

Faixa de exigência e influência do pH no teste de germinação

Gadotti, Gizele Ingrid^{1,2}; Geri Eduardo Meneghello¹; Maria Angela André Tillmann¹

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Departamento de Fitotecnia,
Universidade Federal de Pelotas. Av. Eliseu Maciel, s/n. Capão do Leão, RS, BR. CP 354;
²gigadotti@hotmail.com

Gadotti, Gizele Ingrid; Geri Eduardo Meneghello; Maria Angela André Tillmann (2013). Faixa de exigência e influência do pH no teste de germinação. Rev. Fac. Agron. Vol 112 (1): 27-34.

No capítulo Teste de Germinação das Regras para Análise de Sementes – RAS, nas especificações gerais do item substrato de papel e água, há exigência de pH na faixa de 6,0 – 7,5. Este trabalho teve como objetivo avaliar a alteração do pH em substratos utilizados para realizar o teste de germinação, influência do pH da água e da solução água mais papel na germinação de sementes de cebola e milho, e a atividade enzimática nas plântulas originadas da germinação de sementes de cebola e milho distribuídas em substrato com diferentes pH's. Este trabalho foi realizado em três etapas. Na primeira etapa foi avaliado diferentes papéis e fontes de água para a formação do substrato. A continuidade do trabalho do experimento, considerada segunda etapa, foi baseada no resultado da primeira, na qual o papel com maior alteração foi submetido a diferentes pH's. E, finalmente, o terceiro trabalho verificou a influência desse substrato com diferentes pH's no teste de germinação e sua diferenciação isoenzimática nas plântulas por ele geradas. Os resultados obtidos nos experimentos permitiram as seguintes conclusões: o papel mata borrão libera mais solutos para o meio substrato; independente do pH inicial, o mesmo tende a se neutralizar ao longo do tempo; não houve diferença significativa no resultado do teste de germinação independentemente do pH utilizado; nas análises enzimáticas não houve diferenciação enzimática em pH neutro para as enzimas EST, ADH, MDH, FAC, GOT, GDH e SOD.

Palavras chave: diferenciação enzimática; faixa de pH; solução papel mais água.

Gadotti, Gizele Ingrid; Geri Eduardo Meneghello; Maria Angela André Tillmann (2013). Rango de exigencia e influencia del pH sobre la prueba de germinación Rev. Fac. Agron. Vol 112 (1): 27-34.

En el capítulo Prueba de Germinación de las Reglas para Análisis de Semillas, en las especificaciones generales del ítem substrato de papel y agua, existe una exigencia de pH en el rango de 6,0 – 7,5. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la alteración del pH en substratos utilizados para realizar la prueba de germinación, influencia del pH del agua y de la solución agua más papel en la germinación de semillas de cebolla y maíz, y la actividad enzimática en las plântulas originadas de la germinación de semillas de cebolla y maíz distribuidas en substratos con diferentes pH. Este trabajo fue realizado en tres etapas. En la primera etapa fueron evaluados diferentes papeles y fuentes de agua para la formación del substrato. La continuación del experimento, considerada como segunda etapa, está basada en el resultado de la primera, en la cual el papel con mayor alteración fue sometido a diferentes pH. Finalmente, en la tercera etapa se verificó la influencia de ese substrato con diferentes pH en la prueba de germinación y su diferenciación isoenzimática en las plântulas de ella generadas. Los resultados obtenidos en los experimentos condujeron a las siguientes conclusiones: el papel "mata borrão" libera más solutos para el substrato; independiente del pH inicial, el mismo tiende a neutralizarse a lo largo del tiempo; no hubo diferencia significativa en el resultado de la prueba de germinación independientemente del pH utilizado; en las análisis enzimáticas no hubo diferenciación enzimática en pH neutro para las enzimas EST, ADH, MDH, FAC, GOT, GDH y SOD.

Palabras clave: diferenciación enzimática; rango de pH; solución papel más agua.

Recibido: 28/04/2012

Aceptado: 22/04/2013

Disponible on line: 18/06/2013

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUÇÃO

Fatores como temperatura, luz, pH e umidade afetam diretamente a germinação de sementes (Canossa et al., 2008; Ikeda et al., 2008; Rizzardì et al., 2009). Devido a isto, o pH se torna um dos pontos críticos do teste de germinação, conforme os preceitos de sistema de qualidade.

