

Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada¹

Lilian Madruga de Tunes², Pablo Gerzson Badinelli³, Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros⁴, Geri Eduardo Meneghello⁴, Luciano do Amarante⁵

RESUMO

O objetivo foi avaliar os padrões isoenzimáticos de Esterase (EST - EC 3.1.1.1), Fosfatase Ácida (ACP - EC 3.1.3.2), Malato Desidrogenase (MDH - EC 1.1.1.37), Álcool Desidrogenase (ADH - EC 1.1.1.1) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT - EC 2.6.1.1), em sementes e plântulas de dois cultivares de cevada (MN 721 e Scarlett). As sementes foram fornecidas pela empresa Westermann, localizada no município de Piratini, Rio Grande do Sul, onde foi realizado o cultivo da cevada em 2007. Foram colhidas em três épocas com diferentes percentuais de umidade, secas a 13% de umidade e armazenadas em câmara fria. Os cinco sistemas isoenzimáticos analisados apresentaram variações na expressão, principalmente quando comparados entre sementes e plântulas. Concluiu-se que há variação no padrão de expressão das enzimas EST, ACP, MDH, ADH e GOT entre sementes e plântulas. A expressão das enzimas EST e GOT foi pouco e muito influenciada pela época de colheita, respectivamente.

Palavras-chave: *Hordeum vulgare* L., eletroforese, extração de proteínas.

ABSTRACT

Influence of different harvest times on isozyme expression in barley seeds

This study aimed to assess patterns of isozyme Esterase (EST - EC 3.1.1.1), Acid Phosphatase (ACP - EC 3.1.3.2), Malate Dehydrogenase (MDH - EC 1.1.1.37), Alcohol Dehydrogenase (ADH - EC 1.1.1.1) and Glutamate Oxalacetate Transaminase (GOT - EC 2.6.1.1) of two barley cultivars (MN 721 and Scarlett), harvested at three different times with different moisture contents dried to 13% moisture and stored in cold. Seeds were supplied by Westermann Trade and Agriculture Ltd., located in Piratini, Rio Grande do Sul State, Brazil, in 2007, where the barley crop was grown. Seeds and seedlings of all varieties and harvest times were analyzed. The five isozyme systems analyzed showed variation in the pattern of expression, between seeds and seedlings for the enzymes EST, ACP, MDH, ADH and GOT. The expression of enzymes EST and GOT were little and much influenced by the harvest time, respectively.

Key words: *Hordeum vulgare* L., electrophoresis, protein extraction.

Recebido para publicação em abril de 2008 e aprovado em março de 2011

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada a UFPel.

² Engenheira-Agrônoma, Mestre. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Avenida Roraima nº. 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. lilianmtunes@yahoo.com.br

³ Engenheiro-Agrônomo, Mestre. Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel, 96001-970, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. pgbagro@yahoo.com.br.

⁴ Engenheiros-Agrônomos, Doutores. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel, 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. acbarros@ufpel.edu.br, geriem@ufpel.edu.br

⁵ Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel, 96001-970, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. lucianoamarante@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A cevada vem sendo cultivada, no Brasil, desde a década de 30. A produção brasileira está concentrada na Região Sul, com registros de cultivo também nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Como consequência do melhoramento genético e do desenvolvimento de técnicas de manejo, cada vez mais apropriadas, a cultura foi difundida pelo sul do Brasil, onde se localizam as melhores áreas, em termos de clima e solo, para o cultivo desse cereal (Arias, 1996). A região sul é grande produtora de cereais, entre os quais se destaca a cevada (*Hordeum vulgare* L.) que ocupa a quarta posição em produção de cereais, no mundo (Yalçın *et al.*, 2007), sendo superada somente pelo trigo, arroz e milho.

