

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os padrões isoenzimáticos de fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH) e glutamato oxalacetato transaminase (GOT) em sementes e plântulas F1 de duas cultivares de cevada (MN 721 e Scarlett). As sementes foram coletadas em três épocas com diferentes percentuais de umidade e correspondentes a três diferentes etapas da sua maturação. A umidade das sementes foi reduzida a 13% (condições ideais para armazenamento), sendo então armazenadas em câmara fria até sua análise. Foram analisadas as sementes e plântulas de três amostras de cada uma das duas cultivares. Os três sistemas isoenzimáticos analisados apresentaram diferenças na expressão, como esperado nas comparações entre sementes e plântulas. O teor de água nas sementes influencia o padrão enzimático da enzima GOT. Foram detectadas bandas de ACP em todos os tratamentos avaliados, porém, nas sementes com uma intensidade mais baixa.

Palavras-chave: *Hordeum vulgare* L., eletroforese, padrões de isoenzimas; ACP; ADH e GOT.

Expressão diferencial de Isoenzimas em sementes e em plântulas F1 de cevada¹

Lilian Madruga de Tunes²; Pablo Gerzson Badinelli³;s Maria Alice da Silva de Castro⁴; Antonio Carlos de Souza Albuquerque Barros⁵

Expresión diferencial de las isoenzimas en las semillas y plántulas F1 de cebada

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar los patrones de isoenzimas de la fosfatasa ácida (ACP), la alcohol desidrogenasa (ADH) y el glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) en la semillas y plántulas F1 de dos cultivares de cebada (MN 721 y Scarlett). Las semillas fueron recolectadas en tres temporadas con diferentes porcentajes de humedad y que corresponden a tres etapas diferentes de su maduración. El contenido de humedad de las semillas se redujo a 13% (las condiciones ideales para el almacenamiento), y fueron almacenadas en un cuarto frío hasta su análisis. Se analizaron las semillas y plántulas de tres muestras de cada una de las cultivares. Los tres sistemas isoenzimáticos analizados diferían en la expresión, como se esperaba en las comparaciones entre las semillas y plántulas. El contenido de agua en las semillas influye en el patrón enzimático de la enzima GOT. se han detectado Bandas de ACP en todos los tratamientos, pero en las semillas, la intensidad fue de menor.

Palabras llave: *Hordeum vulgare* L.; electroforesis, patrones de isoenzimas; ACP; ADH y GOT

Introdução

A cevada é cultivada no Brasil desde a década de 30, sua produção está concentrada na Região Sul, com registros de cultivo também nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo (ARIAS, 1996). É o quarto cereal mais importante em superfície cultivada no mundo, depois do trigo, arroz e milho. É uma espécie típica de clima frio, mais precoce e tolerante a baixas temperaturas do que outros cereais, o que permite a exploração de outras espécies na mesma

propriedade (YALÇIN, et al., 2007). A área cultivada com esse cereal no Brasil está em torno de 109 mil hectares (IBGE, 2008). Em vista disso e da resposta econômica em relação a outras culturas de inverno, muitos produtores mostram interesse na inclusão da cevada em seus sistemas de produção.

Os parâmetros utilizados como indicativos do momento adequado para a colheita de sementes de cevada é o seu grau de umidade e o aspecto das plantas. Entretanto, esses parâmetros podem sofrer variações devido a fatores climáticos, temporais

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

2 Engenheira Agrônoma. Estudante do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Ciência e Tecnologia de Sementes, Dep. Fitotecnia – FAEM – UFPel. Email: lilianmtunes@yahoo.com.br

3 Engenheiro Agrônomo. Estudante do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – FAEM – UFPel. Email: pgbagro@yahoo.com.br

4 Técnica em Química. Técnica Laboratório de Bio Sementes / FAEM/UFPel. Email: macastro@ufpel.edu.br

5 Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor, Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPel, Caixa Postal: 354, CEP 96001-970, Pelotas-RS, acarros@ufpel.edu.br

e genéticos, não constituindo, assim, indicativos totalmente seguros do ponto ideal para a colheita. A cevada caracteriza-se por ser altamente sensível a precipitações pluviométricas no momento da colheita, principalmente pelo prejuízo promovido às sementes por sua germinação precoce (REUSS et al., 2003).

