

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PAMELA THAÍSA BRESSAN**

**QUALIDADE DAS SEMENTES DE CEVADA EM FUNÇÃO DA MATURIDADE  
FISIOLÓGICA: PARÂMETRO FISIOLÓGICO E EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL DE ENZIMAS ASSOCIADAS À GERMINAÇÃO**

**PONTA GROSSA  
2018**

PAMELA THAÍSA BRESSAN

**QUALIDADE DAS SEMENTES DE CEVADA EM FUNÇÃO DA MATURIDADE  
FISIOLÓGICA: PARÂMETRO FISIOLÓGICO E EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL DE ENZIMAS ASSOCIADAS À GERMINAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura. Linha de pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline de Jesus Coelho.

PONTA GROSSA  
2018

B843 Bressan, Pamela Thaísa  
Qualidade das sementes de cevada em função da maturidade fisiológica: parâmetro fisiológico e expressão gênica diferencial de enzimas associadas à germinação/ Pamela Thaísa Bressan. Ponta Grossa, 2018. 72 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura – Linha de pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre  
Coorientadora: Profa. Dra. Caroline de Jesus Coelho

1. *Hordeum vulgare*. 2. Semente. 3. Germinação. 4. Malte. 5.  $\alpha$ -amilase. 6.  $\beta$ -amilase. I. Novembre, Ana Dionísia da Luz Coelho. II. Coelho, Caroline de Jesus. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Agronomia. IV. T.

CDD : 633.16



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: **“Qualidade das sementes de cevada em função da maturidade fisiológica: Parâmetro fisiológico e expressão gênica diferencial de enzimas associadas à germinação”.**

Nome: Pamela Thaisa Bressan

Orientador: Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Profª Drª Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Martiello

Prof. Dr. Osmar Paulo Beckert

Data da Realização: 28 de Setembro de 2018.

**DEDICO** a Deus e aos meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, proteção e por me dar suporte na realização de mais uma etapa em minha vida.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao curso de Pós graduação em Agronomia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana D. L. C. Novembre, pela orientação, dedicação, compreensão e por compartilhar seu conhecimento durante a realização desse trabalho.

À minha coorientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Caroline de Jesus Coelho, por sua dedicação e por sempre estar disposta a me ajudar em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello por disponibilizar o Laboratório de Genética Molecular para execução de minhas análises, pelo auxílio e por compartilhar seu conhecimento e, também, por ceder todos os materiais do laboratório.

À minha família, principalmente meus pais, ao Tomas e meus amigos pelo apoio. Agradeço em especial minha mãe, Dilce, por sempre me incentivar e me ajudar de forma incondicional.

À empresa Protecta, em particular aos Eng. Agrônomos Fabio Schmidt e Fernando Campagnoli, pela disponibilização das áreas para a coleta das sementes utilizadas e por dedicarem parte de seu tempo para me auxiliar.

À empresa Gourmet Malz, principalmente a Lorna Hosoya, por disponibilizar a micro maltaria para realização de parte deste trabalho e pela colaboração.

Ao Laboratório de Análise de Sementes da Escola Superior Luiz de Queiroz, principalmente a Eng. Agrônoma MSc. Helena M. C. Pescarin Chamma por compartilhar seus conhecimentos e me proporcionar mais segurança para realização das análises.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial à Zima Richter pela colaboração.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para essa realização, meus sinceros agradecimentos.

BRESSAN, Pamela Thaísa. **Qualidade das sementes de cevada em função da maturidade fisiológica: parâmetro fisiológico e expressão gênica diferencial de enzimas associadas à germinação**. 2018. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Ponta Grossa.

## RESUMO

A germinação das sementes de cevada é essencial para a produção do malte e a degradação enzimática do amido em açúcares solúveis é parte do processo de germinação dessas sementes. O objetivo desse trabalho foi avaliar o parâmetro fisiológico de sementes de cevada, através de testes de germinação e de vigor, em função de diferentes momentos de colheita, armazenadas ou não, e a influência da expressão diferencial dos genes, que codificam as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase. Assim, as sementes das cultivares BRS Cauê e Irina foram produzidas em 2017 e colhidas aos 99 (32% de água), 104 (19,18% de água), 107 (17,92% de água) e 114 (15,89% de água) dias após a semeadura (DAS) para BRS Cauê e 102 (32,76% de água), 107 (20,27% de água), 121 (13,63% de água) e 127 (17,43% de água) DAS para a Irina. A qualidade das sementes foi avaliada logo após a colheita e após o armazenamento por 111 dias (BRS Cauê) e 107 dias (Irina). As sementes mantiveram dormência, principalmente na avaliação inicial; a qualidade das sementes foi superior quando colhidas aos 114 DAS (15,89% de água) para as sementes da cultivar BRS Cauê e aos 107 (20,27% de água) para Irina, sem variação da qualidade das sementes avaliadas após o armazenamento. O nível da expressão diferencial do gene da  $\alpha$ -amilase para as sementes da cultivar BRS Cauê colhidas aos 114 DAS foi superior, independentemente da época de avaliação e aos 99 DAS inicialmente. Para Irina os maiores níveis de expressão foram obtidos quando as sementes foram colhidas aos 127 DAS. O nível de expressão do gene da  $\beta$ -amilase foi superior para as sementes colhidas aos 99 DAS para BRS Cauê e aos 102 DAS para Irina avaliadas logo após a colheita, com redução após o armazenamento. A dormência das sementes favoreceu a manutenção da qualidade fisiológica, independentemente do momento em que foram colhidas. Não é possível estabelecer correlação entre os resultados dos testes de germinação e de vigor das sementes de cevada e a expressão gênica para este experimento, evidenciando a complexidade dessa relação e a necessidade de mais estudos que possam melhor elucidá-la.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hordeum vulgare*. Semente. Germinação. Malte.  $\alpha$ -amilase.  $\beta$ -amilase.

BRESSAN, Pamela Thaísa. **Quality of barley seeds as a function of physiological maturity: physiological parameter and differential gene expression of enzymes associated with germination.** 2018. Master's Dissertation in Agronomy - State University of Ponta Grossa.

### ABSTRACT

The germination of the barley seeds is essential for the production of malt and enzyme degradation of the starch to soluble sugars, makes part of this seed germination process. The objective of this study was to evaluate the physiological parameters of barley seeds, from germination and vigor tests, depending of the harvests close to physiological maturity, stored or not, and the influence of the differential expression of the genes which codify to  $\alpha$  amylase and  $\beta$ -amylase enzymes. The seeds of BRS Cauê and Irina were cultivate in 2017 and harvested at 99 (32% water), 104 (19.18% water), 107 (17.92% water) and 114 (15.89% water) days after sowing (DAS) to BRS Cauê and 102 (32.76% water), 107 (20.27% water), 121 (13.63% water) and 127 (17.43 % water) DAS to Irina. The seed quality was evaluated immediately after harvesting and storage for 111 days (BRS Cauê) and 107 days (Irina). The seeds kept dormancy, mainly in the initial evaluation; (15.89% water) for seeds from BRS Cauê and 107 (20.27% water) for Irina, without variation in the quality of the seeds evaluated after storage. The differential expression level of gene coding to  $\alpha$ -amylase, to the seeds of BRS Cauê harvested at 114 DAS, was higher, regardless of the evaluation time and the 99 DAS. For Irina the highest levels of expression were obtained when the seeds were harvested at 127 DAS. The level of expression of the gene coding to  $\beta$ -amylase was higher for seeds harvested at 99 DAS for BRS Cauê and 102 DAS for Irina initially evaluated, with decrease after storage. Seed dormancy favored the maintenance of seed quality, regardless of when they were harvested. It is not possible to establish a correlation between the results of germination and vigor tests of barley seeds and gene expression for this experiment, evidencing the complexity of this relationship and the requirement for research that can better elucidate it.

**KEYWORDS:** *Hordeum vulgare*. Seed. Germination. Malt.  $\alpha$  -amylase.  $\beta$ -amylase.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Croqui experimental da área de produção das sementes de cevada, para cada um dos experimentos com as cultivares BRS Cauê e Irina, colhidas em quatro momentos..... 29
- Figura 2 - Sementes da cevada envolvidas pelo tecido do tipo tule para o processo de maceração (A). Sementes no tanque durante o processo de maceração (B).....34
- Figura 3 - Expressão relativa dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 em função de dois momentos de colheita (99 DAS e 114 DAS), analisadas inicialmente e aos 111 dias (A/I e A/111), das sementes de cevada da cultivar BRS Cauê. Ponta Grossa, 2018.....50
- Figura 4 - Expressão relativa dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 em função de dois momentos de colheita (102 DAS e 127 DAS), analisados inicialmente e aos 107 dias (A/I e A/107) das sementes de cevada da cultivar Irina. Ponta Grossa, 2018.....51
- Figura 5 - Correlação canônica entre as variáveis fisiológicas e a expressão dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 em função de dois momentos de colheita (99 DAS e 114 DAS), analisadas inicialmente e aos 111 dias das sementes de cevada da cultivar BRS Cauê. Ponta Grossa, 2018.....53
- Figura 6 - Correlação canônica entre as variáveis fisiológicas e a expressão dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 em função de dois momentos de colheita (102 DAS e 127 DAS), avaliadas inicialmente e aos 107 dias das sementes de cevada da cultivar Irina. Ponta Grossa, 2018.....54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Dados de temperatura e precipitação média durante a produção das sementes de cevada e média histórica dos últimos 5 anos. Fonte: Sma, Fundação ABC, 2018. Fonte: Sma, Fundação ABC, 2018.....30
- Tabela 2 - Descrição dos tratamentos. Datas das colheitas e teor de água das sementes correspondente.....30
- Tabela 3 - Dados de temperatura e precipitação média durante a produção das sementes de cevada e média histórica dos últimos 5 anos. Fonte: Sma, Fundação ABC, 2018.....31
- Tabela 4 - Descrição dos tratamentos. Datas das colheitas e teor de água das sementes correspondente.....31
- Tabela 5 - Desdobramento das médias dos testes de germinação e de tetrazólio de sementes de cevada, cultivar BRS Cauê, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 111 dias..... 38
- Tabela 6 - Desdobramento das médias dos testes de germinação e de tetrazólio de sementes de cevada, cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.....41
- Tabela 7 - Desdobramento das médias das avaliações da primeira contagem de germinação (1ª CG), e do índice de velocidade de germinação (IVG) e do teste de envelhecimento acelerado de sementes de cevada, cultivar BRS Cauê, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 111 dias.....42
- Tabela 8 - Desdobramento das médias das avaliações da primeira contagem de germinação (1ª CG) e do índice de velocidade de germinação (IVG) e do teste de envelhecimento acelerado de sementes de cevada, cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.....44
- Tabela 9 - Desdobramento das médias das avaliações da emergência da plântula e do índice de velocidade de emergência da plântula (IVEP), de plântulas originadas das sementes de cevada, cultivar BRS Cauê, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 111 dias.....45
- Tabela 10 - Desdobramento das médias do teste de emergência da plântula e do índice de velocidade de emergência da plântula (IVEP), de plântulas originadas das sementes de cevada, cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.....46

Tabela 11 - Desdobramento das médias dos comprimentos da parte aérea e da raiz das plântulas de cevada, originadas das sementes, da cultivar BRS Cauê, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 111 dias.....	47
Tabela 12 - Desdobramento das médias dos comprimentos da parte aérea e da raiz das plântulas de cevada, originadas das sementes, da cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.....	47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1 CEVADA .....	15
3.2 CEVADA NO BRASIL .....	16
3.3 QUALIDADE INDUSTRIAL DE CEVADA PARA MALTE .....	18
3.4 PARÂMETRO FISIOLÓGICO DAS SEMENTES DE CEVADA: COLHEITA E ARMAZENAMENTO .....	20
3.5 GERMINAÇÃO E DORMÊNCIA DE SEMENTES DE CEVADA .....	22
3.6 ENZIMAS RELACIONADAS COM A GERMINAÇÃO E O PROCESSO DE MALTAGEM DA SEMENTE DA CEVADA .....	24
3.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS .....	26
3.8 EXPRESSÃO DE GENES PELA TÉCNICA DE QRT-PCR (QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION) .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 Avaliação das sementes da cultivar BRS Cauê .....	29
4.2 Avaliação das sementes da Cultivar Irina .....	30
4.3 Amostragem das sementes .....	31
4.4 Análises de Parâmetro Fisiológico .....	32
4.4.1 Teor de água das sementes (TA) .....	32
4.4.2 Massa de mil sementes .....	32
4.4.3 Germinação (G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) .....	32
4.4.4 Comprimento da plântula (CP) .....	32
4.4.5 Envelhecimento acelerado (EA) .....	32
4.4.6 Teste de Tetrazólio (TTZ) .....	33
4.4.7 Emergência da Plântula (EP) e Índice de Velocidade de Emergência da Plântula (IVEP) .....	33
4.5 Análise da expressão gênica das enzimas por RT-qPCR (EG) .....	33
4.6 Extração de RNA total .....	34
4.7 Expressão gênica por qRT-PCR .....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
5.1 massa de mil sementes .....	37
5.2 Testes de germinação e de tetrazólio .....	37
5.3 Teste de 1ª contagem de germinação .....	41

5.4	Índice de velocidade de germinação .....	42
5.5	Teste de envelhecimento acelerado .....	43
5.6	Emergência de plântula e índice de velocidade de emergência de plântula...	44
5.7	Comprimento de parte aérea e de raiz de plântulas .....	46
5.8	Expressão gênica diferencial por RT-qPCR .....	48
5.9	Correlação Canônica .....	52
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) é originária da região denominada na antiguidade de “*Fertile Crescent*”, no Oriente Médio (STANCA, 2016). É um cereal altamente adaptável e está distribuído por inúmeras regiões do mundo (ZHOU, 2010).

No Brasil o cultivo de cevada está concentrado na região Sul, uma vez que, nesta região as condições de clima e de solo são favoráveis ao desenvolvimento da cultura. Em comparação à outros cereais de inverno, a cevada se torna uma boa opção no que diz respeito ao ciclo da cultura, possibilitando a antecipação da semeadura e da colheita, o que favorece o cultivo das culturas de verão aumentando a eficiência das áreas agrícolas.

A produção no país tem como objetivo principal o malte cervejeiro, destino economicamente vantajoso para os grãos de cevada, principalmente no cenário atual, em que houve o aumento da produção das cervejas artesanais. Neste tipo de produto o malte da cevada é requerido em maior proporção (BOND et al., 2015). No entanto, de acordo com Punda & Prikhodko (2009) existem padrões específicos para a comercialização da cevada para fins cervejeiros, como o tamanho e o teor de proteínas nas sementes.

A área de produção de cevada no Brasil no ano 2017 diminuiu 2,45% quando comparada com a safra de 2016. Além disso, a produtividade que havia aumentado de 2.568 kg ha<sup>-1</sup> para 3.921 kg ha<sup>-1</sup> da safra 2015 para a 2016, reduziu em 2017 para 2.667 kg ha<sup>-1</sup>. Dentre os estados produtores o Paraná destacou-se na safra 2017 com a maior produção, sendo de 169,1 mil toneladas (CONAB, 2017).

Segundo a Embrapa (2012), 75% da produção nacional são destinados para a indústria, 19% para produção de ração animal e 6% representam o mercado da produção de sementes. A semente é o principal insumo para a produção agrícola, condicionando a produtividade, tanto em quantidade como em qualidade, de forma que a utilização de sementes com qualidade diferenciada é fundamental para o êxito de qualquer cultura (REUSS et al., 2003). Ainda, particularmente para o cultivo da cevada, visando a malteação, a qualidade das sementes é essencial, visto que a eficiência desse processo depende da germinação e do vigor das sementes.

A obtenção de sementes com qualidade superior está diretamente relacionada com determinação do momento ideal de colheita. Neste sentido, verifica-se que o ponto de maturidade fisiológica de uma semente caracteriza o momento ideal para a colheita, uma vez que, atinge neste ponto seu máximo de germinação e vigor.

Segundo Delouche (1980) o intervalo entre a maturidade fisiológica e a colheita é crítico, isso porque a partir da maturidade fisiológica a semente está apenas fisicamente ligada à planta, com alta umidade, sujeita as intempéries e injúrias. Com a oscilação de umidade da semente pode haver prejuízos para a secagem natural e o comprometimento da qualidade (SILVA, 2007).

No sentido de verificar a qualidade das sementes, o parâmetro fisiológico é regularmente estudado, devido às mudanças degenerativas de origem bioquímica, fisiológica e física após a maturidade das sementes, as quais estão diretamente ligadas à redução de vigor (TUNES, 2009). A redução do parâmetro fisiológico está relacionada com a alteração de processos bioquímicos que comprometem as atividades metabólicas. Dessas alterações destacam-se as mudanças das atividades enzimáticas nos processos de síntese, nos compostos de reserva e nas membranas celulares (McDONALD, 1999).

As enzimas hidrolíticas atuam na conversão do amido, principal forma de reserva em cereais, em açúcares solúveis (LI et al., 2014). São imprescindíveis para o processo de germinação e de maltagem, destacando-se neste processo as enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases (SCHMITT et al., 2013). Essas enzimas são produtos da expressão gênica e são significativamente influenciadas pelo ambiente, isso porque 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).

