



NOTA CIENTÍFICA

Tiago Zanatta Aumonde<sup>1\*</sup>  
Tiago Pedó<sup>1</sup>  
Emanuela Garbin Martinazzo<sup>2</sup>  
Junior Borella<sup>2</sup>  
Francisco Amaral Villela<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel,  
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,  
Departamento de Fitotecnia, Campus Capão do  
Leão, CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil  
<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel,  
Instituto de Biologia, Departamento de Botânica,  
Campus Capão do Leão, CP 354, 96010-900,  
Capão do Leão, RS, Brasil

**Autor Correspondente:**

\*E-mail: [tiago.aumonde@gmail.com](mailto:tiago.aumonde@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE**

*Oryza sativa*  
*Zantedeschia aethiopica*  
*Philodendron bipinnatifidum*  
Alelopatia

**KEYWORDS**

*Oryza sativa*  
*Zantedeschia aethiopica*  
*Philodendron bipinnatifidum*  
Allelopathy

## Expressão isoenzimática de sementes e plântulas de arroz-vermelho sob ação do extrato de duas espécies Araceae

### *Isoenzymatic expression of red rice seeds and seedlings under the action of extracts of two Araceae species*

**RESUMO:** Diversos extratos vegetais possuem potencial de fitotoxicidade para sementes e plântulas; portanto, a avaliação de isoenzimas é importante ferramenta na avaliação da qualidade da semente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos de duas espécies da família Araceae (*Zantedeschia aethiopica* e *Philodendron bipinnatifidum*) sobre a expressão isoenzimática de sementes e plântulas de arroz-vermelho. As concentrações dos extratos foram 0, 12, 25, 50 e 75%. Foram avaliados nos estádios: semente, primeira contagem e teste de germinação. A expressão das isoenzimas esterase, fosfatase ácida, glutamato oxalacetato transaminase e peroxidase foi determinada por meio de sistema de eletroforese vertical em gel de poliácridamida e a interpretação dos resultados foi por análise visual dos géis. Os extratos das espécies da família Araceae alteraram a expressão isoenzimática, sendo a intensidade e o número de bandas variáveis com a concentração e o estágio de avaliação.

**ABSTRACT:** Several plant extracts have phytotoxic potential on seeds and seedlings, while the evaluation of isoenzymes is an important tool in assessing seed quality. In this study, we aimed to evaluate the effect of extracts the two species of the Araceae family (*Zantedeschia aethiopica*, *Philodendron bipinnatifidum*) on the isoenzymatic expression of red rice seeds and seedlings. We used the following extract concentrations: 0; 12; 25; 50 and 75%. Evaluation stages were seed, first count, and germination test. Expression of the isoenzymes esterase, acid phosphatase, glutamate oxaloacetate transaminase and peroxidase was determined by the vertical electrophoresis system in polyacrylamide gel, and interpretation of results was made by visual analysis of the gels. The extracts of the Araceae family species altered the isoenzymatic expression, and the intensity and number of bands varied according to the concentration and the stage of evaluation.

## 1 Introdução

A redução produtiva de genótipos de arroz cultivado decorre, principalmente, da competição com o arroz-vermelho, planta daninha de alta capacidade competitiva, difícil controle e elevada infestação em lavouras (FLECK et al., 2008).

Diversos compostos do metabolismo secundário possuem efeito alelopático e os taninos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, sesquiterpenos, flavonoides e ácidos fenólicos podem ocasionar alterações em nível hormonal, fotossintético, respiratório, proteico e molecular em vegetais (CARILLO, 2010; ABUGRE et al., 2011). Frente à semelhança entre o efeito de aleloquímicos presentes em extratos vegetais e herbicidas sintéticos sobre plantas daninhas, extratos vegetais que apresentem potencial de inibição em ensaios alelopáticos podem ser adotados no controle de plantas daninhas (BENSCH et al., 2009).

