

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE SOJA ATRAVÉS DO TESTE DE PEROXIDASE

Andréia Alana Klaumann¹; Leandro Werlang²; Heins Schönhals¹; Fabricio Balzan¹; Nelde Daiane Becker¹; Fabiana Raquel Mühl³; Neuri Antonio Feldmann⁴; Anderson Clayton Rhoden⁵; Marciano Balbinot⁶

INTRODUÇÃO

Uma das principais exigências do mercado é a qualidade das sementes. As sementes apresentam todos os genes que identificam as características da cultivar. Para que se tenha sementes de qualidade o manejo da produção deve ser conduzido com toda atenção sobre os fatores que interferem na qualidade da mesma. Esses cuidados vão da semeadura até a comercialização garantindo sementes de qualidade fisiológica, genética, sanitária e pureza, oferecendo sementes com uma real garantia para o comércio.

Um método muito utilizado para identificação de contaminação varietal é o teste de peroxidase. Este teste é caracterizado pelas enzimas encontradas na maioria dos tecidos vivos dos vegetais e é no tegumento das sementes de soja que se encontra em maior concentração, onde varia de acordo com a cultivar, permitindo a identificação de misturas com outras cultivares (CAMPA, 1991).

O teste de peroxidase é um método simples e de baixo custo, porém, deve-se tomar muito cuidado no manuseio e na sua interpretação, pois sementes que apresentam umidade acima de 12% e contém parte do cotilédono ou do eixo embrionário no tegumento, levam a testes falsos. Em casos assim e se houver dupla reação no teste da mesma cultivar, recomenda-se o uso de marcador, pelo fato do genótipo estar sendo avaliado, o que dá uma maior garantia nos resultados. A alta atividade é resultado da presença de, pelo menos, um alelo dominante

¹ Acadêmicos do Curso de Agronomia do Centro Universitário FAI. E-mail: andreia49@hotmail.com

² Engenheiro Agrônomo formado pela Faculdade de Itapiranga.

³ Bióloga, Doutora em Agronomia, Professora do curso de Agronomia do Centro Universitário FAI.

⁴ Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia, Coordenador e professor do curso de Agronomia do Centro Universitário FAI.

⁵ Engenheiro Agrônomo, Doutorando do Programa de Pós-graduação da UTFPR, Coordenador Adjunto e professor do Curso de Agronomia do Centro Universitário FAI.

⁶ Licenciado em Ciências Agrárias, Mestre em Agronomia, Professor do curso de Agronomia do Centro Universitário FAI.

(EpEp) ou (Epep), enquanto que baixa atividade resulta da presença do par recessivo (epep) (COSTA et al., 1979).

Peroxidases são enzimas encontradas na forma solúvel e iônica que são ligadas à parede das células, presente nos tecidos vegetais, animais e de micro-organismos. A enzima peroxidase encontrada na planta tem grande importância para a integridade estrutural das paredes celulares agindo na biossíntese de lignina, na suberização (impermeáveis à água) e na formação de ligações covalentes cruzadas entre a celulose, pectina e outros constituintes da parede celular (CLEMENTE et al., 1998).

As enzimas peroxidases tem grande importância para as plantas, no seu desenvolvimento e na diferenciação e desenvolvimento celular, além disso, defendendo-as contra patógenos e estresses bióticos e abióticos, na biossíntese e degradação da lignina, na remoção de peróxido de hidrogênio e na oxidação de produtos tóxicos (MENEZES et al., 2004).

Na ocorrência de diferentes reações no teste de peroxidase a princípio existem três possibilidades dessa variação: mistura varietal, ou encontrar parte do cotilédono ou do eixo embrionário junto com o tegumento utilizado no teste, ou ainda a cultivar apresentar reação positiva e negativa da peroxidase (ZABOT, 2009).

Durante o desenvolvimento de novas cultivares em programas de melhoramento genético a análise das sementes tem grande relevância para verificar a qualidade das mesmas, tendo em vista se o método do melhoramento genético está funcionando, assim, podendo dar continuidade. Para o lançamento de uma nova cultivar testes e análises das sementes são fundamentais para comprovar sua pureza física e varietal, ou seja, avaliar suas características qualitativas mediante a outras cultivares, e este é um dos processos que mais preocupa os melhoristas, pelas chances da ocorrência de similaridades genéticas existentes em cultivares que já estão no mercado, podendo impedir seu lançamento (ZORATO et al., 2011).

