

MODIFICAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE FEIJÃO NO ARMAZENAMENTO¹

CANDICE MELLO ROMERO SANTOS², NILSON LEMOS DE MENEZES³, FRANCISCO AMARAL VILLELA⁴

RESUMO – Para avaliar alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijoeiro durante o armazenamento em condições ambientais não controladas de temperatura e umidade relativa do ar, foi realizado o presente trabalho. Foram utilizadas as cultivares Iapar 44, Macotaço, TPS Bonito, TPS Bionobre e TPS Nobre. As sementes foram avaliadas durante o armazenamento, em condições ambientais não controladas, no município de Santa Maria-RS, pelo período de oito meses. As avaliações fisiológicas constaram do teste de germinação, primeira contagem de germinação, comprimento de hipocótilo e de raízes, condutividade elétrica e emergência em campo. As avaliações bioquímicas das sementes foram obtidas pela técnica de eletroforese de sistemas enzimáticos, avaliando-se a atividade das enzimas fosfatase ácida, malato desidrogenase, glutamato desidrogenase e esterase. Todas as avaliações foram realizadas antes e a cada dois meses durante o armazenamento. Os resultados permitem concluir que a atividade das enzimas malato e glutamato desidrogenase é estável durante o armazenamento em condições ambientais não controladas nos cultivares vigorosos (TPS Bionobre, TPS Nobre e Iapar 44); a enzima esterase tem sua atividade incrementada durante o armazenamento não controlado, independentemente da qualidade fisiológica das sementes de feijão; potenciais de armazenamento sob condições ambientais não controladas são diferentes nos cultivares TPS Bionobre, TPS Nobre, TPS Bonito, Macotaço e Iapar 44.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, enzimas, deterioração.

PHYSIOLOGIC AND BIOCHEMICAL MODIFICATIONS DURING STORAGE OF BEAN SEEDS

ABSTRACT – To evaluate physiologic and biochemical alterations in bean seeds during storage in environmental conditions not controlled of temperature and relative humidity of the air, the present work was accomplished. It were used the cultivars: Iapar 44, Macotaço, TPS Bonito, TPS Bionobre and TPS Nobre. The seeds were stored in not controlled environmental conditions in Santa Maria -RS, for eight months. The physiologic evaluations consisted of the germination test, first germination count, electric conductivity, seedling and root length, electric conductivity and emergency in field. The biochemical evaluations of the seeds were obtained by the technique of electrophoresis of enzymatic systems, being evaluated the activity of the enzymes acid fosfatase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and esterase. All the evaluations were accomplished before and each two months during the storage. The results allow to conclude the activity of the enzymes malate and glutamate dehydrogenase are stable during the storage in not controlled environmental conditions in cultivars vigorous (TPS Bionobre, TPS Nobre and Iapar 44); the esterase enzyme has its activity increased during storage in not controlled environmental

¹ Submetido em 12/12/2003. Aceito para publicação em 06/10/2004.

² Eng^o. Agr^a. Dr^a. SQN 204, Bloco G, apt 301, Asa Norte - Brasília - DF. 70842-070. E-mail: candice_romero@hotmail.com

³ Eng^o. Agr^o. Dr., Professor Adjunto do Depto. Fitotecnia da Universidade

Federal de Santa Maria. 97105-900. E-mail: nlmenezes@smail.ufsm.br

⁴ Eng. Agrícola, Dr., Professor Adjunto do Depto. de Fitotecnia da Universidade Federal de Pelotas. Caixa Postal 354 – 96010-900. E-mail: francisco.villela@ufpel.edu.br

conditions, independently of bean seeds physiologic quality; potentials of storage under not controlled environmental conditions are different in the cultivars TPS Bionobre, TPS Nobre, TPS Bionobre, Macotaço and Iapar 44.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, enzyme, deterioration.

INTRODUÇÃO

A deterioração das sementes tem início logo após as sementes atingirem a maturidade fisiológica, mesmo antes que seja realizada a sua colheita. Desta forma, a antecipação da colheita pode favorecer a manutenção da qualidade das sementes, principalmente, quando no final da fase de maturação, as condições ambientais são adversas (Arhens & Peske, 1994).

O armazenamento de sementes de feijão é feito, geralmente, em condições ambientais não controladas, sendo a temperatura, umidade relativa do ar bem como os fatores inerentes à própria semente, como o teor de água e sua história prévia determinantes na longevidade das sementes (Vieira & Yokoyama, 2000). O teor de água das sementes exerce influência acentuada e direta na longevidade destas, pois estimula a atividade metabólica do embrião (Macedo et al., 1999).

A qualidade das sementes não pode ser melhorada durante o armazenamento, mas pode ser preservada quando as condições de conservação são favoráveis. Segundo Pádua & Vieira (2001), lotes de sementes com porcentagens de germinação semelhantes, mas com diferentes níveis de vigor, podem apresentar comportamentos diferenciados em relação à deterioração, dependendo das condições de armazenamento.

As sementes possuem natureza higroscópica e, dependendo das condições ambientais, podem ganhar ou perder água facilmente. Neste processo de hidratação-secagem, geralmente, ocorrem danos ao tegumento que resultam na redução na qualidade fisiológica (Copeland & McDonald, 1995). Quanto maior o número de ciclos de hidratação-secagem o qual as sementes são submetidas, maior será a redução da germinação, sendo que estes efeitos deletérios aumentam com o período de hidratação (Willians et al., 1980).