A espécie *Zantedeschia aethiopica* é uma planta do gênero que apresenta, em sua constituição, limonoides, esteroides, isopalmitato e palmitato de etila (FEITOSA et al., 2007). Por sua vez, *Philodendron bipinnatifidum* é do gênero que sintetiza compostos aromáticos lignoides e flavonoides do tipo flavonol e flavona (DELLA GRECA et al., 1998). Em razão da constituição, essas espécies da família Araceae podem apresentar potencial fitotóxico sobre arroz-vermelho e, assim, alterar a expressão de isoenzimas em sementes e plântulas. Adicionalmente, a avaliação do perfil eletroforético de isoenzimas pode se constituir em importante ferramenta na avaliação da qualidade da semente (MUNIZ et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos de duas espécies da família Araceae (*Z. aethiopica*, *P. bipinnatifidum*) sobre a expressão isoenzimática de sementes e plântulas de arroz-vermelho.

## 2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia de Sementes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, com localização geográfica de 31° 52' S e 52° 21' W.

Os extratos concentrados de plantas de *Z. aethiopica* e *P. bipinnatifidum* foram obtidos a partir de folhas maduras e completamente expandidas. As folhas de cada material, dotadas de pecíolo carnoso, foram previamente lavadas em água destilada e secas com papel toalha. Em virtude da elevada quantidade de água na constituição, as folhas de cada material foram trituradas separadamente sem adição de água e centrifugadas a 4.000 rpm em aparelho centrifugador, onerando o tempo de 30 min.

Os extratos, de concentração 100%, foram armazenados separadamente em recipientes âmbar, sob temperatura de 10 °C; após 24 h, foram submetidos à filtração simples, sendo os filtrados armazenados sob as mesmas condições. Os tratamentos foram as concentrações 0, 12, 25, 50 e 75%, empregando-se a relação v/v entre extrato vegetal de *Z. aethiopica* e de *P. bipinnatifidum*, e água destilada. As características físico-químicas dos extratos foram acompanhadas e mantiveram-se dentro de limites não prejudiciais à germinação e ao crescimento inicial (BORELLA et al., 2012).

A espécie alvo foi arroz-vermelho (*Oryza sativa* L.), empregando-se sementes não dormentes, estado fisiológico que foi verificado previamente pela avaliação da germinação e pelo teste de tetrazólio (BRASIL, 2009). As sementes foram submetidas à pré-embebição, entre duas folhas de papel germitest umedecido com água destilada 2,5 vezes a massa do papel por 10 min, visando a evitar danos por embebição. Posteriormente, foram embebidas separadamente nos diferentes extratos e concentrações por uma hora, sendo dispostas para germinar em quatro amostras com quatro subamostras de 50 sementes em rolos constituídos por três folhas de papel germitest umedecidos por água destilada; estes foram então transferidos para B.O.D a 25 °C e período luminoso de 12 h.

O material vegetal para determinação das isoenzimas foi obtido pela coleta de dez unidades vegetais nos estádios: a) semente (S); b) plântulas provenientes da primeira contagem aos cinco dias após a semeadura (P), e c) provenientes do teste de germinação aos quatorze dias após a semeadura (G), conforme indicado pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

A expressão das isoenzimas esterase, fosfatase ácida, glutamato oxalacetato transaminase e peroxidase foi determinada pelo sistema de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (MALONE et al., 2007). As sementes e plântulas foram maceradas separadamente em gral de porcelana, em banho de gelo. A seguir, 200 mg do macerado de cada amostra foram transferidos para tubos de microcentrífuga e acrescidos de solução extratora (Borato de Lítio 0,2M a pH 8,3+Tris Citrato+0,2M a 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 20 µL de cada amostra. Os sistemas de coloração utilizados são descritos por Scandális (1969) e Alfenas (1998), e a interpretação dos resultados foi por análise visual dos géis, presença ou ausência e intensidade de expressão das bandas.

## 3 Resultados e Discussão

Nas sementes de arroz-vermelho submetidas à ação dos extratos de *Z. aethiopica* e *P. bipinnatifidum*, indiferentemente da concentração, parece não ter ocorrido expressão da isoenzima esterase (Figuras 1A e 1B). A diminuição do número e da intensidade de bandas da esterase está associada à redução da viabilidade de sementes, fator que possivelmente não mantenha relação com a viabilidade das sementes desta espécie, ao serem expostas à ação dos referidos extratos e concentrações.