Geralmente, os parâmetros utilizados para indicar a época de colheita de sementes de cevada são o grau de umidade das sementes e o aspecto das plantas. Entretanto, esses parâmetros podem sofrer modificações, devidas a fatores climáticos, temporais e genéticos, não constituindo indicativos seguros do ponto de colheita (Dias, 2001). A cevada caracteriza-se por ser altamente sensível a precipitações pluviométricas, no momento da colheita, principalmente pelo prejuízo promovido à germinação das sementes (Reuss *et al.*, 2003).

A colheita realizada na fase da maturidade fisiológica (umidade em torno de 30%) seria ideal, quando a semente atinge o máximo da massa de matéria seca, encontra-se no máximo de sua potencialidade de germinação e vigor e a deterioração é mínima (Delouche, 2005); apesar disso, encontra uma série de problemas a serem contornados. Em virtude das dificuldades, como amassamento das sementes e problemas com a colheita mecânica, as sementes permanecem no campo até atingirem um nível de umidade adequado para a colheita, sujeitas a condições climáticas nem sempre favoráveis à preservação de sua qualidade (Barros & Peske, 2006). Nesse processo, podem ocorrer alterações bioquímicas que conduzem a um comprometimento de suas atividades metabólicas, ou seja, um processo de deterioração das sementes, aumentando o processo da respiração e o gasto de energia. Algumas mudanças geram desorganização e perda de integridade de membrana (Khan *et al.*, 1996), redução na capacidade de sintetizar proteínas e ácidos nucleicos (Diniz *et al.*, 2007), além de danos na taxa respiratória (Malone *et al.*, 2007).

O monitoramento dessas mudanças pode ser feito com a ajuda de marcadores bioquímicos, como as isoenzimas, 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, 1998).

As isoenzimas são produtos da expressão gênica e, conseqüentemente, altamente influenciadas pelo ambiente, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos, ou, ainda, sob um determinado estímulo (Ramírez *et al.*, 1991). De maneira simplificada, as isoenzimas podem ser consideradas variações de uma dada enzima, dentro de um organismo, que apresentam uma mesma especificidade de substrato. De acordo com Peirce & Brewbaker (1973), a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático são específicos para uma determinada parte da planta, tecido e estádio de desenvolvimento.

A possibilidade de utilização de marcadores isoenzimáticos como ferramenta na determinação de alterações bioquímicas, decorrentes do processo deteriorativo das sementes, já foi ressaltada por vários autores (Brandão-Junior *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2004; 2005). As enzimas relacionadas com a qualidade fisiológica das sementes mais pesquisadas são esterase, fosfatase ácida, desidrogenase transaminases (Carvalho *et al.*, 2000). A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólises de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios totais de membrana (Santos *et al.*, 2005). A enzima fosfatase ácida tem função de hidrolisar os fosfomonoésteres de um grande número de reações químicas vegetais, entre elas, a formação de sacarose durante a fotossíntese (Tanksley, 1983). A enzima malato desidrogenase tem a importante função de participar no movimento do malato, através da membrana mitocondrial e de outros compartimentos celulares, sendo, geralmente, de natureza constitutiva (Spinola *et al.*, 2000). A enzima álcool desidrogenase é uma das principais enzimas fermentativas, que converte o acetaldeído em etanol, considerado menos tóxico à planta, por não causar danos a bicamada lipídica das membranas celulares e por ser permeável (Chang *et al.*, 2000). A glutamato oxalacetato transaminase tem uma importante participação em reações de transaminação, durante a eliminação do Nitrogênio dos aminoácidos, e na formação de grupos Ceto, para o ciclo de Krebs e gluconeogênese (Tanksley, 1983).

Diante desses fatos, é crescente a necessidade da utilização de métodos que permitam avaliar, de maneira ágil e eficiente, a qualidade fisiológica das sementes e, desta forma, possibilitar a tomada de decisões referentes à colheita, beneficiamento, armazenamento e comercialização.

