995). Juntamente com o decréscimo de tolerância à dessecação, os autores observaram decréscimo do antioxidante tocoferol e da atividade enzimática de superóxido dismutase, glutatone redutase e peroxidase; a atividade da catalase foi discretamente detectada nos tratamentos.

A produção da enzima α -amilase, essencial na hidrólise do amido, também ocorre em resposta à dessecação das sementes de cereais. Estas enzimas são produzidas pela camada de aleurona em resposta à síntese do ácido giberélico (GA_3), após a redução do conteúdo do ácido giberélico, quando a semente é submetida à secagem, seja natural na fase pós-maturação ou artificial, em estádios mais precoces do desenvolvimento (Evans et al., 1975; Armstrong et al., 1982). Em sementes de trigo (*Triticum sativum* L.), a sensibilidade da camada de aleurona ao hormônio GA_3 não é obtida antes que ocorra a secagem das sementes até um teor de água de 25% (Armstrong et al., 1982). Segundo os autores, a secagem reduz o conteúdo do hormônio de crescimento ácido abscísico (ABA) e confere à camada de aleurona, sensibilidade ao GA_3 .

Comparando a resposta de sementes de milho à secagem prematura e à aplicação de fluridone, um inibidor da síntese ABA, Oishi e Bewley (1990) concluíram que fluridone e secagem causaram o decréscimo no conteúdo de ABA nas

sementes, mas o declínio deste hormônio, embora permitisse a germinação, sozinho não foi suficiente para permitir o aumento da atividade enzimática, necessária ao crescimento do embrião. Portanto, segundo eles, a secagem é necessária para sensibilizar a camada de aleurona ao GA_3 e, então, ativar a síntese de α -amilase. E, para que a camada de aleurona obtenha seu completo potencial para produzir as enzimas necessárias ao crescimento do embrião, ela deve estar livre dos efeitos inibidores do ABA e estar sensível para responder ao GA_3 . O tratamento de secagem imposto prematuramente ou como ocorre nas fases finais do desenvolvimento de sementes de milho, age como um sinal para o estímulo à síntese de α -amilase (Oishi e Bewley, 1990; Rosa, 2000). Embora a função de proteínas *lea* ainda não esteja bem esclarecida, sua estabilidade, afinidade com moléculas de água e abundância em organismos que toleram a desidratação, sugerem a importância de seu papel para a aquisição de tolerância à dessecação (Blackman et al., 1991). Proteínas *lea*, moduladas por ácido abscísico, acumulam em embriões de sementes de milho e cevada, durante os estádios mais tardios do desenvolvimento, em fase correspondente à aquisição de tolerância à dessecação (Bostock e Quatrano, citados por LePrince et al., 1993), e a sua expressão cessa rapidamente após embebição (Blackman et al., 1991; Blackman et al., 1992). Segundo Thomann et al. (1992), proteínas *lea*, moduladas por ABA, acumulam em embriões de sementes de milho, durante a secagem lenta, em fase correspondente à aquisição de tolerância à dessecação. Workers et al. (1998) observaram que embriões imaturos de milho, tolerantes à dessecação, submetidos à secagem lenta, apresentam padrões de proteínas semelhantes aos das proteínas *lea* presentes em sementes maduras e tolerantes à dessecação.

Primeiramente descobertas em embriões de algodão, as proteínas *lea* foram detectadas em várias outras espécies, como ervilha, soja, colza, cenoura, mamona, *Arabidopsis*, beterraba (Koornneef et al., 1989; Blackman et al., 1995; Capron et al., 2000), em estádios tolerantes à dessecação, durante o desenvolvimento das sementes ou após o início de embebição.

Sementes de milho apresentam redução gradativa da sensibilidade à dessecação após a maturidade e, quando submetidas a uma secagem prévia em baixa temperatura (35°C), adquirem tolerância à secagem a 50°C (Herter e Burris, 1989; Rosa, 2000). Nessas sementes ocorreu indução de tolerância à alta temperatura, em decorrência da ativação de mecanismos de defesa contra os efeitos danosos da retirada de água, como aqueles observados por Chen e Burris (1991)

e Borowisk et al. (1995). Mao et al. (1995) verificaram que mutantes de milho, intolerantes à dessecação e que não produzem ácido abscísico e nem proteínas *lea* após a imposição do estresse de água, o fazem em resposta à aplicação exógena do ácido abscísico.

O objetivo do presente trabalho foi investigar o padrão eletroforético de enzimas removedoras de radicais livres, de enzimas α -amilase e de proteínas *lea*, em sementes de milho intolerantes e tolerantes à alta temperatura de secagem.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas (MG) e no Laboratório de Análises de Sementes da Universidade Federal de Lavras (MG). Utilizaram-se sementes de milho do híbrido triplo BRS-3060, colhidas com 42,2% de água e submetidas ao processo de indução de tolerância à alta temperatura de secagem. As sementes foram expostas a períodos crescentes de secagem a 35°C (pré-condicionamento) antes de serem transferidas para a temperatura de 50°C, em secadores de pequena escala, construídos de acordo com Navratil e Burris (1982). As transferências foram efetuadas após 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 e 56 horas de secagem a 35°C, quando as sementes apresentaram teores de água de 42,3; 40,4; 38,1; 33,6; 25,9; 21,4; 17,7; 15,9 e 12,2%, respectivamente e, crescentes graus de tolerância à secagem sob temperatura de 50°C, até atingirem 12% de teor de água, confirmados nos experimentos realizados por Rosa (2000). Amostras de sementes foram tomadas após cada período de pré-condicionamento para determinação dos teores de água, realizada pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 24 horas, com duas subamostras de 50g, segundo as RAS (Brasil, 1992). Foi mantida uma testemunha cujas sementes foram colhidas juntamente com as demais e secadas à sombra até atingirem teor de água próximo a 12,0%.

