

PERFIL ENZIMÁTICO EM SEMENTES DE CEVADA EM RESPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SALINAS

Lilian Madruga de Tunes, Daniele Cardoso Pedroso, Geri Eduardo Meneghello, Maria Alice da Silva de Castro, Antonio Carlos de Souza Albuquerque Barros, Pablo Gerzson Badinelli e Marlove Fátima Brião Muniz

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do estresse salino sobre a germinação e alterações bioquímicas, pela expressão dos sistemas isoenzimáticos esterase, sorbitol desidrogenase, glutamato oxalacetato transaminase e fosfatase ácida, em sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) tratadas com diferentes concentrações de NaCl. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Sementes e Bio-Sementes da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. Foram utilizadas duas cultivares de cevada, MN 721 e Scarlett, colhidas em três épocas distintas, com umidade <30% e após secas em estufa com circulação de ar até 13% de umidade, armazenadas em ambien-

te controlado a 17°C e umidade relativa de 45-50%, por um período de 3 meses. Foram realizados o teste de germinação e a diferenciação isoenzimática em duas concentrações de NaCl (11 e 40g em 100ml de água). A utilização de NaCl (duas concentrações testadas) diminuiu a absorção de água pelas sementes durante o teste de germinação, acarretando uma taxa de deterioração bastante acentuada. Obtiveram-se variações eletroforéticas de isoenzimas, estando estas associadas a situações de estresse salino em sementes de cevada, destacando-se as enzimas esterase e fosfatase ácida.

Introdução

A cultura de cevada (*Hordeum vulgare* L.) para a produção de cerveja vem se constituindo em um dos negócios agrícolas mais promissores e seguros do país, pois é vinculado diretamente ao processo de comercialização, mediante contrato prévio entre o produtor e a indústria de malte (Brahma, 2008). Em vista disto e da resposta econômica em relação a outras culturas de inverno, muitos produtores mostram interesse na inclusão da cevada em seus sistemas de produção.

Nesse contexto, a utilização de sementes com alto vigor se faz imprescindível. A habilidade

de uma semente germinar sob amplo limite de condições é definida como a manifestação de seu vigor, dependendo das condições encontradas no local em que foi semeada. Existem alguns fatores externos que podem afetar, severamente, a expressão do vigor e o processo germinativo, como: água, temperatura, oxigênio e salinidade.

A salinidade, tanto dos solos como das águas, é uma das principais causas da queda de rendimento das culturas (Flowers, 2004), devido aos efeitos de natureza osmótica, tóxica ou nutricional (Viana *et al.*, 2004). Os efeitos dos sais no comportamento germinativo das sementes são conhecidos

há muito tempo como a redução da porcentagem e velocidade de germinação, e o efeito tóxico no embrião (Campos e Assunção, 1990). Entretanto, os efeitos dependem ainda de outros fatores, como espécie, cultivar, estágio fenológico, tipos de sais, intensidade e duração do estresse salino (Tester y Devénport, 2003).

Na tecnologia de sementes, uma das maiores dificuldades para avaliar a qualidade de sementes refere-se à metodologia para execução dos testes. Dessa forma, novos testes devem ser desenvolvidos para obter resultados efetivos e mais rápidos, na tentativa de predizer a qualidade dos lotes que chegam ao laboratório. A eletroforese

vem sendo utilizada no estudo de isoenzimas com relação, não apenas às mudanças na qualidade fisiológica de sementes, mas também nas regulações gênica e bioquímica, entre outros (ISTA, 1992).

Trabalhos sobre mecanismos de adaptação referentes à fisiologia da resistência das plantas à salinidade têm sido realizados (Silva *et al.*, 1992). No entanto, não existem trabalhos que avaliem os danos causados pela permanência de sementes em algum tipo de sal, dentre ele o cloreto de sódio, por minutos, horas, dias, meses ou anos, e que após serem retiradas desta condição, sejam submetidas à avaliação de germinação.

PALAVRAS-CHAVE / Cevada / Determinações Bioquímicas / Enzimas / Germinação / (*Hordeum vulgare* L.) / NaCl /

Recebido: 28/12/2009. Modificado: 06/04/2009. Aceito: 08/04/2010.

