



**ROBERTA FONSECA**

**TERMOINIBIÇÃO EM SEMENTES DE ALFACE  
EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DA FLOR E DO  
ARMAZENAMENTO**

**LAVRAS – MG  
2016**

**ROBERTA FONSECA**

**TERMOINIBIÇÃO EM SEMENTES DE ALFACE EM FUNÇÃO DA  
POSIÇÃO DA FLOR E DO ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em produção vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes

**LAVRAS – MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Fonseca, Roberta.

Termoinibição em sementes de alface em função da posição da  
flor e do armazenamento / Roberta Fonseca. – Lavras: UFLA, 2016.  
60 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2016.

Orientador: Luiz Antonio Augusto Gomes.

Bibliografia.

1. *Lactuca sativa* L. 2. Dormência primária. 3. Teste de  
germinação. 4. Enzima endo-  $\beta$ -mananase. I. Universidade Federal  
de Lavras. II. Título.

**ROBERTA FONSECA**

**TERMOINIBIÇÃO EM SEMENTES DE ALFACE EM FUNÇÃO DA  
POSIÇÃO DA FLOR E DO ARMAZENAMENTO**

**THERMOINIBITION IN LETTUCE SEEDS IN FUNCTION OF  
FLOWER POSITION AND STORAGE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em produção vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 11 de novembro de 2016.

Dra. Luciane Vilela Resende

UFLA

Dr. Luciano Donizete Gonçalves

IFMG

Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2016**

*A Deus por me guiar, estar sempre ao meu lado, sendo fonte de alimento e de  
força todos os dias.  
A minha mãe que nunca mediu esforços para concretizar os meus sonhos, sendo  
minha base e referência.  
Ao meu esposo, Anderson, por todo seu amor, incentivo, companheirismo e  
paciência.*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença em todos os momentos da minha vida, sem Ele nada seria possível! Toda honra e glória seja atribuída a Ele.

Ao meu esposo Anderson, a quem sou infinitamente grata, sem a sua ajuda, amor e companheirismo eu não conseguiria.

À minha família, minha mãe, meu grande exemplo! Meu pai, pelo incentivo, ao meu irmão, por cada palavra de sabedoria e às minhas sobrinhas, por toda alegria e amor!

Ao meu orientador Luiz Antonio, por toda dedicação, pela ajuda, pelos ensinamentos transmitidos e pela infinita paciência!

Ao amigo Luciano Donizete, por todo apoio, pelos conselhos, pelo auxílio durante toda a minha caminhada acadêmica e pessoal!

À professora Luciane Vilela, pela dedicação, estando sempre disposta em ajudar! Aos professores Renato Mendes e Heloísa, pela colaboração!

À comunidade evangélica Sara Nossa terra, por ser meu apoio espiritual, minha segunda família!

Ao Departamento de Agricultura (DAG) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA), por possibilitar-me cursar o mestrado.

Aos colegas: Camila, Taylor, Lu, Márcia, Natália, Ana, Dani, Gabriel, Inês, Pedro, Débora, Giuliana, Raísla, Edila, Milena, Rucyan, Núbia, Duda, Mari, Alex, Henrique Maluf e Damiany por toda amizade, pelo auxílio e companheirismo em disciplinas e na condução do experimento.

À empresa HortiAgro sementes e todos os funcionários, por toda ajuda e comprometimento para realização do trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa em minha vida!

**Muito obrigada!**

## RESUMO

A alface é uma das hortaliças de maior expressão no mundo. Seu consumo cresce a cada ano em todo o Brasil e ampliam-se as áreas de produção para diferentes regiões. Porém, uma das limitações para sua produção é a ocorrência de temperaturas elevadas durante a germinação das sementes, o que leva a maioria das cultivares a não germinarem em temperaturas superiores a 28 °C. No entanto, a cultivar Everglades apresenta germinação de 60 a 70%, em média, em temperatura de 35 °C, sendo considerada tolerante à germinação em temperatura alta (tolerante à termoinibição). Por outro lado, ainda, um fator que normalmente impede/diminui a germinação logo após a colheita é a dormência primária. A posição das sementes na planta-mãe é um aspecto que pode influenciar a dormência de sementes de alface. Assim, objetivou-se com este trabalho, avaliar a influência da posição das sementes na planta-mãe e o efeito do armazenamento de sementes de alface da cultivar Everglades na germinação em temperatura de 35 °C, e analisar a atividade de enzimas e bandas de proteínas tolerantes ao calor. Os experimentos foram conduzidos na área experimental da HortiAgro Sementes S/A e no Laboratório de Análises de Sementes (UFLA). Foram obtidas progênies das cultivares Everglades (tolerante à termoinibição) e Verônica (sensível à termoinibição) a partir de sementes germinadas nas temperaturas de 20 e 35 °C, sendo as sementes, objeto de estudo, colhidas em duas partes da inflorescência (ápice e base). As sementes das progênies foram avaliadas pelos testes de germinação em 4 épocas após a colheita (70, 130, 190 e 400 dias), nestas também foram avaliadas atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase e padrão da proteína resistente ao calor aos 400 dias após a colheita. Não houve diferença na germinação das sementes quanto à sua origem na geração anterior, seja de plantas oriundas de sementes que germinaram a 20 ou a 35 °C. Também não se constatou diferença quanto à posição das sementes nas inflorescências da planta mãe. Por outro lado, verificaram-se diferenças entre as progênies de “Everglades” e para as épocas de armazenamento. A cultivar Everglades mostrou-se tolerante à termoinibição quando comparada à cultivar Verônica e sendo essa tolerância afetada pela dormência primária/termoinibição. De modo geral não houve relação direta entre as progênies, a percentagem de germinação e a atividade enzimática. Verificou-se também que a expressão das proteínas e a atividade da endo- $\beta$ -mananase é maior no genótipo tolerante à termoinibição.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa* L., dormência primária, teste de germinação, enzima endo- $\beta$ -mananase.