Ao final da secagem e após 8 meses de armazenamento, as sementes foram avaliadas quanto à sua tolerância à temperatura de 50°C, mediante testes de germinação, vigor, atividade enzimática de α -amilase, atividade de enzimas removedoras de radicais livres e análise eletroforética de proteínas *lea*.

Teste de germinação - realizado com quatro subamostras de 50 sementes por lote, distribuídas em papel toalha, umedecido com quantidade de água equivalente a duas vezes e meia o peso do substrato seco e colocadas para germinar a 25°C; as avaliações foram realizadas no sétimo dia após a semeadura, segundo as Regras para Análise de

Sementes - RAS (Brasil, 1992) e, os resultados, expressos em porcentagem de plântulas normais; **primeira contagem de germinação** - realizado aos quatro dias do início do teste de germinação, computando-se como plântulas normais, as que apresentavam pelo menos duas raízes seminais e parte aérea com pelo menos dois centímetros de comprimento, os resultados foram expressos em porcentagem; **teste de frio** - realizado conforme metodologia proposta por Dias e Barros (1995), com quatro subamostras de 50 sementes distribuídas em caixas plásticas de 467x302x110mm, contendo mistura de areia e terra recentemente cultivada com milho, na proporção de 2:1, com umidade ajustada para 70% da capacidade de retenção; as caixas foram mantidas a 10°C, em câmara fria, por sete dias e, então, transferidas para câmaras de crescimento a 25°C e a contagem de plântulas emersas foi feita no sétimo dia; **teste de crescimento de plântulas** - realizado de acordo com Dias e Barros (1995), com quatro repetições de 10 sementes previamente classificadas (peneira 20), distribuídas sobre duas folhas de papel toalha, umedecidos com quantidade de água equivalente a duas vezes e meia o peso do substrato seco e colocadas para germinar a temperatura de 25°C, durante quatro dias; as sementes foram distribuídas em uma linha traçada a oito centímetros da margem superior do papel, com as radículas voltadas para baixo; após o período no germinador, foram computados os comprimentos das plântulas, em cm; **massa seca de plântulas** ao final do teste de crescimento, todas as plântulas foram colocadas em sacos de papel, secadas em estufa de circulação forçada, a 65°C, até atingirem peso constante e o peso médio da matéria seca das plântulas foi obtido dividindo-se o peso total pelo número de plântulas obtidas e, os resultados, expressos em mg; **teste de condutividade elétrica** - realizado de acordo com Dias e Barros (1995), com quatro subamostras de 25 sementes em copos plásticos contendo 75mL de água deionizada, cuja condutividade não excedeu 3µmho; as leituras de condutividade foram realizadas após 24 horas de embebição a 25°C, com o condutivímetro Digimed, modelo CD-21, e os resultados expressos em µmho.cm⁻¹.g⁻¹ de sementes; **atividade da enzima alfa-amilase** - as sementes foram submetidas ao teste de germinação por 70 horas (Rood e Larsen, 1988), quando as plântulas foram retiradas, liofilizadas, trituradas a frio em moinho refrigerado e guardadas em congelador, a -80°C, em recipiente contendo sílica gel, até o momento das análises; a extração da enzima se processou pela adição de 200mL de tampão de extração Tris-HCl, 0,2Mol.L⁻¹, pH 8,0 a 0,1g do pó relativo a cada tratamento; o homogeneizado foi mantido por 12 horas em geladeira a uma temperatura de

5°C, centrifugado a 16.000xg, a 4°C, por 60 minutos e, volumes de 40mL do extrato protéico foram aplicados aos géis de policrilamida a 7,5% (gel separador-contendo amido) e 4,5% (gel concentrador); o sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-Glicina pH 8,9 e as corridas eletroforéticas foram efetuadas a 12mA no gel concentrador e 24mA no gel separador; os géis foram revelados para o sistema α-amilase, em solução tampão de acetato de sódio 50mMol.L⁻¹, pH 5,6 e solução de iodo 10mMol.L⁻¹, contendo KI, 14mMol.L⁻¹, segundo Alfenas (1998); após o tratamento com iodo, avalia-se as bandas claras em fundo azulado (revelação negativa), devido à reação com a amilose; **atividade de enzimas removedoras de radicais livres**: realizadas com 100mg de hipocótilo de plântulas resultantes de sementes colocadas para germinar a 25°C, por cinco dias; os hipocótilos foram macerados sobre gelo com 2,5 vezes o seu peso de tampão de extração (Tris-HCl 0,2M + 0,001% de β-mercaptoetanol pH 8), tampão fosfato (0,034M de fosfato de sódio bi-básico; 0,2M de sacarose; 2,56% de PVP40; 3M de DTT; 5,7mM ácido ascórbico; 2,5mM de borato de sódio; 1% de PEG 6000, 0,002% de β-mercaptoetanol) e 2g do antioxidante PVP 40 (polivinilpirrolidone); o tampão fosfato foi utilizado somente para a extração da enzima peroxidase; após a maceração, as amostras foram deixadas a uma temperatura de 4°C por uma noite e então centrifugadas a 16.000 xg por 30 minutos a 4°C, sendo, em seguida aplicados 100mL do sobrenadante de cada amostra em gel de poliácridamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador); o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada a 4°C por quatro horas a uma voltagem de 150V, após a qual, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos peroxidase (PO-EC 1.11.1.7), seguindo as prescrições de Tanksley (1983), e para os sistemas superóxido dismutase (SOD-EC 1.15.1.1) e catalase (CAT-EC 1.11.1.6), seguindo as prescrições de Alfenas (1998); a avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador, sendo considerada a presença e ausência das bandas; **análise eletroforética de proteínas lea**: realizada pelo método SDS-PAGE e procedimentos de extração recomendados por Blackman et al. (1991), com 100mg de eixos embrionários macerados em 1mL de tampão de extração (50mM de Tris-HCl pH 7,5; 500mM NaCl; 5mM de MgCl₂; 1mM de PMSF); as amostras foram centrifugadas a 16000 xg por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante incubado em banho-Maria a 85°C por 15 minutos e novamente centrifugado como anteriormente; o sobrenadante foi vertido em tubos novos e o pellet descartado; antes da aplicação no gel, 40mL de tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46g de