O armazenamento de sementes de feijoeiro com teor de água inicial superior a 13% resultará em danos provocados por mudanças no metabolismo celular, como o aumento da atividade enzimática e respiratória das sementes, propiciando o desenvolvimento de fungos, que serão favorecidos pela

elevada temperatura (Vieira & Yokoyama, 2000).

Condições ambientais adversas durante o armazenamento resultam no envelhecimento das sementes que podem apresentar desde redução da viabilidade até a completa perda do poder germinativo, produção de plântulas de menor tamanho, produção de plântulas anormais, dentre outros (Matthews, 1985; Bewley & Black, 1994; Pádua, 1998).

Os primeiros sinais da deterioração de sementes estão relacionados com a alteração ou perda da integridade das membranas celulares (Delouche & Baskin, 1973). Em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir o vigor, o que pode ser verificado pelo aumento da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição das sementes (Marcos Filho et al., 1990; Lin, 1990; Salinas et al., 1998).

A atividade enzimática também pode indicar transformações degenerativas nas sementes. Como exemplo disto, temos a alta atividade da enzima álcool desidrogenase que foi verificada por Bock (1999) em sementes de soja, indicando aumento na respiração em função do acréscimo no grau de hidratação das sementes. O aumento na atividade celular ocorre às expensas das substâncias de reserva das sementes, que são transformadas em energia para a manutenção dos tecidos vivos das sementes e de novos compostos para o reparo de estruturas danificadas pela deterioração (Bewley & Black, 1994).

A enzima malato desidrogenase catalisa a conversão de malato à oxaloacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e outros compartimentos celulares, geralmente é de natureza constitutiva (Spinola et al., 2000). A fosfatase ácida é uma hidrolase que participa em reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolípidos de membrana, provocando a peroxidação destes (Spinola et al., 2000). A enzima glutamato desidrogenase atua na oxidação de proteínas de reserva fornecendo energia para as células e/ou na redução de a cetoglutarato para a síntese de aminoácidos (Brandão-Júnior et al., 1999).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão

armazenadas em ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa do ar.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido na área experimental e no Laboratório de Análise de Sementes de Produção (LASP), do Departamento de Fitotecnia na Universidade Federal de Santa Maria - RS (UFSM), e no Laboratório de Bio-sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas - RS.

A produção de sementes de feijão foi realizada na área experimental da UFSM, durante os meses de janeiro a abril/2001. Foram utilizadas cinco cultivares de feijão, a saber: TPS Nobre, TPS Bonito, TPS Bionobre, Iapar 44, Br Ipagro 35-Macotaço, recomendadas para a semeadura no Rio Grande do Sul, safra 2001/2002, segundo CEPEF (2000). Durante o processo de produção das sementes, todas as cultivares receberam as mesmas práticas culturais. As sementes, colhidas manualmente com teor de água de 35% e, foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar forçado, até atingirem teor de água de 12%. Em seguida foram armazenadas em sacos de papel, pelo período de oito meses, no LASP-UFSM em condições não controladas de temperatura e umidade relativa do ar. Foram obtidas as médias mensais de temperatura do ar e a umidade relativa do ar com a utilização de um termohigrografo.

A qualidade fisiológica inicial das sementes foi avaliada em cinco épocas diferentes, no início do armazenamento e a cada dois meses. Foram realizados os testes de germinação, primeira contagem, comprimento de raízes e de hipocótilo das plântulas, condutividade elétrica e emergência em campo.

O teor de água das sementes foi determinado pelo método da estufa a temperatura de $105 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 24 horas, com duas amostras por cultivar (Brasil, 1992).

Para o teste de germinação, quatro subamostras de 50 sementes, foram distribuídas em rolos de papel, umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco e mantidas em germinador à temperatura constante de 25°C , durante sete dias. A avaliação das plântulas normais foi realizada no sétimo dia após instalação do teste (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem.

A primeira contagem do teste de germinação foi realizada no teste de germinação. Os resultados foram obtidos computando-se as plântulas normais observadas no quarto dia após a instalação do teste e foram expressos em

porcentagem.

Para a avaliação do comprimento de hipocótilo e de raízes das plântulas foram utilizados quatro subamostras de 25 sementes, para cada cultivar. A semeadura foi efetuada sobre uma linha horizontal traçada no terço superior do papel umedecido. Os rolos contendo as sementes permaneceram em germinador por quatro dias a 25°C , quando então se procedeu a avaliação, conforme descrito por Nakagawa (1999). Os resultados foram expressos em centímetros.

O teste de condutividade elétrica foi conduzido conforme descrito por Vieira (1994). Foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes, por cultivar. Cada subamostra foi pesada e colocada em copos plásticos contendo 75mL de água destilada e mantidas a 25°C por 24 horas. A condutividade elétrica da solução foi medida com o uso do condutímetro da marca DIGIMED CD-21 e os valores obtidos foram divididos pelo peso da amostra (g), sendo os resultados expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de sementes.