As Regras para Análise de Sementes – RAS têm a finalidade de disponibilizar métodos e padrões para análise de sementes, sendo estes de uso obrigatório nos Laboratórios de Análise de Sementes – LAS registrados no Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento – MAPA, do Brasil, objetivando o cumprimento da legislação. As RAS estabelecem que, para realização do teste de germinação, o substrato papel e a água do teste devem possuir pH entre 6,0 e 7,5 (Brasil, 2009). Corroborando, a ISTA – International Seed Testing Association recomenda que o sistema água-areia para germinação de sementes deva ter um pH entre 6,0 a 7,5 (ISTA, 2012).

Quimicamente, o pH é definido como a atividade do íon hidrogênio, expressa com logaritmo negativo da sua concentração, e determina a acidez relativa de um meio (Lide et al., 2011). O pH tem influência direta sobre vários processos de desenvolvimento de um vegetal. Sabe-se, por exemplo, que o pH do solo é de grande importância para o crescimento da planta, devido ao seu efeito na disponibilidade de nutrientes, em especial, de micronutrientes. Entretanto, a influência do pH sobre a germinação tem recebido pouca atenção (Wagner Junior et al., 2007).

Os solos tropicais e subtropicais são normalmente ácidos, seja pela ocorrência de precipitação suficientemente alta para lixiviar quantidades apreciáveis de bases permutáveis do solo, seja pela ausência de minerais primários e secundários, responsáveis pela reposição dessas bases. Sendo assim, devido à grandes áreas de solos ácidos cultivados, a importância da acidez, sob o aspecto prático, sobrepuja a da alcalinidade (Custódio et al., 2002). A água utilizada pela maior parte dos laboratórios brasileiros é proveniente de águas subterrâneas ou de tratamento e, conseqüentemente, o pH apresenta fora dos limites indicados pelas RAS. Com estas características o plantio em solos brasileiros não foi impossibilitado, entretanto os testes de germinação da regra brasileira seguem o padrão dos solos neutros europeus.

Valores de pH menores que 3,0 e superiores a 8,0 tem sido descritos como inibidores do processo germinativo (Wagner Junior et al., 2007). Sementes de muitas espécies germinam com altos índices de pH, considerando aqui pH alto maior que 7,5 preconizados por regras internacionais de análise de sementes, entretanto outros germinam com pH's específicos.

Apesar das indicações relatadas, a ecologia da germinação relacionada à variação de pH necessita de mais estudos. O escurecimento da radícula é um indicio que o pH não é ótimo para a germinação. Assim, problemas causados por valores inadequados de pH podem ser resolvidos usando solo do habitat natural da espécie ou ajustando o pH do substrato com soluções tampão de acordo com o método de Dawson et al. (1986).

É recomendado o controle do pH e da concentração de extratos brutos durante os testes de germinação realizados em laboratório, pois pode haver neles a presença de substâncias como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais influem na concentração iônica e são osmoticamente ativos (Wagner Junior et al., 2007).

Todavia, quanto aos diferentes valores de pHs nas soluções de embebição na germinação de sementes do maracujazeiro amarelo, as análises de variância não foram significativas em todas as variáveis analisadas, indicando que sementes dessa espécie são pouco afetadas durante a germinação por variações no pH. Resultados semelhantes foram obtidos por Chan (1937) que descreveu que a germinação de sementes de muitas espécies não é afetada por valores de pH entre 3,0 e 7,0 (Wagner Junior et al., 2007).

Deve ser ainda considerado que, há poucos dados sobre o efeito de diferentes pH's no substrato durante o processo germinativo na expressão de enzimas envolvidas nos processos metabólicos dessa fase de desenvolvimento. Dentre as enzimas que podem ser avaliadas destacam-se a álcool desidrogenase (ADH), a esterase (EST), a fosfatase ácida (FAC), o glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), o glutamato desidrogenase (GDH), o malato desidrogenase (MDH), a peroxidase (PO) e o superóxido dismutase (SOD).

Lima (2008) comenta que, possivelmente, a alteração na expressão da enzima EST está envolvida no catabolismo de lipídios e com isso há possibilidade de alteração no mecanismo de membranas. Assim, considerando que a viabilidade de uma semente é baseada em seu mecanismo de membranas seu estudo é de grande valia. A enzima EST está relacionada com o catabolismo de lipídios, fonte de carbono para a síntese de novas moléculas em plântulas, uma vez que o maquinário fotossintetizante não está preparado para suprir toda a demanda de carbono requerida pela planta (Machado et al., 2006).

