



DIFERENCIAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE SEMENTES DE CEVADA SUBMETIDAS À SALINIDADE

BIN, Fernando Mauricio¹; TUNES, Lilian Madruga²; BADINELLI, Pablo Gerzson²; BARROS, Antonio Carlos Albuquerque²; CASTRO, Maria Alice²; SOUSA, Fabianne²; CARVALHO, Ireni²

^{1,2}*Departamento de Fitotecnia, Ciência e Tecnologia de Sementes – FAEM/UFPe
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96001-970. bin.fernandomauricio@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cevada, em escala comercial, ocupa em geral, grandes áreas, em torno de 100 mil hectares (IBGE, 2007). Assim, a obtenção de uma população adequada de plantas, torna-se um importante fator de produção. Portanto, deverão ser utilizadas, entre outros fatores, sementes de alta qualidade, uma vez que nem sempre as condições de campo são ótimas, de forma a permitir rápida emergência e desenvolvimento inicial das plântulas (Carvalho e Nakagawa, 2000). Situações como as de estresses na semeadura, podem alterar o padrão de germinação e emergência.

De acordo com dados de pesquisa, o monitoramento dessas mudanças pode ser feito com a ajuda de marcadores moleculares, pois, além de fornecerem dados úteis sobre a estrutura e diversidade genética das populações de plantas, possibilitam a visualização da atividade das enzimas nos diferentes estádios da planta (Alfenas et al., 1991).

O Objetivo do presente trabalho foi avaliar a germinação, a expressão dos sistemas isoenzimáticos Esterase (EST) e Sorbitol Desidrogenase (MDH) diante do efeito de duas concentrações de sal, nas sementes de duas cultivares de cevada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análises de Sementes, do Departamento de Fitotecnia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, na Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas sementes de cevada, cultivar MN 721 e Scarlett as quais foram submetidas ao teste de germinação (G) e análise eletroforética de isoenzimas. Foram estudados os efeitos de duas concentrações de sal: solução não saturada de sal (11g de NaCl diluídas em 100 mL de água), solução saturada de sal (40g de NaCl diluídas em 100mL de água) e a testemunha.

As sementes foram embebidas em soluções, com concentrações acima mencionadas, por um período de 90min. Após, as sementes foram retiradas e colocadas em papel toalha para tirar o excesso da solução.

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 100 sementes, semeadas em papel toalha (*germitest*) umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em temperatura de 20°C, sendo a contagem realizada no sétimo dia após a semeadura, determinando-se a percentagem de plântulas normais e os resultados foram expressos em percentagem de plântulas normais (Brasil, 1992).

Foram analisadas isoenzimas Sorbitol desidrogenase (SDH) e Esterase (EST) nas sementes tratadas e testemunha, de ambas cultivares.

Foram utilizadas dez sementes coletadas aleatoriamente, maceradas em gral de porcelana. De cada uma das amostras, 200 mg do extrato vegetal foram colocados em tubo *ependorf* acrescidos de solução extratora (tampão tris-citrato 0,1 M pH 8,3 + tampão borato de lítio 0,1 M pH 8,3 + 0,15 % de 2-mercaptoetanol) na proporção 1:2 (p/v). A eletroforese foi realizada em géis de poli(acrilamida) 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 10 Vcm⁻¹, até que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel. Os géis foram revelados, para os sistemas enzimáticos Esterase e Sorbitol Desidrogenase, conforme (Scandalios, 1969) e (Alfenas, 1998).

Os géis de eletroforese foram fixados em solução de glicerol 10%.

Procedimento Estatístico: utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados do teste de germinação foram transformados em arco-seno $(x / 100)^{1/2}$, com o objetivo de normalizar a distribuição. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$), utilizando o programa de análises estatísticas Sisvar, (Ferreira, 2000). Na tabela, as médias foram apresentadas sem transformação. A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas em cada sistema isoenzimático avaliado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que as duas cultivares de cevada tiveram germinação reduzida, nas duas concentrações de sal testadas (11g e 40g em 100 mL de água) quando comparadas com a testemunha. À medida que aumenta a concentração de sal, a germinação de ambas cultivares decresce. Segundo Mass e Hoffman (1977) e Epstein (1980) a cevada é considerada uma das culturas mais tolerantes a salinidade. Explicaram a tolerância da cevada nessas condições estudadas, em que maiores concentrações podem causar estresse, como ocorre semelhantemente no trigo.

Tabela 1. Germinação (%) de sementes de cevada, submetidas às concentrações de 0, 11 e 40g de sal (NaCl), no ano de 2008. Pelotas, RS.