Para avaliar a emergência em campo, amostras de sementes de cada cultivar foram coletadas a cada dois meses durante o armazenamento, e mantidas em câmara seca (14°C e 50% UR do ar) até a condução do teste de emergência em campo na época de semeadura indicada pela CEPEF (2000). As sementes armazenadas por dois, quatro, seis e oito meses foram semeadas juntas (quatro repetições de 100 sementes por cultivar). A contagem das plantas normais foi efetuada aos 25 dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Para a determinação de proteínas totais, determinou-se o conteúdo de nitrogênio total presente nas sementes, pelo processo Kjeldahl (AOAC, 1965), onde o nitrogênio da amostra é transformado em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação de amônia, fixada em solução ácida e titulada. Após, fez-se o cálculo para estimativa do total de proteínas, utilizando-se o fator de correção 6,25.

Modificações bioquímicas foram avaliadas pela determinação da atividade enzimática de malato desidrogenase, glutamato desidrogenase, esterase e fosfatase ácida em sementes de feijão, antes do armazenamento e a cada dois meses ao longo do período. Foram retiradas subamostras de sementes de cada cultivar e mantidas por 48 horas em temperatura de $\pm 5^\circ\text{C}$, para determinação da atividade das enzimas. A eletroforese foi realizada em gel vertical de poliácridamida 6% no sistema tampão contínuo, conforme descrito por Scandális (1969).

Utilizou-se uma semente triturada por repetição, sendo

quatro repetições por cultivar. As amostras foram maceradas em recipiente de porcelana sobre gelo para evitar a desnaturação de proteínas pelo aquecimento. Em 50-100mg da amostra foi adicionada a solução extratora (Scandális, 1969), na proporção de 5:1 (volume : peso). As amostras permaneceram 18 horas à $\pm 5^{\circ}\text{C}$, foram centrifugadas por cinco minutos e 25ml do sobrenadante foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 4°C , 25mA, até o azul de bromofenol (corante) atingir a parte inferior do gel. Foram usados os sistemas de revelação citados por Alfenas (1998), para as enzimas malato e glutamato desidrogenase e o sistema recomendado por Scandális (1969) para as enzimas esterase e fosfatase ácida. Os géis foram fotografados e digitalizados utilizando o “Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System” (EDAS 120). A identificação das bandas e determinação das densidades relativas pelo programa foi realizada pelo “Gel-Pro Analyser” (Media Cybernetics, 1997).

Para a análise estatística, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com cinco cultivares, cinco períodos de armazenamento e com quatro repetições. Foram realizados as análises da variância e o estudo da regressão polinomial. Os dados referentes às porcentagens de germinação, primeira contagem de germinação, emergência em campo e densidade relativa foram transformados em $\arcsen (\%/100)^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura média durante o armazenamento foi de $18,6^{\circ}\text{C}$, sendo que as médias para temperatura máxima e mínima foram $31,2^{\circ}\text{C}$ e $10,8^{\circ}\text{C}$, nos meses de janeiro de 2002 e julho de 2001. A umidade relativa do ar média durante o período de armazenamento foi de 77,1%, sendo que a máxima (85%) foi registrada em maio de 2001 e a mínima (67%) em janeiro de 2002.

Os teores iniciais de água das sementes de TPS Bonito, TPS Nobre, Macotaço, Iapar 44 e TPS Bionobre foram 12,0; 11,0; 11,9; 11,7 e 12,0%, respectivamente. As sementes tiveram seus teores de água aumentados no intervalo de maio/2001 a setembro/outubro de 2001, entrando em equilíbrio higroscópico com a umidade relativa do ar. Neste período, as sementes dos cultivares, TPS Bonito, TPS Nobre, Macotaço, Iapar 44 e TPS Bionobre, atingiram teores de água de 15,5; 15,5; 15,2; 14,9 e 15,2%, respectivamente. A partir de setembro/outubro de 2001 até o final do armazenamento, as sementes perderam água ao entrarem em equilíbrio

higroscópico com a umidade relativa do ar. De acordo com Copeland & McDonald (1995), os ciclos de hidratação e secagem nas sementes reduzem a qualidade fisiológica das sementes.

O comportamento para a germinação das sementes dos cinco cultivares, obtidos durante o período de armazenamento, encontra-se representados na Figura 1A. As porcentagens de germinação inicial dos cultivares antes do período de armazenamento, variaram de 92 a 97%. O cultivar TPS Bionobre foi o único que manteve sua porcentagem de germinação de 97% por oito meses de armazenamento, enquanto que os cultivares TPS Nobre, Iapar 44, Macotaço e TPS Bonito tiveram decréscimo linear na germinação de 10; 5; 11 e 15%, respectivamente. Os valores de germinação diminuíram no final do armazenamento, mas ainda ficaram dentro dos padrões mínimos (80%) de comercialização estabelecida pela Comissão Estadual de Sementes e Mudas - RS (2000).

Os resultados de primeira contagem da germinação das sementes de cinco cultivares de feijão, durante o período de oito meses de armazenamento estão apresentados na Figura 1B. Verificou-se que durante todo o período o armazenamento a cultivar TPS Bionobre manteve o vigor inicial de 93% na primeira contagem da germinação. As demais cultivares reduziram o vigor das sementes ao longo do armazenamento. A cultivar TPS Bonito exibiu desempenho inferior às demais, apresentando redução média de 23%. Além disso, as cultivares TPS Bonito e TPS Nobre reduziram consideravelmente o vigor, evidenciado através da maior inclinação das retas. Segundo Carvalho (1994), a deterioração causa progressivo aumento do tempo necessário para a obtenção de um estande e crescente desuniformidade na altura de plântulas.