O objetivo foi avaliar a expressão dos sistemas isoenzimáticos Esterase (EST), Fosfatase Ácida (ACP), Malato Desidrogenase (MDH), Álcool Desidrogenase (ADH) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT), nas sementes e plântulas de dois cultivares de cevada, em diferentes épocas de colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes foram fornecidas pela empresa Westermann – Comércio e Agropecuária Ltda, localizada no município de Piratini, Rio Grande do Sul, no ano de 2007, onde foi realizado o cultivo da cevada. Depois de colhidas, as sementes foram levadas para o Laboratório de Análises de Bio-Sementes, para a realização das análises. Os cultivares estudados foram MN 721 e o Scarlett. O MN 721 é originado da AMBEV (2011) (Companhia-AmBev Americana da Bebida), apresenta ampla adaptação, responde a ambientes de baixa fertilidade. O Scarlett é de origem argentina, possui rendimento bastante elevado, superando as variedades mais produtivas, e se adapta tanto a clima frio como quente. A área experimental foi de aproximadamente 0,5 ha e as amostras foram compostas por dez subamostras, retiradas aleatoriamente de cada área, homogeneizadas, obtendo-se a amostra de trabalho, pesando-se, aproximadamente, quatro quilogramas, por data de colheita e cultivar.

A colheita foi realizada quando os cultivares atingiram grau de umidade inferior a 30%, quando as plantas estavam com 118, 129 e 140 dias após a semeadura (DAS). O grau de umidade na ocasião das amostragens foi de 25, na primeira, 18, na segunda, e 13%, na terceira colheita, para o cultivar MN 721; para o cultivar Scarlett foi de 26, na primeira, 19, na segunda e 13%, na terceira colheita. As sementes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, até atingir 13% de umidade e, então, armazenadas em câmara fria, à temperatura de 17 °C e umidade relativa de 35%, por um período de 18 dias. Antes da realização das análises, as sementes foram submetidas à temperatura de 5 a 10 °C por um período de sete dias para a superação de dormência, conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Foram analisadas isoenzimas Esterase (EST), Fosfatase ácida (ACP), Malato Deshidrogenase (MDH), Álcool Desidrogenase (ADH) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT), nas sementes e, também, pelo teste de germinação, de ambas os cultivares e épocas de colheita. As sementes foram colocadas para germinar e suas plântulas, com sete dias, usadas para a extração. O outro material vegetal analisado foram as sementes secas, não germinadas, retiradas da câmara fria e levadas para a extração.

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, semeadas em papel toalha (*germitest*) umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, conduzido em temperatura constante de 20 °C (Brasil, 2009). Dez sementes e plântulas, coletadas aleatoriamente, foram maceradas em gral de porcelana, para cada época de colheita. De cada uma das amostras, 200 mg do extrato vegetal foram colocados em

tubos *ependorf*, acrescidos de solução extratora (tampão do gel + 0,15% de 2-mercaptoetanol), na proporção 1:2 (p/v). A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando-se 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 câmara fria, com temperatura entre 4 e 6 °C. 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 9 cm do ponto de aplicação. Os géis foram revelados, para os sistemas enzimáticos Esterase, Fosfatase ácida, Glutamato Oxalacetato Transaminase, Álcool Deshidrogenase e Malato Deshidrogenase, conforme Scandalios (1969) e Alfenas (1998). Os géis de eletroforese foram fixados em solução 5-5-1, de água destilada: metanol: ácido acético.

A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas, em cada sistema isoenzimático avaliado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da análise dos cinco sistemas isoenzimáticos utilizados, foi possível visualizar que houve variação significativa na intensidade da expressão isoenzimática, conforme avança o processo de germinação das sementes (Figuras 1-5). Os padrões dos cinco sistemas isoenzimáticos analisados apresentaram variações na expressão; em função disso, cada sistema foi abordado e analisado individualmente.