A enzima ADH, de acordo com Lima (2008), atua no processo respiratório, sendo essencial no processo germinativo. No entanto, no milho foram identificados, em cultura de células, que os níveis de ADH sobem após a sinalização do aumento da concentração de Ca^{2+} citozóico que ocorre em meios anaeróbicos e estresse de déficit O_2 (Taiz & Zeiger, 2006).

A MDH, por sua vez, catalisa a conversão de malato a oxalacetato, tendo importante função dentro do Ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico) e, conseqüentemente, respiração (Manchenko, 2000).

Ainda há a FAC que participa em reações de hidrólise de ésteres e pode provocar a peroxidação dos fosfolipídios de membrana. Essa 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).

Com essas considerações, este trabalho teve como objetivo avaliar a alteração do pH em substratos utilizados para realizar o teste de germinação, influência do pH da água e da solução água mais papel na germinação de sementes de cebola e milho, e a atividade enzimática nas plântulas originadas da germinação de sementes de cebola e milho expostas à diferentes pH's.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em três etapas. Na primeira foi avaliado diferentes papéis e fontes de água para a formação do substrato. A continuidade do trabalho, considerada segunda etapa, foi baseada no resultado da primeira, na qual o papel com maior alteração foi submetido a diferentes pH's. E, finalmente, o terceiro trabalho verificou a influência desse substrato com diferentes pH's no teste de germinação e sua diferenciação isoenzimática nas plântulas por ele geradas.

Experimento 1 - foram analisadas diferentes fontes de papel e água sendo os tratamentos: água destilada, água não destilada, água destilada mais papel toalha (tipo Germitest®), água destilada mais papel borrão, água não destilada mais papel borrão e água não destilada mais papel toalha.

Foram preparadas soluções de papel mais água, utilizando a proporção 2,5x a massa seca do papel. As soluções foram colocadas em *ependorf* fechados e submetidas à temperatura de 25°C. Nesse experimento foi avaliado o valor de pH ao longo dos dias, através de pHmetro digital. As leituras de pH foram diárias através desse aparelho/instrumento até o terceiro dia, sendo que o pHmetro foi calibrado com as soluções padrão de pH 4 e 7 antes de cada leitura.

Na execução das análises estatísticas foi utilizado o SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelo método de Tukey (Canteri et al., 2001). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, sendo os dados obtidos submetidos à análise de variância e, na presença de interação significativa, procederam-se os desdobramentos necessários. As médias foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Experimento 2 - com os resultados do primeiro experimento, o segundo destinou-se ao estudo de um único papel (mata borrão), com diferentes fontes de água e concentrações de pH's. Com a seguinte configuração experimental: tratamentos - água destilada, água não destilada, água com pH baixo (pH 3,10), água com pH alto (pH 10,0), água destilada mais papel mata borrão, água não destilada mais papel mata borrão, água com pH baixo mais papel borrão, água com pH alto mais papel borrão e os padrões de 7.0 e 4.0.

Os tratamentos pH alto e baixo foram obtidos, respectivamente, com a adição de uma gota de HCl e NaOH em 2 litros de água destilada. Como no primeiro experimento, foram preparadas soluções de papel mais água utilizando a proporção 2,5x a massa do papel. As soluções foram colocadas em *ependorf* fechadas e submetidas à temperatura de 25°C. Foram analisadas o pH da solução através de pHmetro digital. As leituras foram diárias através de pHmetro até o décimo primeiro dia. O equipamento foi calibrado a cada leitura com soluções padrão de pH 4 e 7.

Experimento 3 - Esse experimento foi realizado com sementes das culturas de milho e cebola. Os tratamentos neste experimento foram: água destilada, água não destilada, água com pH baixo (pH 3,10), água com pH alto (pH 10,0), com 4 repetições de 50 sementes para cada unidade experimental. Os

tratamentos pH alto e baixo foram obtidos, respectivamente, com a adição de uma gota de HCl e NaOH em 2 litros de água destilada. O teste de germinação foi montado com modificações na metodologia da RAS no tocante a água (distintos pH's). Foi umedecido o papel na proporção 2,5x a massa seca do papel, conforme as RAS (Brasil, 2009). Foram avaliadas a percentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas.