A determinação do vigor obtida pelo teste de condutividade elétrica (Figura 1C) mostrou que houve diferenças de qualidade fisiológica entre as cultivares. O início do processo deteriorativo é caracterizado pela desestruturação do sistema de membranas celulares, que determinam prejuízos à capacidade de retenção de solutos, sendo tais danos considerados um dos primeiros eventos do processo deteriorativo.

Em sementes de feijão, Lin (1990) verificou que o decréscimo no vigor e na germinação diretamente associado ao aumento da lixiviação eletrolítica dos solutos celulares das sementes, sugerindo uma relação íntima entre deterioração das membranas e redução do vigor e germinação. Conforme Pádua & Vieira (2001), a exsudação de constituintes celulares está inversamente associada ao vigor, com base em três

fatores: reflete a perda da integridade das membranas, representa a conseqüente perda de compartimentalização dos constituintes celulares e constitui excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos.

As sementes da cultivar TPS Bonito lixiviaram mais solutos de suas células, provocando maior aumento na condutividade elétrica neste período, verificada pelo maior coeficiente angular da reta representativa do comportamento da condutividade elétrica com o tempo. Segundo Salinas et al. (1998), alterações na integridade das membranas citoplasmáticas ocorrem com conseqüente aumento na lixiviação de solutos, em sementes de soja armazenadas por seis meses.

Para as características de comprimentos de raízes e hipocótilo das plântulas, as cinco cultivares tiveram redução nestes parâmetros, sendo que os comprimentos médios tiveram queda de 40-50% (Figuras 2A e 2B). Constatou-se que o tamanho de plântulas decresceu com o armazenamento, independentemente do vigor das sementes.

A diminuição de vigor das sementes de feijão ao longo do armazenamento manifestou-se pela redução na velocidade de germinação das mesmas e também pelo tamanho das plântulas. A taxa de emergência de plântulas mais lenta, freqüentemente está associada a sementes de baixo vigor, que produzem plantas de menor tamanho comparativamente àquelas produzidas por sementes de alto vigor (Ellis, 1980).

O período de armazenamento teve efeito significativo nas porcentagens de emergência de plântulas em campo (Figura 2C). As cultivares apresentavam, no início do armazenamento, valores de emergência de 95 a 99% e, após oito meses armazenadas, as sementes exibiram decréscimo de emergência, com valores variando de 83 a 95%. Observou-se tendência de redução de emergência das sementes dos cultivares ao longo do armazenamento, sendo mais intensa para os cultivares menos vigorosos.

A atividade da enzima malato desidrogenase nas sementes de feijão, durante o armazenamento em ambiente, está mostrada na Figura 3A. Observou-se que a atividade desta enzima na cultivar TPS Bionobre manteve-se constante. Entretanto, as cultivares Iapar 44 e TPS Nobre tiveram sua atividade diminuída de forma linear com o armazenamento. Equações de segundo grau representaram o comportamento da atividade da referida enzima, nos cultivares TPS Bonito e Macotaço, que foi influenciada pelas condições ambientais do armazenamento sobre as cultivares de menor vigor.

As cultivares TPS Bonito e Macotaço alteraram seu metabolismo respiratório, com o aumento da umidade relativa

do ar demonstrado pelo acréscimo na atividade da MDH. De acordo com Macedo et al. (1999), em arroz a umidade relativa do ar e a temperatura são fatores importantes na longevidade das sementes, por manterem o embrião em maior ou menor atividade metabólica.

A enzima malato desidrogenase catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, tendo uma importante função de produção de NADH para o Ciclo de Krebs. 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 em diferentes compartimentos celulares e/ou pela indução da atividade da enzima expressa pela maior intensidade das bandas, isto pode ter ocorrido devido ao 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 reduzida qualidade, conforme Shatters et al. (1994). Notou-se que as cultivares mais vigorosas tiveram sua atividade enzimática estável (TPS Bionobre) ou diminuída (TPS Nobre e Iapar 44). Já as cultivares menos vigorosas, tiveram maior influência das variantes ambientais durante o armazenamento.

A atividade da enzima glutamato desidrogenase nas cultivares TPS Bionobre, TPS Nobre e Iapar 44 mantiveram-se estáveis durante o armazenamento (Figura 3B). Todavia as cultivares TPS Bonito e Macotaço tiveram sua atividade aumentada no decorrer do armazenamento. Possivelmente, o acréscimo na atividade desta enzima está, também, relacionado com o aumento da umidade relativa do ar durante o armazenamento e com as características próprias das cultivares. A glutamato desidrogenase é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o Ciclo de Krebs e/ou redução do α -cetoglutarato para a síntese de novos aminoácidos, como fonte de energia ao embrião em desenvolvimento. Constatou-se que os cultivares TPS Bonito e Macotaço estavam com seus metabolismos celulares ativos, entretanto, a porcentagem de proteínas totais manteve-se estável durante todo o armazenamento, havendo diferenças apenas nas porcentagens de proteína total entre cultivares.