## ABSTRACT

Lettuce is one of the vegetables with the highest expression in the world. Its consumption is growing every year in Brazil and expanded the production areas for different regions. However, a limitation for its production is the occurrence of high temperatures during the germination, which takes most cultivars do not germinate at temperatures above 28 ° C. However, the Everglades cultivar shows germination of 60 to 70%, on average 35°C, considered tolerant germination at high temperature (tolerant thermo inhibition).. On the other hand, also a factor that normally prevents / reduces germination soon after harvesting is the primary dormancy. The position of the seed in the mother plant is an aspect that can influence the dormancy of lettuce seeds. Thus, the aim of this work was to evaluate the influence of the position of the seed in the mother plant and the effect of Everglades cultivar lettuce seed germination in storage at 35 ° C temperature, and analyze the levels of enzymes and proteins heat tolerant. The experiments were conducted in the experimental area of HortiAgro Sementes S/A and Seed Analysis Laboratory (UFLA). Were obtained progenies of Everglades cultivars (tolerant thermoinhibition) and Veronica (sensitive to thermoinhibition) from germinated seeds in temperatures of 20 and 35 ° C, the seeds, object of study, collected in two parts of the inflorescence (apex and base). The seeds of the progenies were evaluated by germination in four seasons after harvest (70, 130, 190 and 400 days), these were also evaluated activity of endo- $\beta$ -mannanase enzyme and standard resistant protein to heat to 400 days after the harvest. There was no difference in seed germination as to its origin in the previous generation, both in plants grown from seeds that germinated at 20 or 35 ° C. Was also not found difference in the position of the seed in the mother plant inflorescences. On the other hand, there were differences between the progenies of "Everglades" and the storage times. The Everglades cultivar showed to be tolerant thermoinhibition compared to cultivate Veronica and that this tolerance is affected by the primary dormancy / thermoinhibition. Overall there was no direct relationship between the progenies, the percentage of germination and enzyme activity. It was also found that the expression of the protein and the activity of endo- $\beta$ -mannanase is higher in the thermoinhibition tolerant genotype.

**Keywords:** *Lactuca sativa* L., primary dormancy, germination test, enzyme endo- $\beta$ -mananase.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Porcentagem de germinação a 35°C de 20 progênies da cultivar Everglades em função dos períodos de armazenamento (70, 130, 190 e 400 dias após colheita). ..... 41
- Figura 2 - Porcentagem de germinação das sementes de 20 progênies da cultivar Everglades nas temperaturas de 35 e 20 °C, nos períodos de armazenamento de 70 (A) e 130 (B) dias após colheita. .... 42
- Figura 3 - Porcentagem de germinação das sementes de 20 progênies da cultivar Everglades nas temperaturas de 35 e 20 °C, nos períodos de armazenamento de 190 (C) e 400 (D) dias após colheita. .... 42
- Figura 4 - Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em 11 progênies de alface da cultivar Verônica e 11 da Everglades. .... 49
- Figura 5 -Padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor em sementes de alface de 11 cultivares de Verônica e em 11 cultivares de Everglades..... 50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Percentuais médios de germinação a 35 °C de sementes de alface da cultivar Everglades, colhidas em plantas originárias de sementes que germinaram a 35 °C (progênes de 1 a 10) e a 20 °C (progênes de 11 a 20). (Conclusão)..... 35
- Tabela 2 - Percentuais médios de germinação a 35 °C de sementes de alface da cultivar Everglades, colhidas em plantas originárias de sementes que germinaram a 35 °C (progênes de 1 a 10) e a 20 °C (progênes de 11 a 20). (Conclusão)..... 39
- Tabela 3 - Equações de regressão ajustadas do índice de porcentagem de germinação a 35°C em função do período de armazenamento de 20 progênes da cultivar Everglades..... 42
- Tabela 4 - Porcentagem de sementes viáveis (V) e mortas (M) pelo teste de tetrazólio em sementes remanescentes do teste de germinação a 35 e 20°C de sementes de alface da cultivar Everglades armazenadas em quatro períodos de tempo após a colheita. .... 47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos gerais: Cultura da alface .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Germinação de sementes de alface em altas temperaturas .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Dormência de sementes .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Fatores que influenciam na dormência.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Armazenamento de sementes.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Proteínas tolerantes ao calor.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Enzima endo-<math>\beta</math>-mananase .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção das sementes.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Teste de germinação .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Teste de tetrazólio .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Análises enzimáticas e proteicas .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Análise da enzima endo-<math>\beta</math>-mananase .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Eletroforese de proteínas resistentes ao calor .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Avaliação quanto à posição das sementes na planta mãe e quanto à temperatura de germinação das sementes que deu origem às progênes .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Avaliação da germinação a 35°C nos quatro períodos de armazenamento.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Análises enzimáticas e proteicas .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Posição das sementes na planta mãe e temperatura de germinação da semente que deu origem às progênes.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Germinação a 35°C ao longo do período de armazenamento .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Proteínas resistentes ao calor e enzima endo-<math>\beta</math>-mananase em 11 progênes da cultivar Verônica e em 11 da cultivar Everglades .....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família *Asteraceae*, sendo uma das hortaliças de maior expressão no mundo. O Brasil é um importante produtor e consumidor de alface, tanto em saladas *in natura*, como processada. Cresce a cada ano o interesse pelo consumo dessa hortaliça em todo o país, ampliando as áreas de plantio para diferentes regiões.

Apesar desse alto potencial de produção e consumo, prevalecem alguns problemas climáticos que prejudicam a produção em determinadas regiões, limitando as áreas de plantio. Normalmente, a produção é prejudicada em algumas regiões do Brasil devido à ocorrência de temperaturas elevadas, sendo um dos problemas principais o fato da temperatura alta interferir negativamente no processo de germinação das sementes. A temperatura ótima para germinação das sementes de alface situa-se em torno de 20 °C. Diversos trabalhos, além da própria experiência que os produtores têm vivido no campo, demonstram que a maioria das cultivares não germina em temperaturas mais elevadas, acima de 28 °C. A baixa germinação afeta diretamente viveiristas e produtores, pois além de perderem os insumos, a ocupação de área para produção de mudas e o trabalho, muitas vezes perdem contratos de produção, em vista de não terem mudas ou plantas no momento de fazer a entrega.

Alguns trabalhos evidenciam que, além do efeito ambiental, há um componente genético importante associado a maior ou menor capacidade de germinação em temperaturas elevadas, existindo variabilidade genética para essa característica (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; ARGYRIS et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2012). Normalmente, sementes da maioria das cultivares apresentam uma baixa germinação em temperaturas superiores a 28 °C. É sabido, no entanto, que alguns genótipos, como é o caso da cultivar Everglades, alcança germinação em torno de 60 a 70%, em média, à temperatura

de 35 °C. Como a cultivar Everglades é tida como uma linhagem pura, cujos genótipos de todas as plantas deveriam levar a um comportamento semelhante, é interessante observar que cerca de 30% das sementes não germinam em temperatura de 35 °C. Com isso algumas hipóteses podem ser consideradas para explicar esse fato. Entre elas, destaca-se a de que a cultivar Everglades é formada por uma mistura de linhas puras, na qual 30% dos genótipos são representados por plantas em homozigose para suscetibilidade à germinação em temperaturas elevadas e outros 70% por plantas que se encontram em homozigose para tolerância à germinação em temperaturas elevadas.