O aumento da expressão desta isoenzima ocorreu em plântulas provenientes da primeira contagem e do teste de germinação. Efeitos mais marcantes foram observados em plântulas do teste de germinação, para ambos os extratos. Nas concentrações 12 e 25 e 50%, ocorreram bandas de maior intensidade nas plântulas expostas ao extrato de *Zantedeschia*. Naquelas sob ação do extrato de *Philodendron*, as maiores intensidades de bandas ocorreram nas concentrações 12 e 25%, porém, sob ambos os extratos, houve a formação de uma segunda banda. A enzima esterase está envolvida em reações de hidrólise de ésteres e estreitamente relacionada ao metabolismo

de lipídios (PESKE; VILLELA; MENEGHELLO, 2012). Segundo Muniz et al. (2007), sob a maior concentração do extrato de bulbos de tiririca, a expressão esterase foi menor em sementes de alface.

O padrão de expressão da isoenzima fosfatase ácida em sementes expostas às diferentes concentrações do extrato de *Zantedeschia* foi similar (Figura 2C). Os extratos ocasionaram modificações das bandas desta isoenzima, em plântulas provenientes da primeira contagem de germinação e do teste de germinação. Na primeira contagem de germinação, a fosfatase ácida apresentou maior intensidade de expressão em plântulas submetidas às concentrações 0,12 e 25%. Plântulas submetidas às concentrações 50 e 75% apresentaram redução da expressão da fosfatase ácida.

Similarmente, em plântulas obtidas a partir do teste de germinação, a expressão da fosfatase ácida foi marcante nas concentrações 12 e 25%, com redução da intensidade de expressão nas duas maiores concentrações do extrato. A fosfatase ácida participa da hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre o sistema de membranas celulares, afetar a atividade respiratória pela peroxidação de lipídios insaturados nas membranas mitocondriais e manter relação com o processo de deterioração em sementes (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004).

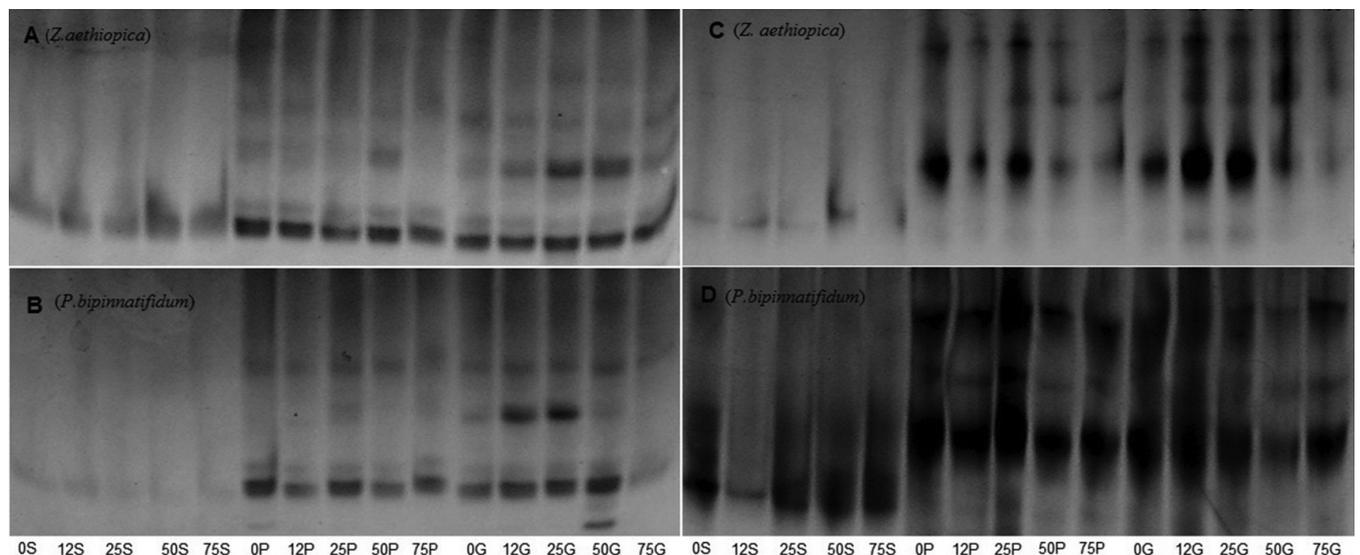
Em sementes de arroz-vermelho submetidas à ação do extrato de *Philodendron*, a expressão da isoenzima fosfatase ácida foi similar para todas as concentrações utilizadas (Figura 1D). Em plântulas provenientes da primeira contagem de germinação, houve similaridade na expressão da fosfatase ácida e, em plântulas do teste de germinação, a expressão desta isoenzima foi maior até a concentração 25%, comparativamente às maiores concentrações, processo que pode afetar a retomada do crescimento do embrião por reduzir a energia química disponível. Segundo Camargo et al. (2000), a redução na atividade desta isoenzima pode afetar o nível de trifosfato de adenosina em sementes.