A atividade da enzima esterase nas sementes de feijão (Figura 3C), durante o armazenamento aumentou, sendo mais acentuada no cultivar TPS Bonito. Vale lembrar que as sementes da cultivar TPS Bonito reduziram mais acentuadamente a germinação, primeira contagem de germinação, emergência em campo em relação às sementes dos demais cultivares. As alterações nos padrões desta enzima evidenciam a ocorrência de eventos deteriorativos. A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres,

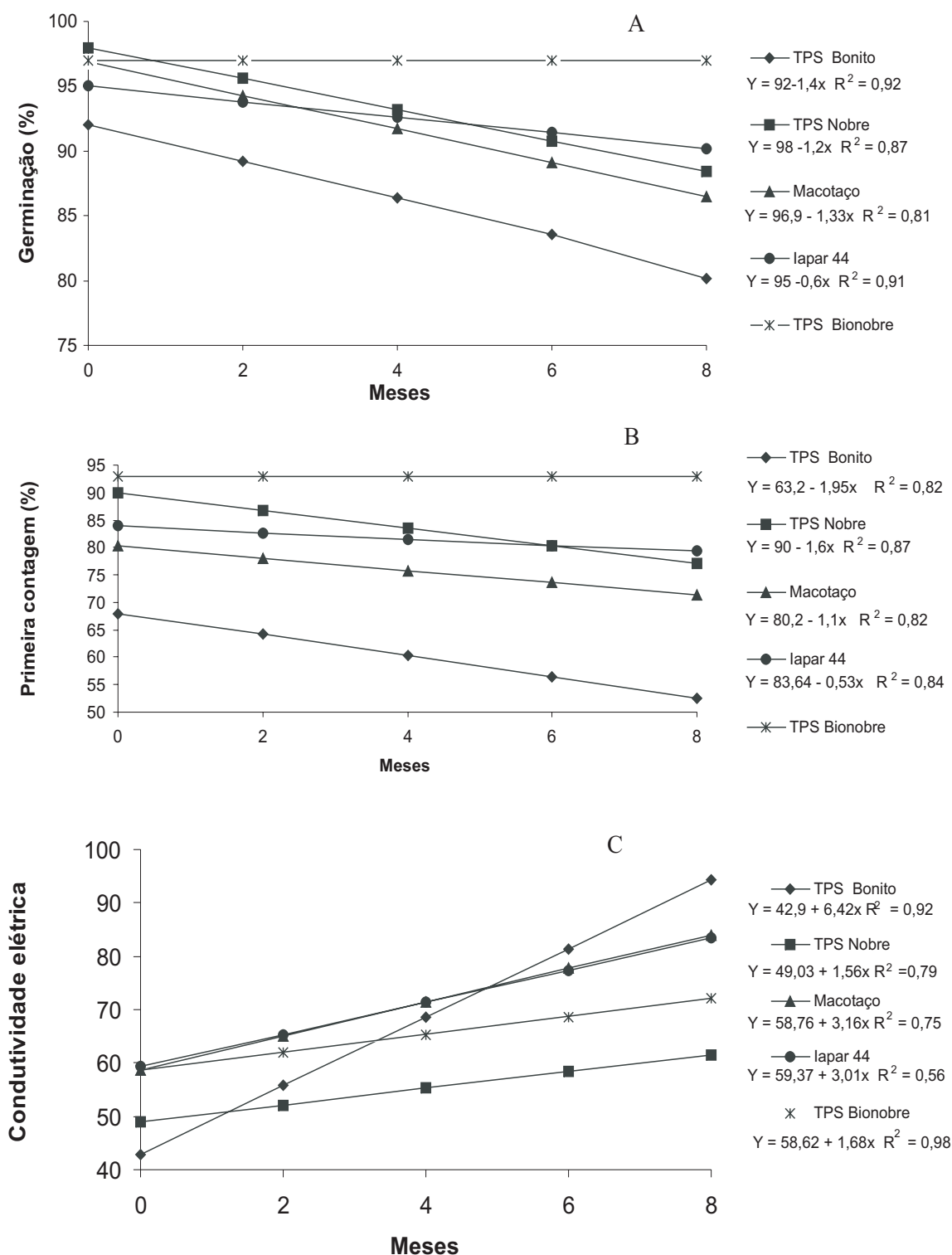


FIGURA 1. Médias de germinação (A), primeira contagem (B) e condutividade elétrica ($\mu S \cdot cm^{-1} \cdot g^{-1}$) (C) de sementes de cinco cultivares de feijão submetidas ao armazenamento, por oito meses em condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar.