A dormência de sementes também é um fator que afeta algumas espécies de plantas e, no caso da alface, é comum a ocorrência de dormência primária, que impede ou diminui a capacidade de germinação das sementes logo após a colheita, prejudicando a formação de estandes uniformes de mudas para transplântio. Alguns autores citam que a posição das sementes na planta-mãe constitui-se em um dos aspectos que pode influenciar a dormência de sementes de alface (MARCOS FILHO, 2005; LOPES; NASCIMENTO, 2012).

Seria interessante verificar a possibilidade de se ampliar porcentagem de germinação das sementes em temperatura elevada, buscando entender melhor quais fatores podem contribuir para o aumento desse valor. Assim, elucidar alguns aspectos que podem estar relacionados à termoinibição e termodormência é de grande importância para que se possam compreender melhor os fatores ambientais e genéticos que afetam a expressão dessa característica. Torna-se importante conhecer os diferentes mecanismos associados à capacidade das sementes de alguma(as) cultivar(es) germinar(em) em temperatura mais elevada, com vistas a se realizarem trabalhos de melhoramento para a obtenção de novas linhagens mais adaptadas a essas condições.

Dessa forma, os objetivos neste trabalho foram:

- 1- verificar a possibilidade de existência de linhas puras, dentro da cultivar Everglades de alface, em diferentes condições de homozigose para tolerância à termoinibição;
- 2- avaliar a influência da posição das sementes na planta mãe e o efeito do armazenamento na germinação em temperatura de 35 °C, de sementes de alface da cultivar Everglades;
- 3- avaliar a atividade enzimática da enzima endo- $\beta$ -mananase e as bandas das proteínas tolerantes ao calor nessas sementes.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais: cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil, devido a seu fácil cultivo e a sua composição (minerais, proteínas, carboidratos e vitaminas) (LOPES et al., 2003). Pertencente à família *Asteracea*, a alface é originária de regiões amenas do Mediterrâneo, sendo uma planta que floresce sob dias longos e temperaturas altas, em condições ambientais de temperaturas amenas e dias curtos favorecem a etapa vegetativa do ciclo (FILGUEIRA, 2008).

A planta é herbácea, delicada, possui caule diminuto, no qual se prendem as folhas que são amplas e crescem em rosetas, podendo ser lisas ou crespas e formar cabeça ou não, com coloração em vários tons de verde ou roxo de acordo com a cultivar. Possui sistema radicular ramificado e superficial, quando transplantada explora apenas 25 cm de profundidade. Quando semeada na forma direta, apresenta raiz pivotante que pode atingir 60 cm de profundidade (FILGUEIRA, 2008).

A alface apresenta inflorescência do tipo capítulo, este é formado por três brácteas que envolvem de 10 a 25 flores e cada flor possui óvulo ínfero. O cálice é coberto por um anel de cerdas (papus) e a corola é soldada por suas anteras que rodeiam o estilete. O óvulo é formado por dois carpelos fundidos que contêm um só óvulo e que formará um único aquênio por florete. As sementes de alface são do tipo aquênio, isto é, um fruto seco, cuja semente está ligada pela região do funículo desenvolvido a partir do ovário com um único óvulo (SALA; NASCIMENTO, 2014).

Essa folhosa é adaptada a temperaturas amenas, sendo que a ideal para o seu desenvolvimento está na faixa de 15,5 a 18,3 °C, apesar de tolerar

temperaturas entre 26,6 a 29,4 °C, por alguns dias, desde que as temperaturas noturnas sejam baixas (SANDERS, 2013). Temperaturas acima de 20 °C induzem o florescimento precoce, o que força os produtores a realizarem uma colheita antecipada, antes mesmo das plantas atingirem o ponto ideal de colheita, trazendo assim prejuízos, por ter que comercializar a alface por um menor valor, sendo comum comercializar duas plantas juntas pelo preço de uma (VIGGIANO, 1990). O pendoamento precoce provoca o alongamento do caule, afeta a formação da cabeça comercial e estimula a produção de lactonas, as quais conferem um sabor amargo à folha, tornando assim a planta imprópria para o consumo (COCK et al., 2002). Dessa forma a produção dessa folhosa pode ser prejudicada em regiões com temperaturas elevadas.

## **2.2 Germinação de sementes de alface em altas temperaturas**

Em condições de altas temperaturas na fase de embebição das sementes, podem ocorrer dois fenômenos, sendo eles: a termoinibição, que remete à dificuldade que as sementes encontram para germinar em temperaturas altas, mas esse processo é considerado reversível, pois a germinação é retomada quando a temperatura reduz para nível ideal, e a termodormência que é conhecida também como dormência secundária, na qual as sementes não germinam mesmo após a redução da temperatura (KHAN, 1981).

Assim, dependendo das condições do local e da época de semeadura, pode ocorrer pouca ou nenhuma germinação, comprometendo a população de plantas. Os processos fisiológicos e bioquímicos que controlam a dormência de sementes e o possível mecanismo da germinação de sementes de alface, principalmente em altas temperaturas, não são bem entendidos (SALA; NASCIMENTO, 2014). Existem alguns fatores capazes de interferir na germinação de alface em altas temperaturas, como: impermeabilidade à troca de

gases e a absorção de água dos tecidos que cobre o embrião, mau funcionamento do fitocromo, efeito inibidor do ácido abscísico, deficiência do potencial de crescimento do embrião, inibição de enzimas que degradam os tecidos que cobrem o embrião e resistência mecânica dos tecidos que cobrem o embrião (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002).

Existem algumas alternativas para minimizar o problema da termoinibição e conseqüentemente maximizar a germinação em temperaturas elevadas. Entre eles estão os reguladores de crescimento, como as citocininas, etileno e giberelinas que, quando aplicadas separadas (soluções de 10 $\mu$ M) ou de forma combinada, podem inibir a termodormência e estimular a germinação das sementes de alface (NASCIMENTO, 2002). Entre os reguladores de crescimento, o etileno se destaca por estimular a germinação e superar a dormência em várias espécies (ESASHI, 1991). O etileno é um fitohormônio que possui forma gasosa (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), sendo considerado um potente regulador de crescimento, afetando vários processos do desenvolvimento das plantas, como crescimento, diferenciação e senescência (KADER, 1985).