SDS; 20mg de azul de Bromofenol; Tris-HCl pH 7,5) foram adicionados em 70mL de cada extrato, seguindo-se uma incubação em banho-Maria com água em ebulição por cinco minutos; em seguida foram aplicados 50mL de cada amostra em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador); o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, à temperatura ambiente e voltagem constante de 150V por quatro horas; após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descorados em solução de etanol 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (1998); a avaliação dos géis foi realizada sobre transluminador, sendo considerada a variação de intensidade das bandas.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 4 repetições e as comparações de médias realizadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, transformando-se os dados em percentagem em $[(\text{arc sen } X.100^{-1/2}) + 0,5]$. A análise dos dados foi realizada através do SAS-System for Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de qualidade fisiológica das sementes utilizadas neste experimento estão apresentados na Tabela 1. A secagem contínua a 50°C (sem pré-condicionamento) de sementes de milho, colhidas com teor de água de 42,3%, resultou em consideráveis danos. No entanto, à medida que as sementes foram submetidas aos períodos crescentes de

secagem a 35°C (processo de indução de tolerância à temperatura de 50°C), os danos causados pela alta temperatura diminuíram gradativamente até que as sementes atingiram seu melhor desempenho fisiológico, comparado à testemunha, com 24 horas de secagem a 35°C, quando as sementes alcançaram 26,0% de teor de água e não mais apresentaram ganhos significativos na qualidade fisiológica.

Após oito meses de armazenamento, pode-se constatar pela Figura 1, que todas as sementes apresentaram decréscimo no desempenho fisiológico, indicando deterioração natural, mas esse desempenho das sementes submetidas ao período de 24 horas de pré-condicionamento, requerido para a aquisição da tolerância a 50°C, não foi alterado. No entanto, as sementes intolerantes à secagem sob temperatura de 50°C até 12%, apresentaram maiores reduções nos valores de germinação e de vigor, relativamente àquelas que não sofreram danos causados pela alta temperatura. Este fato indica que as mudanças proporcionadas às sementes, pela lenta secagem, durante o pré-condicionamento, parecem ter dotado as sementes daqueles mecanismos que as protegem no estado seco (Herter e Burris, 1989; Bernal-Lugo e Leopold, 1992; Kigel e Galili, 1995; Borowski et al., 1995; Hoekstra et al., 1996; Workers et al., 1998; Rosa, 2000). Chen e Burris (1991) observaram que sementes de milho pré-condicionadas a baixa temperatura, tiveram seus sistemas de membranas preservados, apresentando baixos valores de condutividade elétrica. Os autores concluíram que o pré-condicionamento provocou alterações na composição molecular dos fosfolipídeos e mudanças na composição de ácidos graxos,

TABELA 1. Valores médios dos testes de germinação e de vigor, pelos testes de primeira contagem, condutividade elétrica, frio, comprimento de plântula e massa seca de plântula das sementes de milho, cultivar BRS-3060, submetidas à temperatura de 50°C, após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C.

Período de secagem ¹ (horas)	Teor de água na transferência (%)	Germinação (%)	Primeira contagem de germinação (%)	Condutividade $\mu\text{mhos.g}^{-1}.\text{sem}^{-1}$ (²)	Teste de frio (%)	Comp. de plântula (cm)	Peso seco de plântula (mg)
0	42,3	b 14 C	b 3 D	b 23,38	b 7 D	b 11,4 D	b 26,25 D
4	40,4	b 15 C	b 8 D	b 22,82	b 8 D	b 15,2 C	b 30,75 D
8	38,1	b 52 B	b 20 C	b 20,76	b 26 C	b 27,7 B	b 51,75 C
16	33,6	b 92 A	b 67 B	b 17,09	b 87 B	b 34,7 A	b 68,00 B
24	25,9	a 99 A	b 91 A	b 15,85	b 94 AB	b 34,1 A	a 80,75 A
32	21,4	a 100 A	a 95 A	b 15,45	a 98 A	a 36,7 A	a 79,25 A
40	17,7	a 99 A	a 97 A	b 15,97	a 97 A	a 36,7 A	a 81,00 A
48	15,9	a 100 A	a 95 A	b 16,36	a 96 AB	a 36,2 A	a 80,00 A
56	12,2	a 99 A	a 97 A	b 16,29	a 98 A	a 35,0 A	a 79,25 A
Test.	12,4	a 99	a 98	a 8,88	a 99	a 37,6	a 84,00

1. Períodos de pré-condicionamento a 35°C, após a maturidade fisiológica.

2. Não houve efeito significativo do pré-condicionamento.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento com a mesma letra minúscula da testemunha, na coluna, não difere da mesma, para o valor de significância de 5%, pelo teste t.