A partir do exposto, a utilização de ferramentas da biologia molecular associadas ao controle de qualidade das sementes tem sido de grande valia, e vem apresentado rápida evolução para estes tipos de pesquisas. Dessa forma, tecnologias de análise de expressão gênica diferencial são muito importantes na comparação de processos biológicos. A técnica de qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) tem se mostrado promissora em estudos que buscam ampliar o entendimento dos processos envolvidos na formação e na preservação da qualidade das sementes, podendo assim, ser usada para avaliar a expressão de genes correlacionados à este caráter durante o processo de germinação de sementes.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar alterações no parâmetro fisiológico e na expressão diferencial de genes que regulam enzimas importantes para os processos de germinação e da maltagem de sementes de cevada de duas cultivares comerciais.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (i) Avaliar o parâmetro fisiológico, através de testes de germinação e de vigor, de sementes de duas cultivares de cevada colhidas em diferentes momentos após a maturidade fisiológica e submetidas ou não ao armazenamento;
- (ii) Quantificar a expressão diferencial dos genes responsáveis pela regulação das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase em resposta aos momentos de colheita das sementes de duas cultivares de cevada submetidas ou não ao armazenamento.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CEVADA

A planta da cevada (*Hordeum vulgare* L.) é da família Poaceae, seu cultivo é realizado com a espécie *Hordeum vulgare* L. que é classificada em duas subespécies, *Hordeum vulgare* sp. vulgare, a qual representa todas as formas cultivadas, e *Hordeum vulgare* sp. spontaneum, as cevadas selvagens (MINELLA, 2000). São plantas diploides ( $2n=2x=14$  cromossomos), autógamas, monoicas, herbáceas e anuais (TUNES, 2009), sendo a principal característica morfológica a inflorescência em forma de espiga (NILAN & ULLRICH, 1993). É originária da região denominada na antiguidade de Crescente Fértil ("*Fertile Crescent*") no Oriente Médio, que hoje compreende parte de países como a Jordânia, Síria, Turquia e Irã (STANCA, 2016).

As principais utilizações dessa planta são para a alimentação animal na fabricação de rações, pastagem, feno e silagem, assim como, a preparação do malte na indústria cervejeira, podendo ainda ser utilizada na fabricação de uísque e na indústria de fabricação de farinha para panificação (AGROLINK, 2010).

A classificação da cevada pode ser feita em função da utilização, da época da semeadura e do posicionamento das sementes na espiga (ZCSHOERPER, 2009). Assim, a cevada pode ser classificada como cervejeira ou forrageira, sendo que para a cervejeira são estabelecidos padrões químicos, físicos e biológicos de qualidade visando à produção do malte. Por outro lado, a forrageira por não se enquadrar nestes padrões, é destinada exclusivamente para a alimentação animal. Em relação à época de semeadura pode ser classificada como cevada de inverno ou de verão, sendo que no Brasil apenas a cevada de inverno é cultivada (KUNZE, 1999; ZCSHOERPER, 2009).

A classificação usual para distinção de variedades é baseada na posição das sementes na espiga, podendo ser duas e seis fileiras. A cevada de seis fileiras corresponde à que tem seis flores em cada nó da espiga central que, se fecundadas, originarão as seis fileiras na espiga, essa cevada produz grãos de tamanhos desiguais, achatados, menores e que têm mais proteínas quando comparados com os grãos da cevada de duas fileiras (TSCHOPE et al., 1999). Na cevada de duas fileiras apenas as flores centrais são fecundadas, proporcionando o desenvolvimento similar entre os grãos. Essa cevada é utilizada principalmente para a produção da

cerveja, já que possui quantidades relativas maiores de amido, pericarpo fino e teores reduzidos de compostos fenólicos e amargos (KUNZE, 1999).

A cevada é o quarto cereal em importância econômica no mundo, suplantado apenas pelo trigo, arroz e milho, sua produção está concentrada principalmente nas regiões de clima temperado da Europa e América do Norte. A produção mundial de cevada em 2016 foi de 147.277,993 milhões de toneladas em uma área colhida de 46.923,218 milhões de hectares, sendo a Rússia a maior produtora com 17.992,517 milhões de toneladas, seguida pela Alemanha com produção de 10.730,500 milhões de toneladas e a França com 10.306,008 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2018).

O aumento do rendimento da planta de cevada é considerado baixo quando comparado com o dos demais cereais. A produção mundial de cevada aumentou aproximadamente de 100 milhões de toneladas em 1960 para mais de 170 milhões de toneladas em meados dos anos 80 e diminuiu para 140 milhões de toneladas em 2000. Em comparação, a produção de arroz, milho e trigo tem aumentado de forma contínua nos últimos anos, chegando a ser três vezes mais do que no início dos anos 60. O aumento na produção total de cevada deve-se principalmente ao incremento da produtividade, isso devido a área de produção que se manteve relativamente a mesma ou até mesmo diminuiu nos últimos anos (ZHOU, 2010).

Da produção mundial, 65,8% é destinada para alimentação animal, 18,9% para o processamento industrial, 6,9% para sementes, 4,7% para a alimentação humana e 0,4% para outros usos (EMBRAPA, 2012).

A produção de cevada é amplamente distribuída por inúmeras regiões do mundo e é considerada o cereal mais adaptável, podendo ser produzido em locais onde outros cereais, como o milho e arroz, não se desenvolvem bem (ZHOU, 2010). Devido a isso e aos seus inúmeros usos, as práticas de manejo são bastante variáveis, sendo as práticas de produção da cevada destinada a produção de malte as mais rigorosas, devendo atender especificações de germinação, quantidade de proteínas e tamanho de grãos (HORSLEY et al., 2016).

### 3.2 CEVADA NO BRASIL

No cenário nacional a produção de cevada em escala comercial é exclusivamente para a fabricação do malte cervejeiro. A expansão dessa cultura em nosso país foi fomentada principalmente pelas indústrias cervejeiras na década de 70 devido ao aumento do custo de importação. Desde então houve aumento significativo

na área de produção e, principalmente, na produtividade da cevada, graças ao incentivo oficial para construção de maltarias, financiamentos, garantia de preços da produção e ao desenvolvimento de pesquisas pela Embrapa (EMBRAPA, 2012).

Atualmente o Brasil ocupa a 16ª colocação na produção de cevada, a qual se concentra na região Sul do país, devido a condições favoráveis de clima e solo. Nessa região, o cultivo da cevada é uma opção em função do ciclo da cultura e da adaptação ao frio; quando comparada aos demais cereais de inverno, possibilita a antecipação da semeadura e da colheita e o cultivo de outras culturas na propriedade (MINELLA, 2014).

Quando se trata de importação nosso país passa a ser o 7º colocado, isso porque a produção nacional supre apenas 35% da demanda das maltarias nacionais (MINELLA, 2014). Para suprir a demanda da indústria cervejeira, são importadas em torno de 400 mil toneladas de cevada anualmente e 1,3 milhões de toneladas de malte, sendo os países do Mercosul os principais fornecedores (PORPINI, 2016).

Cerca de 91% da cevada semeada é proveniente da pesquisa nacional, as cultivares BRS, que identificam as cultivares desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético liderado pela Embrapa. A maior parte das áreas é cultivada com os cultivares BRS Brau, BRS Elis e BRS Cauê (MINELLA, 2016). No entanto, empresas multinacionais procuram adaptar outros genótipos de cevada no país, como é o caso das cultivares Danielle e Irina da empresa KWS, que foram lançadas no ano de 2017 e que possuem potencial produtivo e qualidade para o malte diferenciada.

A área destinada para o cultivo de cevada na safra de 2017 foi de 109,2 mil hectares, 2,45% a menos quando comparada a do ano de 2016. Já a produtividade reduziu 31,97%, de 3.920 kg ha<sup>-1</sup> em 2016 para 2.667 kg ha<sup>-1</sup> em 2017. O estado do Paraná é o principal produtor com 169,1 mil toneladas, detentor de 58,05% da produção brasileira, seguido pelos Estados do Rio Grande do Sul com 118,8 mil toneladas e Santa Catarina com 3,4 mil toneladas (CONAB, 2017).

Ainda segundo a Conab (2017) a redução na produtividade, principalmente no estado do Paraná é decorrente das condições climáticas não favoráveis para a planta, como o estresse hídrico nas fases de floração e de formação dos grãos, além de um outro fator agravante, que foi o atraso da colheita das lavouras tardias, em função do excesso de chuva no final do ciclo da planta.

A região de Guarapuava é responsável pela maior parte da produção do Estado do Paraná, no entanto, a região de Ponta Grossa é a que mais expande sua

produção, com um avanço de 145% na área semeada na safra de 2015, com o aumento da área de 12,5 mil hectares para 30,6 mil hectares (SEAB, 2015)

A produção de cerveja no Brasil aumentou nos últimos 30 anos, ocupando o terceiro lugar no ranking mundial com 140 milhões de hectolitros, atrás apenas da líder China (460 mi hl) e dos EUA (221 mi hl) e a frente da Alemanha (95 mi hl) e da Rússia (78 mi hl) (BRASIL, 2017). Atualmente estão registradas 610 cervejarias no Brasil, sendo que 91 destas foram registradas apenas no ano de 2017, esse crescimento se dá numa razão de seis vezes, desde 2007 (BRASIL, 2017) e é devido as novas tendências de mercado como as cervejas artesanais produzidas em micro maltarias. Essa produção crescente requer cada vez mais investimentos e estudos que propiciem a otimização da produção de cevada, tanto em quantidade como em qualidade.

### 3.3 QUALIDADE INDUSTRIAL DE CEVADA PARA MALTE

Em 1516 foi estabelecida uma Lei da pureza da cerveja "*The Reinheitsgetbot*" que limitava a produção da cerveja apenas com a utilização do malte de cevada, do lúpulo e da água (PALMER, 2006). Outros elementos, atualmente, podem ser adicionados na fabricação de cerveja, elementos esses que visam à redução do custo de produção, sendo os mais utilizados são o arroz, o milho e a cana de açúcar (KUNZE, 2006).

Ainda segundo Kunze (2006) o objetivo da malteação é estimular alterações básicas no metabolismo, conhecida como "solubilização do grão", ou seja, a decomposição do amido e das proteínas, induzindo a produção e a ativação de enzimas pré-existentes ou não, que transformam substâncias de alto peso molecular em outros produtos de médio e baixo peso molecular, formando os componentes que caracterizam o aroma, a cor e o sabor da cerveja.

A produção do malte representa uma forma econômica favorável de destinação para os grãos de cevada, especialmente nos últimos anos graças a um aumento da produção de cervejas artesanais, que utilizam o malte de cevada em maior proporção (BOND et al., 2015).

Na portaria 691/96 do MAPA está estabelecido que a cevada para ser comercializada para fins de malteação deve ter os seguintes padrões: germinação mínima de 95%, máximo de 12% de proteínas, grau de umidade máximo de 13%, mínimo de 95% de pureza varietal, máximo de 3% de material estranho e máximo de

5% de grãos avariados (BRASIL, 1996). Além desses parâmetros os grãos são classificados por tamanho, com reflexos no preço pago pela indústria cervejeira, em: primeira classe: grãos inteiros de cevada que ficam retidos nas peneiras de 2,8 e 2,5 milímetros; segunda classe: grãos inteiros de cevada que passam pela peneira de 2,5 milímetros, mas que ficam retidos na peneira de 2,2 milímetros e terceira classe: inclui os grãos que passam na peneira de 2,2 milímetros, acrescidos dos avariados, das impurezas e matérias estranhas retidas em quaisquer das peneiras.

A preservação da germinação das sementes de cevada após a colheita é essencial para o processo de maltagem da indústria cervejeira. Esse processo se dá pela germinação da semente em temperatura, umidade e aeração controladas, com o objetivo de produzir enzimas em quantidades adequadas para a completa hidrólise do amido e outros polissacarídeos, após essa etapa o processo é cessado pela secagem do malte verde (VENTURINE FILHO, 2000).

O baixo teor de proteína é outra característica importante, isso porque o excesso de proteínas reduz a quantidade de amido e aumenta o tempo de maltagem. Além disso, maior teor proteico equivale a maior teor de proteínas solúveis e albuminas no malte, essas passam para o mosto, que poderá dar origem à cerveja de baixa estabilidade (FLORIANI, 2002). Os programas de melhoramento genético estão sempre em busca da seleção de genótipos que apresentem baixo teor de proteína no grão (MUURINEN et al., 2006). Outros fatores que contribuem para a preferência do malte de cevada são o alto índice de amido no grão e enzimas, além do sabor e aroma característicos (KUNZE, 2006).

A otimização do processo de maltagem tem sido grande motivação para estudos de germinação de sementes de cevada (BRIGGS, 2002). Até quase o final do século XX, a grande maioria dos estudos foram fisiológicos, já as pesquisas mais recentes envolvem estudos moleculares como a transcriptômica, proteômica e metabolômica, análises que visam maior esclarecimento sobre parâmetros fisiológicos centrais e vias metabólicas. Para entender as implicações dos dados moleculares nos estudos de germinação de sementes de cevada, o contexto fisiológico claramente definido é um pré-requisito, incluindo a distinção e função dos tecidos da semente, suas interações e mudanças durante a germinação e o desenvolvimento de plântulas (DANERI-CASTRO et al., 2016).

### 3.4 PARÂMETRO FISIOLÓGICO DAS SEMENTES DE CEVADA: COLHEITA E ARMAZENAMENTO

A qualidade de sementes envolve diversos aspectos, sendo esses genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários. De acordo com Carvalho & Nakagawa (2000) esses aspectos quando avaliados em conjunto possibilitam conhecer o real potencial de utilização das sementes. A avaliação do parâmetro fisiológico é imprescindível para as decisões em relação ao aproveitamento das sementes como material de multiplicação.

O parâmetro fisiológico das sementes é influenciado de forma direta pelo genótipo, sendo a qualidade máxima atingida na maturidade fisiológica. A partir da fertilização ocorrem transformações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas que originarão o embrião, o tecido de reserva e o envoltório da semente. O processo de maturação se estende até o momento em que se cessa a transferência de nutrientes da planta mãe para a semente, ponto em que se dá a maturidade fisiológica (DIAS, 2001).

A maturidade fisiológica é o momento em que se tem o peso máximo de matéria seca e que comumente coincide com a máxima germinação e o máximo vigor, para a cevada isso ocorre quando a semente tem em torno de 30% de água (ZIMMER, 2006).

A partir deste momento, haverá a deterioração, cuja intensidade dependerá das condições ambientais entre a maturidade e a colheita e dos demais fatores da produção após a colheita.

Delouche & Baskin (1973) sugeriram que após atingir a maturidade fisiológica ocorre a seguinte sequência de transformações que causam a deterioração da semente: degradação das membranas celulares, redução da atividade respiratória, atraso da germinação, redução do potencial de conservação, redução da taxa de desenvolvimento, redução da uniformidade, aumento da sensibilidade às adversidades do ambiente, redução da emergência em campo, aumento da quantidade de plântulas anormais e morte das sementes.

O intervalo de tempo entre a maturidade fisiológica e a colheita é crucial para a qualidade das sementes, isso porque nesse período de tempo as sementes ficam expostas às condições adversas do ambiente, e ainda, existe a probabilidade de que ocorra a germinação na própria espiga, fator que inviabiliza o grão tanto para produção de sementes como para a indústria de malte (TUNES, 2008).

Sendo assim, o ideal para manter a qualidade da semente é colher assim que a maturidade fisiológica seja atingida, mas devido as implicações práticas desse processo, quando se refere à alta umidade, as sementes permanecem no campo sujeitas a intempéries e outras formas de prejuízo até que se atinja umidade mais baixa (BARROS & PESKE, 2006).

Outro ponto que influencia de forma decisiva a qualidade das sementes são as condições e o período de tempo em que essas são armazenadas. A manutenção das características da semente durante o período de armazenamento deve ser considerada dentro do processo produtivo das culturas, isso devido ao papel crucial da utilização de sementes com alto padrão de qualidade para o sucesso de uma lavoura (REUSS et al., 2003), como também, particularmente para a cultura da cevada, para produção de malte.

Para a maioria das plantas que são propagadas por semente, a época de colheita dificilmente coincide com a época de semeadura, o que obriga a armazenagem dos grãos e sementes, essa é uma das etapas mais críticas para o setor produtivo e pode determinar o sucesso da comercialização do produto agrícola (AGRINOVA, 2000)

Os padrões de qualidade das sementes não podem ser melhorados durante o armazenamento, porém, as condições ideais favorecem a preservação (PÁDUA & VIEIRA, 2001). Os principais fatores atuantes durante o período de armazenamento são a umidade e a temperatura, sendo que a baixa umidade do ar e as baixas temperaturas são mais favoráveis, por que mantêm reduzida a atividade metabólica do embrião (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Segundo Nery et al. (2004) a umidade relativa afeta a longevidade da semente de forma mais acentuada e direta. Quando as sementes são armazenadas com teor de água superior a 13% há danos causados por alterações no metabolismo celular, como o aumento da atividade enzimática e respiratória das sementes (VIEIRA & YOKOYAMA, 2000). A redução do teor de água previne também o desenvolvimento de fungos de armazenamento. Teores a partir de 13,5 a 14 % de água favorecem o desenvolvimento de *Aspergillus* spp. As duas principais sub espécies *A. restrictus* e *A. glaucus* causam redução da germinação e do vigor das sementes porque colonizam em especial o embrião de sementes de cevada (LAZZARI, 2006).

As sementes quando submetidas a um determinado período de armazenamento apresentam diferentes níveis de qualidade, isso devido as condições

a que essas sementes foram submetidas anteriormente. Sendo assim, sementes danificadas durante a colheita e o beneficiamento conservam-se por menos tempo do que as integras (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; TUNES, 2009).