Estudos demonstram que em sementes de alface, a síntese de etileno decresce em temperaturas altas durante a embebição das sementes. Entretanto, o efeito inibitório de temperaturas altas sobre a germinação de sementes de alface pode ser superado com a adição do etileno (HUANG; KHAN, 1992; NASCIMENTO, 2003). Assim, a aplicação de precursores de etileno ou produtos à base de etileno tem permitido a germinação de sementes de alface em altas temperaturas (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002). Existe também uma estreita ligação entre o enfraquecimento do endosperma, a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, a produção de etileno e a germinação das sementes de alface sob altas temperaturas (CANTLIFFE et al., 2000)

Nesse contexto, a possibilidade de ocorrer germinação em temperaturas elevadas está associada ao enfraquecimento e amolecimento do endosperma, que

possibilita o crescimento do embrião sob essa condição (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002). O embrião da alface é completamente incluído dentro do endosperma em que a radícula deve penetrar para crescer e terminar a germinação. Sendo assim, as primeiras horas de embebição são consideradas críticas para que as sementes de alface germinem sob condições de altas temperaturas (NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2004).

O endosperma pode retardar ou impedir a germinação das sementes, atuando como uma barreira física à protrusão da radícula sob temperatura elevada, podendo ocorrer à germinação atípica, através dos cotilédones e não da radícula. Assim, nessas condições, o enfraquecimento do endosperma torna-se um pré-requisito para protrusão da radícula (SALA; NASCIMENTO, 2014). O hormônio etileno pode estar também envolvido nesse processo, atuando diretamente no enfraquecimento do endosperma da semente através de um desconhecido mecanismo, ou estar envolvido na regulação de enzimas responsáveis pela “digestão” da parede celular do endosperma (por exemplo, endo- $\beta$ -mananase), ou a combinação de ambos. Todos esses processos favoreceriam a protrusão da radícula e conseqüentemente a germinação das sementes de alface sob altas temperaturas (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002).

### **2.3 Dormência de sementes**

Segundo Baskin e Baskin (2004), semente dormente não tem capacidade de germinar em um período de tempo especificado, em uma ou mais combinações de condições ambientais nas quais a semente germinaria normalmente se não estivesse com dormência. Portanto, mesmo sendo sementes viáveis e tendo todas as condições ambientais favoráveis, deixam de germinar (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). A dormência possui importante

significado ecológico, uma vez que permite a distribuição da germinação das sementes no tempo, através da variação da intensidade do fenômeno entre as sementes de uma mesma planta. A dormência também é uma característica adaptativa que assegura a perpetuação e a sobrevivência das espécies nos diferentes ecossistemas (LOPES; NASCIMENTO, 2012).

Por outro lado, consiste em uma barreira para a agricultura, pois causa desuniformidade na emergência das plântulas. Dessa forma, sementes dormentes não germinam logo após a colheita devido a mecanismos internos, de natureza física ou fisiológica, que bloqueiam a germinação por período de tempo variável com o genótipo, com o estágio de maturação do fruto e com as condições de ambiente durante a maturação, entre outros fatores (CARDOSO, 2004).

Existe uma classificação baseada no momento da aquisição da dormência, sendo primária e secundária. A primária ocorre antes da dispersão da semente como parte do programa genético durante a maturação e a secundária ocorre após a dispersão, influenciada por falta de condições adequadas para a germinação (CARDOSO, 2004). Em relação às sementes não dormentes de alface, estas podem adquirir dormência secundária, quando colocadas para germinar sob altas temperaturas (LOPES; NASCIMENTO, 2012). A dormência pode ainda ser classificada como exógena e endógena (BASKIN; BASKIN, 1998). A dormência endógena está relacionada a algum bloqueio que o embrião apresenta e pode ser subdividida em fisiológica, física, morfológica e morfofisiológica. E a exógena não atinge o embrião, mas sim as outras partes da semente e pode ser subdividida em fisiológica, física e mecânica (CARDOSO, 2004).

O tempo de duração da dormência é muito variável entre as espécies. Algumas sementes de hortaliças e gramíneas forrageiras têm um período curto de dormência (aproximadamente de três a seis meses) de forma que o intervalo de tempo entre a colheita das sementes e a semeadura é suficiente para que no

plantio não tenham mais dormência (LOPES; NASCIMENTO, 2012). O possível mecanismo da dormência de sementes de alface, em condições de altas temperaturas, não é totalmente entendido, assim como os processos fisiológicos e bioquímicos que o controlam (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002).

#### **2.4 Fatores que influenciam a dormência de sementes**

O período de duração da dormência é bastante variado, pode ser de dias, meses ou vários anos. Sendo que para uma mesma espécie esse período pode variar em função do genótipo e do ambiente onde a semente foi produzida (DIAS, 2005). A dormência das sementes é controlada pelo genótipo, mas sempre associada com fatores ambientais como temperatura, fatores físicos como espessura do tegumento e regulação de hormônios (FINCH-SAVAGE; LEUBNER METZGER, 2006). Estudos realizados por Nascimento et al. (2012), avaliando germinação de diferentes cultivares de alface em condições de temperatura elevada, identificaram que existem diferenças entre as cultivares.

Os hormônios vegetais também apresentam papel importante na indução de dormência das sementes. Em diversos estudos estão sendo utilizados o ácido abscísico (ABA) e mutantes da biossíntese e sinalização de giberelina (GA), demonstrando que esses dois hormônios têm papéis importantes e antagônicos na dormência e germinação. O equilíbrio entre os níveis desses dois hormônios e suas respectivas vias de sinalização são importantes na regulação de indução e manutenção de dormência e promoção da germinação (FINKELSTEIN et al., 2008).

O ácido abscísico (ABA) é indicado como o principal inibidor da germinação, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, impedindo dessa forma a germinação precoce. O oposto do que ocorre na classe das giberelinas (GA), estas promovem a germinação das sementes (CADMAN

et al., 2006). O fitormônio ácido abscísico (ABA) é o principal agente envolvido no estabelecimento da dormência embrionária durante a maturação da semente na planta-mãe. Existe um pico de acúmulo de ABA na semente, correspondendo ao período entre as fases intermediária e tardia da embriogênese (TAIZ; ZEIGER, 2004). As giberelinas são conhecidas como hormônios de promoção do crescimento, sendo envolvidas em vários processos durante o desenvolvimento da planta, como o crescimento da parte aérea, lançamento e desenvolvimento da flor, dormência e germinação das sementes (LINKIES et al., 2010). A participação do etileno tem sido sugerida em respostas hormonais, interagindo com a giberelina na promoção da germinação e/ou inibindo a superação do ABA, induzindo a superação da dormência (IGLESIAS FERNÁNDEZ; MATILLA, 2010).

Em estudos realizados por Nascimento e Cantliffe (2000), eles verificaram que existe uma relação entre germinação de sementes em altas temperaturas, produção de etileno e aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase. O aumento da atividade enzimática e da produção do etileno pode ocasionar a superação do efeito inibitório da germinação em altas temperaturas, através do enfraquecimento do endosperma.

Além dos fatores internos que envolvem a semente, a dormência também ocorre pela combinação desses fatores com as condições ambientais. Segundo Marcos Filho (2005), os seguintes fatores ambientais são capazes de induzirem dormência: fotoperíodo, temperatura, umidade relativa do ar e disponibilidade de água.