Lilian Madruga de Tunes. Engenheiro Agrônomo, Mestre em Ciências e Tecnologia de Sementes e Doutoranda em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil. Endereço: Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais, Avenida Roraima N° 1000, cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP: 97105-900, Santa Maria -RS, Brasil. e-mail: lilianmtunes@yahoo.com.br

Daniele Cardoso Pedroso. Bióloga, Mestre em Agronomia e Doutoranda em Agronomia, UFSM, Brasil. e-mail: danibioufsm@yahoo.com.br

Geri Eduardo Meneghello. Engenheiro Agrônomo, Doutor em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPEL). Engenheiro Agrônomo, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, UFPEL,

Brasil. e-mail: geri_meneghello@hotmail.com

Maria Alice da Silva de Castro. Técnica em Química, Instituto Federal Sul-rio-grandense, Brasil. Técnica do Laboratório de Bio Sementes, FAEM-UFPEL, Brasil. e-mail: macastro@ufpel.tche.br

Antonio Carlos de Souza Albuquerque Barros. Engenheiro Agrônomo e Dr. em Ciência e Tecnologia de Sementes, UFPEL, Brasil. Professor, FAEM/UFPE, Brasil. e-mail: acbarros@ufpel.edu.br

Pablo Gerzson Badinelli. Engenheiro Agrônomo e Mestre em Fisiologia Vegetal, UFPEL, Brasil. Engenheiro Agrônomo, Fundação IRGA Instituto Rio-grandense de Arroz, Brasil. e-mail: pgbagro@yahoo.com.br

Marlove Fátima Brião Muniz. Engenheiro Agrônomo e Dra. em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil. Professora, UFSM, Brasil. e-mail: marlovmuniz@yahoo.com.br

ENZYMATIC PROFILE IN BARLEY SEEDS IN RESPONSE TO DIFFERENT SALINE CONCENTRATIONS

Lilian Madruga de Tunes, Daniele Cardoso Pedroso, Geri Eduardo Meneghello, Maria Alice da Silva de Castro, Antonio Carlos de Souza Albuquerque Barros, Pablo Gerzson Badinelli and Marlove Fátima Brião Muniz

SUMMARY

The present work aimed to evaluate the effect of the saline stress on the germination and biochemical alterations, through the expression of the isoenzymatic systems of esterase, sorbitol deshydrogenase, glutamate and oxalacetate transaminase, and acid phosphatase, in barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds treated with two concentrations of NaCl. The analyses were carried out in the Laboratory of Analyses of Seeds and Bio-seeds, Federal University of Pelotas, RS, Brazil. Two cultivars of barley were used, MN 721 and Scarlett, picked at three different times, with humidity <30% and after dryin in an oven with air circulation

to 13% humidity, and stored in controlled environment at 17°C and relative humidity of 35%, for a period of 3 months. Germination test and isoenzymatic differentiation were performed in two concentrations of NaCl (11 and 40g in 100ml of water). Both concentrations of NaCl tested reduced the absorption of water by the seeds during the germination test, leading to a pronounced deterioration. Electrophoretic variations of isoenzymes were obtained, associated to situations of saline stress in barley seeds, standing out the esterase and the acid fosfatase.

PERFIL ENZIMÁTICO DE LAS SEMILLAS DE CEBADA EN RESPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES SALINAS

Lilian Madruga de Tunes, Daniele Cardoso Pedroso, Geri Eduardo Meneghello, Maria Alice da Silva de Castro, Antonio Carlos de Souza Albuquerque Barros, Pablo Gerzson Badinelli y Marlove Fátima Brião Muniz

RESUMEN

Se evaluó el efecto del estrés salino en la germinación y alteraciones bioquímicas, a través de la expresión del sistemas de isoenzimas de esterase, sorbitol desidrogenasa, transaminasa oxalacética y glutámica, y fosfatasa ácida, en semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) tratadas con dos concentraciones de NaCl. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Semillas y Bio-Semillas, Universidad Federal de Pelotas, RS, Brasil. Fueron empleados dos cultivares de cebada, MN 721 y Scarlett, cuiltivados en tres tiempos diferentes, con humedad <30% y después de secar en estufa con circulación