A enzima esterase (EST) está envolvida tanto na hidrólise de ésteres, quanto no metabolismo de lipídios. Não foi observada variação da intensidade de bandas em sementes (Figura 1), na comparação entre cultivares e entre épocas de colheita. Brandão-Junior *et al.* (1999) observaram a diminuição do número e intensidade de bandas de esterase, associada com a perda da viabilidade das sementes. De acordo com dados de Malone *et al.* (2007), provavelmente isso se deve a um metabolismo mais acelerado, sugerindo que a maior parte dos materiais de reserva já haviam sido metabolizados, aos sete dias da germinação, para o cultivar Scarlett, que é de ciclo mais longo, o que, provavelmente, não ocorreu no cultivar MN 721, que é de ciclo curto. Segundo Basavarajappa *et al.* (1991), sendo a peroxidação de lipídeos um evento associado a danos de membrana das sementes, as alterações podem estar denotando a ocor-

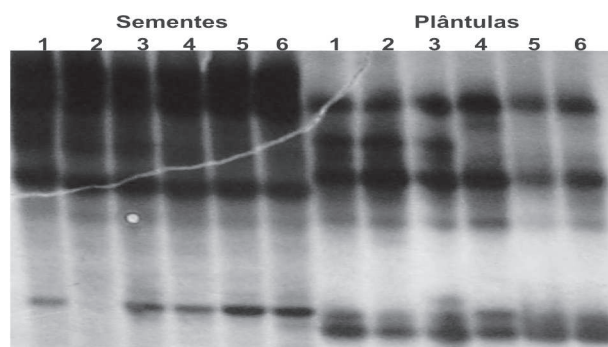


Figura 1. Padrão eletroforético, obtido com o sistema isoenzimático Esterase em dois cultivares de cevada colhidos em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. 1- MN 721 - 118 dias após a semeadura, 2- MN 721 - 129 dias após a semeadura, 3- MN 721 - 140 dias após a semeadura, 4- Scarlett - 118 dias após a semeadura, 5- Scarlett - 129 dias após a semeadura e 6- Scarlett - 140 dias após a semeadura.

rência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes, à medida que são aumentados os fatores temperatura e teor de água das sementes. Ressalta-se que esta resposta pode ser de natureza genética e não de qualidade fisiológica, indicando que a atividade da enzima esterase por si só, não é indicativo de qualidade.

Analisando-se os géis do sistema Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT, Figura 2), também não foi observada variação da intensidade de bandas nas sementes. A expressão e a intensidade variaram em plântulas, no cultivar MN 721, na terceira colheita e, no cultivar Scarlett, na segunda e terceira colheitas, quando apresentaram duas bandas, em vez de uma. A intensidade da expressão aumentou, consideravelmente, na medida em que o processo de colheita foi mais tardio, ou seja, com umidade próxima a 13%. Chauhan *et al.* (1985) observaram incremento de bandas para a enzima GOT, com o envelhecimento das sementes. Segundo os autores, essas mudanças no número de bandas são devidas a um aumento na atividade metabólica, com o processo de deterioração. Esta é uma enzima que participa no processo de degradação e síntese de aminoácidos (Conn & Stumpf, 1980), apresentando um importante papel na germinação de sementes, o que vem confirmar os resultados obtidos neste trabalho. Em função de esta enzima estar diretamente envolvida no metabolismo do N, é possível que variações ocorram à medida que acontece a síntese e degradação de aminoácidos, durante o processo de germinação. Sem dúvida, a enzima GOT tem uma participação fundamental no metabolismo proteico, não somente durante a germinação, mas durante todo o ciclo de vida da planta. Na semente, independentemente da época de colheita, a enzima está presente e ativa. Na plântula, a expressão da enzima não apresentou atividade, em ambos os cultivares, quando colhidos aos 118

DAS. Quando a colheita foi realizada aos 129 DAS, a enzima estava presente apenas no cultivar Scarlett; já aos 140 DAS a GOT foi observada em ambos os cultivares.

Esses dados indicam que a enzima GOT possui atividade diretamente relacionada com a qualidade fisiológica das sementes (Costa *et al.*, 2008). Provavelmente, a ausência de atividade aos 118 DAS indica que a qualidade fisiológica não era alta, pelo fato de a semente apresentar, ainda, elevados teores de umidade. Já aos 129 DAS, a diferenciação entre os cultivares, provavelmente, ocorreu em razão das diferenças genéticas de ambos. Por fim, aos 140 DAS o teor de umidade das sementes já havia atingido patamares que não interferiam na sua qualidade fisiológica.