Segundo Dias (2001), a colheita realizada na fase da maturidade fisiológica (umidade em torno de 30%) seria ideal, pois é quando a semente atinge o máximo do peso da matéria seca e encontra-se no máximo de sua potencialidade, sendo que a deterioração é mínima (DELOUCHE, 2005). Porém, nesta fase não somente o teor de umidade das sementes é muito elevado, como a própria planta ainda se encontra com grande número de folhas verdes, o que tornaria praticamente impossível o procedimento de colheita (BARROS e PESKE, 2006). As sementes permanecem no campo até atingirem um nível de umidade adequado para a colheita, sujeitas a condições climáticas nem sempre favoráveis para a preservação de sua qualidade (BARROS e PESKE, 2006). Nesse processo, poderão 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 gasto de energia.

De acordo com dados de pesquisa, o monitoramento dessas mudanças pode ser feito com a ajuda de marcadores moleculares, pois, além de fornecer dados úteis sobre a estrutura e diversidade genética das populações de plantas, possibilita a detecção da atividade das enzimas nos diferentes estádios da planta (ALFENAS et al., 1998).

A análise da atividade isoenzimática constitui-se em uma das técnicas de marcadores bioquímicos muito utilizados desde a década de 60. 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 e Brewbaker (1973), a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático são específicos para uma determinada parte da planta, tecido e estágio 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 Jr. et al., 1999; SANTOS et

al., 2004; 2005).

As enzimas relacionadas à qualidade fisiológica das sementes mais pesquisadas são fosfatase ácida, desidrogenases e transaminases (CARVALHO et al., 2000). 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 álcool desidrogenase é uma das principais enzimas fermentativas, que converte o acetaldeído em etanol, considerando menos tóxico à planta por não causar danos à bicamada lipídica das membranas celulares e por ser permeável (CHANG et al., 2000). A enzima 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 desta situação, 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 do presente trabalho foi avaliar a expressão dos sistemas isoenzimáticos fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH) e glutamato oxalacetato transaminase (GOT) nas sementes e plântulas de duas cultivares de cevada (MN 721 e Scarlett), obtidas em diferentes épocas de colheita.

Material e métodos

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análises de Sementes e Bio-sementes da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As cultivares estudadas foram “MN 721” e “Scarlett”. A MN 721, obtida pela AmBev (AmBev = Companhia americana de bebidas), apresenta ampla adaptação, inclusive em solos de baixa fertilidade. Scarlett é cultivar de origem argentina, possui rendimento bastante elevado, superando as variedades mais produtivas brasileiras, adaptando-se tanto a climas frios como quentes.

A área experimental total utilizada foi de aproximadamente 0,5 ha, dividida em duas subáreas. Em cada subárea ficou uma cultivar e ambas colhidas

nos três períodos distintos (118, 129 e 140 dias após a maturidade fisiológica). As amostras retidas da subárea eram compostas por dez subamostras (retiradas de dez pontos diferentes dentro da subárea), retiradas aleatoriamente, misturadas para ter uma homogeneidade, obtendo-se a amostra de trabalho para as análises pesando aproximadamente quatro quilogramas de sementes por data de coleta e cultivar.

A coleta das sementes foi realizada quando atingiram grau de umidade inferior a 30%, quando as plantas estavam com 118, 129 e 140 dias após a semeadura (as datas de colheita foram determinadas através da percentagem de umidade das sementes). O grau de umidade, para a cultivar MN 721, foi de 25% na primeira, 18% na segunda e 13% na terceira amostra, e para a cultivar Scarlett foi de 26% na primeira, 19% na segunda e 13% na terceira amostra. As sementes foram secadas em estufa com temperatura de 35-40 °C com circulação forçada de ar, até atingirem 13% de umidade, sendo 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 a temperaturas de 5 a 10 °C, por um período de 7 dias, para a superação da dormência, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Foram analisadas as isoenzimas: fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH) e glutamato oxalacetato transaminase (GOT), nas sementes e também nas plântulas com 7 dias de germinação, de ambas cultivares e das três épocas de coleta das sementes.

As sementes de cada amostra foram colocadas a germinar e suas plântulas (inteira e trituradas), com sete dias para todas as amostras analisadas, usadas para a extração e eletroforese. Foram também analisadas sementes secas (25 sementes por época de colheita para cada cultivar) (trituradas), não germinadas, retiradas da câmara fria e levadas para a extração.