### 3.5 GERMINAÇÃO E DORMÊNCIA DE SEMENTES DE CEVADA

A semente de cevada é constituída pelo embrião, endosperma, camada de aleurona e pericarpo. O pericarpo reveste a semente de cevada e regula a entrada de água e oxigênio, necessários à germinação. A celulose é a principal constituinte do pericarpo e é insolúvel em água, essa é uma das características que torna a cevada a principal opção para produção de malte, pois essa estrutura é mantida durante o processo protegendo o embrião durante a germinação (TONIAZZO, 2014).

A camada de aleurona é delgada e envolve o endosperma, sendo composta por células que são responsáveis pelo transporte hormonal em direção ao endosperma e também por sintetizar enzimas hidrolíticas como  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases e  $\beta$ -glucanases. Essas células permanecem em um estado dormente, até a hidratação da semente para atuarem no metabolismo.

O tecido de reserva de sementes de cevada é o endosperma (triplóide). Esse, é formado por células amiláceas que são utilizadas para manutenção do embrião e para o processo de germinação, até o momento em que a plântula se torne autotrófica. Em torno de 70 a 80% do peso da semente é devido aos grânulos de amido, os quais são revestidos por hemiceluloses e protoplasmas (proteínas) (TSCHOPE, 1999).

O embrião (diploide) de cevada representa de 3 a 4% da semente (TCSHOPE, 1999). Sua função é reprodutiva e é formado por três partes: cotilédone, epicótilo (escutelo) e radícula. O cotilédone é o órgão responsável pelo armazenamento de reservas alimentícias e fornecedor de compostos orgânicos, propiciando o crescimento do embrião durante a germinação. O epicótilo e a radícula completam o eixo embrionário, e darão origem as raízes e ao caule. O epicótilo, que se encontra na parte superior do eixo embrionário é revestido por uma bainha protetora, conhecida como coleóptilo, e dá origem ao primórdio foliar. A radícula, envolvida pela coleorriza, situada na extremidade inferior do eixo, origina as raízes (MERCIER, 2005).

O entendimento das funções de cada parte da semente é importante para compreender conceitos básicos como o de germinação, vigor e dormência. Segundo Bewley (1997) a germinação das sementes se inicia com a embebição de água pela semente e se torna completa com o aparecimento de um tecido embrionário, a

radícula no caso da cevada, que se projeta através das estruturas circundantes. Qualquer processo após isso é correspondente ao crescimento e alongamento das plântulas. Já para Laburiau (1983) a germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado botanicamente como a retomada do crescimento do eixo embrionário, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula. Entretanto, para os tecnólogos de sementes, a germinação é reconhecida como tal, desde que as plântulas apresentem tamanho suficiente para que se possam avaliar a normalidade de suas partes e a sua possibilidade de sobrevivência. A temperatura ideal para germinação de sementes de cevada é de 20°C. Segundo Reuss et al. (2003) a planta da cevada é sensível às precipitações pluviométricas no momento da colheita, o que causa prejuízos para a germinação das sementes.

Outro conceito importante é o vigor de sementes, que segundo Delouche (1980), é definido como uma propriedade inerente à semente e que determina o potencial para uma emergência rápida e uniforme, e o desenvolvimento das plântulas em condições normais ou adversas. Vários são os fatores que podem afetar o vigor das sementes, os principais são a constituição genética, desenvolvimento e nutrição da planta geradora, estágio de maturidade no momento da colheita, tamanho e peso, integridade e grau de deterioração da semente (COPELAND & McDONALD, 1995).

Por fim, a dormência é considerada um estado de repouso fisiológico em que a semente, devido a sua estrutura ou composição química, possui um ou mais mecanismos que bloqueiam a germinação (VILLIERS, 1972). Este fenômeno tem importância fundamental na planta para a sobrevivência e produção agrícola, no entanto, os mecanismos que regulam a dormência ainda não estão totalmente claros (FINKELSTEIN et al., 2008; NONOGAKI, et al, 2014). Os níveis de dormência de sementes geralmente diminuem durante domesticação para garantir que as culturas tenham sucesso para germinar no campo. A compreensão dos mecanismos de dormência podem facilitar a obtenção de variedades de culturas com níveis apropriados de dormência (RODRÍGUEZ et al., 2015; LI et al., 2013).

O fenômeno da dormência é considerado comum. Em ambientes naturais as sementes não germinam logo após o rompimento da ligação com a planta mãe, seja ele de forma natural ou através da colheita realizada por animais, devido a mecanismos internos, físicos ou fisiológicos, que bloqueiam a germinação. Esses mecanismos estão programados geneticamente e ocorrem durante a formação e a maturação da semente, de forma que, logo após a dispersão, a semente ainda não se

encontra apta para germinar. Existem outros fatores além dos genéticos que podem influenciar na dormência, como as condições ambientais durante o período de desenvolvimento e após maturação das sementes (TUNES, et al., 2008<sup>1</sup>).

Para cevada, certo grau de dormência é considerado aceitável já que previne a germinação precoce, ainda na espiga, especialmente em lugares como o Sul do Brasil em que podem ocorrer períodos úmidos e chuvas prolongadas durante a colheita.

A regulação da síntese e degradação de AG (ácido giberélico) e ABA (ácido abscísico) em diferentes fases da germinação controla os processos de germinação e dormência, sugerindo que as sementes de plantas desenvolveram um mecanismo de regulação de transcrição de DNA que pode prevenir expressão antagônica desses genes na mesma fase de germinação (AN & LIN, 2011). Segundo Holdsworth et al. (2008), em *Arabidopsis*, a relação AG/ABA é crucial para a regulação da dormência e germinação de sementes. Quando a proporção é maior, a dormência é mantida. Em contraste, quando a relação é menor, a dormência é liberada e a germinação é favorecida.

O ambiente pode influenciar na intensidade que a dormência se expressa, principalmente quando se trata de temperatura e a ocorrência de precipitações pluviométricas durante períodos críticos da fase de maturação. Estudo de Reiner & Loch (1976) mostrou que entre 12 e 16 dias após o espigamento, a dormência “curta” era induzida por baixas temperaturas, enquanto a dormência mais “longa” era induzida por temperaturas superiores à média.

### 3.6 ENZIMAS RELACIONADAS COM A GERMINAÇÃO E O PROCESSO DE MALTAGEM DA SEMENTE DA CEVADA

A produção de enzimas em sementes de cevada se dá a partir da ação de hormônios, os quais são distribuídos com a hidratação da semente ao longo da camada de aleurona (MAYA-AMPUDIA & BERNAL-LUGO, 2006). Durante a germinação as enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase caracterizam-se por serem as principais enzimas produzidas (ONYEKA & DIBIA, 2002; MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

A camada de aleurona é a responsável pela liberação das enzimas hidrolíticas durante a germinação. Essas enzimas atuam na degradação de lipídeos, proteínas de reserva e do amido, para que o embrião possa germinar adequadamente (COSTA, et al., 2011). Para que haja a produção dessas enzimas a camada de aleurona precisa

ser estimulada, sendo assim, as giberelinas são fito hormônios necessários. O ácido giberélico é sintetizado pelo embrião e, então, é distribuído pela camada de aleurona (OLSEN, 2004). No processo de malteação ainda é possível a aplicação exógena de ácido giberélico, para estimular a germinação da cevada (PINHEIRO, 2016).

A conversão do amido em açúcares durante o processo de maltagem é principalmente catalisada por enzimas hidrolíticas (LI et al., 2014), entre essas estão as dextrinases, as amilases e as glicosidases (SCHMITT et al., 2013). A ação combinada dessas enzimas é conhecida como “potencial diastático” e influencia na eficiência da fermentação e na qualidade da cerveja (HU et al., 2014; HERRERA-GAMBOA, 2018).

A quantidade produzida das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase é dependente de vários fatores: variedade da cevada, tamanho do embrião, condições climáticas durante o desenvolvimento, conteúdo de água na produção do malte verde, temperatura da germinação e da maceração (SAIKA et al., 2005).

Segundo Kunze (1996), a  $\alpha$ -amilase não está presente de forma acentuada nas sementes de cevada, a maior parte da produção dessa enzima é entre o segundo e o quarto dia da germinação. Já a enzima  $\beta$ -amilase é encontrada em quantidades um pouco mais significativas antes mesmo da germinação, quando comparada a  $\alpha$ -amilase. Depois de uma diminuição inicial, a quantidade de  $\beta$ -amilase tem aumentos consideráveis no segundo e terceiro dia de germinação (MOLINA-CANO et al., 2000; KUNZE, 1996). Por ser sintetizada e acumulada durante o estágio de formação dos grãos seus níveis são diretamente afetados pelas condições ambientais (GUERIN et al., 1992).

A  $\alpha$ -amilase é uma endohidrolase, ou seja, é uma enzima que atua no interior da cadeia de amido (KUNZE, 1994), somente nas ligações  $\alpha$ -1,4 entre os carbonos, liberando produtos maiores que dímeros. O carboidrato resultante da hidrólise da enzima  $\alpha$ -amilase com o amido pode ser de diferentes tamanhos, dependendo da região da cadeia do amido onde há a interação com a enzima (SHITAKUBO, 2015; BUSH, et al., 1989).

A enzima  $\alpha$ -amilase tem o íon  $\text{Ca}^{2+}$  como cofator. A dependência da atividade enzimática com o  $\text{Ca}^{2+}$  já foi estudada em diferentes isoformas por Bush (1989). Algumas das isoformas são mais dependentes do cálcio que outras, no entanto, em um substrato deficiente de  $\text{Ca}^{2+}$  as enzimas formadoras de dextrinas são inativas (SHITAKUBO, 2015; PINHEIRO, 2016).

A enzima  $\beta$ -amilase possui atividade exoamilolítica, significa que hidrolisa as cadeias de amido a partir das extremidades, somente nas ligações  $\alpha$ -1,4 entre carbonos, resultando como produto final dímeros de glicose, as maltoses. Esse é o açúcar redutor que está diretamente relacionado à concentração de álcool na produção de cerveja, por ser o principal açúcar consumido pelas leveduras *Saccharomyces* sp. durante a produção de cerveja (PINHEIRO, 2016).

### 3.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS

A compreensão da base genética da qualidade do malte é importante para o aprimoramento da cevada para a cerveja. A qualidade do malte é um fenótipo que combina vários fatores fisiológicos e bioquímicos inter-relacionados e cada um desses tem herança complexa (HAYES & JONES, 2000).

A expressão gênica pode ser caracterizada, de forma sucinta, como o conjunto de processos que ocorrem para que um organismo, tecido ou célula inicie, aumente, diminua ou cesse a produção de produtos finais de seus genes, as proteínas e, ou, RNAs (MARTINS & MACIEL FILHO, 2010).

O mapeamento genético de fenótipos de qualidade de maltagem em cevada tem como resultado mais de 150 QTLs (“*Quantitative Trait Loci*”) associados a 19 características (GAO et al., 2004; ZALE et al., 2000). No entanto, apenas alguns genes envolvidos na determinação da qualidade de maltagem já foram caracterizados. Entre esses genes estão os que codificam as enzimas de degradação de amido:  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e limite dextrinase (FINCHER, 1989; LAPITAN, et al., 2009). Contudo, devido ao número de QTLs associado ao caráter de qualidade de maltagem é possível pressupor que muitos outros genes desempenham papéis significativos nesse processo (LAPITAN, et al., 2009).

As isoenzimas são produtos da expressão gênica e são significativamente influenciadas pelo ambiente, isso porque os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos ou, ainda, em função de um determinado estímulo (RAMÍREZ et al. 1991). O termo isoenzima refere-se às diferentes formas moleculares que uma determinada enzima pode apresentar, porém, reagindo sempre com o mesmo substrato (MARKET & MOLLER, 1959).

A semente madura (“seca”) de cevada contém um número considerável de mRNAs funcionais que codificam proteínas consideradas imprescindíveis para o início

da germinação (SREENIVASULU et al., 2008). Diferenças na expressão gênica entre órgãos foram encontradas precocemente em apenas quatro horas após o início da embebição (POTOKINA et al., 2002). Os genes preferencialmente expressos no embrião foram relacionados ao ciclo da divisão celular e à formação do citoesqueleto; já os preferencialmente expressos no escutelo estavam relacionados à produção de enzimas hidrolíticas, enquanto no endosperma estavam relacionados à produção de enzimas hidrolíticas e antioxidantes. Alterações na expressão de genes no endosperma são atribuídas à camada de aleurona (DANERI-CASTRO et al., 2016).

O gene *Amy32b* foi caracterizado por Whittier et al. (1987) e codifica a  $\alpha$ -amilase e é expresso em células da camada de aleurona de cevada controlado pelos hormônios vegetais, ácido giberélico e abscísico.

A  $\beta$ -amilase codificada pelo gene  $\beta$ -*amy1* é uma das enzimas envolvidas na germinação e na produção do malte de cevada (SUN & HENSON, 1991). O gene  $\beta$ -*amy1* da cevada tem sido intensamente estudado devido à sua importância para o potencial diastático para fabricação de cerveja (VINJE, 2011).

### 3.8 EXPRESSÃO DE GENES PELA TÉCNICA DE QRT-PCR (QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION)

O estudo da expressão dos genes responsáveis pela regulação enzimática de processos como a germinação das sementes é relevante para contribuir para a elucidação dos diversos mecanismos envolvidos nesses processos. As pesquisas sobre qualidade de sementes associadas à biologia molecular evoluiu rapidamente, devido a isso técnicas moleculares são consideradas úteis para a obtenção de classes distintas de marcadores moleculares, os quais colaboram com o esclarecimento de causas que afetam a qualidade, a manipulação, a identificação e preservação do material genético (DANTAS et al., 2002).

Segundo Kuiper et al. (2001) o estudo da expressão gênica pode ser realizado em nível proteico ou de transcritos das células. A mensuração qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos das células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos, possam ser identificados, de forma que sua função metabólica possa ser esclarecida. Neste sentido, a técnica de transcrição reversa acoplada com a reação de polimerase em cadeia, também conhecida como qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*), tem sido amplamente utilizada, possibilitando a realização

precisa de análises da expressão de genes de distintos tecidos ou submetidos a diferentes situações ou ambientes (COELHO, 2015).

A diferença entre qRT-PCR e o PCR clássico é a mensuração do produto de PCR amplificado em cada ciclo de reação de amplificação. Nesse processo uma câmera de vídeo grava a luz emitida por sondas fluorogênicas ou por agentes intercalantes de fitas duplas de DNA. Dessa forma, o qRT-PCR possibilita o acompanhamento em tempo real da amplificação durante a fase exponencial dos ciclos, permitindo de forma ágil, específica e sensível a detecção de um determinado ácido nucleico alvo (GACHON et al., 2004). A eficiência da amplificação pode ser afetada de diversas formas, como por exemplo o comprimento do amplicon, existência de estruturas secundárias na amostra, qualidade dos primers utilizados, erros nos procedimentos laboratoriais, presença ou utilização de inibidores ou promotores da PCR (OLIVEIRA, 2010). Apesar disso, é uma técnica acessível para pesquisas em que a quantidade de material inicial é pequena ou para avaliar quantidades mínimas de RNA em vários genes (FREEMAN et al., 1999).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Duas áreas de produção de sementes pertencentes à empresa Protecta, foram cedidas para a condução dos experimentos. As sementes de cevada, das cultivares BRS Cauê e IRINA, foram produzidas em áreas distintas, conforme as recomendações técnicas indicadas para a produção destas sementes.

Cada um dos experimentos foi conduzido no delineamento de blocos aleatorizados com quatro repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 4x2, sendo quatro momentos de colheita, as quais foram avaliadas em duas épocas, recém colhidas e após armazenamento (Figura 1).

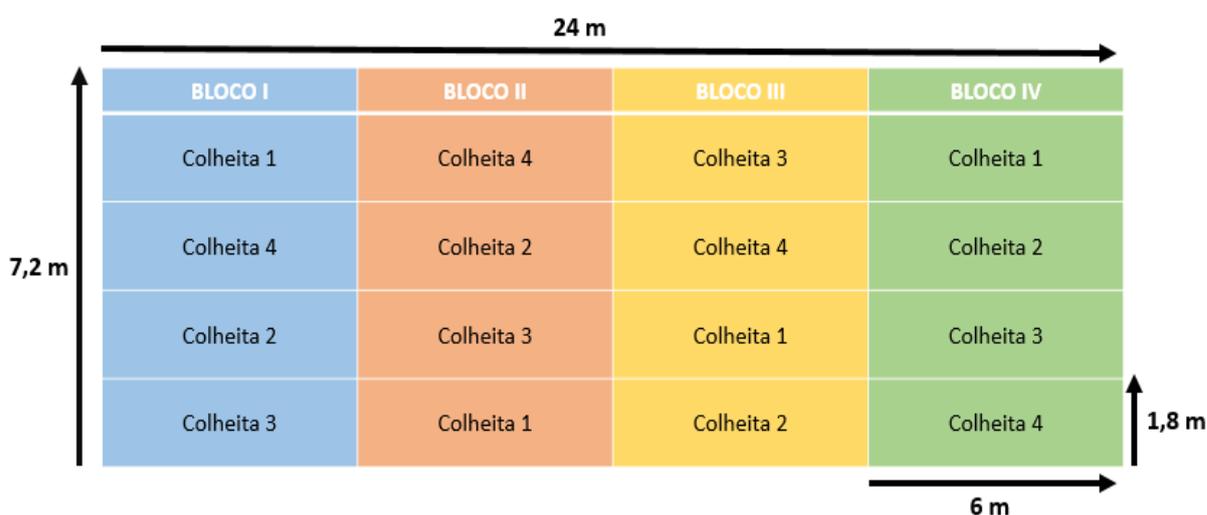


Figura 1 - Croqui experimental da área de produção das sementes de cevada, para cada um dos experimentos com as cultivares BRS Cauê e Irina, colhidas em quatro momentos.