Para a diferenciação isoenzimática, realizadas no Laboratório de BioSementes, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, as isoenzimas analisadas foram: esterase (EST), álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), fosfatase ácida (FAC), glutamato oxalato desidrogenase (GOT), glutamato desidrogenase (GTDH), peroxidase (PO) e superóxido dismutase (SOD) para todos os tratamentos. Após o teste de germinação, as plântulas foram utilizadas para extração. De cada uma das amostras, o extrato vegetal foi colocado 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. 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 V.cm⁻¹, até que a linha frontal, formada pelo azul de bromofenol, atingisse 9 cm do ponto de aplicação. Os géis foram revelados conforme Scandalios (1969) e Alfenas (1998). Os géis de eletroforese foram fixados em solução 5-5-1, de água destilada: metanol: ácido acético. A análise e a interpretação dos géis foram realizadas considerando a presença/ausência e a intensidade das bandas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento foi possível verificar que o pH nos diferentes tratamentos variou ao longo dos dias. Comparando tratamentos com papel e sem, esse substrato influenciou o pH para valores superiores no último dia de coleta (Tabela 1).

A água destilada mais papel mata borrão obteve valores superiores aos demais, demonstrando que o papel mata borrão libera mais solutos durante o período de exposição. A água destilada possui maior pH do que a água não destilada, pois segundo Degremont (1991) o pH da água destilada é aproximadamente de 5,8.

No segundo experimento, Tabela 2, em todos os dias avaliados foram comparados os tratamentos com e sem substrato. O papel influenciou o pH para valores neutros (pH 6,0 a 7,5), exceto o tratamento com água destilada que oscilou. Ao longo do tempo,

Tabela 1. Valores de pH em água e diferentes substratos umedecido, por um período de 3 dias. UFPel, Pelotas, 2011. * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	1º DIA		2º DIA		3º DIA	
Água destilada + papel borrão	6,2	a A	5,1	a A	5,4	a A
Água destilada	5,7	b B	5,1	a A	5,1	ab AB
Água não destilada + papel borrão	4,8	bc BC	4,9	ab AB	5,2	a AB
Água destilada + papel germitest	4,8	bc BC	4,4	c C	4,8	ab BC
Água não destilada + papel germitest	4,6	c C	4,6	bc BC	4,9	ab BC
Água não destilada	4,6	c C	4,3	c C	4,6	b C
C.V. (%)	2,79		2,71		4,56	

Tabela 2. Leituras de pH com diferentes concentrações em água e substrato umedecido. A = água; AD = água destilada; A+S = água mais substrato; AD+S = água destilada mais substrato; AA= água com pH alto; AB = água com pH baixo; AA+S= água com pH alto mais substrato; AB+S= água com pH baixo mais substrato. * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Dias																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11														
A	4,56	gF	4,71	fF	4,77	efF	4,98	cdG	4,91	deF	4,87	deG	4,95	cdG	5,0	cG	5,4	1	bG	5,3	8	bG	6,2	6	aD
AD	5,56	hE	5,64	hE	5,88	gD	6,05	fE	6,49	D	6,64	bcD	6,42	eD	4	cdeD	6,5	2	D	6,7	0	bD	7,0	3	aC
A + S	5,48	eE	5,54	deE	5,55	E	5,69	F	5,81	aE	5,60	F	5,55	F	5,6	bcde	7	2	abF	5,6	9	F	5,6	9	E
AD + S	5,83	D	6,00	efD	5,85	gD	6,38	bD	7,52	aB	6,06	defE	5,94	fgE	6,0	efE	6,1	6	cdE	6,0	8	deE	6,2	4	cD
AA	11,0	7	11,0	11,0	10,7	10,7	10,7	10,2	10,2	10,0	10,2	10,0	10,0	9,7	9,2	9,2	9,2	9,2	8,1	8,1	8,1	8,0	8,0	8,0	8,0
AB	3,07	I	3,09	I	3,02	eI	3,30	aI	2,68	fI	3,13	bcdeI	3,11	cdeJ	4	J	4	8	J	3,2	7	gA	3,2	3	gA
AA+S	10,8	1	10,6	10,4	5	cB	8,06	dB	7,21	fC	7,19	fB	7,18	fB	7,3	eB	7,4	8	eB	7,4	8	eB	7,4	8	eB
AB+S	3,41	fH	3,80	eH	3,85	deH	3,94	cdH	4,05	cG	3,87	deH	4,07	bcH	4,2	abH	4,2	1	aH	4,2	4	aH	4,3	1	aF

independentemente do pH alto ou baixo, os valores foram tendendo a neutro, como se o substrato causasse um tamponamento no meio.

O pH da água não destilada, transcorridos 36 horas, apresentava valores de pH fora da especificação das RAS, assim como o da água destilada a partir do 4º dia, o da água não destilada mais papel no 11º dia e o da água destilada mais papel no 2º dia.

Em água com pH baixo o substrato alterou o pH para valores superiores e no pH alto o substrato alterou o pH para valores inferiores, ambos tendendo para faixa de 6,0 a 7,5.

