

Padrões Isoenzimáticos em Grãos de Milho Provenientes de Linhagens Tolerantes e Suscetíveis aos Grãos Ardidos¹

Luiz Antonio Yanes Bernardo Júnior¹, Gabriella Santos Pereira¹, Édila Vilela de Resende Von Pinho¹, Renzo Garcia Von Pinho¹ e Glória Maria de Freitas Naves¹

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, luiz_yanes@hotmail.com; gabipereira87@yahoo.com.br; edila@dag.ufla.br; renzo@dag.ufla.br; glorinha.fn@gmail.com

RESUMO - O uso de cultivares tolerantes aos grãos ardidos tem sido eficaz no controle da doença. Marcadores isoenzimáticos estão sendo requisitados para seleção de genótipos superiores, pois os polimorfismos estão mais perto da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA. Objetivou-se neste trabalho diferenciar linhagens tolerantes e suscetíveis aos grãos ardidos por meio de padrões enzimáticos para esterase (EST) e álcool desidrogenase (ADH). A partir de 30 linhagens foram selecionadas visualmente cinco tolerantes e cinco suscetíveis à doença. As espigas foram inoculadas com suspensão de conídios 2×10^4 de *Fusarium verticillioides*. Para extração das enzimas utilizou-se tampão tris HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,1% de • ME + 0,4% PVP + 0,4% PEG + 1mM EDTA. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O padrão de bandas da EST apresentou diferenças entre quatro genótipos suscetíveis e entre três genótipos tolerantes. Para a ADH, obteve-se padrão de bandas mais intensas em quatro genótipos suscetíveis, porém observou-se este mesmo padrão em dois genótipos tolerantes. As linhagens tolerantes e suscetíveis aos grãos ardidos apresentam diferenças para os padrões enzimáticos da esterase e álcool desidrogenase em grãos.

Palavras-chave: esterase, álcool desidrogenase, *Fusarium verticillioides*, polimorfismo.

Introdução

A obtenção de linhagens de milho tolerantes aos grãos ardidos, causados pelos fungos *Gibberella zaeae*, *Diplodia maydis*, *Diplodia macrospora* e *Fusarium verticillioides*, têm sido o foco de muitos programas de melhoramento de milho, sendo que a utilização de cultivares tolerantes é a principal medida de controle desta doença.

Os marcadores moleculares isoenzimáticos podem auxiliar na seleção de genótipos que apresentam tolerância aos grãos ardidos.

Durante muito tempo os marcadores de isoenzimas foram substituídos pelos marcadores de DNA, porém com o novo conceito de gene (RESENDE et al., 2011), os marcadores isoenzimáticos estão sendo novamente requisitados. A principal justificativa para o emprego destes marcadores é o fato de que os polimorfismos estão mais perto da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA (TORGGLER et al., 1995 e SOUZA et al., 2005).

¹ Trabalho realizado com o apoio financeiro da CNPq e Fapemig

Além disso, mecanismos de defesa das plantas a estresse biótico e abiótico causam mudanças metabólicas e podem ser verificados por meio da atividade das isoenzimas (BURDON & MARSHALL, 1983).

As esterases destacam-se por ser um dos sistemas isoenzimáticos mais polimórficos, e por estarem relacionada com a ação de microorganismos na planta. (PASCHOLATI et al., 1993 e SOUZA et al., 2005).

Muitos trabalhos na literatura relatam a influência de microorganismos na atividade de isoenzimas, como esterase (EST) e álcool desidrogenase (ADH), em grãos (SILVA et al., 2000, SOUZA et al., 2005, COUTINHO et al., 2007 e HENNING et al., 2009) .

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi diferenciar linhagens de milho tolerantes e suscetíveis aos grãos ardidos causados por *F. verticillioides* por meio dos padrões enzimáticos para EST e ADH.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Eletroforese do Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A partir de 30 linhagens de milho foram selecionadas visualmente grãos de cinco linhagens que apresentaram maior tolerância aos grãos ardidos e grãos de cinco linhagens que apresentaram um maior nível de severidade da doença.

É importante ressaltar que as espigas de todas as plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios 2×10^4 de *Fusarium verticillioides*.

Para a extração das enzimas, foram macerados em nitrogênio líquido 100 grãos de cada linhagem selecionada que foram previamente submetidos à secagem natural. A extração das isoenzimas foi realizada ressuspensão 100mg do pó das sementes em 250 µl de tampão Tris HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,1% de • ME + 0,4% PVP + 0,4% PEG + 1mM EDTA, mantidos a 4°C, por 16 horas.

Foram aplicados 50µL do sobrenadante em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador).

Os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos esterase (EST) e álcool desidrogenase (ADH), segundo Alfenas et al. (1991).

Resultados e Discussão

O padrão de bandas da esterase foi divergente para os genótipos suscetíveis 1, 2, 3 e 4 e dos genótipos tolerantes 6, 7 e 8 (Figura 1). Foi observado aumento na intensidade das bandas para aquelas linhagens que apresentaram grãos mais atacados pelo *F. verticillioides*, o que sugere interferência do fungo no metabolismo das sementes, propiciando maior alteração no padrão desta enzima.

Estes resultados corroboram com os de Coutinho et al.(2007) . Estes autores verificaram bandas mais intensas para a mesma enzima em sementes de milho infectadas com *F. verticillioides*.

Em sementes de aveia com maior incidência de fungos foi observado maior atividade das isoenzimas álcool desidrogenase, fosfatase ácida e esterase (HENNING et al., 2009).

Quando tecidos de plantas são danificados por patógenos ocorre uma degradação seqüencial de lipídeos e a esterase participa de reações de hidrólise de ésteres, portanto, atua diretamente no metabolismo dos lipídios (COUTINHO et al., 2007). Isto explica a maior expressão desta enzima nos grãos mais infectados.