O teste de germinação foi realizado, para cada cultivar e amostra, com quatro repetições de 50 sementes semeadas em papel toalha umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, sendo conduzido em temperatura constante de 20 °C, segundo as Regras para Análise

de Sementes (BRASIL, 1992). Dez sementes e 10 plântulas de cada cultivar e amostra foram coletadas aleatoriamente e maceradas separadamente em gral de porcelana.

De cada uma das amostras, 200 mg do extrato obtido foi colocado em tubo *eppendorf*, sendo acrescido de solução extratora (tampão do gel + 0,15% de 2-mercaptoetanol) na proporção 1:2 (p/v). A eletroforese foi realizada em géis de poliácridamida 7%, colocando 20µL de cada extrato/amostra em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Três aplicações (repetições) de cada amostra foram realizadas. Foi utilizado o sistema de tampões descrito por Scandalios (1969). Os géis foram colocados a migrar 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 fosfatase ácida, glutamato oxalacetato transaminase ou álcool desidrogenase, conforme Scandalios (1969) e Alfenas (1998). Os géis foram então 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 em consideração a presença/ausência, bem como a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas em cada sistema isoenzimático avaliado.

Resultados e discussão

Quando analisado o padrão enzimático para a enzima GOT, foi constatado aumento da intensidade de bandas quando o material analisado foi plântulas de cevada. Este fato foi detectado também nos diferentes estádios da germinação (Figura 1).

Analisando os géis do sistema glutamato oxalacetato transaminase (Figura 1), também não é possível concluir sobre aumento ou redução da intensidade de bandas nas sementes ao longo do tempo. Entretanto, é mostrada claramente a existência de três bandas, em gradiente de intensidade crescente, do ponto de aplicação (início do gel). Cada uma dessas bandas mostra aumentos de intensidade,

nas diferentes amostras de plântulas com idades mais avançadas. A intensidade das bandas aumentou consideravelmente na medida em que o processo de colheita foi mais tardio, ou seja, com umidade próxima a 13%. Segundo Conn e Stumpf, (1980) esta enzima participa no processo de degradação e síntese de aminoácidos, apresentando um importante papel na germinação de sementes. Em função de a 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.

A enzima GOT tem uma participação fundamental no metabolismo protéico, não somente durante a germinação, mas, durante todo o ciclo de vida da planta. Na semente, independente da época de colheita a enzima esta presente e ativa. Na plântula a expressão da enzima não apresentou atividade em ambas as cultivares quando colhidas 118 DAS. Quando a colheita foi realizada aos 129 DAS a enzima estava presente apenas na cultivar Scarlett, já aos 140 DAS a GOT foi observada em ambas as cultivares.

Esses dados indicam que esta enzima possui atividade diretamente relacionada com a qualidade fisiológica das sementes (COSTA et al., 2008).

Provavelmente a ausência aos 118 DAS indica que a qualidade fisiológica não era alta, pelo fato da semente apresentar ainda elevados teores de umidade. Já aos 129 DAS a diferenciação entre as cultivares provavelmente ocorreu em razão das diferenças genéticas de ambas. Por fim, aos 140 DAS o teor de umidade das sementes já havia atingido patamares que não interferiam na qualidade fisiológica das sementes.

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, nas sementes com um número menor de bandas (2 bandas). Já nas plântulas foram encontrados 3 bandas na cultivar MN 721 e na cultivar Scarlett. Malone et al. (2007) pesquisou em arroz períodos de 0 a 10 dias de germinação, a expressão isoenzimática de ACP, e também observou aumento do número de bandas, à medida que avança o período germinativo. Segundo dados deste autor, no zero dia de germinação as plântulas de arroz expressaram 2 bandas de ACP e aos 10 dias de germinação foi verificado um aumento para 4 bandas. Essa enzima tem sido amplamente caracterizada em plantas, e sua atividade aumenta em plantas que apresentam deficiência de fósforo.