Não houve diferença significativa no resultado do teste de germinação independentemente do pH e da espécie utilizada (Tabela 3). A média do teste de germinação para as sementes de cebola foi de 85% e para o milho de 98%.

Assim, o pH da água na faixa entre 3,10 a 10,00 pode ser utilizado na condução do teste de germinação de sementes de cebola e milho.

Segundo Ghaderi-Far et al., (2010), a germinação de sementes de trevo amarelo doce (*Melilotus officinalis*) ocorre em uma faixa de pH entre 4 e 9, mas a máxima germinação foi observada a pH 6. A germinação decresceu nos extremos do teste, mas os autores afirmam que sementes dessa espécie germinam tanto em solos ácidos como alcalinos e com isso o pH não é um fator limitante a germinação.

Em sementes de soja, segundo Custodio et al., (2002), pH 6,0 apresentou o maior valor numérico de germinação não se diferenciando estatisticamente dos tratamentos 7,0; 5,5 e 5,0. Estes não diferiram do pH 6,0 e nem de pH 4,5. O pH 4,5 produziu o menor valor de germinação. Souza Filho & Dutra (1998) reportaram para o calopogônio (leguminosa tropical utilizada como adubo verde) a não interferência do pH na germinação, cuja variação daquele foi de 3 a 11. Os resultados de plântulas anormais não foram afetados pelos tratamentos de pH. Os cultivares que produziram maior germinação foram aqueles que apresentaram menores valores de plântulas anormais.

Tabela 3. ANOVA para pH's diferentes sobre a variável resposta teste de Germinação em sementes de cebola e milho.

Causa da variação	G.L.	Q.M. Cebola	Q.M. Milho
Tratamentos	2	5,431818	3,47E-18
Resíduo	45	9,486111	6,25E-06
Total	47		
C.V.		9,51%	0,32%

No estudo da diferenciação isoenzimática da enzima EST (Figura 1), visualiza-se que em milho há alteração enzimática em pH alto e baixo, não sendo observado o mesmo em pH normal.

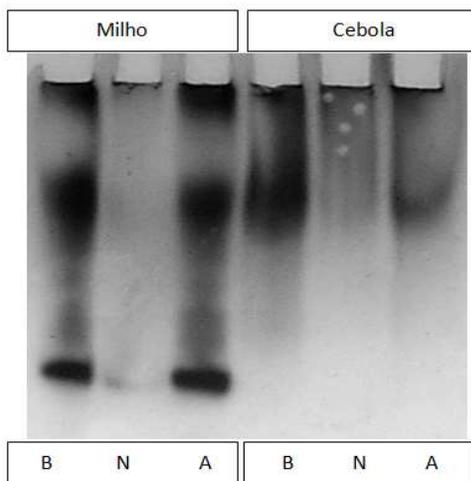


Figura 1. Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima esterase em plântulas de milho e cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

Em cebola foi observada maior expressão da enzima EST em pH baixo, seguindo para o pH alto e pouca expressão em pH normal. Lima (2008) comenta que possivelmente a alteração na expressão da enzima EST está envolvida no catabolismo de lipídios e com isso há possibilidade de alteração no mecanismo de membranas.

Na Figura 2 é possível visualizar a expressão da enzima ADH. No milho se observou que quanto maior o pH maior é sua ativação, com a formação de uma banda bem mais nítida e intensa em pH alto. Isso porque na espécie cebola não houve expressão em nenhum dos tratamentos, provavelmente nessa espécie o período de ação dessa enzima não coincide com a época avaliada.

A ADH é uma enzima que atua no processo respiratório, removendo substâncias tóxicas, como acetaldeído e etanol, que são produzidos quando as

células passam a respirar anaerobicamente (Lima, 2008). No metabolismo anaeróbico (na fermentação alcoólica) o piruvato, primariamente produzido na glicólise, é convertido a acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase, sendo o acetaldeído reduzido a etanol pela ADH.