Para a álcool desidrogenase, observou-se um padrão de bandas mais intensas para os genótipos suscetíveis 1, 2, 3 e 4, porém este mesmo padrão foi observado nos genótipos tolerantes 8 e 10 (Figura 2).

Alterações tanto na intensidade como no número de bandas dos padrões isoenzimáticos da álcool desidrogenase em sementes de milho infectadas com *Aspergillus flavus* foram observados por Silva et al.(2000).

A álcool desidrogenase é uma enzima da respiração anaeróbica, e a sua maior expressão em grãos infectados por microorganismos está relacionada com a produção de toxinas, as quais irão causar decomposição dos tecidos vivos e conseqüentemente aumento da taxa respiratória do hospedeiro (HENNING et al., 2009). Estes mesmos autores verificaram maior expressão desta enzima em sementes de aveia com baixa qualidade sanitária.

Como a expressão de enzimas pode ser alterada de acordo com o tecido da planta, são necessários estudos que verifiquem a expressão destas enzimas em outras partes planta, para inferir sobre a estabilidade destes marcadores para a característica estudada.

Conclusão

As linhagens de milho tolerantes e suscetíveis aos grãos ardidos apresentam diferenças para os padrões enzimáticos da esterase e álcool desidrogenase em grãos.

Literatura Consultada

ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos de essências florestais. Viçosa: UFV. 1991.

BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R. The use of isozymes research. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). Isosymes in plantsgenetics and breeding: part A. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. p.401-412.

COUTINHO, W.M., SILVA-MANN, R., VIEIRA, M.G.G.C., MACHADO, C.F. & MACHADO, J.C. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. Fitopatologia Brasileira 32:458- 464. 2007.

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, vol. 31, nº 3, p.063-069, 2009

PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R.L. Cutinase e non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology, v.42, p.37-51, 1993.

RESENDE, K.F.M.; SANTOS, F.M.C.; DIAS, M.A.D.; RAMALHO, M.A.P. Implication of the changing concept of genes on plant breeder's work. Crop Breed. Appl. Biotechnol. (Online) vol.11 no.4 Viçosa Dec, 2011.

SILVA, E.A.A.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, M.G.G.C., CARVALHO, M.L.M.; MACHADO, J.C. Padrões eletroforéticos de isoenzimas em coleótilos de milho em associação com microrganismos. Revista Brasileira de Sementes, vol. 20, no 2, p.176-181 – 1998.

SILVA, E.A.A.; PINHO, E.V.R.V.; VIEIRA, M.G.G.C.; CARVALHO, M.L.M.; MACHADO, J.C. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas com fungos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.35, p.1725-1732, 2000.

SOUZA, R.; SCHONS, J.; BRAMMER, S.P.; PRESTES, A.M.; SCHEEREN, P.L.; SILVA, M.S.; DEL DUCA, L.J.A. Atividade isoenzimática em plantas de trigo infectadas com o vírus SBWMV. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.40, n.9, p.845-852, set. 2005.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. Isoenzimas – variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1995. 87p.

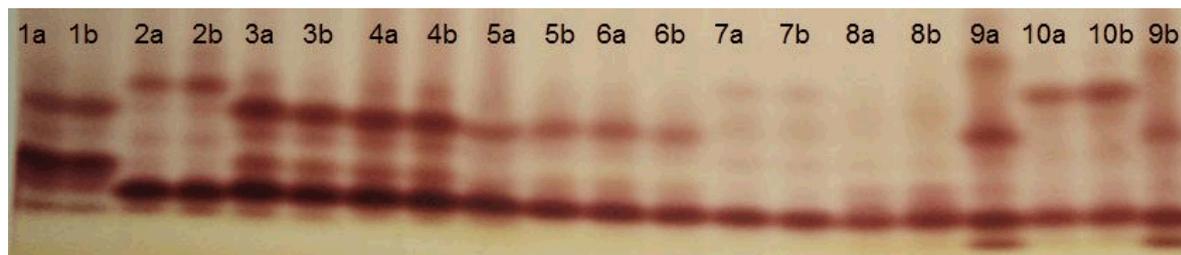


Figura1. Padrão isoenzimático da esterase para grãos de milho (1, 2, 3, 4 e 5: linhagens suscetíveis; 6, 7, 8, 9 e 10: linhagens tolerantes, a e b: repetições).

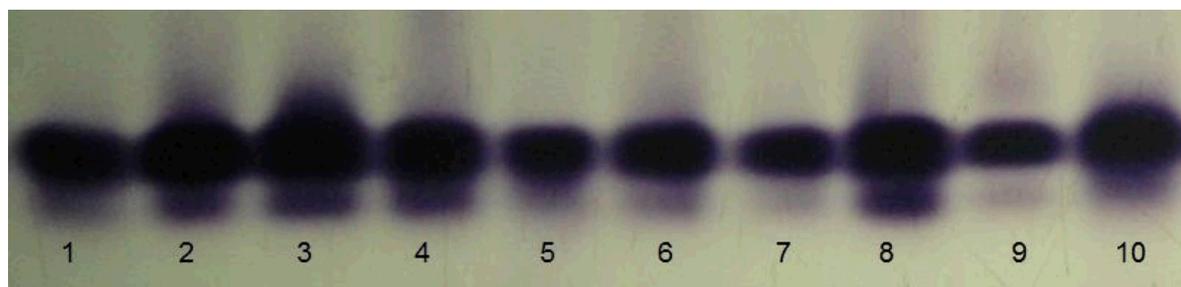


Figura2. Padrão isoenzimático da álcool desidrogenase para grãos de milho (1, 2, 3, 4 e 5: linhagens suscetíveis; 6, 7, 8, 9 e 10: linhagens tolerantes).