de aire hasta 13% de humedad y almacenar en ambiente controlado a 17°C y de humedad de 35%, durante un período de 3 meses. Se realizaron pruebas de germinación y de diferenciación isoenzimática en dos concentraciones de NaCl (11 y 40g en 100ml de agua). Las dos concentraciones ensayadas de NaCl reducen la absorción de agua por las semillas durante la prueba de germinación, y producen un acentuado deterioro. Se obtuvieron variaciones isoenzimáticas, asociadas a las situaciones de estrés salino en la cebada, destacando las enzimas esterasa y fosfatasa ácida.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estresse salino sobre a germinação e alterações bioquímicas, através da expressão dos sistemas isoenzimáticos esterase, sorbitol desidrogenase, glutamato oxalacetato transaminase e fosfatase ácida em sementes de cevada, tratadas com diferentes concentrações de NaCl.

Material e Métodos

As sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) utilizadas, da safra 2007/08, foram provenientes da empresa Westermann, Comércio e Agropecuária Ltda., localizada no município de Piratini/RS, Brasil. Depois de colhidas, as sementes foram levadas para o Laboratório de Análises de Sementes e Bio-Sementes da Universidade Federal de Pelotas, para a realização das análises.

As cultivares estudadas foram MN 721 e Scarlett. A MN 721 é originada da AMBEV (Companhia Aericana da Bebida), apresenta ampla adaptação, produz bem em ambientes de baixa fertilidade. A Scarlett é de origem argentina, possui rendimento bastante elevado, superando as variedades mais produtivas e se adaptando tanto a clima frio como quente.

A área experimental tinha aproximadamente 0,5ha, e as amostras de sementes foram compostas por dez subamostras, retiradas aleatoriamente de cada área, homogeneizadas, obtendo-se a amostra de trabalho, pesando ~4kg por data de coleta e cultivar. A coleta foi realizada aos 118, 129 e 140 dias após a sementeira, quando o grau de umidade na semente era de 25, 18 e 13%, respectivamente, para as duas cultivares (MN 721 e Scarlett). As sementes

foram secadas em estufa com circulação forçada de ar, até atingir 13% de umidade. Após, foram armazenadas em ambiente com temperatura de 17°C e umidade relativa de 35%, por um período de três meses.

Para avaliar o efeito do estresse salino na germinação das sementes, foi conduzido um teste de germinação modificado, ou seja, o papel utilizado como substrato foi umedecido com diferentes concentrações salinas. O referido teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 100 sementes, sementeiras em papel toalha (germitest®), umedecidos ou não com solução salina (NaCl), na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. As duas concentrações utilizadas constituíram-se de 11g e de 40g em 100ml de água. As sementes permaneceram em contato com a solução salina durante todo

o período de germinação (7 dias). O teste foi conduzido em temperatura constante de 20°C, sendo a contagem realizada no sétimo dia após a sementeira. A testemunha foi sementeira em papel toalha, umedecido apenas com água, de acordo com as regras de análises de sementes (Brasil, 1992).

Para diferenciação isoenzimática, as isoenzimas analisadas foram: sorbitol desidrogenase (SDH), fosfatase ácida (ACP), esterase (EST) e glutamato oxalacetato transaminase (GOT), para as cultivares e épocas de colheita (sementes e plântulas).

Para ele, dez sementes e plântulas coletadas aleatoriamente foram maceradas em gral de porcelana, para cada época de colheita. De cada uma das amostras, 200mg desse macerado foram colocados em tubo Eppendorf acrescidos de solução extratora (tampão tris-

citrato 0,1M pH 8,3 + tampão borato de lítio 0,1M pH 8,3 + 0,15% de 2-mercaptoetanol) 1:2 (p/v). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando 20µl 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 temperatura ambiente. As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 10V·cm⁻¹, até que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel. Os géis foram revelados, para os referidos sistemas enzimáticos conforme (Scandalios, 1969; Alfenas, 1998) e fixados em solução de glicerol 10%.

Procedimento estatístico

Para o teste de germinação utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com oito repetições e as análises de variância foram realizadas separadamente para cada teste e cultivar. Os dados foram transformados em arco-seno (x/100)^{1/2}, com o objetivo de normalizar a distribuição e os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (α=0,05), utilizando o programa de análises estatísticas Sisvar, (Ferreira, 2000). Nas tabelas, as médias foram apresentadas sem transformação. Para a interpretação dos resultados da eletroforese a análise visual dos géis levou em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas em cada sistema isoenzimático avaliado.