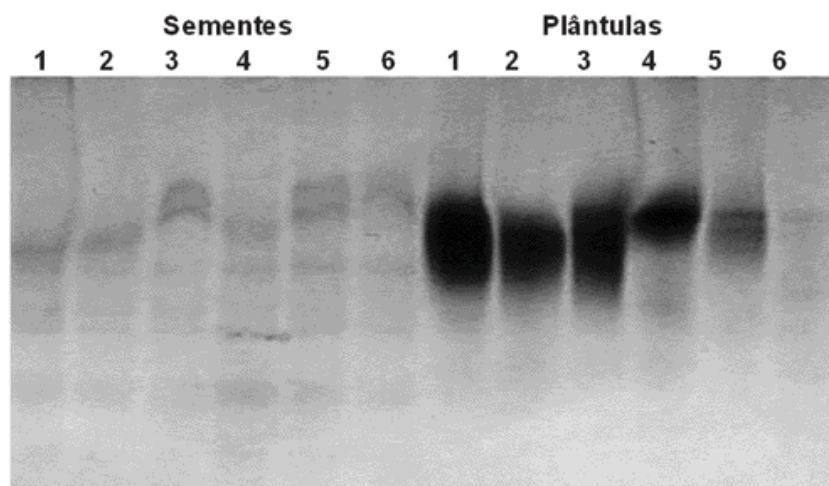


Figura 1. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Glutamato Oxalacetato Transaminase em duas cultivares de cevada colhidas em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. 1- MN 721 118 dias após a sementeira, 2- MN 721 129 dias após a sementeira, 3- MN 721 140 dias após a sementeira, 4- Scarlett 118 dias após a sementeira, 5- Scarlett 129 dias após a sementeira e 6- Scarlett 140 dias após a sementeira. Laboratório de Bio Sementes/UFPel – Pelotas, 2007.

De acordo com Lefebvre et al. (1990), o incremento na atividade de ACP sob baixas concentrações de fósforo tem sido relatado para um grande número de espécies e órgãos vegetais. Desta forma, a intensidade da expressão da enzima fosfatase ácida aumenta na medida em que o conteúdo de fósforo do solo decresce e quando os requerimentos nutricionais das plântulas são maiores. 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, 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.

Nas plântulas, a atividade da fosfatase ácida foi maior, conseqüentemente maiores danos por embebição e maior peroxidação lipídica podem ter ocorrido. Embora tenham passado 22 dias (118 DAS – primeira colheita e 140 DAS – última colheita) a semente não propriamente envelheceu, mas sim perdeu água, e esteve sujeita a condições climáticas, e as cultivares responderam de forma diferente a esta condição.

A ADH é uma enzima que atua no processo

respiratório, removendo substâncias tóxicas às sementes, como acetaldeído e etanol, que são produzidos quando as células passam a respirar anaerobicamente. A expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) nas sementes foi bastante pronunciada (Figura 3), o que sugere intensa atividade de respiração anaeróbica. Entretanto, autores como Faria et al. (2003) não observaram atividade da ADH em plântulas.

A ADH é uma enzima que atua no processo respiratório, removendo substâncias tóxicas às sementes, como acetaldeído e etanol, que são produzidos quando as células passam a respirar anaerobicamente (FARIA et al., 2003). Segundo Aldasoro e Nicolás (1980), durante os estágios iniciais da germinação, a degradação do amido é realizada num processo quase que totalmente anaeróbico, até que a casca da semente seja rompida pela saída do eixo embrionário. Confirmando estas evidências no padrão 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 três sistemas isoenzimáticos analisados