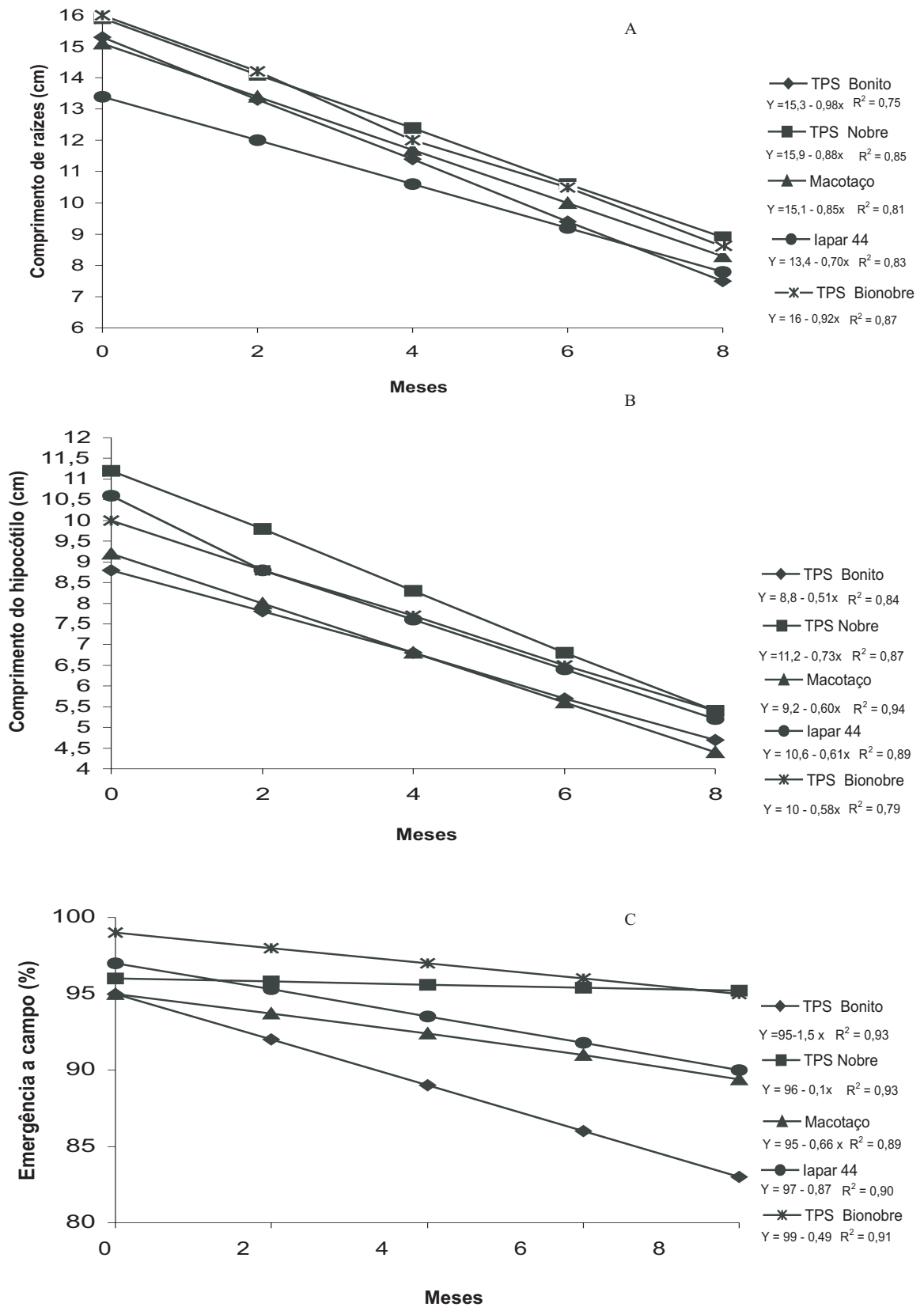


FIGURA 2. Médias do comprimento de raízes (A), comprimento do hipocótilo (B) e emergência em campo (C) de sementes de cinco cultivares de feijão submetidas ao armazenamento por oito meses em condições não controladas de temperatura e umidade relativa do ar.