TABELA I
 AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO (%), DE SEMENTES DE CEVADA MN 721 (MN) E SCARLETT (SC) SUBMETIDAS A DUAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl, E RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES DAS ÉPOCAS DE COLHEITA*, SEPARADAS PARA CADA UMA DESSAS DUAS CULTIVARES. PIRATINI-RS, SAFRA 2007

Cultivar	Colheita (dias)	Testemunha	NaCl	
			11g	40g
MN 721	118	98 a	0	0
	129	98 a	0	0
	140	98 a	0	0
CV (%)		1,02		
DMS		1,00		
SC	118	98 a	0	0
	129	96 b	0	0
	140	97 ab	0	0
CV (%)		0,84		
DMS		0,82		

* Colheitas (118, 129 e 140 dias após a sementeira). Médias seguidas das mesmas letras, maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação. *Significativo em nível de 5% de probabilidade do erro pelo teste F. DMS: diferença mínima significativa.

Resultados e Discussão

Na Tabela I observou-se que a germinação das sementes testemunha nas diferentes épocas de colheita foram estatisticamente semelhantes (p > 0,05) nos testes de germinação, na cultivar MN 721. Porém, a cultivar Scarlett apresentou diferença na germinação, a qual obteve o maior percentual na primeira época de colheita. As sementes das duas cultivares apresentaram germinação semelhante e superior ao mínimo (80% de germinação) estabelecido para a comercialização de sementes cevada no Estado Rio Grande do Sul (Brasil, 2004).

Ambas cultivares tratadas com solução salina de 11g e 40g em 100ml de água, independente da época de colheita, não germinaram (Tabela I). Esses resultados evidenciam que a germinação é afetada negativamente em condições onde o meio é extremamente alcalino. O excesso de sais modifica as atividades metabólicas das células no processo de alongamento celular, limitando a elasticidade da parede celular, reduzindo o alongamento da célula e, como consequência, o crescimento da planta (Orcutt y Nilsen, 2000).

As reduções na percentagem

de germinação, conforme observados neste trabalho, têm sido atribuídas aos efeitos osmóticos de NaCl, limitando a hidratação das sementes e, também, aos efeitos tóxicos do sal sobre o embrião ou as células da membrana do endosperma. Análise esta que corroboram as conclusões de Perez e Tambelini (1995), Silva (1997) e Ulisses *et al.* (2000). Dados de Ferreira e Rebouças (1992) descrevem, entre outros processos afetados pelo NaCl, a imobilização das reservas indispensáveis para ocorrência do processo germinativo. Segundo Yoshimura *et al.* (2000), a salinidade pode comprometer a germinação, não só dificultando a absorção de água pelas sementes, como facilitando a entrada de íons em níveis tóxicos.

Essa discussão é importante, porque evidencia que sob estresse salino, as épocas estabelecidas pela regras para análise de sementes (Brasil, 1992), não devem ser tomadas como padrão para avaliar estas cultivares quanto à sua viabilidade. Para esta condição desfavorável à germinação, os resultados sugerem que a avaliação das sementes pelo teste de germinação, não deve ser regido pela RAS (regras para análise de sementes; Brasil, 1992), a qual estabelece sete dias após a sementeira para a contagem final. E, conforme foi observado, sob condições de estresse salino, a germinação foi nula (0%). No entanto, os procedimentos recomendados nestas regras com relação ao tempo das leituras devem ser empregados como base normativa para análise e avaliação do efeito da salinidade no retardamento e perda de germinação de sementes (Silva, 1997).

O tempo decorrido da sementeira até a germinação deve ser considerado como variável no estudo da viabilidade das sementes de cevada, submetida

a diferentes níveis e fontes de salinidade.

O estresse salino, além de restringir a absorção de água e nutrientes pelas plantas, provoca mudanças na expressão gênica das cultivares utilizadas. A identificação de genes relacionados com a capacidade de adaptação ou tolerância ao estresse salino é essencial nos programas de melhoramento e tecnologia de sementes, mas pouco se conhece sobre esses mecanismos genéticos quanto à tolerância salina (Hurkman, 1992).

Para avaliar os sistemas isoenzimáticos foram utilizadas apenas as sementes uma vez que não houve germinação e consequentemente emissão de plântulas.