A expressão da enzima fosfatase ácida (ACP), nos diferentes tratamentos, pode ser observada na Figura 3. Foram detectadas bandas de ACP, em todos os tratamentos avaliados, porém, nas sementes, com uma intensidade muito baixa. Já nas plântulas, a expressão foi bastante intensa no cultivar MN 721 (de ciclo mais curto) e no cultivar Scarlett, durante a primeira colheita, diminuindo gradativamente, à medida que se prorrogou a colheita. Essa enzima tem sido amplamente caracterizada, em plantas, e sua atividade aumenta naquelas que apresentam deficiência de fósforo. De acordo com Duff *et al.* (1989) e Lefebvre *et al.* (1990), o incremento na atividade de ACP sob baixas concentrações de fósforo tem sido reportado para um grande número de espécies e órgãos vegetais. Essa enzima também participa de reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídios de membrana e provocar a peroxidação desses lipídios. Nas membranas mitocondriais, por serem ricas em lipídios insaturados, podem apresentar intensa peroxidação desses lipídios,

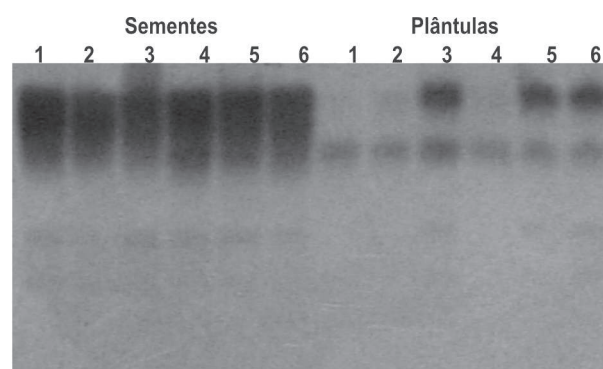


Figura 2. Padrão eletroforético, obtido com o sistema isoenzimático Glutamato Oxalacetato Transaminase em dois cultivares de cevada colhidos em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. 1- MN 721 - 118 dias após a semeadura, 2- MN 721 - 129 dias após a semeadura, 3- MN 721 - 140 dias após a semeadura 4- Scarlett - 118 dias após a semeadura, 5- Scarlett - 129 dias após a semeadura e 6- Scarlett - 140 dias após a semeadura.

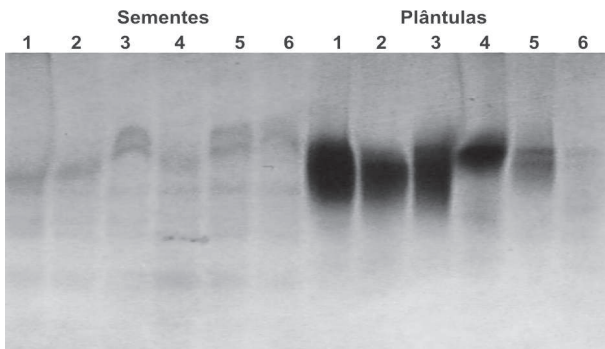


Figura 3. Padrão eletroforético, obtido com o sistema isoenzimático Fosfatase Ácida em dois cultivares de cevada colhidos em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. 1- MN 721 - 118 dias após a semeadura 2- MN 721 - 129 dias após a semeadura, 3- MN 721 - 140 dias após a semeadura, 4- Scarlett - 118 dias após a semeadura, 5- Scarlett - 129 dias após a semeadura e 6- Scarlett - 140 dias após a semeadura.

interferindo na respiração. Autores como 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. Neste trabalho, nas plântulas, a atividade da fosfatase ácida foi maior que nas sementes, conseqüentemente, maiores danos por embebição e maior peroxidação lipídica podem ter ocorrido. Embora tenham passado 22 dias entre a primeira e última colheita (118 e 140 DAS, respectivamente), a semente não envelheceu propriamente, mas, sim, perdeu água, esteve sujeita a diferentes condições climáticas e os cultivares responderam de forma diferente a essas condições.