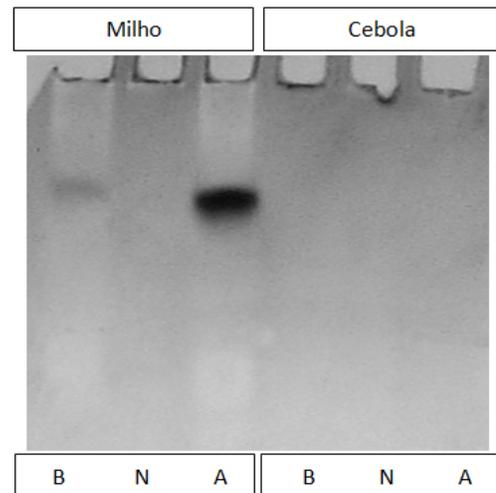


Figura 2. Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima álcool desidrogenase em plântulas de milho e cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

Na Figura 3, pode-se observar que a enzima MDH está ativada, em plântulas de milho, tanto em pH baixo como alto e pouca em pH normal. Na cebola não foi observada atividade dessa enzima. A enzima MDH catalisa a conversão de malato a oxalacetato, tendo importante função dentro do Ciclo de Krebs (Manchenko, 2000).

Segundo Santos et al. (2004), a enzima MDH atua com a fosfoenolpiruvato carboxilase, para a redução de oxaloacetato a malato, utilizando NAD como doador ou receptor de elétrons nessas reações, tendo uma importante função no Ciclo de Krebs (mitocôndria) para a produção de NADH.

Na Figura 4 observa-se que a atividade da enzima FAC é maior no pH alto e menor no pH baixo e imperceptível em pH normal nas plântulas de milho e cebola.

A FAC participa em reações de hidrólise de ésteres e pode provocar a peroxidação dos fosfolipídios de membrana. Essa 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 de nucleotídeos (Camargo et al., 2000).

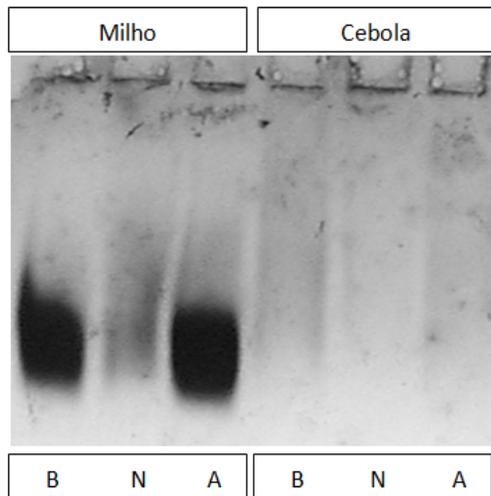


Figura 3. Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima malato desidrogenase em plântulas de milho e cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

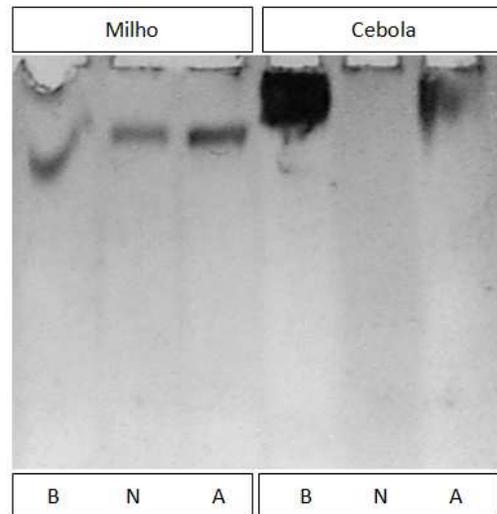


Figura 5. Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima glutamato oxaloacetato transmitase em plântulas de milho e de cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

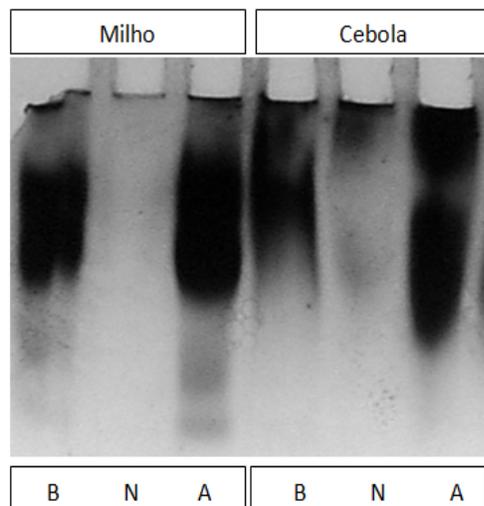


Figura 4. Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima fosfatase ácida em plântulas de milho e cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

Na Figura 5 encontra-se o padrão eletroforético da enzima GOT, que é responsável pela oxidação de aminoácidos, fornecendo energia para o Ciclo de Krebs ou a redução do α -cetoglutarato para a síntese de novos aminoácidos, como fonte de energia ao embrião em desenvolvimento (Tunes et al., 2010). Baseado nos autores citados anteriormente visualiza-se que não houve expressão em milho, pois a plântula já estava totalmente desenvolvida. No entanto, em cebola a expressão não é distinguida entre os tratamentos, pois o pH não influencia o mesmo.