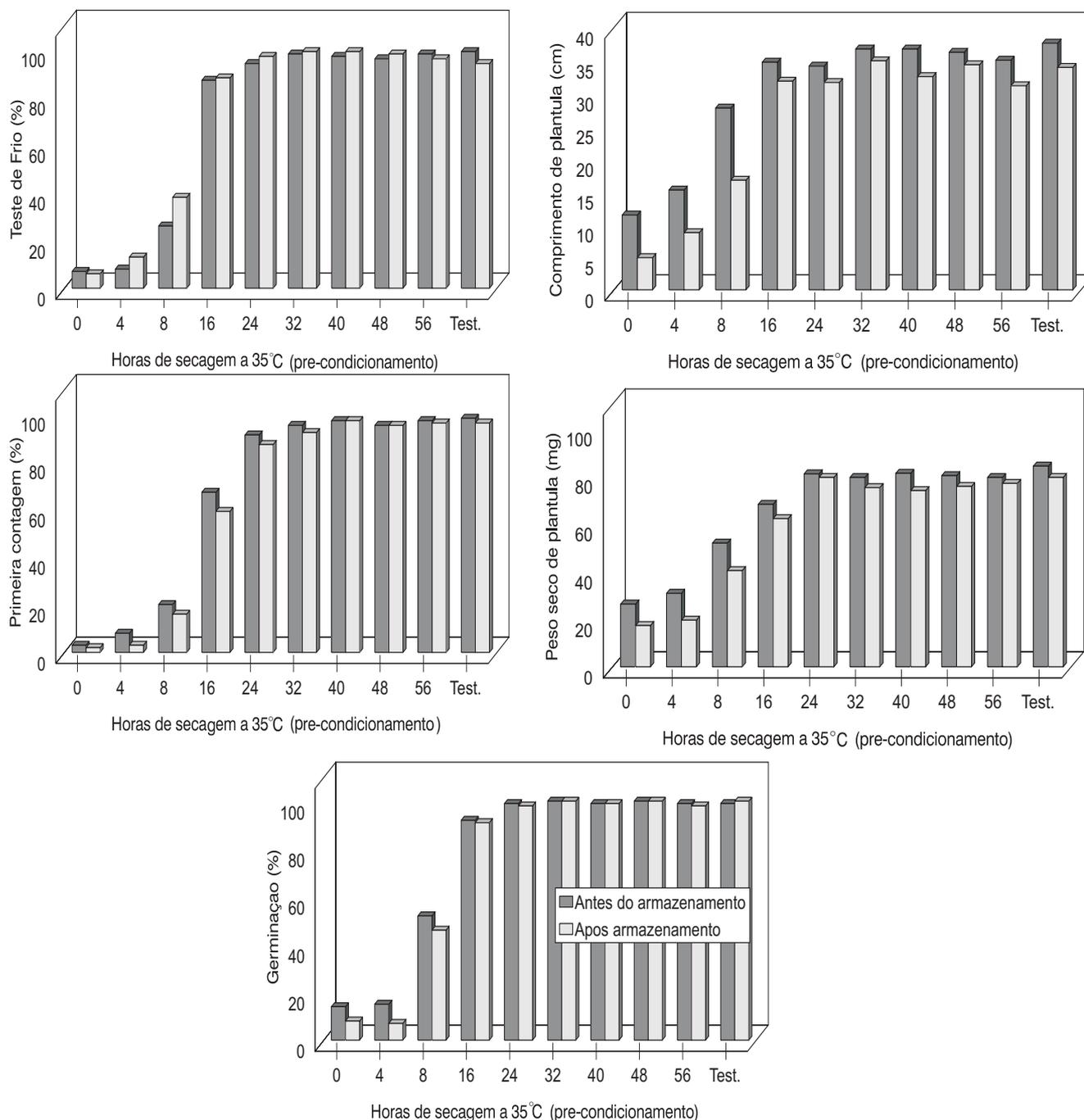


FIGURA 1. Valores médios, após a secagem e após oito meses de armazenamento, de germinação e de vigor, pelos testes de primeira contagem, frio, massa seca de plântula, comprimento de plântula e condutividade elétrica de sementes de milho, cultivar BRS-3060, submetidas à temperatura de 50°C, após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C.

para uma composição mais saturada (de ácido linoleico-18:2, para ácido oleico-18:1), o que representa um papel importante da secagem lenta, na preservação da funcionalidade das membranas, após dessecação a alta temperatura. Radicais livres podem causar oxidação de ácidos graxos insaturados, causando danos em membranas.

Diferenças entre sementes tolerantes e intolerantes à secagem sob temperatura de 50°C até 12%, também foram observadas nos resultados da análise eletroforética da enzima α -amilase (Figura 2). Observou-se atividade crescente da enzima α -amilase (evidenciado pela intensidade das bandas claras em fundo azulado devidas à reação do iodo com a amilose