Observa-se, pela análise dos padrões enzimáticos de sementes e plântulas de cevada revelada para a Malato Desidrogenase (MDH, Figura 4), uma maior expressão da enzima nas sementes, contrariamente ao que ocorre para a enzima Esterase (Figura 1). Sua atividade foi mais intensa nos primeiros estádios do processo de germinação, em que a síntese de novos tecidos da semente requer mais energia para o crescimento. Assim, nas plântulas, a enzima MDH apresentou-se com menor número e intensidade de bandas, em ambos os cultivares, indicando menor atividade respiratória nessa condição. A enzima Malato Desidrogenase catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, tendo importante função de produção de NADH para o Ciclo de Krebs e geração de oxaloacetato, para biossínteses de aminoácidos. Segundo Satters *et al.* (1994), por se tratar de uma enzima importante durante o processo respiratório celular, o aumento da sua atividade pode ser devido ao aumento da expressão desta enzima, em diferentes compartimentos celulares, ou à indução da atividade da enzima, expressa pela maior intensidade das bandas. O aumento da atividade pode ter ocorrido por causa do aumento da respiração nas sementes que se encontravam

em processo deteriorativo, uma vez que as enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de menor qualidade.

A expressão da enzima Álcool Desidrogenase (ADH), nas sementes, foi bastante pronunciada (Figura 5), o que sugere intensa atividade de respiração anaeróbica; no entanto, nas plântulas, em geral, não foi observada a sua atividade. A ADH é uma enzima que atua no processo respiratório, removendo substâncias tóxicas das sementes, como acetaldeído e etanol, que são produzidos quando as células passam a respirar anaerobicamente (Faria *et al.*, 2003). Segundo Aldasoro & Nicolás (1980), durante os estádios iniciais da germinação, a degradação do amido é realizada num processo quase totalmente anaeróbico, até que a casca da semente é rompida pela saída do eixo embrionário. Confirmando essas evidências no padrão

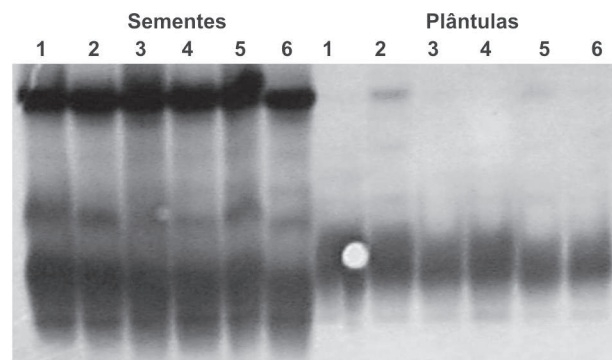


Figura 4. Padrão eletroforético, obtido com o sistema isoenzimático Malato Desidrogenase em dois cultivares de cevada colhidos em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. 1- MN 721 - 118 dias após a semeadura, 2- MN 721 - 129 dias após a semeadura, 3- MN 721 - 140 dias após a semeadura, 4- Scarlett - 118 dias após a semeadura, 5- Scarlett - 129 dias após a semeadura e 6- Scarlett - 140 dias após a semeadura.