Na enzima GDH (Figura 6), houve o mesmo padrão de bandas para as plântulas de milho. Nas plântulas de cebola houve diferentes intensidades de banda conforme o pH. Essa enzima catalisa a reação reversível que sintetiza ou desamina glutamato em parte do processo de assimilação de nitrogênio. Essa é considerada uma via alternativa de assimilação de amônia (Taiz & Zeiger, 2006).

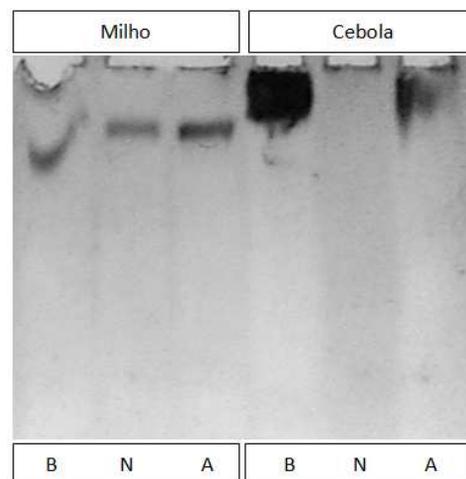


Figura 6. Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima glutamato desidrogenase em plântulas de milho e de cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

Na Figura 7 é possível verificar que não há diferenciação nas bandas da enzima PO, no entanto no milho com pH alto há uma maior expressão que nos outros tratamentos ou no ocorrido com a cebola. O peróxido de hidrogênio é removido pelas PO, que estão associadas aos processos bioquímicos e fisiológicos como crescimento, formação celular, desenvolvimento de frutos, biossíntese do etileno, bem como resposta a vários estresses (Lima, 2008). Portanto, as plântulas de milho desenvolvidas em pH alto podem sofrer algum tipo de estresse.

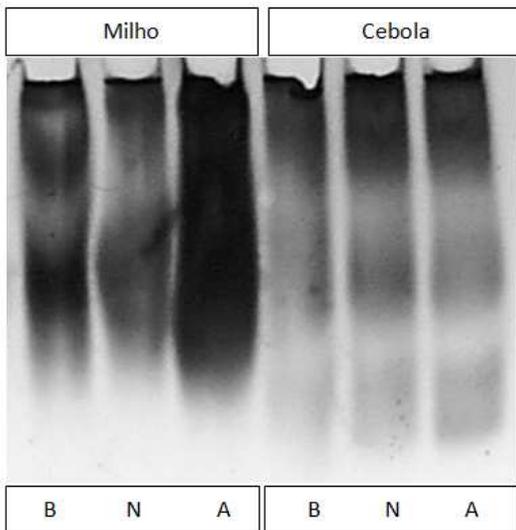


Figura 7. Padrões eletroforéticos obtidos com a peroxidase plântulas de milho e de cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

Na Figura 8 é visualizada a expressão da enzima SOD. Essa enzima converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. O radical superóxido é um de uma série de espécies de oxigênio ativo que pode ser muito danoso para membranas biológicas, mas ele pode ser eliminado pela ação de uma série de enzimas incluindo a superóxido dismutase (Taiz & Zeiger, 2006).

A não expressão da enzima SOD demonstra que o pH não influencia na formação de radicais superóxido e com isso na integridade das membranas. Entretanto, pode indicar que o pico de atividade da mesma é distinto do momento desta análise.

Em geral, não há diferenciação enzimática em pH neutro nas enzimas deste estudo, exceto na enzima PO.

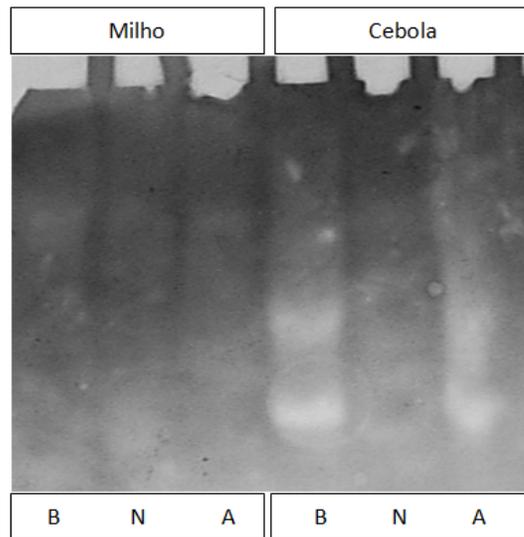


Figura 8. Padrões eletroforéticos obtidos com a superóxido dismutase plântulas de milho e de cebola originadas de sementes germinadas em condições de pH baixo (B), normal (N) e alto (A).