### 4.1 AVALIAÇÃO DAS SEMENTES DA CULTIVAR BRS CAUÊ

O experimento foi conduzido no Sítio Abdala, município de Ipiranga-PR, em uma área de 57,3 ha para a produção comercial das sementes de cevada S2 (não certificada de 2ª geração) da cultivar BRS Cauê (descrição no apêndice A). O clima da região segundo a classificação de Köppen-Geiger é Cfa, subtropical úmido. Os dados meteorológicos de temperatura e precipitação durante ciclo da cultura, estão descritos na Tabela 1.

A área total designada para o experimento foi de 172,8 m<sup>2</sup> e a área de cada parcela experimental foi de 10,8 m<sup>2</sup> (Figura 1). A semeadura foi realizada no dia 3 de junho de 2017, com densidade de 160 kg ha<sup>-1</sup> e espaçamento de 0,17 m entre linhas. A adubação de base foi de 300 kg ha<sup>-1</sup> na formulação NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) de 14-40-00 mais 7% de S (enxofre). Em cobertura foram aplicados 120 kg

ha<sup>-1</sup> de ureia mais 200 kg ha<sup>-1</sup> de KCL (cloreto de potássio). Os tratamentos fitossanitários realizados estão descritos no apêndice B.

Tabela 1 - Dados de temperatura e precipitação média durante a produção das sementes de cevada e média histórica dos últimos 5 anos.

	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Temperatura média(°C)	16,92	14,33	12,79	15,58	19,73	18,58	19,33
Temperatura histórica média (°C)	15,55	13,8	13,24	15,11	17,4	19,14	19,94
Precipitação média (mm)	198,2	160,4	9,2	121,0	52,4	357,6	213,4
Precipitação histórica média (mm)	167,54	250,45	160,55	137,25	145,4	189,98	126,88

Fonte: Sma, Fundação ABC, 2018. Fonte: Sma, Fundação ABC, 2018.

As colheitas foram realizadas a partir da maturidade fisiológica das sementes, que segundo Zimmer (2006) é quando as sementes de cevada têm em torno de 30% de água; a previsão determinada para as demais colheitas foi baseada na variação de, pelo menos, 5% de água entre os momentos previstos para a colheita, entretanto, devido as condições climáticas não foi possível manter esse parâmetro para todas as colheitas. Posteriormente, as sementes foram avaliadas em dois momentos, imediatamente após a colheita e após 111 dias da primeira colheita. Sendo assim os tratamentos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos. Datas das colheitas e teor de água correspondentes das sementes.

Momento de colheita	Cultivar	Data de colheita	Dias após a semeadura (DAS)	Teor de água das sementes (%)
1 <sup>a</sup>	BRS Cauê	10/10/17	99	32,00
2 <sup>a</sup>	BRS Cauê	15/10/17	104	19,18
3 <sup>a</sup>	BRS Cauê	18/10/17	107	17,92
4 <sup>a</sup>	BRS Cauê	25/10/17	114	15,89

#### 4.2 AVALIAÇÃO DAS SEMENTES DA CULTIVAR IRINA

O experimento foi conduzido na Fazenda Nhazinha, município de Palmeira - PR em uma área de 157 ha de produção comercial de sementes de cevada S1 (não certificada de 1<sup>a</sup> geração) da cultivar Irina, a qual está descrita no apêndice C. O clima segundo a classificação de Köppen-Geiger é Cfa, subtropical úmido. Os dados meteorológicos de temperatura e precipitação estão descritos na Tabela 3.

A área total designada para o experimento foi de 172,8 m<sup>2</sup> e a área de cada parcela experimental foi de 10,8 m<sup>2</sup> (Figura 1). A semeadura foi realizada no dia 4 de junho de 2017, com densidade de 160 kg ha<sup>-1</sup> em um espaçamento de 0,17 m entre

linhas. A adubação de base foi de 300 kg ha<sup>-1</sup> da formulação NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) de 10-20-20 e a adubação de cobertura foi de 120 kg ha<sup>-1</sup> de ureia. Os tratamentos fitossanitários realizados estão descritos no apêndice D.

Tabela 3 - Dados de temperatura e precipitação média durante a produção das sementes de cevada e média histórica dos últimos 5 anos.

	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Temperatura média (°C)	16,4	14,1	12,6	14,9	19,4	17,9	18,7
Temperatura histórica média (°C)	15,3	13,5	12,9	14,8	17,0	18,6	19,4
Precipitação média (mm)	150,8	151,2	9,8	123,2	54,2	268,6	121,2
Precipitação histórica média (mm)	159,0	267,5	138,9	128,9	160,5	253,3	161,7

Fonte: Sma, Fundação ABC, 2018.

Semelhantemente ao experimento de avaliação da cultivar BRS Cauê, as colheitas foram realizadas a partir da maturidade fisiológica das sementes, em torno de 30% de água. Devido as condições climáticas não foi possível manter um parâmetro para todas as colheitas. Em razão disto, os teores de água nos quais as colheitas foram realizadas estão descritos na Tabela 4. As sementes foram avaliadas em dois momentos, imediatamente após a colheita e após 107 dias da primeira colheita.

Tabela 4 - Descrição dos tratamentos. Datas das colheitas e teor de água correspondente das sementes.

Momento de colheita	Cultivar	Data de colheita	Dias após a semeadura (DAS)	Teor de água das sementes (%)
1º	Irina	14/10/17	102	32,76
2º	Irina	19/10/17	107	20,27
3º	Irina	02/11/17	121	13,63
4º	Irina	08/11/17	127	17,43

#### 4.3 AMOSTRAGEM DAS SEMENTES

Foram colhidas aleatoriamente em média 60 espigas por parcela experimental, as quais foram levadas para o laboratório de Análise de Sementes da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Primeiramente, realizou-se o processo de debulha manual das espigas e, em seguida, uma parte das sementes foi separada para as análises sem armazenamento. Outra parte foi seca em estufa de circulação forçada de ar a 35° C até 11 a 13% de água e, posteriormente, armazenada em câmara fria por 111 e 107 dias para as cultivares BRS Cauê e Irina, respectivamente, e então submetidas as análises.

#### 4.4 ANÁLISES DE PARÂMETRO FISIOLÓGICO

##### 4.4.1 Teor de água das sementes (TA)

Foi determinado pelo método da estufa, a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de água.

##### 4.4.2 Massa de mil sementes

A avaliação da massa de mil sementes, baseou-se no método indicado nas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009). A determinação foi por meio da contagem de oito repetições de 100 sementes que foram pesadas em balança analítica de precisão. Os resultados foram expressos em gramas.

##### 4.4.3 Germinação (G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

Foram avaliadas 50 sementes em quatro repetições, as quais foram distribuídas em papel de germinação (Germitest), umedecido com água, correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Em seguida, os rolos de germinação foram mantidos em um germinador a  $20^{\circ}\text{C}$  por 7 dias (BRASIL, 2009), sendo realizadas avaliações diárias. Com os dados obtidos foram calculados a porcentagem de sementes germinadas, considerando-se as plântulas normais, e o Índice de Velocidade de Germinação, conforme proposto por Maguire (1962).

##### 4.4.4 Comprimento da plântula (CP)

Foram avaliadas 10 sementes em quatro repetições. As sementes passaram pelo processo de germinação, conforme descrito no item no item anterior. Após o período de 7 dias, foram determinados os comprimentos (em centímetros) da parte aérea e da raiz da plântula, com o auxílio de uma régua.

##### 4.4.5 Envelhecimento acelerado (EA)

Para esse teste uma camada única de sementes foi colocada sobre uma tela, no interior de uma caixa plástica contendo 75 mL de água destilada que, em seguida, foi mantida a  $41^{\circ}\text{C}$  por 72 horas em incubadora do tipo B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio). Após esse período estas sementes foram avaliadas por meio do teste de germinação após quatro dias, verificando-se a porcentagem de plântulas normais.

#### 4.4.6 Teste de Tetrazólio (TTZ)

Foram avaliadas quatro repetições de 50 sementes, as quais foram previamente hidratadas. As sementes foram distribuídas em papel de germinação (Germitest), umedecido com água, correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, e mantidas em germinador a 20 °C por 18 horas. Em seguida foram seccionadas no sentido longitudinal e imersas em solução de sal de tetrazólio (2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio), com pH 7,0, na concentração de 0,1% durante 3 horas a 30 °C (BRASIL, 2009). A avaliação foi baseada na coloração dos tecidos das sementes, onde foram quantificadas as sementes viáveis, em porcentagem.

#### 4.4.7 Emergência da Plântula (EP) e Índice de Velocidade de Emergência da Plântula (IVEP)

Foram avaliadas 50 sementes em quatro repetições em substrato areia, umedecido com água em quantidade equivalente a 60% da capacidade de retenção da água pela areia, e mantidas em ambiente natural. A partir do início da emergência das plântulas, as avaliações foram diárias até a estabilização deste processo. Foram quantificadas as plântulas emersas, em porcentagem, e o índice de velocidade de emergência das plântulas, conforme indicado por Maguire (1962).

#### 4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS POR RT-QPCR (EG)

Foram selecionadas as amostras das colheitas realizadas aos 99 dias após a semeadura (DAS) (32% de água) e aos 114 DAS (15,89% de água) avaliadas inicialmente (A/I) e após ao armazenamento (A/111), para cultivar BRS Cauê. Já para cultivar Irina as colheitas selecionadas foram as realizadas aos 102 DAS (32,76% de água) e aos 127 DAS (17,33% de água) avaliadas inicialmente (A/I) e após ao armazenamento (A/111)

Para a análise de expressão gênica das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase por qRT-PCR, primeiramente, as sementes de ambas as cultivares passaram pela maceração, etapa inicial do processo de malteação. Este processo foi realizado nas dependências da micro maltaria Gourmet Malz, localizada no município de Palmeira, seguindo um protocolo para produção de malte do tipo Pilsen.

Foram utilizados cerca de 18 gramas de sementes por repetição, as quais foram acondicionadas em tecido do tipo tule, o qual permite a livre movimentação de água pela massa de sementes (Figura 2A). Segundo o protocolo utilizado pela

empresa, as sementes são primeiramente imersas em água por 4 horas. Após a remoção da água, as sementes passam por um período dito “seco”, por 4 horas (Figura 2B). Em seguida, uma nova imersão em água é realizada por mais 4 horas, passando depois por outras 16 horas de período “seco”. Ao final deste período é feita a aspersão de água sobre as sementes, a qual se repete após 8 horas. Depois de mais 16 horas realiza-se o revolvimento da massa de sementes, e então, uma nova aspersão de água após 8 horas. Finalmente, depois de mais 12 horas o processo é encerrado, totalizando 72 horas. No fim do processo as sementes foram colocadas em caixas térmicas com gelo e transportadas até o Laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), onde foram estocadas em freezer (- 20°C) até a etapa de extração do RNA total.

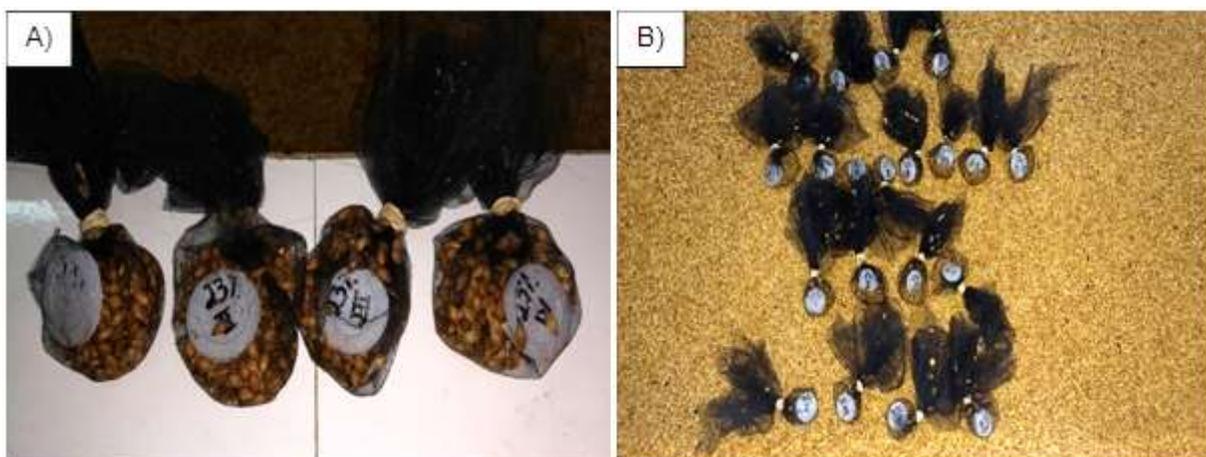


Figura 2 - Sementes da cevada envolvidas pelo tecido do tipo tule para o processo de maceração (A). Sementes no tanque durante o processo de maceração (B).

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para cada um dos experimentos (cultivares BRS Cauê e Irina) foram utilizadas 8 sementes por repetição de cada tratamento para a extração do RNA, totalizando 16 amostras. Primeiramente, as sementes foram fragmentadas em nitrogênio líquido e, em seguida, foi realizada a extração de RNA com o kit PureLink RNA mini kit (Ambion®) seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente as amostras de RNA foram armazenadas em ultra freezer a - 80 °C até sua utilização.

A concentração ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) e pureza do RNA total extraído foram determinadas a partir das relações de absorvância  $A_{260}/A_{280}$  (RNA/proteínas) e  $A_{260}/A_{230}$  (RNA/polissacarídeos e polifenóis), com a utilização de um espectrofotômetro (NanoVue GE Healthcare®) (Apêndice E).

A integridade do RNA extraído foi visualizada em gel de agarose 1%. Alíquotas de 2,0  $\mu\text{L}$  de RNA total foram coradas com 2,0  $\mu\text{L}$  de GelRed 0,1 X com adição de 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento (0,25 de azul de bromofenol e 0,4 de sacarose). As amostras foram submetidas à corrida eletroforética por aproximadamente 1,5 h a 60 V e fotodocumentadas sob luz UV no aparelho Alphamager HP, versão 3400, sendo comparadas a um marcador de 100 pb (NORGEN Biotek corp.). A presença dos fragmentos referentes ao RNA ribossômico 28S e 18S confirmaram a integridade das amostras de RNA extraídas. Posteriormente, as amostras foram tratadas com DNAase, para eliminação de possível DNA nas amostras, através da utilização do kit comercial DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações técnicas do fabricante.

Para a síntese dos cDNAs (DNA complementar), aproximadamente 0,5  $\mu\text{g}$  de RNA total foi submetido a transcrição reversa utilizando o kit comercial First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, UK Limited), seguindo as recomendações técnicas do fabricante. As amostras de cDNAs obtidas foram posteriormente diluídas para a concentração de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  e armazenadas em freezer (- 20 °C). Alíquotas dessas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 2% para a verificar a integridade das mesmas.

#### 4.7 EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR

A análise de expressão gênica foi realizada por ensaio de RT-qPCR através do equipamento G8830A AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Para a quantificação da expressão do gene *Amy32b*, que codifica para a enzima  $\alpha$ -amilase, foi utilizado o seguinte par de primers: Forward 5'CGGCAATGACTATGCCGTAT3' e Reverse 5'GCATGTCCCTCATCCTCACT3' (LAPITAN et al., 2009). Já para a quantificação da expressão do gene *B-amy1*, que codifica para a enzima  $\beta$ -amilase, foi utilizado o seguinte par de primers: Forward 5'TGATAACCAGCCTCTCTTCCA3' e Reverse 5'GACGATAACACCAGCATCCA3' (OVESNÁ et al., 2012). Como controle interno foi utilizado o gene de normalização *G3PD* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) através dos primers: Forward 5'GCCAGTTACTGTCTTTGGCGTC3' e Reverse 5'GGCCTTGTCCTTGTCAGTGAAG3', com eficiência de 88,8% (OVESNÁ et al., 2012). Para as reações de amplificação utilizaram-se os seguintes reagentes: 10  $\mu\text{L}$  Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies),

0,3  $\mu\text{L}$  ROX (Reference dye Agilent) (1:500), 0,8  $\mu\text{L}$  de cada primer forward/reverse em concentração de 10 mM, 2  $\mu\text{L}$  de cDNA (10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e água ultrapura estéril para completar 20  $\mu\text{L}$  de reação. Em cada experimento de RT-qPCR foi incluído um controle negativo (água), visando a confirmação da ausência de contaminantes na reação. O equipamento foi programado para a seguinte ciclagem: 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 62°C. A curva de dissociação foi composta pela seguinte programação: 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C e 10 segundos a 94°C. Os níveis de expressão diferencial do gene foram calculados através do método  $\Delta\Delta\text{CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) através do programa GenEx Enterprise (versão 6.1 Demo).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MASSA DE MIL SEMENTES

As médias obtidas para peso de mil sementes para as cultivares BRS Cauê e Irina não apresentaram diferenças significativas em relação ao momento de colheita, apresentando valores de 46 e 47 g para BRS Cauê e de 47 e 49 g para Irina, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Tunes et al. (2008), para sementes de cevada, da cultivar Scarlet, colhidas em diferentes momentos. Entretanto, Lin & Carvalho (1978) ao avaliarem o peso de mil sementes de trigo, colhido em diferentes momentos a partir da maturidade fisiológica, obtiveram resultados distintos entre as colheitas.