Na análise dos cinco sistemas enzimáticos utilizados foi possível visualizar que houve variação significativa na intensidade da expressão isoenzimática conforme o aumento da concentração de NaCl nas sementes e entre as épocas de colheita (Figuras 1-4). Em função dessa variação, cada sistema foi abordado e analisado individualmente.

Para a cultivar MN 721 (Figura 1) a intensidade de bandas não variou entre as épocas de colheita. À medida que aumenta a concentração de NaCl, aumenta a intensidade das bandas em todas as épocas de colheita. Segundo Basavarajappa *et al.* (1991), sendo a peroxidação de lipídeos um evento associado a danos de membrana das sementes, alterações podem estar denotando a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes à medida que são aumenta a temperatura e o teor de água das sementes. Ressalta-se que esta resposta pode ser de natureza genética e não fisiológica, indicando que esta enzima por si só não é indicativo de qualidade. De acordo com Silva *et al.* (2000) essa indução pelo NaCl pode ser decorrente da sensibilidade dessa enzima à interferência de fatores abióticos.

Estes resultados concordam com os encontrados por Padilha *et al.* (2001), que verificaram

aumento da intensidade das bandas para os estresses mais drásticos em sementes de milho, e por Chauhan (1985) e Bock (1999), que analisaram avanço no número de bandas desta enzima, em sementes envelhecidas de cevada e soja, respectivamente. Alterações nos padrões da enzima esterase evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes, pois esta é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios.

No entanto, para a cultivar Scarlett foi observada variação da intensidade de bandas com o tratamento de 40g de sal em todas as épocas de colheita, e nas testemunhas na segunda e terceira colheita, que apresentaram uma segunda banda no gel (Figura 1).

A expressão da enzima fosfatase ácida (ACP), nos diferentes tratamentos, pode ser observada na Figura 2. Foram detectadas bandas de ACP em todos os tratamentos avaliados; porém, na cultivar MN 721, a partir da segunda colheita com maior expressão, e à medida que aumentou a concentração de

NaCl, houve aumento na sua intensidade. A cultivar Scarlett apresentou comportamento inverso, relacionado ao avanço da concentração salina. Essa enzima participa em reações de hidrólise de ésteres e pode provocar a peroxidação dos fosfolipídios de membranas. Segundo Camargo *et al.* (2000) está envolvida também na manutenção do fosfato celular e sua atividade pode afetar o metabolismo

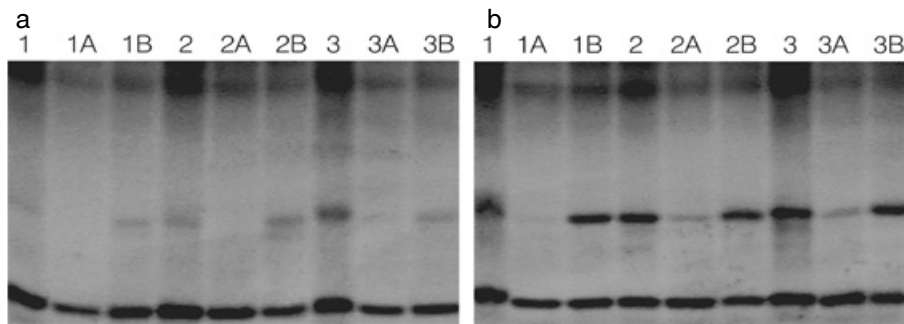


Figura 1. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático esterase em duas cultivares de cevada colhidas em três épocas distintas. 1: 118 dias após a semeadura (testemunha), 1^a: 118 dias após a semeadura (11g de NaCl), 1B: 118 dias após a semeadura (40g NaCl), 2: 129 dias após a semeadura (testemunha), 2^a: dias após a semeadura (11g NaCl), 2B: 129 dias após a semeadura (40g NaCl), 3: 140 dias após a semeadura (testemunha), 3A: 140 dias após a semeadura (11g NaCl), e 3B: 140 dias após a semeadura (40g NaCl). a: cultivar MN 721, b: cultivar Scarlett.