CONCLUSÃO

O papel mata borrão libera mais solutos para o meio substrato.

Independente do pH inicial, o mesmo tende a se neutralizar ao longo do tempo.

Não há diferença significativa no resultado do teste de germinação independentemente do pH utilizado. Nas análises enzimáticas somente há diferenciação em pH neutro para a enzima PO.

REFERÊNCIAS

- Alfenas, A. C.** 1998. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa: UFV, 574 p.
- Brasil.** 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 395 p.
- Camargo, M.L.P., E.S. Mori, E.J. De Mello, S. Oda & G.P. Lima.** 2000. Atividade enzimática de sementes envelhecidas artificial e naturalmente. Ciênc. Florest. 10:113-122.
- Canteri, M.G., R.A. Althaus, J.S. Virgens Filho, E.A. Giglioti & C.V. Godoy.** 2001. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. Revista Brasileira de Agrocomputação, 1(2):18-24.
- Canossa, R.S.** 2008. Effect of temperature and light on joyweed (*Alternanthera tenella*) seed germination. Planta Daninha, 26(4):745-750.

- Chan, C.T.** 1937. Study of the relation of different pH values of nutrient solution and tree seed germination. Journal Agricultural Assn, [S.l.], 158:21-47.
- Custodio, C.C., D.C Bomfim, S.M. Saturnino, & N.B. Machado Neto.** 2002. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), 59(1):145-153.
- Dawson, R.M.C., D.C. Elliot, W.H. Elliot & K.M. Jones.** 1986. Data for Biochemical Research; 3rd ed., Oxford Science Publ.
- Degremont.** 1991. Water treatment handbook; 6ª Ed.
- Ghaderi-Far, F., J. Gherekhloo & M. Alimaghham.** 2010. Influence of environmental factors on seed germination and Seedling emergence of yellow sweet clover (*Melilotus officinalis*). Planta Daninha, Viçosa, 28(3): 463-469.
- Ikeda, F.S.** 2008. Light and KNO₃ on *Tridax procumbens* seed germination at constant and alternating temperatures. Planta Daninha, 26(4):751-756.
- International Seed Testing Association.** 2012. Handbook of vigour test methods. 3.ed. Zürich: ISTA, 117p.
- Lide, D.R. & F. Taylor.** 2011. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 92 ed. (Internet version) Boca Raton. Florida. Disponível em: www.hbcpnetbase.com. Visualizado em 23/01/2012.
- Lima, M.G.S.** 2008. Detecção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) crescidas sob estresse salino. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 93f.
- Machado, R.F., A.C.S.A. Barros, P.D. Zimmer & A.S. Amaral.** 2006. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. Revista Brasileira de Sementes, 28(3):151-160.
- Manchenko, G.P.** 2000. Handbook of detection of enzymes in electrophoretic gels. CRC Press, Boca Raton, 341p.
- Rizzardi, M.A., A.R. Luiz, E.S. Roman & L. Vargas.** 2009. Effect of cardinal temperature and water potential on morning glory (*Ipomoea triloba*) seed germination. Planta Daninha, 27(1): 13-21.
- Santos, C.M.R., N.L. Menezes & F.A. Villela.** 2004. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. Revista Brasileira de Sementes, 26(1):110-119.
- Scandalios, J. G.** 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. Biochemical Genetics, 3: 37-39.
- Souza Filho, A.S. & S. Dutra,** 1998. Germination of seeds of *Calopogonium mucunoides*. Pasturas Tropicales, 20:26-30.
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2006. Plant Physiology. 4º Ed. 764p.
- Tunes, L.M., D.C. Pedroso, G.E. Meneghello, M.A. Castro, A.C.S.A. Barros, P.G. Badinelli & M.F.B. Muniz.** 2010. Perfil enzimático em sementes de cevada em resposta a diferentes concentrações salinas. Interciencia, 35(5): 369-373.
- Wagner Júnior, A., J.R.S. Negreiros, R.S. Alexandre, L.D. Pimentel & C.H. Bruckner.** 2007. Efeito do pH da água de embebição e do trincamento das sementes de maracujazeiro amarelo na germinação e desenvolvimento inicial. Ciênc. Agrotec., Lavras, 31(4):1014-1019.