### 5.2 TESTES DE GERMINAÇÃO E DE TETRAZÓLIO

O desdobramento da interação dos períodos de colheita, em função do armazenamento das sementes, para o teste de germinação das sementes, da cultivar BRS Cauê, são apresentados na Tabela 5. Os resultados evidenciaram a diferença estatística significativa entre as sementes avaliadas logo após as colheitas e as armazenadas, sendo observadas as maiores porcentagens de germinação nas sementes que permaneceram armazenadas. A germinação das sementes colhidas aos 114 DAS (15,89% de água), avaliadas recém-colhidas, apresentaram porcentagem superior de germinação (99%) quando comparadas aos demais períodos de colheita. Não houve variação estatística para os resultados de germinação das sementes colhidas aos 99, 104 e 107 DAS com 82, 80 e 87%, respectivamente. As sementes armazenadas não apresentaram diferenças significativas entre os momentos distintos de colheita, mostrando que não houve redução da germinação em decorrência da postergação da colheita (Tabela 5).

A germinação da maioria das sementes de cevada avaliadas foi superior a 85%, padrão mínimo exigido para a comercialização destas sementes (BRASIL, 2013). Entretanto, apenas as sementes recém colhidas aos 114 DAS (15,89% de água) e as armazenadas, obtidas das quatro colheitas, tiveram germinação superior a 95%, que é a porcentagem mínima requerida para a comercialização do grão da cevada, para a produção do malte (BRASIL, 1996).

Tabela 5 - Desdobramento das médias dos testes de germinação e de tetrazólio de sementes de cevada, cultivar BRS Cauê, em quatro períodos de colheita e analisadas inicialmente e aos 111 dias.

Momento de colheita (DAS)	Germinação (%)		Teste Tetrazólio (%)	
	Avaliações			
	Inicial	111 dias	Inicial	111 dias
99	82 Bb	100 Aa	93 Bab	98 Aa
104	80 Bb	97 Aa	83 Bc	97 Aa
107	87 Bb	99 Aa	87 Bbc	97 Aa
114	99 Aa	99 Aa	95 Aa	93 Aa
	CV (%): 4,42		CV (%): 3,16	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS= Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

Devido a ocorrência de dormência nas sementes de cevada, os resultados do teste de germinação representam a soma das plântulas normais obtidas pelo teste de germinação em 7 dias, mais a quantidade de sementes viáveis, remanescentes, que não haviam germinado pelo mesmo teste, avaliadas pelo teste de tetrazólio. A dormência das sementes de cevada, assim como das sementes de outras espécies, não está esclarecida. Este fato limita as discussões a respeito de como esse mecanismo de sobrevivência pode influenciar o desenvolvimento das sementes em determinadas condições, como as que essas sementes foram submetidas neste trabalho, em que observou-se que a dormência não apresentou distribuição uniforme na população avaliada.

Tunes et al. (2010) observaram a ocorrência de dormência nas sementes de cevada da cultivar Scarlett em função de diferentes períodos de colheita, dos 118 dias até os 149 dias após a semeadura. No entanto, para a cultivar MN 721, os autores verificaram germinação de 59% na primeira colheita e na medida em que a colheita foi postergada, houve redução da germinação. Estes resultados comprovam a variabilidade existente entre as cultivares com relação à dormência intrínseca, assim como, a influência do ambiente de produção dos genótipos distintos (BARROS & PESKE, 2006).

A expressão da dormência de um genótipo é dependente de inúmeros fatores, incluindo o ambiente em que a semente foi produzida e as condições de armazenamento. Condições ambientais durante a embriogênese e o amadurecimento de sementes têm impacto no desenvolvimento de dormência. Estudos indicam que a redução da temperaturas durante a formação das sementes é, provavelmente, o fator preponderante para a dormência das sementes de cevada (BURAAS & SKINNES, 1984; STRAND, 1989).

Estudos em sementes de arroz vermelho demonstraram que além da influência de características genéticas de cada variedade e das condições ambientais vigentes durante a formação das sementes, a posição da semente na panícula também pode interferir na forma e na intensidade com que a dormência se expressa (JENNING & DE JESUS, 1964; SIKDER, 1967; ARGEL & HUMPREYS, 1983; DELATORRE, 1994). Além de que sementes oriundas de diferentes plantas ficam expostas aos diferentes microambientes, que podem modificar o balanço interno de fitormônios, alterando o grau de dormência (DELATORRE, 1999).

Os dados médios percentuais para o teste de tetrazólio para a cultivar BRS Cauê foram similares aos do teste de germinação (Tabela 5). A maior porcentagem de sementes viáveis foi obtida após o período de armazenamento. Quando se observa a diferença entre resultados decorrentes dos momentos de colheita, para a avaliação inicial, constata-se que aos 114 DAS (15,89% de água) e aos 99 DAS (32% de água) a viabilidade das sementes foi superior.

Para a cultivar Irina, de maneira geral, a germinação das sementes armazenadas superou a das sementes recém colhidas, exceto para o segundo momento de colheita, porque não houve diferença entre as duas épocas de avaliação (Tabela 6). A menor porcentagem de germinação (63%) foi das sementes colhidas aos 102 DAS (32,76% de água) da avaliação inicial. Essa redução da germinação pode ser decorrente de uma quantidade expressiva de sementes que não havia atingido a maturidade fisiológica e, portanto, não tinham a formação suficiente para germinar (Tabela 6).

Apenas as sementes das quatro colheitas que foram armazenadas, com exceção aos 127 DAS, e as sementes colhidas aos 107 DAS (20,27% de água) avaliadas recém colhidas atingiram germinação mínima de 85% (BRASIL, 2013), exigida para a comercialização como semente. Para a cultivar Irina, em nenhum dos tratamentos as sementes atingiram a germinação mínima requerida para a malteação (95%) (BRASIL, 1996) (Tabela 6).

A redução da germinação das sementes foi, provavelmente, decorrente das condições adversas do ambiente durante o ciclo de desenvolvimento da plantas de cevada, pois houve limitação de água no mês de junho, que coincidiu com a semeadura e o desenvolvimento inicial das plantas, e no mês de setembro, época da floração e formação das sementes (Tabela 3). Outro aspecto para ser considerado é que se trata de um genótipo recém introduzido da Europa na região de Ponta Grossa,

necessitando ainda de mais pesquisas quanto à sua adaptação às condições ambientais da região.

Não houve interferência dos diferentes momentos de colheita em relação à germinação das sementes das duas cultivares, avaliadas após o armazenamento o que indica que o intervalo de dias estabelecido não foi suficiente para causar a deterioração e afetar a germinação das sementes. Resultado similar aos obtidos por Nakagawa et al. (1994), que não observaram diferenças significativas para a germinação de sementes de aveia preta colhidas entre o 21º e o 38º dias, após a emergência das panículas no campo.

Embora, não haja redução da germinação das sementes, a redução da capacidade de germinar é uma das consequências do processo de deterioração das sementes (PERRY, 1978), diferenças mínimas entre a germinação das sementes de um lote podem ser representativas em relação à deterioração (ELLIS; ROBERTS, 1980).

A avaliação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio, para a cultivar Irina, demonstrou de modo geral, maior viabilidade de sementes após o período de armazenamento. Entretanto, para a colheita aos 107 DAS (20,27% de água) verificou-se maior porcentagem de sementes viáveis, na avaliação inicial. Para a avaliação após o armazenamento, as sementes colhidas aos 102 DAS (32,76% de água) e aos 107 DAS (20,27% de água) apresentaram maior viabilidade (Tabela 6).

Na medida em que as sementes permaneceram mais tempo no campo após atingirem a maturidade fisiológica, a redução da viabilidade foi observada de forma mais efetiva na avaliação após o armazenamento. Segundo Halmer & Bewley (1984), parte das mudanças no metabolismo básico da semente está associada às reduções de viabilidade, afetando de forma direta o desenvolvimento das sementes. Isso pode ser explicado, provavelmente, pelo consumo de reservas, ou seja, a deterioração, na fase que antecedeu a colheita.

Para as duas épocas de avaliação houve diferença apenas para a colheita realizada aos 102 DAS (32,76% de água), no qual as sementes armazenadas tiveram viabilidade superior à das recém colhidas (Tabela 6). Esse resultado caracterizou a diferença do momento em que as sementes atingiram a maturidade fisiológica, assim como a distribuição desuniforme da dormência na população avaliada.

Tabela 6 – Desdobramento das médias dos testes de germinação e de tetrazólio de sementes de cevada, cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.

Momento de colheita (DAS)	Germinação (%)		Tetrazólio (%)	
	Avaliações			
	Inicial	107 dias	Inicial	107 dias
102	63 Bc	87 Aa	69 Bb	97 Aa
107	86 Aa	86 Aa	95 Aa	99 Aa
121	71 Bbc	85 Aa	76 Ab	82 Ab
127	74 Bb	84 Aa	67 Ab	73 Ab
	CV (%): 6,40		CV (%): 5,76	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS = Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

### 5.3 TESTE DE 1ª CONTAGEM DE GERMINAÇÃO

A primeira contagem do teste de germinação é utilizada para estimar o vigor, uma vez que, a velocidade de germinação é reduzida na medida em que há a deterioração da semente (BARROS et al., 2002).

O resultado da primeira contagem de germinação, aos 4 dias, indicou que as sementes da cultivar BRS Cauê avaliadas após o armazenamento tiveram germinação superior em relação às sementes recém colhidas. Foram observadas diferenças significativas entre os momentos de colheita para a avaliação inicial, na qual, as sementes colhidas aos 114 DAS (15,89% de água) destacaram-se com germinação de 87% (Tabela 7). A grande amplitude dos resultados, principalmente entre as duas épocas de avaliação, pode ser explicada em função da superação gradativa da dormência pelas sementes durante o período de armazenamento.

Para as sementes da cultivar Irina a tendência dos dados foram similares, o que confirma a superação gradativa da dormência, fenômeno não observado nas sementes que ficaram armazenadas, período esse de armazenamento que foi suficiente para superação da mesma (Tabela 8).

Quando se observam os dados da 1ª contagem de germinação das sementes após o armazenamento, não há variação da germinação decorrente da deterioração nos períodos posteriores de colheita, provavelmente devido à dormência das sementes.

O armazenamento destas sementes, que foi em câmara fria, entre 7 e 10°C, favoreceu a superação da dormência. Segundo Brasil (2009) um dos métodos de superação de dormência é o pré-esfriamento a 5-10°C por um período de até sete dias ou mais.

Tunes et al. (2010) observaram, ao analisar a germinação das sementes de cevada da cultivar Scarllet, que na medida em que o período de colheita foi mais

tardio, a germinação variou de 50% (118 dias após a semeadura) a 64% (140 dias após a colheita). Entretanto, após o armazenamento houve aumento significativo da germinação, atingindo valores superiores a 90%. Este fato pode ser explicado pela dormência, que é comum nas sementes recém-colhidas de diversas espécies (BRASIL, 2009). Segundo Carvalho & Nakagawa (1983) quando as sementes recém-colhidas têm dormência, o armazenamento entre a colheita e a semeadura favorece o aumento da germinação das sementes. Nesse sentido, Tunes et al. (2010) afirmaram que houve superação da dormência das sementes de cevada armazenadas tanto em câmara fria e seca, quanto em ambiente natural por 6 meses.

#### 5.4 ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

O índice de velocidade de germinação das sementes da cultivar BRS Cauê foi superior para as sementes avaliadas após o armazenamento. Nestas condições, as sementes colhidas aos 99 DAS (32% de água), aos 114 DAS (15,89% de água) e aos 107 DAS (17,92% de água) apresentaram os maiores índices, sendo que esta última não diferiu estatisticamente da colheita aos 104 DAS (19,18% de água). Para a avaliação das sementes recém-colhidas o melhor índice foi obtido aos 114 DAS (15,89% de água), Tabela 7.

Tabela 7 - Descobramento das médias das avaliações da primeira contagem de germinação (1ª CG), e do índice de velocidade de germinação (IVG) e do teste de envelhecimento acelerado de sementes de cevada, cultivar BRS Cauê, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 111 dias.

Momento de colheita (DAS)	1ª CG (%)		IVG		Envelhecimento Acelerado (%)	
	Avaliações					
	Inicial	111 dias	Inicial	111 dias	Inicial	111 dias
99	11 Bc	99 Aa	4,08Bd	17,19 Aa	19 Bb	95 Aa
104	13 Bc	99 Aa	5,69 Bc	16,07 Ab	83 Ba	98 Aa
107	30 Bb	97 Aa	8,65 Bb	16,28 Aab	95 Aa	96 Aa
114	87 Ba	99 Aa	13,35 Ba	17,03 Aa	98 Aa	88 Aa
	CV (%): 5,17		CV (%): 3,81		CV (%): 9,45	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS= Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

Para as sementes da cultivar Irina o resultado relacionado ao índice de velocidade de germinação também foi superior para as sementes avaliadas após o período de armazenamento, para as quais não houve diferença significativa entre os momentos de colheita. Na avaliação inicial, o resultado das sementes colhidas aos 127 DAS (17,43% de água) não diferiu estatisticamente do obtido da avaliação das

sementes colhidas aos 121 DAS (13,63% de água), sendo superior aos demais (Tabela 8).

Os resultados do IVG para sementes das duas cultivares demonstram que o período de armazenamento foi suficiente para a superação da dormência das sementes e que quanto mais próximo da maturidade fisiológica mais evidente foi esse fenômeno. Esses dados corroboram com os de germinação e de 1ª CG, em que a deterioração ocorrida entre os momentos de colheita não foi pronunciada a ponto de influenciar nestas análises.

## 5.5 TESTE DE ENVELHECIMENTO ACELERADO

Em relação ao teste de envelhecimento acelerado para as sementes da cultivar BRS Cauê, as sementes germinaram mais nas avaliações realizadas após o armazenamento, para as colheitas aos 99 DAS (32% de água) e aos 104 DAS (19,18% de água), nas demais, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 7).

Na avaliação inicial, o resultado da germinação das sementes colhidas aos 99 DAS (32% de água) foi inferior aos demais resultados, que não diferiram entre si (Tabela 7). Este resultado pode ser decorrente da dormência das sementes.

Resultados similares foram obtidos para as sementes da cultivar Irina, havendo diferença estatística apenas para a colheita aos 102 DAS (32,76% de água) em relação às épocas de avaliação, na qual a germinação das sementes armazenadas foi superior. Na avaliação inicial, não houve variação estatística significativa para os resultados das colheitas aos 107, aos 121 e aos 127 DAS.

Para avaliação após o período de armazenamento nas duas primeiras colheitas, aos 102 DAS (32,76% de água) e aos 107 DAS (20,27% de água) os resultados foram superiores, indicando que nas colheitas posteriores o vigor das sementes foi inferior ao das colhidas próximo à maturidade fisiológica. As condições do ambiente de produção, durante o período excedente que as sementes permaneceram no campo, provavelmente, causaram deterioração que reduziu a qualidade dessas sementes. (Tabela 8).

Cardozo et al. (2002) avaliaram as sementes de aveia branca por meio do teste de envelhecimento acelerado e verificaram redução linear da germinação dessas sementes na medida em que aumentou o tempo em que as sementes ficaram no campo. Estes resultados confirmam que quanto mais tempo, após a maturidade

fisiológica, as sementes permanecem no campo, mais acentuada é a redução do vigor.

O teste de envelhecimento acelerado é uma opção para avaliar o vigor das sementes. O baixo vigor causa redução da viabilidade das sementes quando são submetidas a condições de alta temperatura e umidade. Por outro lado, as sementes mais vigorosas, mantêm sua capacidade de produzir plântulas normais e apresentam germinação mais elevada após serem submetidas ao envelhecimento (VIEIRA, 1994).

Tabela 8 – Desdobramento das médias das avaliações da primeira contagem de germinação (1ª CG) e do índice de velocidade de germinação (IVG) e do teste de envelhecimento acelerado de sementes de cevada, cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.

Momento de colheita (DAS)	1ª CG (%)		IVG		Envelhecimento Acelerado (%)	
	Inicial	107 dias	Inicial	107 dias	Inicial	107 dias
102	2 Bd	50 Aa	2,17 Bc	9,40 Aa	65 Bb	94 Aa
107	22 Bc	65 Aa	7,17 Bb	11,15 Aa	89 Aa	93 Aa
121	40 Bb	65 Aa	7,66 Bab	11,02 Aa	75 Aab	63 Ab
127	57 Aa	65 Aa	9,65 Ba	11,67 Aa	77 Aab	63 Ab
	CV (%): 19,16		CV (%): 13,34		CV (%): 14,05	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS= Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

Os resultados obtidos antes do armazenamento das sementes de cevada, tanto para BRS Cauê, evidenciaram que, após o teste de envelhecimento acelerado, a germinação foi maior para as sementes obtidas das duas últimas colheitas. Este fato pode ser explicado pela superação da dormência dessas sementes devido à temperatura desse teste, pois dentre os métodos descritos para a superação da dormência das sementes de cevada, é indicada a utilização de temperatura entre 30°C e 35°C por um período de sete dias (BRASIL, 2009).

## 5.6 EMERGÊNCIA DE PLÂNTULA E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE EMERGÊNCIA DE PLÂNTULA

Através da análise de emergência de plântula das sementes da cultivar BRS Cauê, observou-se não houve deterioração significativa das sementes armazenadas, uma vez que a dormência é uma forma de garantir e conservar a qualidade das sementes (Tabela 9).

Para a avaliação das sementes recém-colhidas a maior porcentagem de emergência da plântula (91%) foi obtida para as sementes colhidas aos 114 DAS

(15,89% de água). Em relação às sementes armazenadas, o resultado da emergência da plântula para a colheita aos 99 DAS (32% de água) foi superior quando comparado ao da colheita 114 DAS (15,89% de água), no entanto, não diferiu das colheitas aos 104 (19,18% de água) e aos 107 (17,92% de água), Tabela 9.