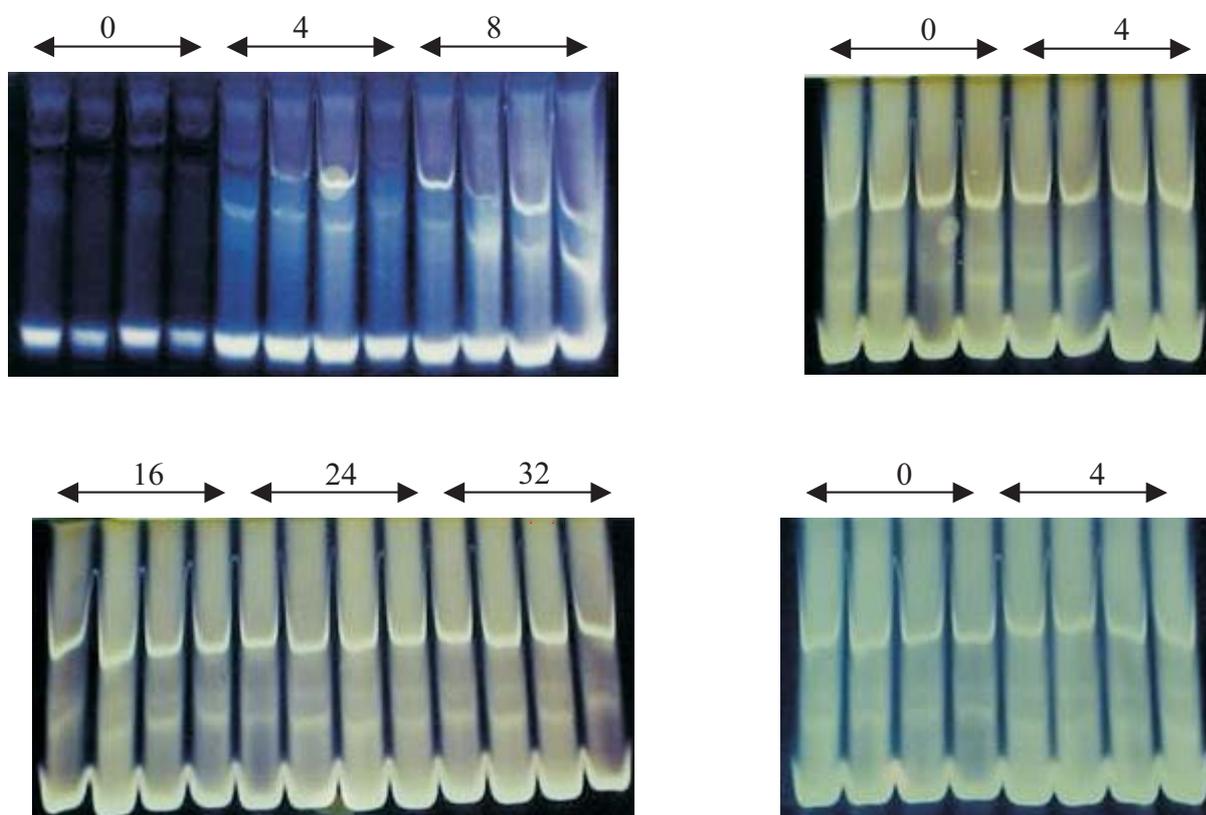


FIGURA 2. Padrão eletroforético da enzima α -amilase em plântulas oriundas de sementes de milho, cultivar BRS-3060, submetidas à temperatura de 50°C, após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C e testemunha secada à sombra.

(revelação negativa), à medida que as sementes adquiriram tolerância à secagem sob temperatura de 50°C até 12%, indicando que os danos causados às sementes, em estádios intolerantes, também estão relacionados à menor síntese das enzimas necessárias à degradação do amido para o crescimento do embrião. Sabe-se que há necessidade da redução no teor de água em sementes de milho, para que ocorra a síntese de enzimas α -amilase, permitindo o início do processo germinativo após a reidratação (Oishi e Bewley, 1990; Rosa, 2000). Embora as sementes secadas continuamente a 50°C tenham sofrido redução do teor de água até próximo de 12%, não apresentaram a mesma atividade enzimática daquelas que já haviam adquirido tolerância à alta temperatura, evidenciando danos neste sistema enzimático. Com referência à atividade das enzimas removedoras de radicais livres estudadas, as enzimas superóxido dismutase e peroxidase não apresentaram diferenças detectáveis entre os tratamentos de pré-condicionamento (Figura 3 e 5), ou seja, tanto as sementes tolerantes à secagem sob temperatura de 50°C até 12%, quanto as intolerantes, apresentaram atividades

semelhantes. Quanto às enzimas catalase (Figuras 4), essas apresentaram um aumento de atividade enzimática nas sementes tolerantes à secagem a 50°C, as quais foram submetidas aos períodos de pré-condicionamento iguais ou superiores a 24 horas, evidenciado pela maior intensidade das bandas e uma tendência de maior polimorfismo. Provavelmente, a enzima catalase tenha removido peróxidos de hidrogênio produzidos por outras enzimas como a superóxido dismutase, protegendo as células destes compostos tóxicos, nas sementes tolerantes. Nota-se que as sementes intolerantes a 50°C, principalmente aquelas submetidas a poucas horas de pré-condicionamentos (zero e quatro), as quais apresentaram baixo desempenho fisiológico (Figura 1), também apresentaram menor intensidade de atividade da enzima catalase.