Existe uma ampla variação nas respostas germinativas quanto à sensibilidade à luminosidade. Em algumas espécies a germinação é inibida pela luz, entretanto outras são favorecidas (NASSIF et al., 1998). A alface produz sementes do tipo fotoblásticas positivas, isto é, só germinam, ou germinam em maior porcentagem, quando submetidas à presença de luz. Contudo, devido à

domesticação e ampla produção, muitas cultivares já perderam esse fotoblastismo passando a ser fotoblásticas neutras (CASTRO et al., 2005). Segundo Nascimento (2002), alguns genótipos de alface possuem sua germinação controlada pela luz, porém grande parte das cultivares comerciais não necessitam de luz para germinar. Sementes de alface de genótipos fotossensíveis possuem um sistema funcional do fitocromo que são afetadas pela radiação luminosa a que são submetidas. De acordo com radiação luminosa, as sementes poderão germinar ou não.

A temperatura máxima e crítica para a germinação de sementes de alface dependem do genótipo, sendo que algumas cultivares podem germinar em temperaturas que variam de 5 °C a 33 °C. Entretanto, temperaturas superiores a 30 °C afetam a germinação das sementes reduzindo a porcentagem de germinação (SALA; NASCIMENTO, 2014). De acordo com estudos realizados por Menezes et al. (2000), utilizando três cultivares de alface, verificaram que a luz limita a germinação, sendo que, na presença de luz a germinação ocorreu em uma maior amplitude de temperatura (20 a 30 °C) e que temperaturas superiores a 35 °C induzem a dormência secundária.

Outro fator que influencia na ocorrência de dormência é a posição da semente na planta-mãe. Segundo Marcos Filho (2005), a posição da semente na planta-mãe é um dos aspectos que pode influenciar os diferentes graus de dormência. Em espécies da família *Asteraceae* a posição dos aquênios nos capítulos ou na planta-mãe pode afetar durante a maturação o grau de dormência (BRYANT, 1989). Já foram realizados diferentes trabalhos verificando a influência da posição das sementes na planta-mãe de diversas espécies. De acordo com os estudos de Pereira (1983), foi constatado que existe diferença em relação à localização dos frutos de quiabo na planta-mãe, sendo que sementes que se encontravam de 60 a 120 cm do nível do solo obtiveram maior germinação. Cardoso (2000) verificou que sementes de cenoura das umbelas

primárias e secundárias apresentam maior poder germinativo quando comparada com as terciárias. Porém, Machado et al (2010), estudando a posição dos racemos em sementes de mamona concluiu que a posição não influenciou na porcentagem de germinação.

## **2.5 Armazenamento de sementes**

Longevidade é definida como período em que as sementes se mantêm vivas, tendo a capacidade de germinar em condições favoráveis. A longevidade é variável de acordo com o genótipo, mas a conservação do potencial fisiológico depende de outras diversas condições como grau de umidade, temperatura e ambiente de armazenamento (MARCOS FILHO, 2005). O armazenamento é de grande importância para manutenção da qualidade fisiológica das sementes. A capacidade da semente em manter sua qualidade durante o armazenamento está ligada à longevidade da espécie e à sua qualidade inicial, porém as condições do armazenamento podem alterar o seu potencial de conservação (CARVALHO; PINHO, 1997).

O armazenamento adequado é prática fundamental para conservar o nível de qualidade das sementes, minimizarem a velocidade do processo de deterioração, que é dependente das características das sementes e do comportamento quanto à tolerância a dessecação, e assim manter a viabilidade e vigor por um maior período de tempo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; AZEVEDO et al., 2003). O armazenamento depois da colheita deve ser conduzido de forma a reduzir as transformações bioquímicas que propiciam a redução da qualidade fisiológica, além de evitar o desenvolvimento de insetos e microrganismos, os quais promovem a diminuição da qualidade (CARVALHO; VILELA, 2006).

As condições de umidade relativa do ar e a temperatura apresentam grande influência durante o período de armazenamento. A umidade do ar possui ligação estreita com o teor de água nas sementes, que dirige a ocorrência de diferentes processos metabólicos que ela pode sofrer, ao passo que, a temperatura afeta a velocidade dos processos bioquímicos, interferindo sobre o teor de água das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994).

De acordo com Delouche et al. (1973), a queda na qualidade durante o armazenamento é um dos sintomas de deterioração das sementes. O armazenamento de forma adequada em condições propícias visa a diminuir o processo de deterioração, mantendo a viabilidade das sementes.

## **2.6 Proteínas tolerantes ao calor**

Em condições de estresse, o mecanismo mais estudado na adaptação dos organismos é a indução das proteínas resistentes ao calor (Heat Shock Proteins (HSP)) (JOSÉ, 2003). Essas proteínas possuem função de preservação das estruturas macromoleculares durante a desidratação e de reparo durante a reidratação (VERTUCCI; FARRANT, 1995), podendo ser utilizadas como um importante auxílio para a identificação de cultivares tolerantes a altas temperaturas, uma vez que essas proteínas conservam sua natureza, são abundantes e mantêm suas propriedades físicas em condições de estresse (JOSÉ et al., 2004).

Segundo Mann (2002), um grupo de proteínas conhecidas como LEA (Late Embryogenesis Accumulated), vem se destacando como marcador na identificação de cultivares. Estas se acumulam em resposta ao ácido abscísico, na fase final de maturação (VIDIGAL et al., 2009). Altas temperaturas induzem o acúmulo de proteínas LEA, que são ricas em glicina e outros aminoácidos

hidrofílicos e apresentam poucos resíduos hidrofóbicos, podendo ser extraídas em condições de temperatura elevadas (BLACKMAN et al., 1991).

Foram realizados diferentes estudos em relação à utilização de proteínas tolerantes ao calor como identificadores de genótipos. No trabalho de José et al. (2004), utilizou-se linhagens de milho submetidas às diferentes condições de produção e secagem, verifica-se boa estabilidade das proteínas, sendo portanto promissoras para identificação de cultivares de milho. Resultados semelhantes foram relatados por Menezes et al. (2008), nos quais os padrões de proteínas resistentes ao calor foram estáveis para diferentes linhagens e híbridos de milho, sendo eficiente na separação dessas cultivares. No entanto, para as cultivares de soja, algodão e feijão os padrões de proteínas se apresentaram monomórficas.