O resultado do índice de velocidade de emergência da plântula, das plântulas originadas das sementes da cultivar BRS Cauê foi estatisticamente superior para as sementes armazenadas em relação as recém colhidas. Entre as recém colhidas o maior índice foi observado no momento de colheita aos 114 DAS (15,89% de água), para as armazenadas não houve diferença significativa (Tabela 9).

Tabela 9 - Desdobramento das médias das avaliações da emergência da plântula e do índice de velocidade de emergência da plântula (IVEP), plântulas originadas das sementes de cevada, cultivar BRS Cauê, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 111 dias.

Momento de colheita (DAS)	Emergência da plântula (%)		IVEP	
	Avaliações			
	Inicial	111 dias	Inicial	111 dias
99	12 Bc	100 Aa	1,07 Bc	12,57 Aa
104	47 Bb	98 Aab	4,20 Bb	12,30 Aa
107	44 Bb	97Aab	3,75 Bb	11,75 Aa
114	91 Aa	94 Ab	7,83 Ba	11,75 Aa
	CV (%): 3,93		CV (%): 5,88	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS= Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

Para a cultivar Irina as maiores porcentagens de emergência de plântula na avaliação inicial foram observadas para as colheitas aos 107, 121 e 127 DAS, as quais não diferiram entre si. Já para as sementes que foram armazenadas o resultado superior foi encontrado na colheita aos 107 DAS (20,27% de água) (Tabela 10).

Entre as épocas de avaliação não houve diferença apenas para a colheita 121 DAS e (13,63% de água), para as demais colheitas as maiores porcentagens foram observadas para as sementes avaliadas após o armazenamento (Tabela 10).

O IVEP apresentou resultados similares aos da emergência da plântula, onde os momentos de colheita apresentaram resultados superiores quando avaliados após o armazenamento (Tabela 10). Novamente é possível observar o efeito da dormência sobre as sementes recém-colhidas e a preservação da qualidade que esse fenômeno exerce sobre as sementes.

Tabela 10 - Desdobramento das médias do teste de emergência da plântula e do índice de velocidade de emergência da plântula (IVEP), plântulas originadas das sementes de cevada, cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.

Momento de colheita (DAS)	Emergência da plântula (%)		IVEP	
	Avaliações			
	Inicial	107 dias	Inicial	107 dias
102	13 Bb	63 Ab	1,12 Bb	6,62 Ab
107	39 Ba	81 Aa	3,13 Ba	9,28 Aa
121	55 Aa	64 Ab	4,55 Ba	7,49 Aab
127	45 Ba	58 Ab	4,33 Ba	6,61 Ab
CV (%): 16,56		CV (%): 17,07		

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS= Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

## 5.7 COMPRIMENTO DE PARTE AÉREA E DE RAIZ DE PLÂNTULAS

O comprimento de parte aérea da cultivar BRS Cauê (Tabela 11), de modo geral, foi superior nas sementes que passaram pelo período de armazenamento. As plântulas originadas de sementes avaliadas após o armazenamento aos 114 DAS (15,89% de água), apresentaram o maior comprimento de parte aérea.

Tunes et al. (2010) observaram aumento significativo do comprimento da parte aérea na 1ª e 2ª colheitas, 118 e 129 dias após a semeadura, da cultivar de cevada Scarlet, após o período de 6 meses de armazenamento em ambiente natural e de câmara fria. Os resultados desses autores corroboram com o observado nesse experimento, em que as três primeiras colheitas apresentaram aumento significativo após as sementes terem sido armazenadas, demonstrando que a antecipação da colheita de sementes de cevada dessas cultivares, não influenciou na redução da germinação. Porém, quando colhidas com teor elevado de água, apresentaram maior dormência, sendo essa superada mais lentamente durante o armazenamento.

Para o comprimento de raiz as colheitas aos 107 DAS (17,92% de água) e aos 114 DAS (15,89% de água), foram superiores nas sementes recém-colhidas, não havendo diferença entre as colhidas aos 104 DAS (19,18% de água) e aos 107 DAS (17,92% de água). Na avaliação após o armazenamento não houve diferença significativa entre os momentos de colheita. Entre as épocas de avaliação as colheitas aos 99 e 114 DAS apresentaram diferença, sendo superior na avaliação inicial aos 114 DAS e superior após o armazenamento aos 99 DAS (Tabela 11).

Tabela 11 – Desdobramento das médias dos comprimentos da parte aérea e da raiz das plântulas de cevada, originadas das sementes, da cultivar BRS Cauê, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 111 dias.

Momento de colheita (DAS)	Comp. parte aérea (cm)		Comp. raiz (cm)	
	Avaliações			
	Inicial	111 dias	Inicial	111 dias
99	2,14 Bc	7,96 Aa	2,66 Bc	4,46 Aa
104	4,56 Bab	8,80 Aa	4,11 Abc	5,07 Aa
107	4,05 Bbc	7,46 Aa	4,38 Aab	4,16 Aa
114	6,51 Aa	7,82 Aa	5,70 Aa	4,32 Ba
CV (%): 17,92		CV (%): 18,21		

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS= Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

Para as sementes da cultivar Irina (Tabela 12) as variações foram constatadas apenas entre as épocas de avaliação, em que as sementes armazenadas originaram plântulas que tinham o maior comprimento da raiz, com exceção apenas para as sementes colhidas aos 121 DAS (13,63% de água), cujos resultados foram similares.

Na avaliação inicial, para o comprimento da raiz da plântula, o resultado das sementes colhidas aos 102 DAS (32,76% de água) foi inferior aos demais, as quais não diferiram estatisticamente entre si, e na avaliação das sementes armazenadas não houve diferença, em função do momento de colheita.

Entre as épocas de avaliação houve diferença do comprimento de raiz para as sementes colhidas aos 102 DAS (32,76 % de água) e aos 121 DAS (13,63% de água), onde na colheita aos 102 DAS (32,76 % de água) o comprimento de raiz da plântula foi maior nas plântulas originadas das sementes armazenadas e aos 121 DAS (13,63%de água) as sementes recém colhidas originaram plântulas que tinham raiz com o maior comprimento (Tabela 12).

Tabela 12 – Desdobramento das médias dos comprimentos da parte aérea e da raiz das plântulas de cevada, originadas das sementes, da cultivar Irina, colhidas em quatro momentos e analisadas inicialmente e aos 107 dias.

Momento de colheita (DAS)	Comp. parte aérea (cm)		Comp. raiz (cm)	
	Avaliações			
	Inicial	107 dias	Inicial	107 dias
102	1,03 Ba	5,30 Aa	0,93 Bb	2,51 Aa
107	3,78 Ba	6,58 Aa	2,36 Aa	2,68 Aa
121	3,71 Aa	5,40 Aa	3,79 Aa	1,85 Ba
127	4,08 Ba	6,05 Aa	3,19 Aa	2,11 Aa
CV (%): 29,77		CV (%): 40,53		

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DAS= Dias após a semeadura. CV = Coeficiente de variação.

## 5.8 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR RT-QPCR

Para a cevada, as pesquisas que visem o entendimento dos processos fisiológicos, para a otimização da produção e da qualidade do malte, são essenciais. Neste sentido, há diversos estudos relacionados às avaliações dos índices de degradação e modificação do tecido de reserva em diferentes condições de germinação. Uma vez que o controle da germinação da semente da cevada é a base da indústria de maltagem e a compreensão dos fatores que regulam este processo são importantes em termos econômicos (SHENG et al., 2018).

Nas sementes de cevada têm quatro enzimas associadas à produção dos açúcares fermentáveis durante a germinação ( $\beta$ -amilase,  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e limite dextrinase). A  $\beta$ -amilase, codificada pelo gene  $\beta$ -amy1, é a que tem a maior correlação com o potencial diastático, uma medida da atividade aminolítica total e essencial para aferir a qualidade do malte (OVESNÁ et al., 2012). A partir do exposto, foram realizadas as análises de expressão dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1, envolvidos na regulação das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase, respectivamente, visando determinar a relação com as análises utilizadas para avaliar o parâmetro fisiológico das sementes de cevada.

O padrão de expressão dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 foi verificado por meio da utilização da PCR quantitativa em tempo real para as sementes da cultivar BRS Cauê (Figura 3). As sementes que não passaram pelo processo de malteação foram utilizadas como controle, demonstrando que não há a expressão dos genes nas sementes quiescentes.

A análise do gene Amy32b evidenciou os maiores níveis de expressão nas sementes colhidas aos 114 DAS, independentemente da época de avaliação (inicial, A/I e após os 111 dias, A/111), e aos 99 DAS na A/I (Figura 3). Esse nível de expressão do gene obtida na colheita posterior, indica que não houve deterioração das sementes devido ao aumento do período que as sementes ficaram no campo após atingirem a maturidade fisiológica a ponto de interferir nesse parâmetro.

O mecanismo molecular da síntese e regulação de  $\alpha$ -amilase na semente da cevada é, há algumas décadas, uma das principais áreas de pesquisa dessa espécie (SHENG et al., 2018). O ácido giberélico aumenta a síntese de mRNA específico para  $\alpha$ -amilase e a eficiência da tradução (HIGGINS et al., 1976). Por outro lado, o ácido abscísico inibe a síntese de  $\alpha$ -amilase no momento de transcrição e tradução (CHRISPEELS & VARNER, 1967; JACOBSEN et al., 1982).

Para o gene  $\beta$ -amy1 foi possível observar o pico de expressão nas sementes colhidas aos 99 DAS e avaliadas imediatamente após a colheita. Uma vez que as sementes colhidas próxima à maturidade fisiológica têm o máximo de qualidade, em termos fisiológicos, a maior expressão desse gene, indica que possivelmente o maior potencial diastático da cultivar é atingido nestas condições de colheita e sem armazenamento.

Para as sementes colhidas aos 99 DAS, primeira colheita, nos resultados da avaliação inicial a expressão dos dois genes foi superior; Já, para as sementes oriundas dessa colheita que foram armazenadas, a expressão destes genes foi menos evidente (Figura 3).

Resultado que evidencia que as sementes recém colhidas e colhidas próximo à maturidade fisiológica têm os maiores níveis de expressão diferencial destes genes, assim, este resultado possibilita associar a maturidade fisiológica da semente de cevada ao valor do potencial diastático que, por sua vez, será utilizado como referência para o controle da produção do malte. Por outro lado, após a secagem e o armazenamento destas sementes houve redução da expressão desses genes, o que pode ser consequência da temperatura da secagem.

Ovesná et al. (2012) obtiveram redução do número de genes regulados positivamente e relacionados ao metabolismo das macromoléculas regulados positivamente, na medida em que houve o aumento da temperatura no processo de malteação. Fato esperado, tendo em vista que no processo de malteação a secagem é empregada para cessar a germinação das sementes. No entanto, alguns genes permaneceram positivamente regulados, dentre os quais os que codificam as enzimas  $\alpha$ -amilase, limite dextrinase,  $\alpha$ -glucosidase e  $\beta$ -glucanase, indicando que são enzimas termoestáveis. Resultado diferente do obtido nesta pesquisa, pois houve redução da expressão do gene codificante de  $\alpha$ -amilase, quando as sementes colhidas aos 99 DAS (32% de água) foram secas até 13% de água.

Na Figura 4 pode ser observado o padrão de expressão dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 para as sementes da cultivar Irina. Para o gene Amy32b, os maiores níveis de expressão foram observados nas sementes colhidas aos 127 DAS, com maior expressão nas sementes que não passaram pelo período de armazenamento.

As análises do gene  $\beta$ -amy1 evidenciaram maior expressão para a colheita aos 102 DAS nas sementes sem armazenamento. Este resultado, corrobora com o obtido para a cultivar BRS Cauê, indicando que a colheita mais próxima da maturidade

fisiológica da cultura favorece a manutenção da qualidade da semente e, conseqüentemente, em função da maior concentração de  $\beta$ -amilases na semente, contribui para a melhor qualidade do malte.

Segundo Saika et al. (2005) a quantidade de  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase na semente é influenciada por inúmeros fatores como, por exemplo, o genótipo da cultivar, as condições climáticas durante a formação das sementes e do processo de germinação, conteúdo de água na produção de malte verde e temperatura de maceração.

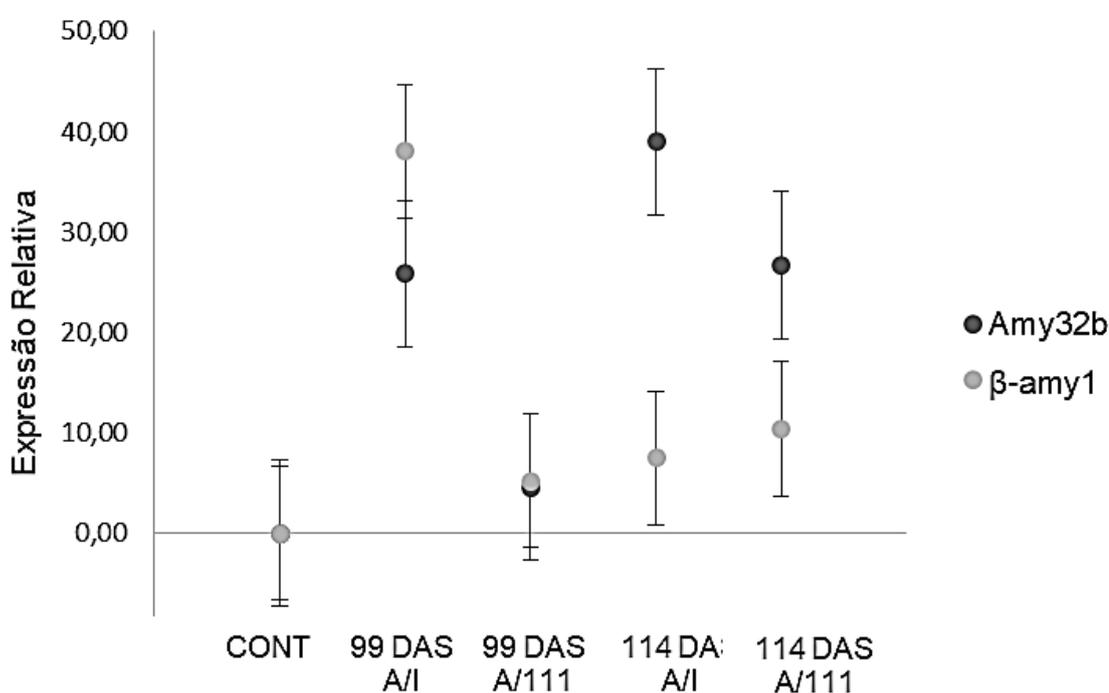


Figura 3 - Expressão relativa dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 em função de dois momentos de colheita (99 DAS e 114 DAS), analisadas inicialmente e aos 111 dias (A/I e A/111), das sementes de cevada da cultivar BRS Cauê. Ponta Grossa, 2018.

Apesar do objetivo do trabalho não envolver comparações entre os genótipos avaliados, verifica-se que para a cultivar Irina os valores de expressão relativa foram elevados quando comparados ao da cultivar BRS Cauê.

A empresa detentora da cultivar Irina, material recém introduzido no Brasil, atribui a esse genótipo qualidade superior para produção de malte cervejeiro, característica que pode estar associada aos maiores valores de expressão dos genes que codificam para enzimas que influenciam no potencial diastático das sementes.

As diferenças de expressão diferencial do gene  $\beta$ -amy1 entre genótipos são demonstradas por Vinje et al. (2011), os quais verificaram que a cultivar Harrington

apresentou os mesmos níveis de mRNA de  $\beta$ -amy1 que a cultivar Legacy aos 17, 19 e 21 dias após a antese. Entretanto, as cultivares Ashqelon e PI 296897 obtiveram níveis de mRNA em torno de 3 vezes superior às demais cultivares, evidenciando uma grande variação na abundância de transcritos  $\beta$ -amy1.

De modo geral, as sementes colhidas mais tardias para BRS Cauê e Irina (114 DAS e 127 DAS respectivamente) expressaram o gene Amy32b em maior quantidade que gene  $\beta$ -amy1. Resultado que diverge do encontrado por outros autores que constataram que plantas superiores apresentam maior atividade da  $\beta$ -amilase em relação a outras enzimas hidrolíticas (DOEHLERT et al., 1983; DUKE et al., 2009; HENSON et al., 2008; KAKEFUDA et al., 1986; SUN et al., 1991; VINJE et al., 2011).