A expressão da isoenzima glutato oxalacetato transaminase, ao ser avaliada em sementes sob ação do extrato de *Zantedeschia*, apresentou-se maior no estágio de primeira contagem de germinação, sendo os resultados similares entre a concentração zero e as demais concentrações do extrato (Figura 2A). Tal processo pode ser explicado, em parte, pelo fato de a glutamato oxalacetato transaminase atuar na oxidação de aminoácidos com vistas ao fornecimento de energia para o ciclo de Krebs ou para a redução do  $\alpha$ -cetoglutarato, voltada à biossíntese de novos aminoácidos destinados ao crescimento do embrião, estando também relacionada à síntese proteica (MALONE et al., 2007).

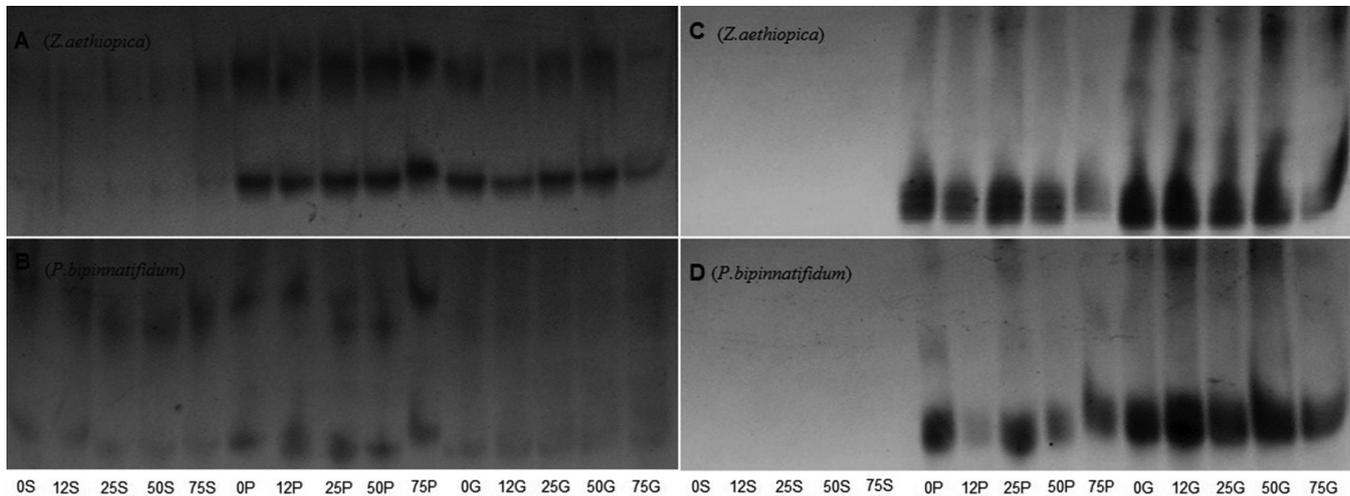
Por outro lado, em plântulas provenientes do teste de germinação, a concentração 75% promoveu certa inibição na expressão desta isoenzima. Similarmente, sob a ação do extrato de *Philodendron*, a glutamato oxalacetato transaminase atingiu expressão mais efetiva em plântulas da primeira contagem de germinação (Figura 2B). A expressão foi inibida em plântulas originadas do teste de germinação, indicativo de possível dano ao aparato metabólico da semente e da plântula, evidenciando provável processo deteriorativo. Conforme Muniz et al. (2007), a inibição da expressão desta enzima indica redução na qualidade da semente.