Em trabalho realizado por Catão et al. (2014), avaliando as proteínas tolerantes ao calor em sementes de alface, verificaram que a temperatura de embebição alterou a expressão das proteínas, e que as bandas proteicas foram diferentes nas cultivares termotolerantes e termosensíveis, com destaque para a cultivar Everglades que é considerada termotolerante e que apresentou maior quantidade dessas proteínas. Diante disso, é possível identificar marcadores que possam se tornar ferramentas para seleção de materiais capazes de germinar em temperaturas elevadas (JOSÉ et al., 2004).

## **2.7 Enzima endo- $\beta$ -mananase**

O embrião na semente é envolvido pelos tecidos do endosperma, integumento e pericarpo. O endosperma é um tecido vivo, compreendendo aproximadamente 8% do peso seco das sementes. Ele é considerado a fonte inicial de reservas para o crescimento do embrião, e suas células contêm todo o mecanismo para a síntese de enzimas (NASCIMENTO, 2002). O endosperma pode retardar ou impedir a germinação das sementes, atuando como uma

barreira física à protrusão da radícula, em condições desfavoráveis, como temperaturas elevadas. Dessa forma, o enfraquecimento do endosperma torna-se um pré-requisito, nessas condições, à protrusão da radícula (SALA; NASCIMENTO, 2014).

As paredes celulares do endosperma das sementes de alface são compostas em sua maior parte por polímeros de galactomananas, que para serem degradados, é necessária a atuação de hidrolases, entre elas, a endo- $\beta$ -mananase, que por sua vez atua especificamente nas ligações  $\beta 1 \rightarrow 4$  desse carboidrato (IGLESIAS FERNÁNDEZ et al., 2010). A enzima endo- $\beta$ -mananase possui um papel fundamental e está diretamente envolvida com o enfraquecimento da parede celular do endosperma em sementes de alface (SUNG et al., 2008).

A endo- $\beta$ -mananase está diretamente envolvida na hidrólise da parede celular do endosperma durante a germinação e também está associada com o amolecimento dos tecidos (STILL; BRADFORD, 1997). As células do endosperma possuem paredes celulares espessas constituídas de galactomananas, que além de possuírem a função de reserva, também conferem restrições mecânicas à germinação dificultando a protrusão radicular (GONG et al., 2005). Diante do exposto, tem se observado uma relação entre a atividade da endo- $\beta$ -mananase antes da protrusão radicular e a diminuição da resistência do endosperma, em condições de temperatura elevada na germinação de sementes de alface (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002).

De acordo com trabalho realizado por Catão et al. (2014), observou-se que a maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, ocorreu nas sementes da cultivar Everglades, quando embebidas a 35 °C. Sendo que as maiores atividades enzimáticas ocorrem nos genótipos termotolerantes do que nos termosensíveis (NASCIMENTO et al., 2000).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos na área experimental da HortiAgro Sementes S/A, junto ao Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), fazenda Palmital, no município de Ijaci-MG, localizada na latitude de 21°9'24'' Sul e longitude 44° 55' 34'' Oeste e no Laboratório de Análises de Sementes, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

#### 3.1 Obtenção das sementes

Para a obtenção das sementes a serem utilizadas, inicialmente utilizaram-se amostras de 100 sementes da cultivar Everglades, tolerante à termoinibição e 100 sementes da cultivar Verônica, sensível à termoinibição (SUNG et al., 1998; NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2000; NASCIMENTO; PEREIRA, 2007, REZENDE, 2013; CATÃO et al. 2014). No Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura, as sementes foram distribuídas em caixas Gerbox, sobre duas folhas de papel mata-borrão, umedecidos em um volume de água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Foram utilizadas 100 sementes em cada Gerbox, as quais foram colocadas em câmara do tipo “*Biochemical oxygen demand*” (BOD) ajustada com temperatura de 35 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. As sementes germinadas até o sétimo dia tiveram suas plântulas repicadas para bandejas de poliestireno expandido de 128 células contendo substrato comercial Plantmax® e transportadas para casa de vegetação da fazenda Palmital. As sementes remanescentes, que não germinaram na temperatura de 35 °C, permaneceram na câmara BOD por mais sete dias, porém com a temperatura de

20 °C. Após esse período, aquelas que retomaram o processo e germinaram, tiveram também suas plântulas repicadas conforme descrito anteriormente.

Ao final desse processo foram obtidas 60 plantas da cultivar Everglades e uma única planta da cultivar Verônica, a partir de sementes que germinaram a 35 °C, bem como, 30 plantas da cultivar Everglades e 30 plantas de Verônica oriundas das sementes que retomaram o processo de germinação a 20 °C.

Após aproximadamente 20 dias da repicagem para as bandejas, as mudas obtidas da germinação a 35 °C e a 20 °C, foram transplantadas para vasos de 10 litros, contendo mistura de solo, areia, matéria orgânica e adubo à base de N-P-K. Os vasos contendo as plantas de alface foram organizados em casa de vegetação, com espaçamento de 0,6 m entre plantas e 1 m entre linhas. As plantas receberam adubações via fertirrigação e realizaram-se práticas de manejo para retirada de folhas velhas e tutoramento após o início do pendoamento, sendo as plantas conduzidas até o florescimento e produção de sementes.

Quando se iniciou o florescimento, as inflorescências foram separadas em duas partes utilizando-se de um fio de lã colorido, que foi amarrado na parte mediana da inflorescência, separando-as em superior e inferior.

Cerca de 20 dias após o florescimento, quando as sementes se apresentavam fisiologicamente maduras, marcaram-se aleatoriamente vinte plantas da cultivar Everglades, sendo 10 provindas de plantas oriundas de sementes germinadas na temperatura a 35 °C e 10 à temperatura de 20 °C. Para a cultivar Verônica selecionou-se apenas uma única planta germinada na temperatura de 35 °C e 10 plantas oriundas de sementes germinadas na temperatura de 20 °C. Cada planta identificada teve suas sementes colhidas individualmente, de acordo com a posição em que se encontravam na planta-mãe, originando dois tipos de sementes para uma mesma planta, as que se encontravam na parte superior (ápice) da inflorescência e as que se encontravam na parte inferior (basal) da inflorescência. Cada planta havia recebido uma

numeração para identificá-la e suas sementes colhidas, separadamente, constituíram diferentes “progênies”.

No momento da colheita utilizou-se tesoura de poda, com a qual se cortou as inflorescências que se encontravam no ápice, colocando-as dentro de um saco plástico, onde foram batidas para retirada das sementes. O mesmo procedimento foi realizado com a parte inferior. As sementes foram beneficiadas manualmente após a colheita e colocadas para secar à sombra, em peneiras com malha fina por sete dias. Após esse período foram acondicionadas em embalagens individuais de papel *Kraft*, identificadas e armazenadas em câmara fria por um período de 70, 130, 190 e 400 dias e submetidas ao teste de germinação.