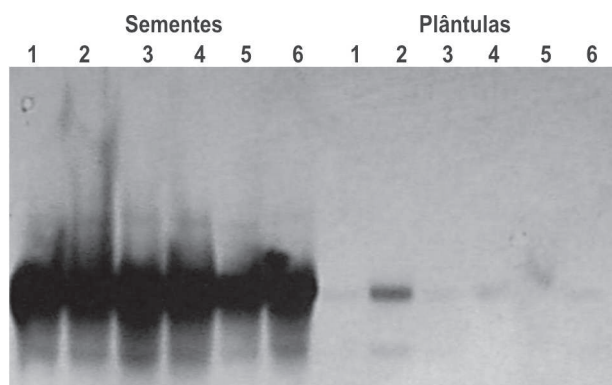


Figura 5. Padrão eletroforético, obtido com o sistema isoenzimático Álcool Desidrogenase em dois cultivares de cevada colhidos em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. 1- MN 721 - 118 dias após a semeadura, 2- MN 721 - 129 dias após a semeadura 3- MN 721 - 140 dias após a semeadura, 4- Scarlett - 118 dias após a semeadura, 5- Scarlett - 129 dias após a semeadura e 6- Scarlett - 140 dias após a semeadura.

isoenzimático para ADH, foi observada alta atividade, com expressão exclusiva nas sementes, evidenciando que, à medida que o processo de germinação avança e o processo aeróbico de geração de energia começa a ser predominante, a enzima ADH não é mais necessária. A expressão diminuiu praticamente a zero, com o processo de emergência das plântulas.

Nos cinco sistemas isoenzimáticos analisados, houve padrões de expressão diferencial nas sementes, durante o processo de germinação, para épocas diferentes de colheita. De uma forma geral, pode ser observado que o padrão isoenzimático expresso nas sementes não variou, entre os cultivares, em todos os sistemas proteicos analisados, quando comparado com os expressos pelas plântulas em desenvolvimento. Isto pode ser atribuído ao fato de que o desenvolvimento da semente e a germinação correspondem a diferentes processos de diferenciação celular e perfis de expressão gênica. Na semente, a atividade metabólica é extremamente baixa, ocorrendo apenas as reações biossintéticas e catabólicas necessárias para a respiração celular. Já, nas plântulas em desenvolvimento, durante o processo de germinação, diversas reações biossintéticas e catabólicas são desencadeadas, tais como a intensa produção de ATP, a degradação de proteínas e polissacarídeos de reserva, a síntese de RNAs novos, a reestruturação e reparo de membranas e organelas danificadas, o que modifica consideravelmente a expressão isoenzimática.

As sementes apresentaram resultados mais homogêneos, ou seja, não diferiram quanto à época de colheita e entre cultivares, ao contrário das plântulas, que apresentaram resultados bastante heterogêneos entre os parâmetros mencionados acima.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam que, dependendo do sistema enzimático utilizado, existe uma diferenciação de proteínas. Em função disso, a análise conjunta de vários sistemas isoenzimáticos, realizando-se a extração das proteínas em dois estádios de desenvolvimento (semente e plântula), é recomendável, pois permitirá verificar modificações que ocorrem da semente para as plântulas e, também, a influência da umidade durante a colheita.

CONCLUSÃO

Há variações no padrão de expressão das enzimas EST, ACP, MDH, ADH e GOT, entre as sementes e as plântulas.

A expressão das enzimas EST e GOT é pouco e muito influenciada pela época de colheita, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve suportes financeiros provenientes da Capes.