A expressão da isoenzima peroxidase foi alterada pela ação dos dois extratos empregados (Figuras 2C e 2D). Na semente, não houve expressão, tanto em sementes sob ação do extrato de *Philodendron* quanto de *Zantedeschia*. Modificações na expressão enzimática iniciaram-se de forma marcante a partir da primeira contagem de germinação, sendo incrementada em plântulas do teste de germinação. Sob ação da concentração 75%, houve redução da expressão da peroxidase. Este evento é evidência de possível efeito tóxico.

Da mesma forma, Muniz et al. (2007) obtiveram redução da expressão da referida isoenzima em sementes de alface submetidas a extratos de tiririca, afirmando que a redução pode indicar efeito na germinação. Cabe salientar que Rossi e Lima (2001) relatam que a indução na elevação da atividade da peroxidase pode ser um mecanismo para redução do nível de peróxido de hidrogênio, radical livre cujo acúmulo



**Figura 1.** Perfil eletroforético da enzima esterase (A e B) e fosfatase ácida (C e D) em sementes – S; plântulas de arroz-vermelho provenientes da primeira contagem – P; teste de germinação – G, sob ação dos extratos de *Zantedeschia aethiopica* e *Philodendron bipinnatifidum*.



**Figura 2.** Perfil eletroforético da enzima glutamato transaminase (A e B) e peroxidase (C e D) em sementes – S; plântulas de arroz-vermelho provenientes da primeira contagem – P; teste de germinação – G, sob ação dos extratos de *Zantedeschia aethiopica* e *Philodendron bipinnatifidum*.

causa a peroxidação de lipídeos e altera a permeabilidade de membranas celulares.

## 4 Conclusão

Os extratos das duas espécies da família Araceae (*Z. aethiopica* e *P. bipinnatifidum*) alteram a expressão isoenzimática em sementes e plântulas de arroz-vermelho, havendo intensificação ou ausência de bandas conforme a concentração do extrato, evidenciando sua fitotoxicidade sobre sementes e plântulas de arroz-vermelho.

## Referências

- ABUGRE, S.; APETORGBOR, A. K.; ANTWIWAA, A.; APETORGBOR, M. M. Allelopathic effects of ten tree species on germination and growth of four traditional food crops in Ghana. *Journal of Agricultural Technology*, v. 7, n. 3, p. 825-834, 2011.
- ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- BENSCH, E.; SCHALCHLI, H.; JOBET, C.; SEEMANN, P.; FUENTES, P. Potencial alelopático diferencial de cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) chileno sobre algumas malezas associadas ao cultivo em el Sur de Chile. *Idesia*, v. 27, n. 3, p. 77-88, 2009. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292009000300010>
- BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. *Acta Botânica Brasileira*, v. 26, n. 2, p. 404-409, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília: SNAD/CLAV, 2009. 398 p.
- CAMARGO, M. L. P.; MORI, E. S.; MELLO, E. J.; ODA, S.; LIMA, G. P. Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. *Ciência Florestal*, v. 10, n. 2, p. 113-122, 2000.
- CARILLO, P. Effects of the Allelochemicals Dihydrodiconiferyl Alcohol and Lariciresinol on metabolism of *Lactuca sativa*. *Open Bioactive Compounds Journal*, v. 3, p. 18-24, 2010. <http://dx.doi.org/10.2174/1874847301003010018>
- DELLA GRECA, M.; FERRARA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 5, p. 1299-1304, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00092-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00092-2)
- FEITOSA, C. M.; BEZERRA, M. Z. B.; CITÓ, A. M. G. L.; COSTA JUNIOR, J. S.; LOPES, J. A. D.; IOTA NETO, J. M. Constituintes químicos de *Philodendron imbé* Schott. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 41-44, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000100009>
- FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; GALON, L.; SCHAEGLER, C. E. Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-vermelho. *Planta daninha*, v. 26, n. 1, p. 101-111, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000100011>
- MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; CASTRO, M. A.; 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>
- MUNIZ, F. R.; CARDOSO, M. G.; PINHO, É. V. R. V.; VILELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alfaca na presença de extrato de tiririca. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 29, n. 2, p. 195-204, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222007000200026>
- PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. (Eds.). *Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos*. 3. ed. Pelotas: UFPel, 2012. 573 p.
- ROSSI, C.; LIMA, G. P. P. Cádmiio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 1, p. 197-199, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162001000100030>
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222004000100017>
- 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://dx.doi.org/10.1007/BF00485973>