Cultivar	Germinação (%)		
	Testemunha	11g de sal	40g de sal
MN 721	98Aa	89Ab	59Ac
Scarlett	96Ba	81Bb	50Bc
CV (%)	2,27	3,56	3,10

Médias seguidas das mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = coeficiente de variação. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade do erro pelo teste F (todas variáveis analisadas obtiveram resultados significativos).

A expressão da enzima esterase (EST) nos diferentes tratamentos pode ser observada na Figura 1. Foram detectadas bandas de EST em todos os tratamentos avaliados, porém, na cultivar MN 721, à medida que aumenta a concentração de sal observa-se uma maior expressão da enzima. A enzima esterase (EST) está envolvida tanto na hidrólise de ésteres quanto no metabolismo de lipídios. 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 é aumentado o fator salinidade.

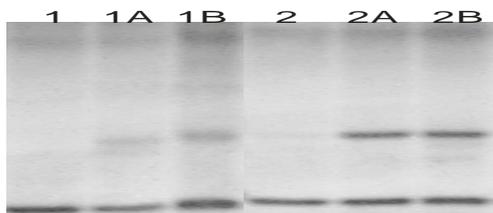


Figura 1. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático esterase em duas cultivares de cevada, em sementes. 1- MN 721 testemunha, 1A- MN 721 11g de sal, 1B- MN 721 40g de sal, 2- Scarlett testemunha, 2A- Scarlett 11g de sal e 2B - Scarlett 40g de sal. Laboratório de Bio Sementes/UFPel – Pelotas, 2008.

A enzima sorbitol desidrogenase (SDH), que é uma enzima oxiredutora que catalisa a reação de remoção de hidrogênio do monossacarídeo sorbitol possibilitando a degradação deste com posterior obtenção de energia para célula. A exemplo dos resultados obtidos por Basavarajappa et al. (1991), foi verificado um decréscimo na expressão dessa enzima nas sementes de cevada com o uso da solução de 11g de sal para a cultivar MN 721, sendo que, para a cultivar Scarlett, esse decréscimo não ocorreu. Os autores afirmam que a perda de atividade de desidrogenase em sementes em situação de estresse pode estar associada com baixos níveis de produção da ATP e uma taxa reduzida de ATP e GTP dependente da síntese de proteína.

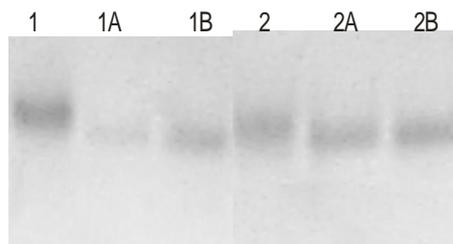


Figura 2. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático sorbitol desidrogenase em duas cultivares de cevada, em sementes. 1- MN 721 testemunha, 1A- MN 721 11g de sal, 1B- MN 721 40g de sal, 2- Scarlett testemunha, 2A- Scarlett 11g de sal e 2B - Scarlett 40g de sal. Laboratório de Bio Sementes/UFPel – Pelotas, 2008.

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 (Jianhua e McDonald, 1996).

Quanto aos dois diferentes sistemas enzimáticos estudados, o da enzima esterase (EST), revelou ser promissor marcador bioquímico para avaliação de qualidade de sementes de cevada em ocasiões de estresse salino, já que detectou alterações no perfil eletroforético de sementes que, submetidas as diferentes concentrações de sal, mostraram variações mínimas no seu vigor.

4. CONCLUSÕES

A utilização de solução de NaCl diminui a absorção de água pelas sementes de cevada durante o teste de germinação, acarretando uma taxa de deterioração mais acentuada;

Variações eletroforéticas de isoenzimas estão associadas a situações de estresse salino em sementes de cevada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. *et al.* **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: UFV. 1991, 242 p.

- ALFENAS, A. C. **Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1998, 574p.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S. & PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.19, n.2, p. 279-286, 1991.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Semente**: ciência, tecnologia e produção. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 429p.
- EPSTEIN, E. **Responses of plants to saline environments**. *In* : Genetic Engineering of osmoregulation. D.W. Rains; R.C. Valentine and A. Hollaender (eds.), New York: Plenum, 1980. 7-21 pp.
- FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4.0**. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, São Carlos. Anais. São Carlos: UFSCAR, p.225-258, 2000.
- IBGE. **Levantamento sistemático de produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>>. Acesso em 11 de maio de 2007.
- JIANHUA, Z.; McDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small seeded crops. **Seed Science and Technology**, Zurich v.25, p. 123-131, 1996.
- MAAS, E.V.; HOFFMAN, G.J. Grop salt tolerancecurrent assessment. **Journal Irrigation and Drainage Division**, v.103, p.115 134, 1977.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v. 3. 1969. p.37-39.