REFERÊNCIAS

- Aldasoro I & Nicolás G (1980) Fermentative products and dark CO₂ fixation during germination of seeds of *Cicer arietinum*. *Phytochemistry*, 19:3-5.
- Alfnas AC (1998) Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 574p.
- Ambev (2011) Companhia de Bebidas das Américas. Disponível em: <<http://www.ambev-ir.com/ambev/index.htm>>. Acessado em: 28 de março de 2011.
- Arias GN (1996) Mejoramiento genético y producción de cebada cervecera en América del Sur. Santiago: FAO, 1995. 157p. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria no 691 de 22 de novembro de 1996. Diário Oficial da União, 25 nov. Seção 1, p.24751-24752.
- Barros ACS & Peske ST (2006) Produção de sementes. In: Peske ST, Lucca Filho O & Barros ACSA (Eds.) Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos. Pelotas, UFPEL. 470p.
- Basavarajappa BS, Shetty HS & Prakash HS (1991) Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Science and Technology*, 19:279-286.
- Brandão-Junior DS, Carvalho MLM & Vieira MGGC (1999) Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. *Revista Brasileira de Sementes*, 21:114-121.
- Brasil (2009) Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília. 399p.
- Carvalho MLM, Vieira MGGC & Pinho ERV (2000) Técnicas moleculares em sementes. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 17:44-47.
- Chang WWP, Huang L, Shen M, Webster C, Burlingame AL & Roberts JKM (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiology*, 122:295-317.
- Chauhan KPS, Gopinathan MC & Babu CR (1985) Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. *Seed Science and Technology*, 13:629-641.
- Conn EC & Stumpf PK (1980) Introdução à bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher. 451p.
- Costa CJ, Vilella FA, Bertonecello MR, Tillmann MAA & Menezes NL (2008) Expressão de isoenzimas após a pré-hidratação de sementes de ervilha. *Revista Brasileira de Sementes*, 30:130-138.
- Delouche JC (2005) Qualidade e desempenho da semente. *Seed News*, 4:11-18.
- Dias DC (2001) Maturação de sementes. *Seed News*, 5:3-4.
- Diniz KA, Silva P de A, Veiga AD, Alvim PO & Oliveira JA (2007) Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de alface revestida com diferentes doses de micronutrientes, aminoácidos e reguladores de crescimento. *Revista Ciência Agronômica*, 38:396-400.
- Duff SMG, Moorhead GBG, Lefebvre DD & Plaxton WC (1989) Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology*, 90:1275-1278.
- Faria LC, Costa JGC, Rava CA, Peloso MJD, Melo LC, Carneiro GES, Soares DM, Díaz JLC, Abreu AFB, Faria JC, Sartorato A, Silva HT, Bassinello PZ & Zimmermann FJP (2003) BRS Requite: nova cultivar de feijoeiro comum de tipo de grão carioca com retardamento do escurecimento do grão. 1ª ed. Goiás, EMBRAPA Arroz e Feijão. 65p.

- Khan MM, Hendry GAF, Atherton NM & Vertucci-Walters CW (1996) Free radical accumulation and lipid peroxidation in tests of rapidly aged soybean seeds: a light – promoted process. *Seed Science Research*, 6:101-107.
- Lefebvre DD, Duff SMG, Fife C, Julien-Inalsingh C & Plaxton WC (1990) Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increase in Pi-absorption rate. *Plant Physiology*, 93:504-511.
- Malone G, Zimmer PD, Meneghello GE, Castro MA de & Peske ST (2007) Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. *Revista Brasileira de Sementes*, 29:61-67.
- Peirce LC & Brewbaker JL (1973) Applications of isozyme analysis in horticultural science. *HortScience*, 8:17-22.
- Ramírez H, Calderon A & Rocca W (1991) Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: Rocca W & Mroginski L (Ed.) *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y plicaciones*. Cali, CIAT. p.825-856.
- Reuss R, Cassells JA & Green JR (2003) Malting barley: storage, dormancy and processing quality. In: Reuss R, Cassells JA & Green JR (Eds) *Australian postharvest technical conference*. Camberra, Stored Grain Research Laboratory. p.44-48.
- Santos CMR, Menezes NL & Villela FA (2004) Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. *Revista Brasileira de Sementes*, 26:110-119.
- Santos CMR, Menezes NL & Villela FA (2005) Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 27:104-114.
- Satters JR, Abdel-Ghany A, Elbagoury O & West SH (1994) Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Science*, 4:33-41.
- Scandalios JG (1969) Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics*, 3:37-39.
- Spinola MCM, Cícero SM & Melo M (2000) Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. *Scientia Agricola*, 57:263-270.
- Tanksley SD (1983) *Isozymes*. Part B. Amsterdam, ElSevier. 472p.
- Yalçın E, Celik S, Akar T, Sayim I & Köksel H (2007) Effects of genotype and environment on β -glucan and dietary fiber contents of hull-less barley grown in Turkey. *Food Chemistry*, 101:171-176.