Trabalhando com embriões de milho Leprince et al. (1990a), observaram uma diminuição na atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, durante o processo de embebição, em estágios de intolerância à dessecação. Esses autores, não detectaram aumento na atividade da enzima

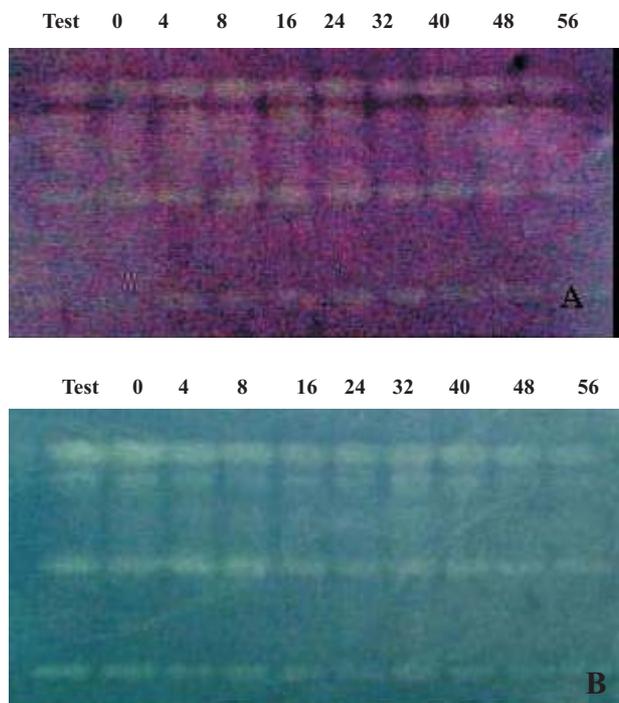


FIGURA 3. Padrão eletroforético da atividade da enzima superóxido dismutase em coleótilos oriundos de sementes de milho, cultivar BRS-3060, submetidas à temperatura de 50°C, após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C e testemunha secada à sombra A – Antes do armazenamento; B – Após o armazenamento.

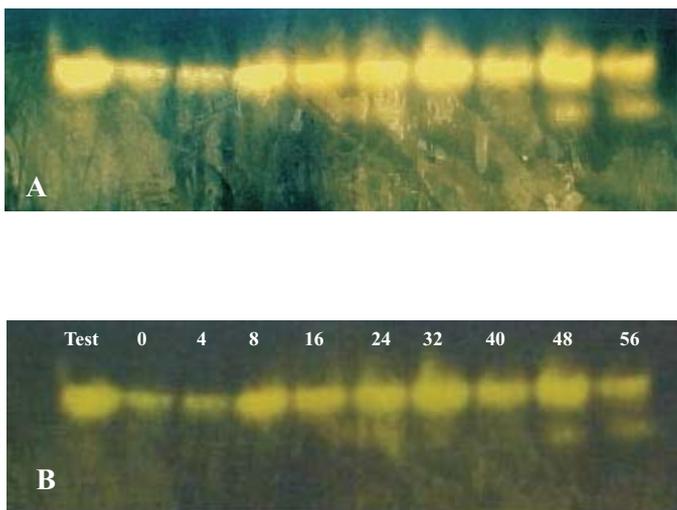


FIGURA 4. Padrão eletroforético da atividade da enzima catalase em coleótilos oriundos de sementes de milho, cultivar BRS-3060, submetidas à temperatura de 50°C, após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C e testemunha secada à sombra A – Antes do armazenamento; B – Após o armazenamento.

catalase, a qual se comportou como a peroxidase, ou seja, apresentou uma atividade crescente ao longo do processo de aquisição de tolerância à alta temperatura de secagem. Já Nkang et al. (2000) observaram um decréscimo em atividades de catalase e superóxido dismutase, importantes mecanismos de defesa celular, associados com aumentos em níveis de hidroperóxidos, durante o processo de secagem de sementes de *Telfairia occidentalis*, sensíveis à dessecação. Li e Sun (1999) observaram aumentos em peroxidação de lipídios em eixos embrionários de *Theobroma cacao*, durante dessecação e um associado decréscimo em sistemas enzimáticos de proteção. Segundo os autores, estes resultados sugerem um aumento no teor de radicais livres oxidativos, embora não quantificados, os quais podem causar danos em membranas, confirmados pelo aumento em lixiviação de eletrólitos e perda de viabilidade das sementes intolerantes, resultados dos danos oxidativos. No presente trabalho, as sementes intolerantes a 50°C também apresentaram aumentos nos valores de condutividade elétrica e baixa viabilidade (Figura 1).

A Figura 6 mostra o resultado das análises eletroforéticas de proteínas *lea* das sementes tolerantes e intolerantes à altas temperaturas de secagem. Nota-se uma tendência de aumento de intensidade das bandas a partir de 16 horas de pré-condicionamento a 35°C. Sabe-se que as proteínas *lea* são sintetizadas nos processos finais da maturação das sementes e, tendo sido a colheita realizada com alto de água das sementes, pode-se inferir que durante o pré-condicionamento à baixa temperatura, houve condições propícias para a síntese dessas proteínas, induzindo tolerância à secagem sob temperaturas mais elevadas. Thomann et al. (1992), estudando o efeito de secagem lenta durante o desenvolvimento de sementes de milho, verificaram acúmulo de proteínas *lea*, moduladas por ABA nos embriões, em fase correspondente à aquisição de tolerância à dessecação. O aparecimento dessas proteínas tem sido bem associado à aquisição de tolerância à dessecação durante o final da fase de maturação, com o início da secagem ou após a embebição (Blackman et al., 1991e 1992).