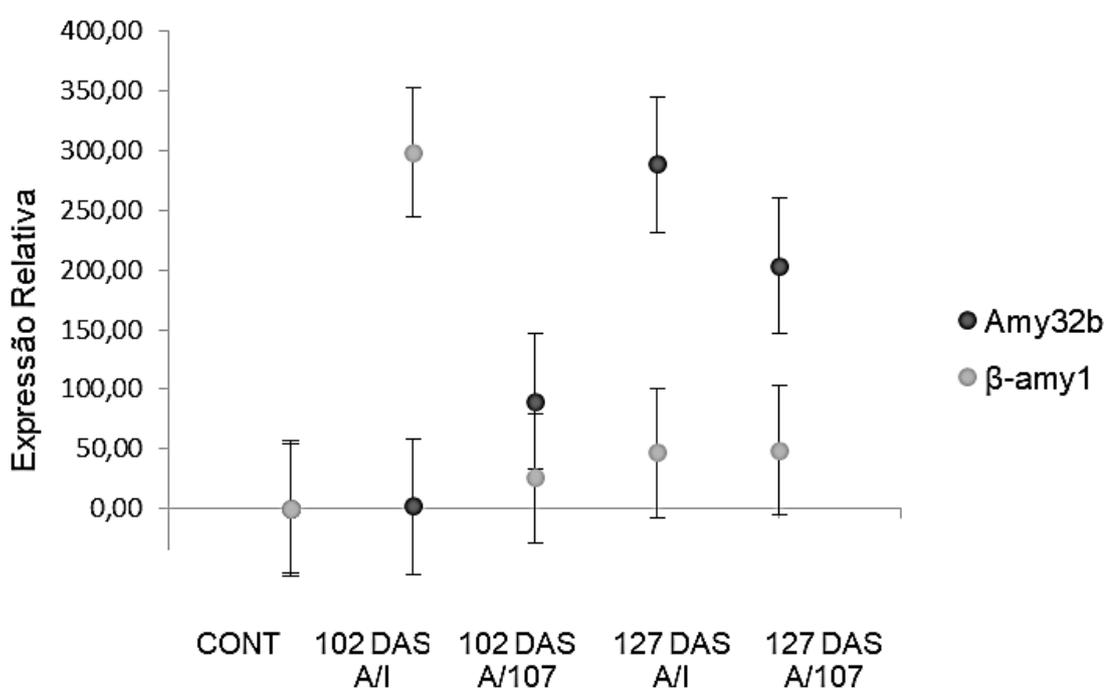


Figura 4 - Expressão relativa dos genes Amy32b e  $\beta$ my1 em função de dois momentos de colheita (102 DAS e 127 DAS), analisados inicialmente e aos 107 dias (A/I e A/107) das sementes de cevada da cultivar Irina. Ponta Grossa, 2018.

A maioria dos trabalhos sobre a expressão diferencial de genes codificadores de enzimas responsáveis pelo potencial diastático em cevada abordam a diferença de expressão durante o período de germinação. Em alguns destes estudos, foram observados que a  $\beta$ -amilase está presente em quantidades um pouco maiores na cevada antes da germinação, quando comparada à  $\alpha$ -amilase. E que depois de uma diminuição inicial, a quantidade de  $\beta$ -amilase tem aumentos consideráveis no segundo e terceiro dia de germinação (MOLINA-CANO et al., 2000, 2001; KUNZE, 1996;

SANTOS et al., 2010). Resultado que não foi observado para este experimento, onde não houve expressão dos genes antes do início da germinação.

Resultados de Kunze (1996), apontam que a enzima  $\alpha$ -amilase não está acentuadamente presente na semente de cevada. A sua síntese se dá entre o segundo e quarto dia de germinação e a quantidade desta enzima pode ser aumentada durante o prolongamento da germinação condicionado pela concentração de substrato. Segundo Santos et al. (2010) os aumentos e diminuições na síntese de  $\alpha$ -amilase estão relacionadas possivelmente ao processo fisiológico de formação e desenvolvimento da semente e na germinação. Este fato evidencia que a regulação dos genes que codificam essas enzimas é dependente de inúmeros fatores intrínsecos e extrínsecos às sementes, e que são necessários maiores estudos que correlacionem a regulação gênica dessas enzimas com os estádios de formação das sementes e a deterioração das mesmas.

## 5.9 CORRELAÇÃO CANÔNICA

A análise de correlação canônica é utilizada para a identificação e quantificação da associação entre dois grupos de variáveis (CHAVES NETO, 2002). A análise de regressão múltipla é uma técnica multivariada que pode prever o valor de uma única variável dependente a partir de uma função linear de um conjunto de variáveis independentes. Em alguns casos, o interesse pode não ser em uma única variável dependente, e sim nas relações entre conjuntos de múltiplas variáveis dependentes e independentes (LIRA, 2004).

Na Figura 5 é possível observar o grau de relação entre a expressão diferencial dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 e as variáveis fisiológicas avaliadas para cultivar BRS Cauê. A correlação obtida foi baixa e negativa para ambos os genes. Apesar disso, o gene Amy32b apresentou maior correlação com a análise de envelhecimento acelerado e de comprimento de raiz de plântula. Enquanto o gene  $\beta$ -amy1 foi melhor correlacionado com o teste de tetrazólio e de germinação.



fisiológicos e genéticos responsáveis pela qualidade da semente que, conseqüentemente, contribuem para o elevado potencial diastático da cevada.

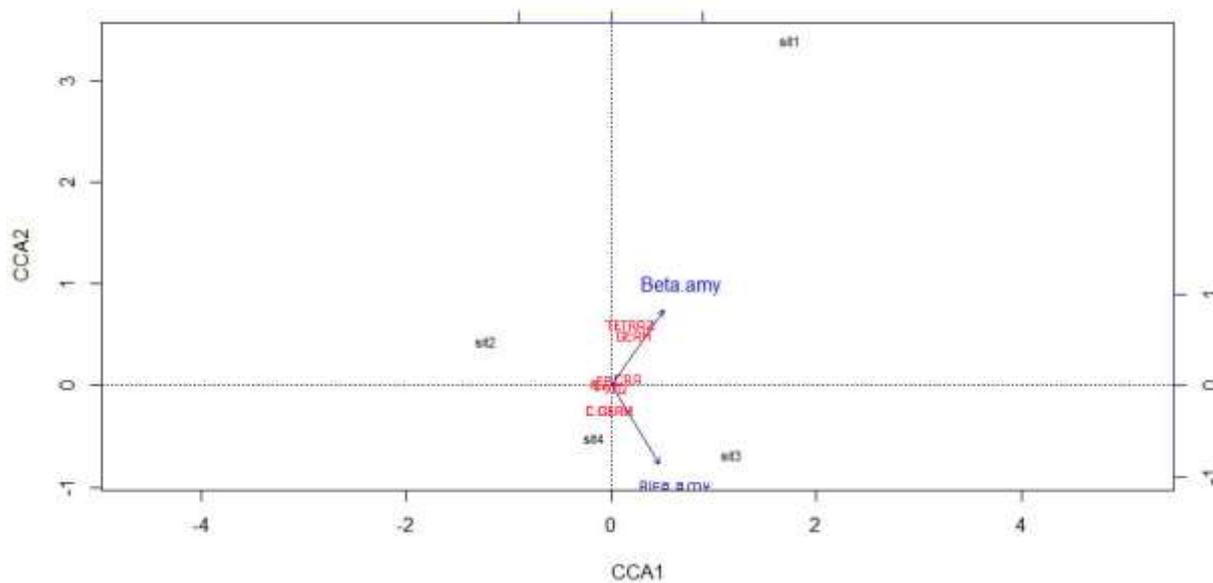


Figura 6 - Correlação canônica entre as variáveis fisiológicas e a expressão dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 em função de dois momentos de colheita (102 DAS e 127 DAS), avaliadas inicialmente e aos 107 dias das sementes de cevada da cultivar Irina. Ponta Grossa, 2018.

## 6. CONCLUSÕES

- (i) As sementes das duas cultivares que foram avaliadas após o período de armazenamento apresentaram de forma geral maior germinação e vigor.
- (ii) A presença de dormência nas sementes propiciou a manutenção da qualidade dessas mesmo após o armazenamento.
- (iii) A cultivar BRS Cauê para avaliação inicial apresentou maior germinação e índices de vigor na colheita realizada aos 114 DAS (15,89% de água), na qual o fenômeno de dormência foi menor.
- (iv) Para cultivar Irina os melhores resultados foram decorrentes da colheita realizada aos 107 DAS (20,27 % de água). Indicando que as sementes colhidas após esse período sofreram perdas de qualidade devido as condições ambientais reinantes no período.
- (v) A expressão diferencial dos genes Amy32b e  $\beta$ -amy1 ocorreu em escalas diferentes entre as duas cultivares, sendo que a cultivar Irina apresentou valores mais significativos.
- (vi) Não houve deterioração suficiente das sementes a ponto de influenciar de forma substancial a expressão diferencial desses genes.
- (vii) Não é possível estabelecer uma correlação entre testes de germinação e vigor com o de expressão gênica para este experimento, evidenciando a complexidade dessa relação e a necessidade de mais estudos que possam melhor elucidá-la.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRINOVA. Grãos e Fibras: Recorde a caminho. **Revista AGRINOVA**. n. 1, p. 42-51. 2000

AGROLINK, **Cereais de Inverno – Cevada, 2010**. Disponível em: <<https://www.agrolink.com.br/cereaisdeinverno/InformacoesTecnicasCevada.aspx>>. Acesso em 28.mai.2018.

AGRARIA. **Palestras simultâneas difundem tecnologia durante WinterShow 2017**. Disponível em: <<http://twixar.me/NzF3>>. Acesso em 14.mai.2018.

AN, Y; LIN, L. Transcriptional regulatory programs underlying barley germination and regulatory functions of gibberellin and abscisic acid. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 105, 2011.

ARGEL, P.J.; HUMPHREYS, L.R. Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano. I. Temperature. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 3, p. 261-270, 1983

BALDONI, A. B. **Acúmulo de rícino em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas**. 2010, 71f. Tese (Doutorado em Biologia molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

BARROS, D.I. et al. Comparação entre testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 2, p. 12-16, 2002.

BARROS, A.C.S.A.; PESKE, S.T. Produção de sementes. In: PESKE, S.T.; LUCCA, O.F.; BARROS, A.C.S.A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. v. 2, p. 470-498, 2006.

BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**. v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.

BOND, J. et al. Boutique brews, barley, and the balance sheet: Changes in malt barley industrial use require an updated forecasting approach. **Economic Research Division, United States Department of Agriculture**, p. 18-23, 2015.

BRASIL. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. **Anexo IX. Instrução normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013**. Padrões para a produção e a comercialização de sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Disponível em: <<http://twixar.me/pwF3>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A cerveja no brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo**. Disponível em: <<http://twixar.me/P5F3>>. Acesso em: 24.mai.2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 691 de 22 de novembro de 1996**. NORMA DE IDENTIDADE E QUALIDADE DA CEVADA. Disponível em: <<http://twixar.me/xzF3>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, p. 399, 2009.

BRIGGS, D.E. Malt modification, a century of evolving views. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 4, p. 395-405, 2002.

BURAAS, T.; SKINNES, H. Genetic investigations on seed dormancy in barley. **Hereditas**, v. 101, n. 2, p. 235-244, 1984.

BUSH, D.S. et al. The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone alpha-amylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 32, p. 19392-19398, 1989.

CARDOZO, T.M.; SCHUCH, L.O.B.; ROSENTHAL, M.D. Efeito do retardamento da colheita sobre a qualidade fisiológica de sementes de aveia-branca (*Avena sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p.331-338, 2002.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP. p. 588, 2000.

CHAVES NETO, A. **Análise multivariada aplicada à pesquisa**. Notas de Aula. Mestrado em Métodos Numéricos em Engenharia. Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2010.

CHRISPEELS, M.J.; VARNER, J. E. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of  $\alpha$ -amylase and ribonuclease by isolated barley and aleurone layers. **Plant Physiology**, v. 42, n. 3, p. 398-406, 1967.

COELHO, C.J. **Tolerância ao alumínio em milho tropical: Herança genética, Mapeamento de QTLs e Expressão Gênica**. 2015, 107f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2017/18 - Segundo levantamento**. Brasília. v. 5, p. 1-120, 2017.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.F. **Principles of seed science and technology**. Springer Science & Business Media, 2012.

COSTA, J.C.; ZIMMER, P.D.; VILELA, F.A. Base celular da origem e desenvolvimento do endosperma. **Revista Científica Rural**, v. 12, n. 1, p. 226-246, 2011.

DANERI-CASTRO, S. N.; SVENSSON, B.; ROBERTS, T.H. Barley germination: Spatio-temporal considerations for designing and interpreting 'omics' experiments. **Journal of Cereal Science**. v. 70, p. 29-37, 2016.

DANTAS, B.F. et al. Padronização da metodologia do RT-PCR utilizada para identificação do m-RNA da  $\alpha$ -amilase em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 2, p.113-117, 2002.

DELATORRE, C.A. Dormência em sementes de arroz vermelho. *Ciência Rural*, v. 29, n. 3, 1999.

DELATORRE, C.A. **Regulação não-específica da germinação de sementes de *Stylosanthes humilis***. Viçosa, 1994. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.

DELOUCHE, J.C. **Environmental effects on seed development and seed quality**. 1980.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, v.1, n.2, p.427-452, 1973.

DIAS, D.C.F. Maturação de sementes. **Seed News**. v. 5, n. 6, p. 22-24, 2001.

DOEHLERT, D.C.; DUKE, S.H. Specific determination of  $\alpha$ -amylase activity in crude plant extracts containing  $\beta$ -amylase. **Plant Physiology**, v. 71, n. 2, p. 229-234, 1983.

DUKE, S.H.; HENSON, C.A. A comparison of barley malt amylolytic enzyme activities as indicators of malt sugar concentrations. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 67, n. 2, p. 99-111, 2009.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, v. 45, n. 1, p. 13-30, 1980.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS CAUÊ**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/124355/1/FD-0346.pdf>>. Acesso em 14.mai.2018.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A cevada no Brasil**. Passo Fundo, 2012. Disponível em: <<http://twixar.me/d5F3>>. Acesso em: 18.mai.2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Agribusiness Handbook: Barley, Malt, Beer**. EastAgri Network, Rome, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>>. Acesso em 20.mai.2018.

FARMERS GUIDE. **New spring barley for European markets**. Disponível em: <<https://www.farmersguide.co.uk/feature/new-spring-barley-for-european-markets/>>. Acesso em 14.mai.2018.

FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Biology**, v. 40, n. 1, p. 305-346, 1989.

FINKELSTEIN, R. et al. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, 2008.

FLORIANI, A. P. **Cevada cervejeira: características bioquímicas**. UFRGS, Porto Alegre, 2002. Disponível em: <<http://twixar.me/Z5F3>>. Acesso em 30.mai.2018.  
FREEMAN, S.; MAIMON, M.; PINKAS, Y. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. **Phytopathology**, v. 89, n. 6, p. 456-461, 1999.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GAO, W. et al. Fine mapping of a malting-quality QTL complex near the chromosome 4H S telomere in barley. **Theoretical and applied genetics**, v. 109, n. 4, p. 750-760, 2004.

GUERIN, J.R.; LANCE, R.C.M.; WALLACE, W. Release and activation of barley beta-amylase by malt endopeptidases. **Journal of Cereal Science**, v. 15, n. 1, p. 5-14, 1992.

HALMER, P.; BEWLEY, J. D. A physiological perspective on seed vigour testing. **Seed Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 561-575, 1984.

HAYES, P. M. Malting quality from a QTL perspective. In: **8th International Barley Genetics Symposium**, Adelaide, South Australia, 2000. p. 99-105.

HENSON, C.A.; DUKE, S.H. A comparison of standard and nonstandard measures of malt quality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 1, p. 11-19, 2008.

HERRERA-GAMBOA, J.G. et al. Proteomic analysis of two malting barleys (*Hordeum vulgare* L.) and their impact on wort quality. **Journal of Cereal Science**, v. 80, p. 150-157, 2018.

HIGGINS, T.J.V.; ZWAR, J.A.; JACOBSEN, J.V. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for  $\alpha$ -amylase in barley aleurone layers. **Nature**, v. 260, n. 5547, p. 166, 1976.

HOLDSWORTH, M.J.; BENTSINK, L.; SOPPE, W.J.J. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytologist**, v. 179, n. 1, p. 33-54, 2008.

HORSLEY, R.D.; HOCHHALTER, M. Barley: Agronomy. **Encyclopedia of Food Grains**, Second Edition. USA, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00232-1>>. Acesso em 23.mai.2018.

HU, S. et al. Relationship between levels of diastatic power enzymes and wort sugar production from different barley cultivars during the commercial mashing process of brewing. **Starch-Stärke**, v. 66, n. 7-8, p. 615-623, 2014.

JACOBSEN, J.V.; HIGGINS, T.J.V. Characterization of the  $\alpha$ -amylases synthesized by aleurone layers of Himalaya barley in response to gibberellic acid. **Plant Physiology**, v. 70, n. 6, p. 1647-1653, 1982.

JENNINGS, P.R.; DE JESUS, J. Effect of Heat on Breaking Seed Dormancy in Rice. **Crop Science**, v. 4, n. 5, p. 530-533, 1964.

KAKEFUDA, G.; DUKE, S.H.; HOSTAK, M.S. Chloroplast and extrachloroplastic starch-degrading enzymes in *Pisum sativum* L. **Planta**, v. 168, n. 2, p. 175-182, 1986.

KUIPER, H.A. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. 2. Ed. Berlin: VLB Berlin, 1999. 726 p.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting. Research and teaching institute of brewing**, 1996. Disponível em: <<http://www.vlbberlin.org/english/kunze/enzym.htm>>. Acesso em 23.mai.2018.

KUNZE, W. **Tecnología para cerveceros y malteros**. 1. Ed. Berlin. VLB, 2006. 1074 p.

KUNZE, W; **Tecnologie Brauer & Mälzer**. 7th ed, Ed. Berlin: VLB Berlin, 1994. 1090 p.

KWS. **KWS Irina**. Disponível em: <<https://www.kws-uk.com/aw/Products-TopMenu/Winter-Barley/KWS-Irina/~etyq/>>. Acesso em 14.mai.2018.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington, OEA. 1983.

LAPITAN, N.L.V et al. Differentially expressed genes during malting and correlation with malting quality phenotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 5, p. 937-952, 2009.

LAZZARI, F. A. **Recebimento, secagem e armazenamento de cevada cervejeira**. Department of Grain Science and Industry. Kansas State University. Disponível em: <<http://twixar.me/B5F3>>. Acesso em: 13.jul.2018.

LI, C.D. et al. A major QTL controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting/grain  $\alpha$ -amylase in two-rowed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, n. 12, p. 1303-1313, 2003.