MATERIAIS E MÉTODOS

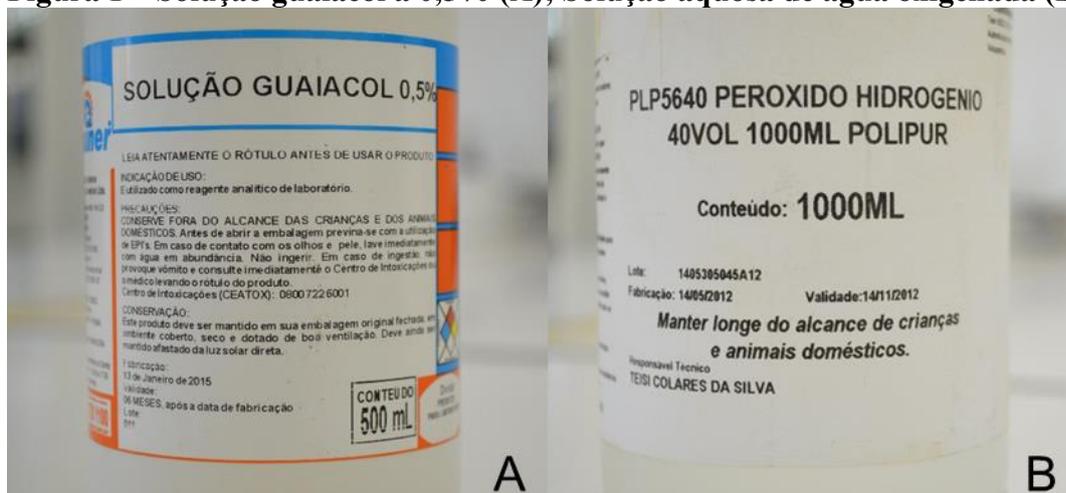
Uma das formas de identificar a contaminação varietal das sementes é a realização do teste de peroxidase, com isso, garante a pureza da tecnologia que a semente desejada apresenta. Na CCGL – TECNOLOGIA/FUNDACEP, o teste de peroxidase foi realizado em um laboratório específico para o procedimento, a empresa opta na realização do teste por ser de baixo custo e de grande importância, dando garantia para dar sequência no programa de melhoramento genético.

Na cultura da soja o tegumento das sementes apresenta uma reação da enzima peroxidase, permitindo a identificação e separação das cultivares em dois grupos: um com alta atividade, que apresenta reação positiva e outra com baixa atividade, designada como reação negativa.

Para início do processo selecionava as sementes que originariam uma nova parcela no próximo ensaio. Dessas foram utilizadas 20 sementes para realização do teste e, quando o teste foi realizado em origens de planta se utilizava 10 sementes. Tendo como auxílio um bisturi, é feito dois cortes em forma de V e retirado uma parte do tegumento. Este é um procedimento que necessita de muito cuidado para não deixar aderido ao tegumento nenhum fragmento do eixo embrionário ou dos cotilédones, pelo fato de interferir no resultado do teste, como já foi visto anteriormente.

Os tegumentos foram colocados individualmente em tubos de ensaio e a cada tubo adiciona-se 10 gotas de solução alcoólica de guaiacol a 0,5% (Figura 1 A). Após 10 minutos, adiciona-se uma gota de solução aquosa de água oxigenada (H₂O₂) 40 volumes (1.32) (Figura 1 B). A solução aquosa de água oxigenada é obtida utilizando-se 1 parte de H₂O₂ (40 volumes) para 32 partes de água destilada, todo esse processo é realizado dentro de uma capela (Figura 2) para evitar que os produtos se misturem com o ar no interior do laboratório podendo intoxicar as pessoas que ali trabalham.

Figura 1 – Solução guaiacol a 0,5% (A); Solução aquosa de água oxigenada (B).



Fonte: Werlang (2015).

Figura 2 – Capela utilizada para introduzir as soluções nos tubos de ensaio com tegumento.



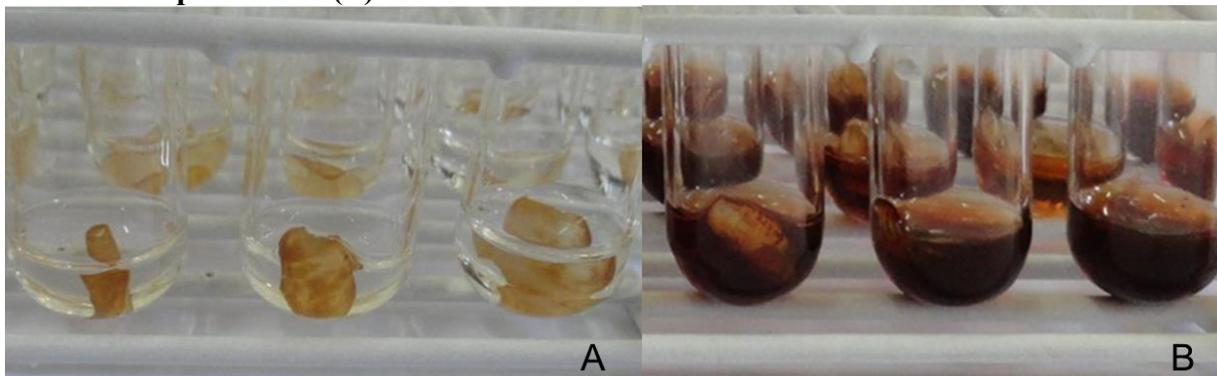
Fonte: Werlang (2015).