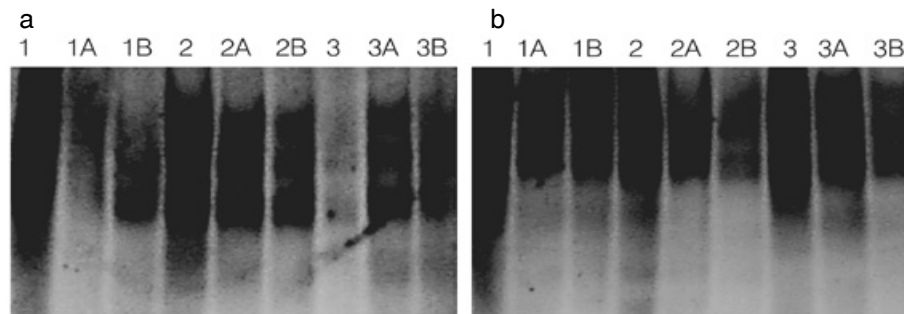


Figura 2. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático fosfatase ácida em duas cultivares de cevada colhidas em três épocas distintas. 1: 118 dias após a semeadura (testemunha), 1^a: 118 dias após a semeadura (11g de NaCl), 1B: 118 dias após a semeadura (40g NaCl), 2: 129 dias após a semeadura (testemunha), 2^a: dias após a semeadura (11g NaCl), 2B: 129 dias após a semeadura (40g NaCl), 3: 140 dias após a semeadura (testemunha), 3A: 140 dias após a semeadura (11g NaCl), e 3B: 140 dias após a semeadura (40g NaCl). a: cultivar MN 721, b: cultivar Scarlett.

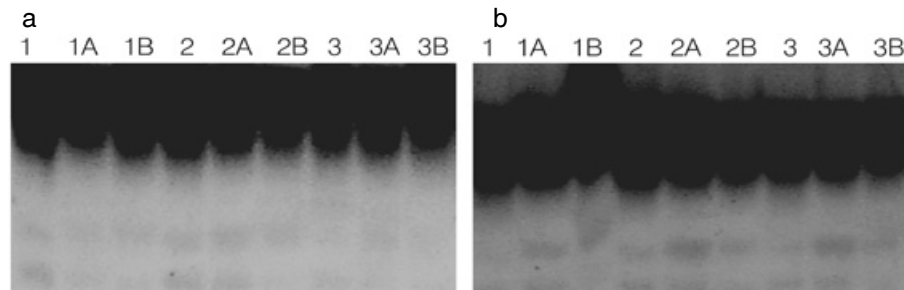


Figura 3. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático glutamato oxalacetato transaminase em duas cultivares de cevada colhidas em três épocas distintas. 1: 118 dias após a semeadura (testemunha), 1^a: 118 dias após a semeadura (11g de NaCl), 1B: 118 dias após a semeadura (40g NaCl), 2: 129 dias após a semeadura (testemunha), 2^a: dias após a semeadura (11g NaCl), 2B: 129 dias após a semeadura (40g NaCl), 3: 140 dias após a semeadura (testemunha), 3A: 140 dias após a semeadura (11g NaCl), e 3B: 140 dias após a semeadura (40g NaCl). a: cultivar MN 721, b: cultivar Scarlett.

do fosfato em sementes, como os níveis de ATP e nucleotídeos. Autores como Vieira (1996) e Brandão Junior *et al.* (1999) somente verificaram atividade da fosfatase ácida nas sementes de milho e algodão que se apresentavam em avançado grau de deterioração.

Analisando os géis do sistema glutamato oxalacetato transaminase (GOT; Figura 3), não foi observada variação da inten-

sidade de bandas nas sementes, tanto entre épocas de colheita como na variação da concentração salina de ambas cultivares. Esta enzima é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o ciclo de Krebs ou redução do -cetoglutarato para a síntese de novos aminoácidos, como fonte de energia ao embrião em desenvolvimento. Pesquisas de Chauhan *et al.* (1985) e Tu-

nes (2009), observaram incremento de bandas para a enzima GOT com a deterioração das sementes. Segundo os autores, essas mudanças no número de bandas são devidas a um aumento na atividade metabólica com o processo deteriorativo. De acordo com Barndão Junior *et al.* (1999), essa enzima participa no processo de degradação e síntese de aminoácidos apresentando um importante papel na germinação de sementes, o que vem confirmar os resultados obtidos por este trabalho. 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.