Para avaliações de germinação a 35 °C e teste tetrazólio utilizaram-se, amostras das sementes de 20 progênies da cultivar Everglades, aquelas que se originaram da temperatura de 35 e 20 °C. A cultivar Verônica (testemunha sensível à termoinibição) não foi utilizada nesses testes já que apenas uma semente havia germinado na temperatura de 35 °C o que demonstra a sensibilidade à germinação em altas temperaturas dessa cultivar.

### **3.2 Teste de germinação**

Para os ensaios de germinação utilizaram-se caixas gerbox cada uma contendo 2 folhas de papel toalha tipo mata-borrão umedecidas 2,5 vezes o peso do papel seco. No laboratório foram separadas 2 câmaras BODs, as quais foram reguladas com temperaturas de 35 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro por sete dias. Após esse período, a temperatura das BODs foi reduzida para 20 °C, permanecendo assim por mais sete dias, totalizando um período de 14 dias. Cada tratamento foi composto por duas repetições correspondentes a 100 sementes oriundas do ápice e da base das inflorescências.

A contagem das sementes germinadas foi realizada no quarto e no sétimo dia durante o período em que estavam submetidas à temperatura de 35 °C e nos mesmos intervalos após reduzir a temperatura para 20 °C. Após cada contagem as plântulas eram descartadas. As sementes remanescentes após o décimo quarto dia de início da avaliação foram submetidas ao teste de tetrazólio.

Os resultados foram registrados em porcentagem de germinação, o qual pode ser definido pela equação 1, para sementes germinadas a 35 °C:

$$Gt_{(35^{\circ}\text{C})} = G_{4^{\circ}} + G_{7^{\circ}} \quad (1)$$

Em que:  $Gt_{(35^{\circ}\text{C})}$  refere-se ao total de germinação na temperatura de 35 °C,  $G_{4^{\circ}}$  às sementes germinadas até o quarto dia e  $G_{7^{\circ}}$  para as sementes germinadas até o sétimo dia.

Os resultados de germinação das sementes submetidos à temperatura de 20 °C foram definidos pela equação 2:

$$Gt_{(20^{\circ}\text{C})} = G_{4^{\circ}} + G_{7^{\circ}} \quad (2)$$

Em que:  $Gt_{(20^{\circ}\text{C})}$  refere-se ao total de germinação na temperatura de 20°C,  $G_{4^{\circ}}$  às sementes germinadas até o quarto dia e  $G_{7^{\circ}}$  para as sementes germinadas até o sétimo dia.

Os testes de germinação foram realizados aos 70, 130, 190 e 400 dias após a colheita, retirando-se as amostras dos mesmos lotes de sementes armazenados em câmara fria. Vale destacar que a realização dos testes de germinação nos quatro períodos pós-colheita foi em função de alguns ensaios preliminares terem mostrado baixa germinação da cultivar Everglades a 35 °C logo após a colheita, o que poderia estar relacionado com uma possível ocorrência de dormência primária, comum em sementes de alface, conforme relato de Marcos Filho (2005).

### **3.2.1 Teste de tetrazólio**

Utilizaram-se as sementes remanescentes da cultivar Everglades não germinadas após o décimo quarto dia do teste de germinação. Esse teste determina a viabilidade das sementes e tem o objetivo de distinguir as sementes viáveis das não viáveis. Para esse procedimento foram retirados os tegumentos das sementes colocando o embrião em exposição à coloração com a solução de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio com concentração de 1%, esses foram identificados e acondicionados em recipiente de cor escura por um período de 3 horas e temperatura de 30 °C. Após esse período verificou-se e interpretou-se a coloração de acordo com Regra de Análise de Semente (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

### **3.3 Análises enzimáticas e proteicas**

Avaliou-se a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase e das proteínas resistentes ao calor (LEA). Nessa etapa da pesquisa utilizaram-se as cultivares Everglades e Verônica, ressaltando que ambas as cultivares foram utilizadas por apresentarem características distintas, uma vez que a cultivar Everglades é considerada tolerante à termoinibição e a cultivar Verônica sensível à termoinibição.

Para essas análises utilizaram-se amostras de sementes armazenadas por 400 dias após a colheita oriunda das 11 progênies da cultivar Verônica, sendo que as dez primeiras provindas de plantas cujas sementes haviam germinado à temperatura de 20 °C e uma única germinada a 35 °C. Para a cultivar Everglades foi necessário considerar o mesmo número de amostras de progênies obtidas para a cultivar Verônica, ou seja, onze. Assim, amostraram-se aleatoriamente 11 progênies dentro das 20 da cultivar Everglades originadas da temperatura de 35

e 20 °C. De modo que as amostras da cultivar Everglades utilizadas nesse teste foram provenientes das plantas 1, 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15 e 18, sendo que as seis primeiras originadas da temperatura de 35 °C e as outras cinco da temperatura de 20 °C.

### **3.3.1 Análise da enzima endo-β-mananase**

Para análise eletroforética das enzimas endo-β-mananase, foi macerado 1 g de sementes de cada progênie das cultivares Everglades e Verônica na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido em cadinho de porcelana. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em *DEEP Freezer* à temperatura de -86 °C. Em cada microtubo com 100 mg de pó de cada amostra, foram adicionados 300 µL de tampão de extração (0,1 mol L<sup>-1</sup> HEPES por 0,5 mol L<sup>-1</sup> de NaCl e ácido ascórbico (5 mg de ácido ascórbico por mL de tampão), pH 8,0. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados por 30 min a 12.000 g e 2 µL do sobrenadante foram aplicados em gel contendo 6 mL de “*locust bean gum*” (LBG), 0,24 g de agarose e 24 mL de tampão pH 5,0 (1 mol L<sup>-1</sup> de ácido cítrico por 0,4 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel de poliacrilamida com auxílio de furador. O gel foi incubado por 21 horas em geladeira e revelado como descrito em Silva et al. (2004). A atividade da enzima endo-β-mananase foi calculada segundo Downie et al. (1994), para a curva padrão utilizou-se a endo-β-mananase comercial de *Aspergillus niger*.

### **3.3.2 Eletroforese de proteínas resistentes ao calor**

Para esta análise foi macerado 1 g de sementes de cada progênie das cultivares Everglades e Verônica em cadinho de porcelana contendo nitrogênio

líquido e polivinilpirrolidona (PVP), em seguida pesou-se 100 mg de cada macerado, os quais foram adicionados em microtubos de 2 mL junto a 1000  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (50  $\text{mmol L}^{-1}$  tris-HCl, pH 7,5; 500  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl; 5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$ ; 1  $\text{mmol L}^{-1}$  PMSF) e agitados em Vortex e centrifugados a 12000 g por 30 minutos em uma temperatura de 4 °C e o sobrenadante coletado.