De uma maneira geral, os resultados das avaliações de enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea*, realizadas em sementes de milho tolerantes e intolerantes à secagem sob alta temperatura até 12% de teor de água, permitem afirmar que estes sistemas protéicos podem ser considerados como atuantes mecanismos de proteção celular contra os efeitos danosos da perda de água em sementes de milho sob altas temperaturas. Além disto, outro sistema protéico, o das enzimas α -amilase, de fundamental importância no processo de germinação de sementes de milho,

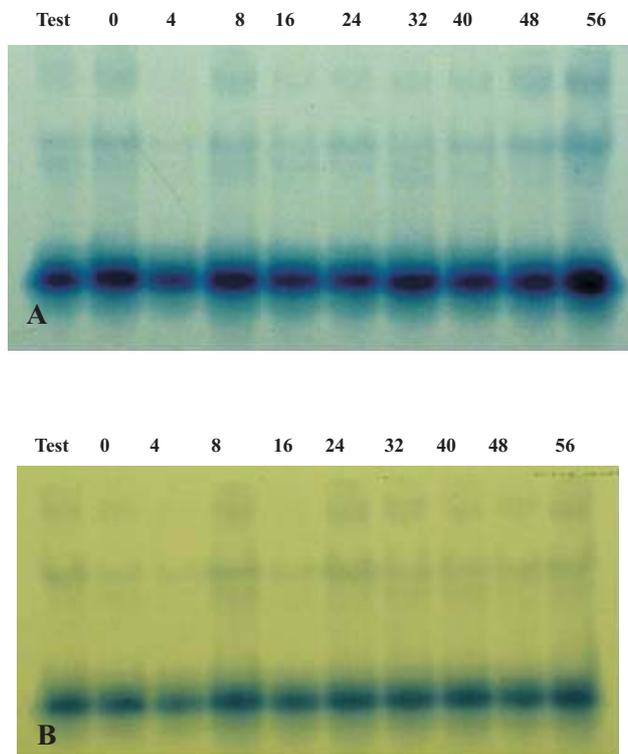


FIGURA 5. Padrão eletroforético da atividade da enzima peroxidase em coleótilos oriundos de sementes de milho, cultivar BRS-3060, submetidas à temperatura de 50°C, após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C e testemunha secada à sombra. UFLA, Lavras - MG, 2001. A – Antes do armazenamento; B – Após o armazenamento.

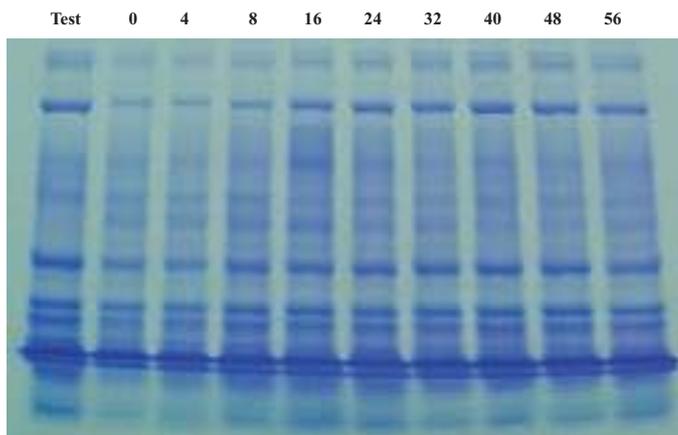


FIGURA 6. Padrão eletroforético da proteína *lea* em embriões oriundos de sementes de milho cultivar BRS-3060, submetidas à temperatura de 50°C, após crescentes períodos de pré-condicionamento a 35°C e testemunha secada à sombra. UFLA, Lavras - MG, 2001.

também podem ser danificados por altas temperaturas de secagem. Portanto, estes resultados ajudam no entendimento das causas dos danos que podem ocorrer em decorrência da secagem mal conduzida de sementes de milho e, enfatizam os cuidados que devem ser tomados durante a secagem de sementes, quando estas são colhidas com altos teores de água. Herter e Burris (1989) já haviam detectado que sementes de milho, com altos teores de água, podem ser secadas com segurança à baixas temperaturas e temperaturas mais altas podem ser utilizadas quando as sementes são colhidas com teores de água variando entre 20 e 25%. Os resultados das análises dos sistemas protéicos aqui apresentados corroboram esta afirmativa.

Desta forma, pode-se afirmar que sementes de milho podem ser colhidas em espigas, com altos teores de água, desde que sejam submetidas a uma pré-secagem sob 35°C até atingirem valores próximos de 24%, quando sistemas protéicos associados à tolerância à dessecação encontram-se atuantes nessas sementes.

CONCLUSÕES

Em sementes de milho, a aquisição de tolerância à secagem sob alta temperatura é associada à atividade da enzima catalase e pouco associada à atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase.

Sementes de milho tolerantes à alta temperatura de secagem apresentam maior quantidade de proteínas *lea*, bem como maior síntese de enzimas α -amilase, do que sementes intolerantes.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:** fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- ARMSTRONG, C.; BLACK, M.; CHAPMAN, J.M.; NORMAN, H.E.; ANGOLD, R. The induction of sensitivity to gibberellin in aleurone tissue of developing wheat grains. I. The effect of dehydration. *Planta*, Berlin, v.154, n.6, p.573-577, 1982.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds:** physiology of development and germination. New York: Plenum Press, 1985. 367 p.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 630-638, 1995.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology*, Rockville, v. 100, n. 1, p. 225-230, 1992.

- BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 868-874, 1991.
- BOCHICCHIO, A.; RIZZI, E.; BALCONI, C.; VERNIERI, P.; VAZZANA, C. Sucrose and raffinose contents and acquisition of desiccation tolerance in immature maize embryos. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 123-126, 1994.
- BOCHICCHIO, A.; VERNIERI, P.; PULIGA, S.; MURELLI, C.; VAZZANA, C. Desiccation Tolerance in Immature Embryos of Maize: Sucrose, Raffinose and the ABA-Sucrose Relation. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: basic and applied aspects of seed biology, 5., 1995, Reading. **Proceedings...** Reading: University of Reading, 1996. p. 1-12.
- BOROWSKI, A. M.; FRITZ, V. A.; WATERS JR., L. Seed maturity and desiccation affect carbohydrate composition and leachate conductivity in shrunken-2 sweet corn. **Hort Science**, Alexandria, v. 30, n. 7, p. 1396-1399, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMAN, A.M.; SMITH, M.E.; OBENDORF, R.L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed developing and maturation. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 150, n. 4, p. 481-488, 1997.
- CAPRON, I.; CORBINEAU, F.; DACHER, F.; JOB, C.; CÔME, D.; JOB, D. Sugarbeet seed priming: effects of priming conditions on germination, solubilization of 11-S globulin and accumulation of *LEA* proteins. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 243-254, 2000.
- CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Desiccation tolerance in maturing maize seed: membrane phospholipid composition and thermal properties. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 766-770, 1991.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 43 p. (Circular, 88).
- EVANS, M.; BLACK, M.; CHAPMAN, J.M. Induction of hormone sensitivity by dehydration is one positive role for drying in cereal seed. **Nature**, London, v.258, n.5531, p.144-145, 1975.
- FINCH-SAVAGE, W.E.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. Free radical activity and loss of viability during drying of desiccation-sensitive tree seeds. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B -Biological Sciences**, Edinburgh, v. 102B, p. 257-260, 1994.
- FINCH-SAVAGE, W.E. The role of developmental studies in research on recalcitrant and intermediate seeds. In: WORKSHOP ON IMPROVED METHODS FOR HANDLING AND STORAGE OF INTERMEDIATE/RECALCITRANT TROPICAL FOREST TREE SEEDS, 1996, Humlebaek., **Proceedings...** Humlebaek, Denmark, 1996. p. 83-97.
- GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.; ATHERTON, N.M.; BERJAK, P. Viability loss free radical processes during desiccation of recalcitrant *Avicennia marina* seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 3, p. 235-242, 2001.
- HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 2, p. 141-153, 1993.
- HERTER, U.; BURRIS, J. S. Preconditioning reduces the susceptibility to drying injury in corn seed. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 69, n. 3, p. 775-789, 1989.
- HOEKSTRA, F. A.; WOLKERS, W. F.; BUITINK, J.; GOLOVINA, E.A. Desiccation Tolerance and Long Term Structural Stability. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: basic and applied aspects of seed biology, 5., 1995, Reading. **Proceedings...** Reading: University of Reading, 1996. p. 1-12.
- HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R. L. Seeds desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols - review and survey. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 4, p. 385-405, 1994.
- KOORNNEEF, M.; HANHART, C.J.; HILHORST, H.W.M.; KARSSSEN, C.M. In vivo inhibition of seed development and protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 2, p. 463-469, 1989.
- LEPRINCE, O.; ATHERTON, N.M.; DELTOUR, R.; HENDRY, G.A. F. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating zea mays l. an electron paramagnetic resonance study. **Plant Physiology**, Edinburgh, v. 104, n. 4, p. 1333-1339, 1994a.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; ATHERTON, N.M. Free radical processes induced by desiccation in germinating maize: The relationship with respiration and loss of desiccation tolerance. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B - Biological Sciences**, Edinburgh, v. 102B, p. 211-218, 1994b.
- LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea Mays* L.). **New Phytologist**, London, v. 116, p. 573-580, 1990a.
- LEPRINCE, O.; DELTOUR, R.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N. M.; HENDRY, G.A.F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v. 116, n. 4, p. 573-580., 1990b.
- LEPRINCE, O.; HENDRY G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 231-246, 1993.
- LEPRINCE, O.; VERTUCCI, C.W.; HENDRY, G.A.F.; ATHERTON, N.M. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 233-240, 1995.
- LI, C.; SUN, W. Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 3, p. 209-217, 1999.
- MAO, Z.Y.; PAIVA, R.; KRIZ, A.L.; JUVIK, J.A. Dehydrin gene expression in normal and viviparous embryos of *Zea mays* during seed development and germination. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 33, n. 6, p. 649-653, 1995.
- NAVRATIL, R.J.; BURRIS, J.S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 1, p. 159-161, 1982.

NKANG, A.; OMOKARO, D.; EGBE, A. Effects of desiccation on the lipid peroxidation and activities of peroxidase and polyphenoloxidase in seeds of *Telfairia occidentalis*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2000.

ROOD, S.B.; LARSEN, K.M. Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. **Journal Experimental Botany**, London, v. 39, n. 199, p. 223-233, 1988.

ROSA, S.D.V.F. **Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura**. 2000. 121 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; BOROCHOV, A. Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 38, n. 197, p. 2005-2014, 1987.

SUN, L.; LEOPOLD, A.C. Cytoplasmatic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 117A, n. 3, p. 327-333, 1997.

TANKSLEY, S.D.; ORTON, T. J. **Isozymes**: developments in plant genetic and breeding. Parte A (IA). New York: Elsevier, 1983. 516 p.

THOMANN, E.B.; SOLLINGER, J.; WHITE, C.; RIVIN, C.J. Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. Roles of abscisic acid and the viviparous-1 gene product. **Plant Physiology**, Rockville v. 99, n. 2, p. 607-614, 1992.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J. L.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Dekker, 1995. p. 237-271.

WOLKERS, W. F.; BOCHICCHIO, A.; SELVAGGI, G.; HOEKSTRA, F.A. Fourier transform infrared microscopy detects changes in protein secondary structure associated with desiccation tolerance in developing maize embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 3, p. 1169-1177, 1998.