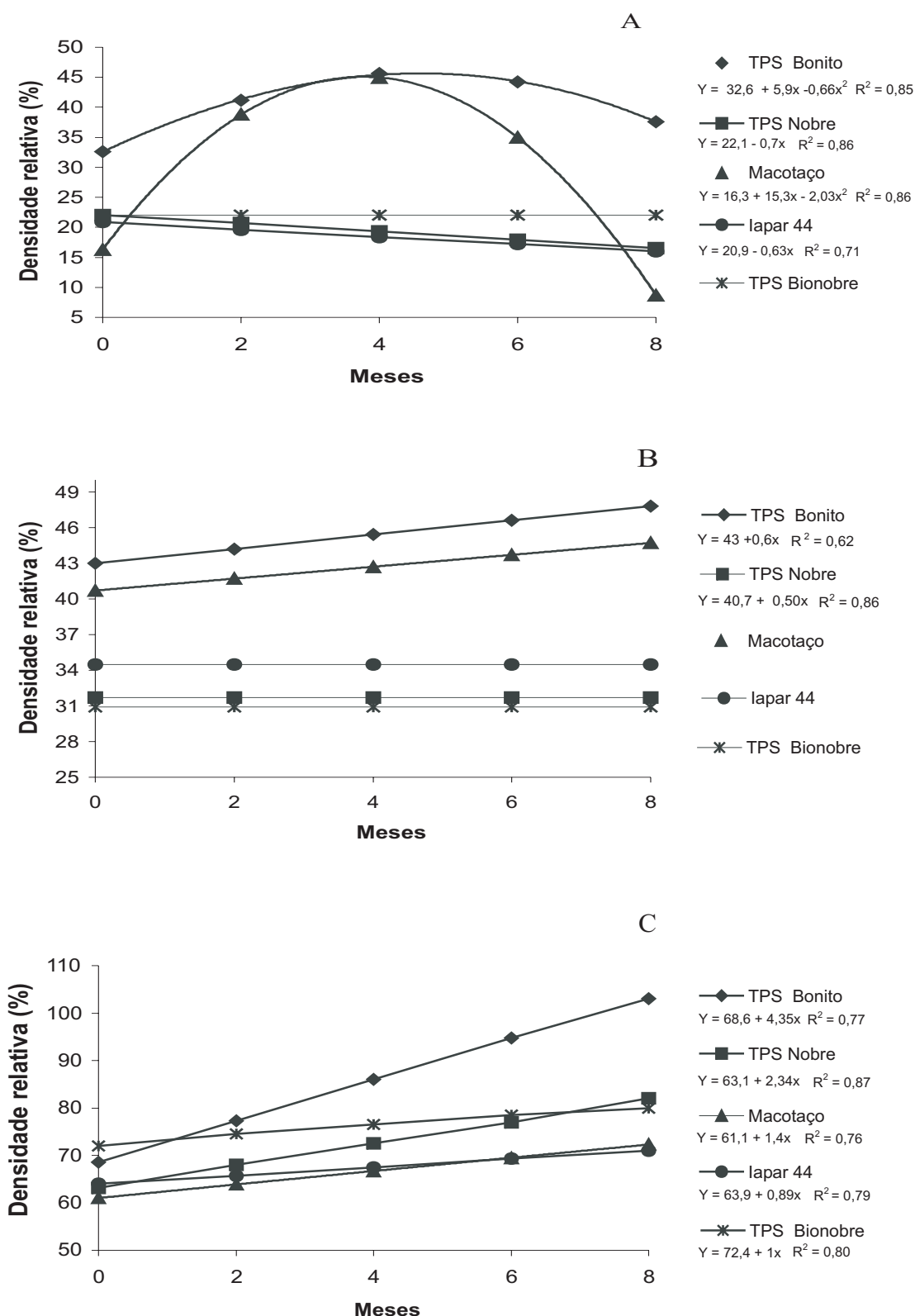


FIGURA 3. Densidade relativa das enzimas malato desidrogenase (A), glutamato desidrogenase (B) e esterase (C) de sementes de cinco cultivares de feijão armazenadas por oito meses em condições ambientais sem controle de temperatura e umidade relativa do ar.

estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios totais de membrana. Conforme Lin (1990), a redução do vigor de sementes envelhecidas de feijão poderia ser causada pela perda do controle sobre a compartimentalização intracelular e alterações nas concentrações de metabólitos, resultado da perda de lipídios da membrana.

A fosfatase ácida hidrolase participa em reações de hidrólise de ésteres e pode provocar a peroxidação dos fosfolipídios de membrana. Esta enzima está envolvida também na manutenção do fosfato celular e sua atividade pode afetar o metabolismo do fosfato em sementes, como os níveis de ATP e nucleotídeos (Camargo et al. 2000). Novamente as cultivares TPS Bonito e TPS Nobre mantiveram a atividade constante para esta enzima durante o armazenamento (Figura 4). Já as cultivares TPS Bonito e Macotaço, mais sensíveis às condições de armazenamento e sofreram redução de vigor mais rapidamente, mostraram aumento na atividade enzimática, ao longo do armazenamento. O cultivar Iapar 44 de qualidade fisiológica superior aos cultivares mencionados anteriormente,

apresentou aumento menos acentuado na atividade enzimática. Segundo Roberts (1973), enzimas hidrolíticas têm sua atividade incrementada com a perda da viabilidade das sementes.

Os testes mais sensíveis, segundo Carvalho et al. (2000), para determinar o estágio de deterioração das sementes são aqueles que medem a atividade de determinadas enzimas associadas com a degradação das reservas e/ou biossíntese de novos tecidos. Com base nos resultados expostos neste trabalho e com os relatos de Vieira (1996), Spinola et al. (2000) e Carvalho et al. (2000), as isoenzimas podem ser utilizadas no monitoramento da deterioração e no controle de qualidade de sementes, pois a integridade e o metabolismo celular estão relacionados com grande variedade de enzimas e proteínas estruturais de cada espécie. Desta forma, a técnica de eletroforese de proteínas possibilitou a detecção dos estágios iniciais de deterioração, nos cultivares menos vigorosos, através da atividade de enzimas associadas à degradação, respiração, germinação e metabolismo dos lipídios.