A avaliação foi realizada após 1 à 3 minutos, onde se observou a formação ou não de coloração da solução e do tegumento no interior do tubo de ensaio.

Ocorre reação positiva quando as cultivares apresentam alta atividade da peroxidase no tegumento produzindo uma coloração marrom avermelhada intensa. Já para ocorrência de reação negativa é quando as cultivares dotadas de baixa atividade da peroxidase não mostram alteração quanto a coloração.

Reação à enzima peroxidase negativa, pode ocorrer leve pigmentação do tegumento em algumas sementes, porém jamais pigmenta a solução reagente.

Figura 3 – Reação negativa do teste de peroxidase (A); Reação positiva do teste de peroxidase (B).



Fonte: Werlang (2015).

Na ocorrência de mistura da reação ao teste, ou seja, encontrar reação negativa e positiva no mesmo teste de uma cultivar, a mesma era eliminada do programa de melhoramento

genético. É importante salientar que todo o processo do teste de peroxidase deve-se evitar o uso de recipientes plásticos pois o guaiacol reage com o plástico.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a diversidade de cultivares de soja e com a pouca diferença genética entre elas, fica cada vez mais difícil a identificação de cultivares e a verificação de contaminação varietal e por isso pesquisadores desenvolveram métodos que facilitam na identificação desses problemas.

O teste de peroxidase por ter grande importância nos programas de melhoramento genético tem uso fundamental pelos melhoristas, por garantir e facilitar na identificação de contaminação de futuras cultivares que estão sendo conduzidas e avaliadas pelos condutores dos materiais em pesquisa.

Apesar de ser um teste de fácil realização muitas vezes o mínimo detalhe pode comprometer todo o resultado, no entanto, deve-se tomar muito cuidado no manuseio e na sua interpretação, pois sementes que apresentam umidade acima de 12% e contém parte do cotilédono ou do eixo embrionário no tegumento, levam a testes falsos, na interpretação deve-se ter cuidado pelo fato que em resultados negativos muitas vezes o tegumento sofre uma pequena pigmentação, mas a solução não muda de cor.

O processo do teste de peroxidase por ser de fácil realização, baixo custo e apresenta resultado imediato é muito usado por empresas que desenvolvem pesquisas de melhoramento genético. Quando realizado o teste de peroxidase e não ocorrendo mistura possibilita o melhorista a dar continuidade nas pesquisas desse material, garantindo assim que tenha maior possibilidade de chegar a uma nova cultivar por não apresentar mistura, mas não basta só ser livre de contaminação para poder lançar no mercado é também preciso apresentar características desejáveis e superiores, atendendo os objetivos do melhorista e as expectativas do mercado. Já na ocorrência de mistura da reação ao teste, ou seja, encontrar reação negativa e positiva no mesmo teste de uma cultivar, a mesma é eliminada do programa de melhoramento genético.

CONCLUSÃO

Nenhuma das cultivares testadas apresentam reação positiva e negativa na mesma reação, indicando que as cultivares não apresentaram mistura varietal.

Com o aumento de cultivares de soja a cada ano que passa, com uma grande diversidade no mercado apresentando as mesmas tecnologias, fica cada vez mais difícil para os melhoristas identificar certas cultivares para diferenciá-las das que já estão no mercado e poder lançá-las. Isto é um fato que exigirá novas tecnologias para identificação das cultivares e uma delas será a exigência de marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

CAMPA, A. Funções biológicas de peroxidases de planta: saber e função potencial. Em: EVERSE, K.; GRISHAM, M.B.A. (Eds). **Peroxidase em química e biologia**. Nova York: CRC Press, 1991. v. 2, p. 25.

COSTA, M. P.; PEREIRA, L. A. G.; FRANÇA-NETO, J. B. Método da peroxidase na identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 01, nº 1, p.89-91, 1979.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase e polyphenoloxidase: a importância de tecnologia de alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n. 2, p.167-171, 1998.

ZABOT, L. **Caracterização agrônômica de cultivares transgênicas de soja cultivadas no Rio Grande do Sul**. 2009. 280 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria/RS.

MENEZES, S. M. et al. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 26, nº 2, p.150-155, 2004.

ZORATO, M. F.; SCHUSTER, I. Uso da peroxidase na análise de pureza genética em sementes de soja. **Anuário Associação Brasileira de Sementes e Mudas 2011**, Brasília, p.20-23, 2011.