Outra desidrogenase estudada foi a sorbitol desidrogenase (SDH), uma enzima oxidoreductora que catalisa a reação de remoção de hidrogênio do monossacarídeo sorbitol, possibilitando a degradação deste com posterior obtenção de energia para célula (Figura 4). A exemplo dos resultados obtidos por Basavarajappa *et al.* (1991), foi verificado um decréscimo gradual na atividade dessa enzima nas sementes de milho com o aumento da concentração salina, sendo que para as duas cultivares de cevada deste estudo, esse decréscimo não ocorreu, mantendo-se em todos os tratamentos analisados. Os autores afirmam que a perda de atividade de desidrogenase em sementes submetidas a um estresse pode estar asso-

ciada a baixos níveis de produção da ATP e reduzidas taxas de ATP e GTP dependente da síntese de proteína.

A tolerância à salinidade é um termo que não está precisamente definido devido aos diferentes enfoques conceituais que se podem fazer. Assim, a tolerância tem sido definida como o grau no qual uma planta ajusta seu potencial osmótico com um sacrifício mínimo de seu crescimento ou

como a medida da capacidade de uma planta para suportar os efeitos de uma solução salina concentrada na zona radicular (Ushimaru *et al.*, 2001).

Quanto aos quatro diferentes sistemas enzimáticos estudados, o da enzima esterase (EST) e fosfatase ácida (FAC), revelaram-se como promissores marcadores bioquímicos para avaliação de qualidade de sementes de cevada em ocasiões de estresse salino. Foram detectadas alterações no perfil eletroforético das sementes que, submetidas às diferentes concentrações de sal, evidenciaram variações no grau de deterioração.

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 estresse durante seu desenvolvimento.

Conclusões

A utilização de solução de NaCl (11 e 40g em 100ml) diminui a absorção de água pelas sementes de cevada durante o teste de germinação, acarretando numa taxa de deterioração acentuada, impedindo a germinação das sementes.

Variações eletroforéticas de isoenzimas estão associadas a situações de estresse salino

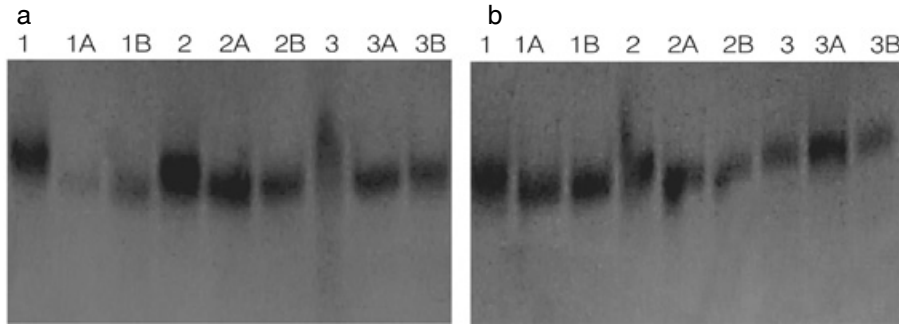


Figura 4. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático sorbitol desidrogenase em duas cultivares de cevada colhidas em três épocas distintas. 1: 118 dias após a semeadura (testemunha), 1^a: 118 dias após a semeadura (11g de NaCl), 1B: 118 dias após a semeadura (40g NaCl), 2: 129 dias após a semeadura (testemunha), 2^a: dias após a semeadura (11g NaCl), 2B: 129 dias após a semeadura (40g NaCl), 3: 140 dias após a semeadura (testemunha), 3A: 140 dias após a semeadura (11g NaCl), e 3B: 140 dias após a semeadura (40g NaCl). a: cultivar MN 721, b: cultivar Scarlet.