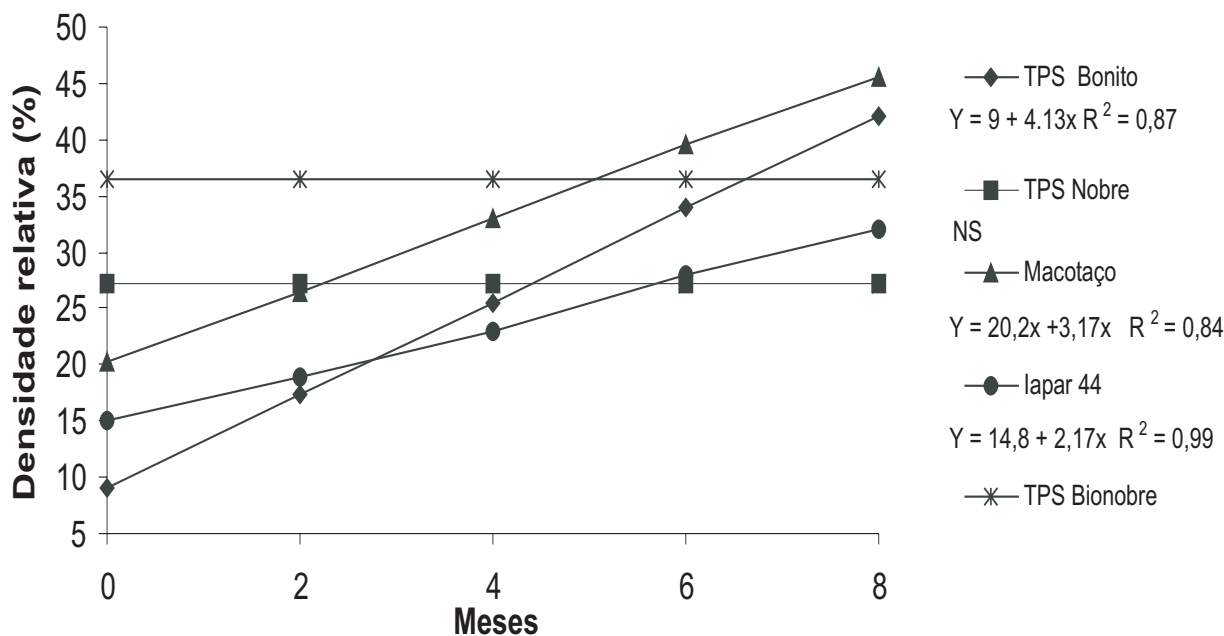


FIGURA 4. Densidade relativa da enzima fosfatase ácida em sementes de cinco cultivares de feijão armazenadas por oito meses em condições ambientais, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar.

CONCLUSÕES

A atividade das enzimas malato e glutamato desidrogenase é estável durante o armazenamento em condições ambientais não controladas nos cultivares vigorosos (TPS Bionobre, TPS Nobre e Iapar 44).

A enzima esterase tem sua atividade incrementada durante o armazenamento não controlado, independentemente da qualidade fisiológica das sementes de feijão.

Os potenciais de armazenamento sob condições ambientais não controladas são diferentes nos cultivares TPS Bionobre, TPS Nobre, TPS Bonito, Macotaço e Iapar 44.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- AHRENS, D.C.; PESKE, S.T. Flutuações de umidade e qualidade de semente de soja após a maturidade fisiológica. II. Avaliação da qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.2, p.111-115, 1994.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 10ed. Washington D.C. 1965. 957p.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BOCK, F.L. **Resposta a nível molecular do envelhecimento artificial, natural e pré-condicionamento de sementes de soja**. 1999. 27f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.
- BRANDÃO-JUNIOR, D.S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n.1, p. 114-121, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 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**, Santa Maria, v.10, n.2, p.113-122, 2000.
- CARVALHO, N.M. O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 1-30.
- CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; PINHO, E.R.V. Técnicas moleculares em sementes. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.17, p. 44-47, 2000.
- COMISSÃO ESTADUAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. **Recomendações técnicas para o cultivo de feijão no Rio Grande do Sul**. Santa Maria: PALLOTTI, 2000. 80p.
- COMISSÃO ESTADUAL DE SEMENTES E MUDAS. **Normas e padrões de produção de sementes para o estado do Rio Grande do Sul**. 4 ed. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Departamento de Produção Vegetal, 2000. 160p.
- COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. **Seed Science and Technology**. New York: CHAPMAN & HALL, 1995. 410 p.
- DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.2, p.427-452, 1973.
- ELLIS, R.H. The effects of differences in seed quality resulting from priming or deterioration on the relative growth rate of onion seedlings. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.253, p.203-212, 1989.
- LIN, S.S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.2, n.2, p.1-6, 1990.
- MACEDO, E.C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n.1, p.67-65, 1999.
- MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R.; NOVEMBRE, A.D.C. Estudo comparativo de métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.12, p.1805-1815, 1990.
- MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**, London, v.14, n. 2, p. 89-94, 1985.
- MEDIA CYBERNETICS. **Gel - Pro Analyser Version 3.0 for Windows User's Guide**. Media Cybernetics, L.P. Silver Spring, 1997.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.23.
- PÁDUA, G.P. Vigor de sementes e seus possíveis efeitos sobre a emergência em campo e a produtividade. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 8, n. 1/2/3, p.46-48, 1998.
- PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p.255-262, 2001.
- ROBERTS, E.H. Loss of seed viability: chromosomal and genetic aspects. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.515-527, 1973.
- SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.3, n. 2, p.106-118, 1998.
- SCANDÁLIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v. 3, n.1, p.37-79, 1969.
- SHATTERS, R.G.JR.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.

Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n.1, p. 33-41, 1994.

SPINOLA, M.C.M.; CICERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

VIEIRA, R.D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.103-132.

VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 114f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

VIEIRA, E.H.N.; YOKOYAMA, M. Colheita, processamento e armazenamento. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. **Sementes de feijão - produção e tecnologia**. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2000. p. 233-248.

WILLIAMS, R.D. Moisture stress and hydration-dehydration effects on hemp *Sesbania exaltata* seed germination. **Weed Science**, Lawrence, v.28, n.2, p.487-492, 1980.