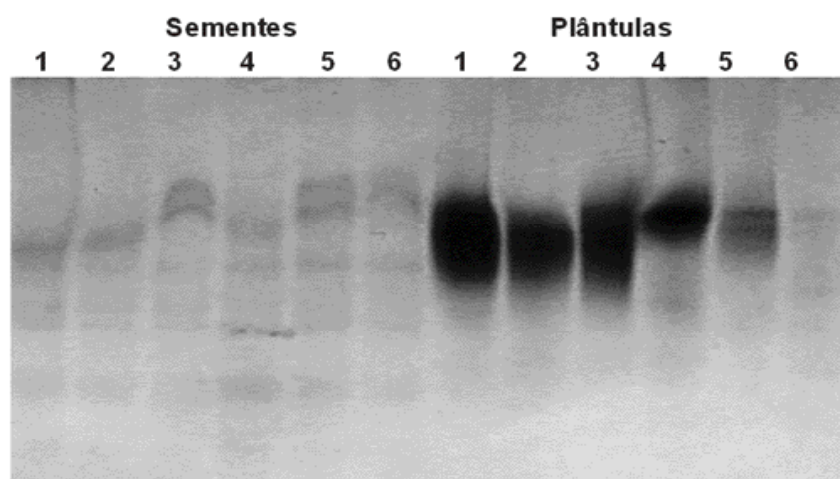


Figura 2. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Fosfatase Ácida em duas cultivares de cevada colhidas em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. . 1- MN 721 118 dias após a sementeira, 2- MN 721 129 dias após a sementeira, 3- MN 721 140 dias após a sementeira, 4- Scarlett 118 dias após a sementeira, 5- Scarlett 129 dias após a sementeira e 6- Scarlett 140 dias após a sementeira. Laboratório de Bio Sementes/UFPEL – Pelotas, 2007.

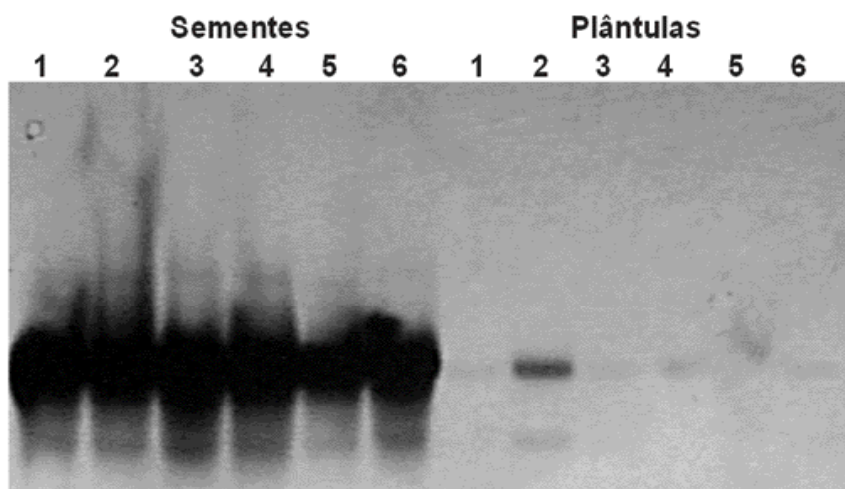


Figura 3. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Alcool Deshidrogenase (ADH) em duas cultivares de cevada colhidas em três épocas, em sementes e plântulas com emergência de sete dias. 1- MN 721 118 dias após a semeadura, 2- MN 721 129 dias após a semeadura, 3- MN 721 140 dias após a semeadura, 4- Scarlett 118 dias após a semeadura, 5- Scarlett 129 dias após a semeadura e 6- Scarlett 140 dias após a semeadura. Laboratório de Bio Sementes/UFPel – Pelotas, 2007.

houve padrões de expressão diferencial nas sementes e durante o processo de germinação, realizadas em épocas diferentes de colheita. De forma geral, pode ser observado que o padrão isoenzimático expresso nas sementes, não diferiu entre as 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 programa de desenvolvimento da semente e durante a germinação correspondem a diferentes processos de diferenciação celular e perfis de expressão gênica.

Na semente seca a atividade metabólica é extremamente baixa, ocorrendo apenas às 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 mRNAs 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 revelam que dependendo do sistema enzimático utilizado existe uma expressão diferencial de isoenzimas em sementes e em plântulas F1 de cevada.

Em função disso, a análise conjunta de vários sistemas isoenzimáticos, realizando a extração das proteínas em dois estádios de desenvolvimento (sementes e plântulas), são recomendáveis, pois nos permitirá verificar modificações que ocorrem da semente para as plântulas e também a influência da umidade durante a colheita.

Conclusão

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

O teor de água nas sementes influencia o padrão enzimático da enzima GOT.

Foram detectadas bandas de ACP em todos os tratamentos avaliados, porém, nas sementes com uma intensidade mais baixa.

Agradecimentos

À Empresa Westermann, do Município de Piratini, RS, pelo fornecimento da área para a pesquisa, que possibilitou a concretização dos resultados obtidos; ao Laboratório Didático de Análise de Sementes Professor Flávio Rocha, do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de

Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas; à CAPES, pelo apoio e financiamento do projeto de pesquisa.

Referências

Apresentadas no final da versão em inglês.