em sementes de cevada, destacando-se as enzimas esterase e fosfatase ácida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Westermann, do Município de Piratini, RS, Brasil, pelo fornecimento da área para a pesquisa; ao Laboratório de Didático de Análise de Sementes Professor Flávio Rocha, do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas; Brasil, e a Capes, pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC (1998) *Eletroforeses de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microrganismos*. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 574 pp.
- Basavarajappa BS, Shetty HS, Prakash HS (1991) Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Sci. Technol.* 19: 279-286.
- Bock FL (1999) *Resposta a Nível Molecular do Envelhecimento Artificial, Natural e Pré-Condicionamento de Sementes de Soja*. Tese. Universidade Federal de Pelotas. Brasil. 27 pp.
- Brandão-Junior DS, Carvalho MLM, Vieira MGC (1999) Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. *Rev. Bras. Sem.* 21: 114-120.
- Brahma (2008) *Cevada: matéria-prima da cerveja*. Net, São Paulo, março 1998. brahma.com.br/produtos/cervejas/inst/cervmateria7.htm. Cons. 10/05/2008.
- Brasil (1992) *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília, Brasil. 365 pp.
- Brasil (2004) Portaria Nº 5.153 de 23/06/04. Seção 1. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*. Brasília, Brasil. pp. 24751-24752.
- Campos IS, Assunção MV (1990) Efeito do cloreto de sódio na germinação e vigor de plântulas de arroz. *Pesq. Agropec. Bras.* 25: 837-843.
- Camargo MLP, Mori ES, De Mello EJ, Oda S, Lima GP (2000) Atividade enzimática de sementes envelhecidas artificial e naturalmente. *Ciênc. Florest.* 10: 113-122.
- Chauhan KPS (1985) Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. *Seed Sci. Technol.* 13: 629-641.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4.0. In Anais da Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria 45. UFSCAR. São Carlos, Brasil. pp. 225-258.
- Ferreira LG, Rebouças MA (1992) Influência da hidratação/desidratação de sementes de algodão na superação dos efeitos da salinidade da germinação. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 609-615.
- Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Hurkman WJ (1992) Effect of salt stress on plant gene expression: a review. *Plant Soil* 146: 145-151.
- ISTA (1992) *Handbook of variety testing: Electrophoresis Testing*. International Seed Testing Association. Zurique, Suíça. 44 pp.
- Orcutt DM, Nilsen ET (2000) *Physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors*. Wiley. Nova Iorque, EEUU. 683 pp.
- Padilha L, Vieira MGGC, Von Pinho EVR (2001) Relação entre o teste de deterioração controlada

e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. *Rev. Bras. Sem.* 23: 198-204.

Pérez SCJG de A, Tambellini M (1995) Efeito dos estresses salino e hídrico e do envelhecimento precoce na germinação de algaroba. *Pesq. Agropec. Bras.* 30: 1289-1295.

Scandalios JG (1969) Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genet.* 3: 37-39.

Silva DA da (1997) *Efeitos de Fontes e Níveis de Salinidade sobre Germinação e Desenvolvimento de Plântulas de Graviola (Annona muricata, L.)*. These. Universidade Federal de Paraíba. Brasil. 66 pp.

Silva EAA, Pinho EV, Vieira MGGC, Carvalho MLM, Machado JC (2000) Alterações de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. *Pesq. Agropec. Bras.* 35: 1725-1732.

Silva MJ, Souza JG, Barreiro Neto M, Silva JV (1992) Seleção de três cultivares de algodoeiro para a tolerância à germinação em condições salinas. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 655-659.

Tester M, Davénport R (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 19: 503-527.

Tunes LVM de (2009) *Atributos Fisiológicos de Qualidade de Sementes de Cevada sobre Diferentes Épocas de Colheita e Durante o Armazenamento*. Universidade Federal de Pelotas. Brasil. 102 pp.

Ulisses C, Camara TR, Rocha PSG da, Willadino L, Albuquerque CC, Meunier I (2000) Seleção in vitro de gemas de bananeira Nanicão tolerantes à salinidade. *Scien. Agríc.* 57: 667-670.

Ushimaru T, Kanematsu S, Katayama M, Tsuji H (2001) Antioxidative enzymes in seedling of *Nelumbo nucifera* germinated under water. *Physiol. Plant.* 112: 39-46.

Viana SBA, Fernandes PD, Gheyi HR, Soares FAL, Carneiro PT (2004) Índices morfofisiológicos e de produção de alface sob estresse salino. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb.* 8: 23-30.

Vieira MGGC (1996) *Utilização de Marcadores Moleculares no Monitoramento da Qualidade Sanitária e Nível de Deterioração de Sementes de Algodoeiro (Gossypium hirsutum L.)*. Tese. Universidade Federal de Lavras. Brasil. 114 pp.

Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000) Expreion of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* 123: 223-233.