LI, X. et al. Comparative proteomic analysis of Dan'er malts produced from distinct malting processes by two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis (2D-DIGE). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 38, p. 9310-9316, 2014.

LIN, S.S. Efeito retardamento de colheita sobre o rendimento, peso, poder germinativo e vigor de aquênios de girassol (*Helianthus annuus* L.). **Agronomia Sulriograndense**, v.19, n.2, p.43-54, 1983.

LIN, S.S.; DE CARVALHO, F.I.F. Efeito do período de colheita sobre a qualidade e rendimento do produto final de trigo (*Triticum aestivum* L.). **Agronomia Sulriograndense**. v. 14 (2), p. 151-158, 1978.

LIRA, S.A. **Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações**. 2004, 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MA, Z.; BYKOVA, N.V.; IGAMBERDIEV, A.U. Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. **The Crop Journal**, 2017

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science Technology**, v. 27, p. 177-237, 1999.

MAGUIRE, J.D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor. **Crop science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARKET, C.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.45, p.753-763, 1959.

MARTINS, E.A.C.; MACIEL FILHO, P.R. Mecanismos de expressão gênica em Eucariotos. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 1-5, 2018.

MAYA-AMPUDIA, V.; BERNAL-LUGO, I. Redox-sensitive target detection in gibberellic acid-induced barley aleurone layer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1362-1368, 2006.

MERCIER, H. **Germinação de sementes. Modelo: Cevada**. Disponível em: <<http://felix.ib.usp.br/bib131/texto1/pag3.htm>>. Acesso em: 28.mai.2018.

MINELLA, E. Mais de 90% da área de cevada é cultivada com variedades da Embrapa. **Successful Farming Brasil**. SF Agro, 2016. Disponível em: <<https://sfagro.uol.com.br/cevada-variedades-embrapa/>>. Acesso em: 28. mai. 2018.

MINELLA, E. Safra brasileira de cevada-1998. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA, 19. 1999, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999.

MOLINA-CANO, J. L. et al. Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph I. Genotype by environment interaction of hordein content. **Journal of Cereal Science**, v.34, n. 3, p. 285–294, 2001.

MOLINA-CANO, J.L. et al. Mechanisms of malt extract development in barleys from different European regions: II. Effect of barley hordein fractions on malt extract yield. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, n. 2, p. 117-124, 2000.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal  $\alpha$ -amylases—an overview. **Carbohydrate polymers**, v. 60, n. 2, p. 163-173, 2005.

MUURINEN, S. et al. Breeding effects on nitrogen use efficiency of spring cereals under northern conditions. **Crop Science**, v.46, n.1, p.561-568, 2006.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994, p. 49-85.

NERY, M.C.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, L.M. Determinação do grau de umidade de sementes de ipê-docerrado *Tabebuia ochracea* ((Cham.) Standl.) pelos métodos de estufa e forno de microondas. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 28, p. 1299-1305, 2004.

NILAN, R.A.; ULLRICH, S.E. Barley: taxonomy, origin, distribution, production, genetics, and breeding. **Barley chemistry and technology**, p. 1-5, 1994.

NONOGAKI, H. Seed dormancy and germination—emerging mechanisms and new hypotheses. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 233, 2014.

OLIVEIRA, M.S.P. et al. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia** v. 34, n. 5, p. 1253-1260, 2010.

OLSEN, O.A. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 16, n. 1, p. S214-S227, 2004.

ONYEKA, U.; DIBIA, I. Malted weaning food made from maize, soybean, groundnut and cooking banana. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 5, p. 513-516, 2002.

OVESNA, J. et al. Validation of the  $\beta$ -amy1 transcription profiling assay and selection of reference genes suited for a RT-qPCR assay in developing barley caryopsis. **Public Library of Science**, v. 7, n. 7, p. e41886, 2012.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p.255-262, 2001

PALMER, J. J. How to Brew: Everything you need to know to brew beer right the first time. **Brewers Publications**, 2006.

PERRY, D.A. Report of the vigour committee, 1974-1978. **Seed Science & Technology**, v.6, n.1, p.159-181, 1978.

PFÄFFL, M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PINHEIRO, L.G.P. **Caracterização e processamento de cevada cultivada no cerrado brasileiro**. 2016, 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química e Biológica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

PORPINI, G. Grandes culturas. **Revista Cultivar**. Pelotas, RS. 2016. Disponível em: <<https://www.grupocultivar.com.br/noticias/mais-de-90-da-cevada-plantada-no-brasil-e-resultado-da-pesquisa-nacional>>. Acesso em: 25.mai.2018.

POTOKINA, E. et al. Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Functional & Integrative Genomics**, v. 2, n. 1-2, p. 28-39, 2002.

PUNDA, I.; PRIKHODKO, D. **Agribusiness Handbook: Barley Malt Beer**. FAO, Rome. 2009. Disponível em: <<http://twixar.me/99L3>>. Acesso em: 26.maio.2018.

RAMÍREZ, H.; CALDERÓN, A.; ROCCA, W. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. CIAT, p. 825-856, 1991.

REINER, L.; LOCH, N. Ein vorhersageverfahren bei braugerste. **Brauwissenschaft**, v. 29, n. 2, p. 167-168, 1976.

REUSS, R.; CASSELLS, J.A.; GREEN, J.R. Malting barley: storage, dormancy and processing quality. In: AUSTRALIAN POSTHARVEST TECHNICAL CONFERENCE, 2003, Camberra. **Proceedings...** Camberra: Stored Grain Research Laboratory, 2003. p. 44-48

SAIKA, H. et al. A transposon-induced spontaneous mutation results in low  $\beta$ -amylase content in rice. **Plant Science**, v. 169, n. 1, p. 239-244, 2005.

SANTOS, I. J. et al. A alfa e beta amilase durante a germinação de cevada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.67-73, 2010.

SCHMITT, M.R.; SKADSEN, R.W.; BUDDE, A.D. Protein mobilization and malting-specific proteinase expression during barley germination. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 2, p. 324-332, 2013.

SEAB. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná. **Investimento do setor cervejeiro estimulam a produção de cevada**. Curitiba: SEAB, 2015. Disponível em: <[www.casacivil.pr.gov.br/2015/07/85116,10/Investimentos-do-setor-cervejeiroestimulam-producao-de-cevada-.html](http://www.casacivil.pr.gov.br/2015/07/85116,10/Investimentos-do-setor-cervejeiroestimulam-producao-de-cevada-.html)>. Acesso em: 26.maio.2018.

SHENG, Y. et al. Effects of exogenous gamma-aminobutyric acid on  $\alpha$ -amylase activity in the aleurone of barley seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 127, p. 39-46, 2018.

SHITAKUBO, R. **A degradação do amido da banana depende da ação combinada de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase em regiões de diferentes graus de cristalinidade do grânulo**. 2015, 138f. Teses (Doutorado em Farmácia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SIKDER, H.P. Dormancy of paddy seeds in relation to different seed treatments. **Experimental Agriculture**, v. 3, n. 3, p. 249-255, 1967.

SILVA, R.N. et al. Physiological quality of barley seeds submitted to saline stress. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 40-44, 2007.

SREENIVASULU, N. et al. Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. **Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 1738-1758, 2008.

STANCA, A. M. et al. Barley: an overview of a versatile cereal grain with many food and feed uses. In: WRIGLEY, C. et al. (Eds). **Encyclopedia of Food Grains**, 2nd ed.; p. 147-152, 2016.

STRAND, E. Studies on seed dormancy in small grain species. Part 1. Barley. **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, n.3, p. 85-99, 1989.

SUN, Z.; HENSON, C.A. A quantitative assessment of the importance of barley seed  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, debranching enzyme, and  $\alpha$ -glucosidase in starch degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 284, n. 2, p. 298-305, 1991.

SUN, Z.; HENSON, C.A. A quantitative assessment of the importance of barley seed  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, debranching enzyme, and  $\alpha$ -glucosidase in starch degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 284, n. 2, p. 298-305, 1991.

TONIAZZO, C. **Micromalteação e marcadores moleculares como suporte ao melhoramento de cevada cervejeira**. 2014, 110f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

TSCHOPE, E. C.; NOHEL, F. A malteação da cevada. Vassouras: Senai-RJ, 1999. 272 p.

TUNES, L.M. et al. Testes de vigor em função de diferentes épocas de colheita de sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.3, n.4, p.321-326, 2008.

TUNES, L.V.M. **Atributos fisiológicos de qualidade de sementes de cevada sobre diferentes épocas de colheita e durante o armazenamento.** 2009, 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Univesidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

TUNES, L.V.M. et al. Armazenabilidade de sementes de cevada colhidas em diferentes épocas. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.

TUNES, L.V.M. et al. Tratamentos para superação da dormência em sementes de cevada. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 1, 2009.

VENTURINI FILHO, W.G. et al. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado.** São Paulo: Edgard Blucher, 2005.

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

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.

VILLIERS, T.A. Seed dormancy. In: KOZLOWSKY, T.T. (Ed). **Seed biology**, New York: Academic Press, v.2, p.220 - 282, 1972.

VINJE, M.A. et al. Differential RNA expression of Bmy1 during barley seed development and the association with  $\beta$ -amylase accumulation, activity, and total protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 39-45, 2011.

ZALE, J.M. et al. Summary of barley malting quality QTLs mapped in various populations. **Barley Genetics Newsletter**, v. 30, p. 44-54, 2000.

ZCSHOERPER, O.P. **Apostila curso cervejeiro e malteador.** Porto Alegre, AMBEV, 2009. 79p.

ZHOU, M.X. **Barley production and consumption.** In: **Genetics and Improvement of Barley Malt Quality.** Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 1-17.

ZIMMER, P. D. Produção de Sementes. In: PESKE, S.T.; LUCCA FILHO, O.; BARROS, A.C.S.A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos.** 2ªed. Ver. E ampl. Pelotas: Ed.Universitária/UFPel, 2006. 470 p.

## APÊNDICES

## **APÊNDICE A – DESCRIÇÃO DA CULTIVAR BRS CAUÊ**

A cultivar foi desenvolvida pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo, em parceria com a Ambev e a Cooperativa Agrária Agroindustrial.

Segundo a Embrapa, essa cultivar apresenta porte anão, medindo cerca de 0,80 m, estatura que condiciona maior resistência ao acamamento. A semeadura é indicada para o mês de junho, seu ciclo é de 125 a 135 dias, iniciando seu espigamento a partir de 85 dias após a semeadura. O rendimento potencial é de 6000 kg ha<sup>-1</sup>, e seus grãos apresentam classificação média superior a 80% de classe 1.

O malte produzido a partir dessa cultivar no Paraná e Rio Grande do Sul apresenta perfil de qualidade e atende as normas das indústrias cervejeiras.

## APÊNDICE B – Manejo fitossanitário para o experimento de avaliação da Cultivar BRS Cauê

A semeadura da cultivar BRS Cauê foi realizado no dia 3 de junho de 2017, com densidade de 160 kg ha<sup>-1</sup> e espaçamento de 0,17 m entre linhas. A adubação de base foi de 300 kg ha<sup>-1</sup> na formulação NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) de 14-40-00 mais 7% de S (enxofre) e a adubação de cobertura foi de 120 kg ha<sup>-1</sup> de ureia mais 200 kg ha<sup>-1</sup> de KCL (cloreto de potássio).

No dia 28 de junho realizou-se a aplicação do herbicida Hussar® (Iodossulfurom-metílico-sódico), na dosagem 0,1 kg ha<sup>-1</sup> com o adjuvante Hoefix® (Lauril éter sulfato de sódio), na dosagem de 0,2 L ha<sup>-1</sup>.

Uma aplicação conjunta de herbicidas mais fungicida foi aplicada no dia 7 de julho, Ally® (Metsulfurom-metílico) na dosagem 0,05 kg ha<sup>-1</sup> e 2-4-D na dosagem de 1 L ha<sup>-1</sup>, mais Corbel® (Fenpropimorfe) na dosagem de 0,6 L ha<sup>-1</sup> e Iharol® (óleo mineral) na dosagem 0,25 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em 2 de agosto aplicou-se os fungicidas Corbel®, (Fenpropimorfe) na dosagem 0,4 L ha<sup>-1</sup> e Gauss® (Epoconazol), na dosagem 0,6 L ha<sup>-1</sup>.

Os fungicidas Nativo® (Trifloxistrobina e Tebuconazo), na dosagem 0,8 L ha<sup>-1</sup>; Rovral® (Iprodiona), na dosagem 0,5 L ha<sup>-1</sup>, mais o adjuvante Hoefix® (Lauril éter sulfato de sódio), na dosagem 0,2 L ha<sup>-1</sup>.

No dia 4 de setembro foram aplicados os fungicidas Carbendazim® (Carbendazim), na dosagem 1,0 L ha<sup>-1</sup> e Gauss® (Epoconazol), na dosagem 0,6 L ha<sup>-1</sup>.

## **APÊNDICE C – Descrição da cultivar Irina**

A cultivar Irina foi desenvolvida na Europa pela empresa KWS, é caracterizada como cevada de primavera e vem ganhando mercado devido sua alta produtividade e também à elevada qualidade do malte obtido (FARMERS GUIDE, 2014). Apresenta alta resistência ao acamamento e grande capacidade de perfilhamento (KWS, 2018).

No Brasil sua adaptação é uma parceria entre a empresa KWS e a FAPA, sua apresentação aos produtores no estado do Paraná foi no ano de 2017 (AGRÁRIA, 2017), sendo assim, ainda não se tem informações disponíveis a respeito do desempenho dessa cultivar para as nossas condições ambientais.

## APÊNDICE D – Manejo fitossanitário para o experimento de avaliação da Cultivar Irina

A semeadura da cultivar Irina foi realizada no dia 4 de junho de 2017, com densidade de 160 kg ha<sup>-1</sup> em um espaçamento de 0,17 m entre linhas. A adubação de base foi de 300 kg ha<sup>-1</sup> da formulação NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) de 10-20-20 e a adubação de cobertura foi de 120 kg ha<sup>-1</sup> de ureia.

No dia 27 de junho foi realizada a aplicação conjunta de herbicida Hussar® (Iodossulfurom-metílico-sódico), na dosagem 0,1 kg ha<sup>-1</sup> com o adjuvante Hoefix® (Lauril éter sulfato de sódio) e Guapo® (Cresoxim-metílico e Epoxiconazol), nas dosagens de 0,2 L ha<sup>-1</sup> e 0,75 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

Uma nova aplicação de herbicidas e fungicida foi realizada no dia 3 de agosto, Ally® (Metsulfurom-metílico) na dosagem 0,05 kg ha<sup>-1</sup> e Agritone® (MCPA) na dosagem 1,0 L ha<sup>-1</sup> mais, Brio® (Cresoxim-metílico e Epoxiconazol) na dosagem 0,6 L ha<sup>-1</sup> e Iharol® (óleo mineral) na dosagem 0,25 L ha<sup>-1</sup>.

Em 24 de agosto foi realizada a aplicação dos inseticidas Galaxy® (Novalurom) e Platinum neo® (Lambda-cialotrina e Tiametoxam), nas dosagens 0,1 e 0,07 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente, mais os fungicidas Ativum® (Piraclostrobina, Epoxiconazol e Fluxapiraxade) e Iharol® (óleo mineral), na dosagens 0,8 e 0,5 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os fungicidas Nativo (Trifloxistrobina e Tebuconazo), Rovral (Iprodiona), Carbendazim (Carbendazim), Certero (Triflumuron) e o adjuvante Hoefix (Lauril éter sulfato de sódio), nas dosagens 0,6; 0,5; 1,0; 0,05 e 0,2 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente, foram aplicados no dia 11 de setembro.

**APÊNDICE E - Concentrações (ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de RNA total obtidas pela extração de amostras de sementes de cevada e relações A260/A280 e A260/230.**

Cultivar BRS CAUÊ							
Tratamento/ Rep	ng $\mu\text{L}^{-1}$	A 260/280	A 260/230	Tratamento/ Rep	ng $\mu\text{L}^{-1}$	A 260/280	A260/230
Controle	32,8	2,680	0,018	T5 I	44,4	3,038	0,011
T1 I	37,6	1,895	0,099	T5 II	35,2	1,905	0,175
T1 II	-	-	-	T5 III	34,4	2,157	0,069
T1 III	29,2	1,872	0,224	T5 IV	25,2	1,969	0,079
T1 IV	39,2	1,888	0,171	T8 I	26,4	2,389	0,019
T4 I	48,8	2,453	0,022	T8 II	32,4	2,250	0,024
T4 II	58,4	1,829	0,118	T8 III	40,0	2,083	0,037
T4 III	45,6	1,933	0,098	T8 IV	44,4	2,200	0,033
T4 IV	58,0	2,237	0,025				

Cultivar IRINA							
Tratamento/ Rep	ng $\mu\text{L}^{-1}$	A 260/280	A 260/230	Tratamento/ Rep	ng $\mu\text{L}^{-1}$	A 260/280	A 260/230
Controle	28,4	1,972	0,133	T5 I	-	-	-
T1 I	-	-	-	T5 II	39,6	2,250	0,029
T1 II	28,8	2,000	0,200	T5 III	57,2	2,509	0,031
T1 III	39,2	1,960	0,221	T5 IV	58,8	2,410	0,032
T1 IV	104,0	2,955	0,055	T8 I	52,8	2,444	0,030
T4 I	62,4	2,836	0,034	T8 II	29,2	2,274	0,025
T4 II	42,0	2,019	0,282	T8 III	48,4	2,881	0,026
T4 III	35,2	2,514	0,020	T8 IV	42,4	2,524	0,023
T4 IV	58,0	1,987	0,611				