O sobrenadante foi incubado em banho-maria a 85 °C por 15 minutos e posteriormente centrifugado por 30 minutos a 12000 g em 4 °C, em seguida o mesmo foi acondicionado em microtubos junto a 70 mL de extrato de proteína + 40 mL do tampão da amostra (5 mL de glicerol, 2,5 mL de solução tampão do gel concentrador, 2,5 mg de azul do bromofenol, completando o volume para 25 mL de água destilada) os quais foram levados a banho-maria por 5 minutos. Por fim foram aplicados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 v, durante 12 horas, segundo a metodologia de Alfnas (2006).

As avaliações dos padrões proteicos foram realizadas de acordo com a intensidade das bandas, utilizando-se o transiluminador de luz branca, modelo TFP-C/WL.

### 3.4 Análises estatísticas

Com relação aos testes de germinação foram feitas análise de variância e posteriormente os dados foram submetidos a um teste de média ou à análise de regressão, conforme o caso. Para a comparação entre as médias, empregou-se o teste *Scott Knott* (1974), a um nível de 5% de probabilidade. Utilizou-se do software SISVAR<sup>®</sup>.

### **3.4.1 Avaliação quanto à posição das sementes na planta-mãe e quanto à temperatura de germinação das sementes que deu origem às progênes**

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso (DIC), em esquema fatorial 20 x 2, cujos fatores foram 10 progênes da cultivar Everglades provindas de plantas oriundas de sementes germinadas à temperatura de 35 °C e 10 progênes provindas de plantas oriundas de sementes germinadas à temperatura de 20 °C, e 2 posições de colheita na planta-mãe (parte basal e ápice das inflorescências), todas submetidas à temperatura de germinação de 35 °C. Ressalta-se que para essas avaliações foram utilizadas as médias de germinação dos quatro períodos de armazenamento (70, 130, 190 e 400 dias).

### **3.4.2 Avaliação da germinação a 35 °C nos quatro períodos de armazenamento**

Para a avaliação adotou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso (DIC), em parcelas subdividas no tempo onde as parcelas foram constituídas pelas 20 amostras das progênes da cultivar Everglades (10 oriundas de plantas cujas sementes haviam germinado a 35 °C e 10 germinadas a 20 °C) e as subparcelas pelas quatro épocas de armazenamento (70, 130, 190 e 400 dias após a colheita), submetidas à temperatura de germinação de 35 °C.

### **3.4.3 Análises enzimáticas e proteicas**

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso (DIC), utilizando-se as amostras de 11 progênes da cultivar Verônica e 11 da cultivar Everglades.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Posição das sementes na planta-mãe e temperatura de germinação das sementes que deu origem às progênes

A análise de variância não acusou diferenças significativas entre a germinação das sementes colhidas na posição basal ou no ápice das inflorescências, independentemente da temperatura de germinação das sementes que deram origem às plantas-mães. A média de germinação das sementes das progênes foi semelhante para as duas temperaturas de origem (20 e 35 °C). Não houve também interação entre qualquer um dos fatores. Houve diferença, no entanto, para a germinação entre as sementes colhidas nas diferentes plantas da cultivar Everglades, independentemente da temperatura (tabela 1).

Tabela 1- Percentuais médios de germinação a 35 °C de sementes de alface da cultivar Everglades, colhidas em plantas originárias de sementes que germinaram a 35 °C (progênes de 1 a 10) e a 20 °C (progênes de 11 a 20). (Continua)

Progênes Everglades	Médias de germinação (%)
1	93 A
2	87 B
3	64 E
4	75 D
5	64 E
6	41 F
7	78 C
8	67 E
9	70 D
10	65 E
11	89 B
12	81 C

Tabela 1- Percentuais médios de germinação a 35 °C de sementes de alface da cultivar Everglades, colhidas em plantas originárias de sementes que germinaram a 35 °C (progênes de 1 a 10) e a 20 °C (progênes de 11 a 20). (Conclusão)

Progênes Everglades	Médias de germinação (%)
13	66 E
14	73 D
15	71 D
16	95 A
17	67 E
18	87 B
19	82 C
20	58 E
Média total	74

CV (%) = 5,79

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Apesar de diferentes autores como Bryant (1989), Marcos Filho (2005) e Lopes e Nascimento (2012), relatarem a existência de influência entre porcentagem de germinação e posição de colheita das sementes de algumas culturas na planta-mãe, esta não foi verificada neste trabalho. Segundo Brancalion e Marcos Filho (2008), as sementes estão submetidas individualmente às condições microambientais impostas pela posição na qual estão inseridas na planta-mãe. Mesmo dentro de uma única cápsula, a posição de uma semente pode influenciar na capacidade de germinação (GUTTERMAN, 2000). No entanto, esses fatores não foram capazes de causar essa influência, isso possivelmente pode ser explicado pelo fato de o desenvolvimento das plantas terem ocorrido em casa de vegetação, onde é normal manter-se um maior

controle de condições edafoclimáticas (CANSADO, 2003; MATOS, 2007; SANTOS et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011).

Para diversas culturas é descrita a ocorrência de diferenças na germinação das sementes colhidas em diferentes posições na planta-mãe (PEREIRA, 1983; CARDOSO, 2000; ALVES et al., 2012; ALOHO; ANITA, 2016). Por outro lado, encontram-se também relatos que não confirmam a existência dessa diferença, como descrito por Machado et al. (2010), estudando a posição do racemo na planta de mamona, quando não encontrou diferença na porcentagem de germinação das sementes. Assim como Freitas et al. (2013), que analisaram a porcentagem de germinação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em relação à posição na qual se encontravam na planta (proximal, intermediária e distal), e não verificaram diferença na porcentagem de germinação em relação às diferentes posições.

Segundo Gutterman (2000), as sementes variam em seu grau de germinação entre e dentro das populações e entre e dentro dos indivíduos, algumas dessas variações têm origem genética, mas grande parte ocorre pelo fenótipo. Portanto, as diferenças encontradas na literatura quanto à posição na qual as sementes se encontram na planta-mãe pode ser variável, sendo influenciadas pelo ambiente ao qual estão submetidas.

Não foi constatada diferença significativa para germinação quanto à origem da semente, seja colhida em planta oriunda de semente que germinou a 35 °C ou a 20 °C, pode-se afirmar que independentemente da temperatura de germinação da semente da geração anterior, as sementes apresentam o mesmo nível de tolerância à termoinibição, com a mesma capacidade de germinação a 35 °C, que nesse caso foi, em média, de 74%. Esse resultado demonstra que não se pode confirmar a hipótese de que o fato da germinação da cultivar Everglades a 35 °C situar-se em torno de 70% seja atribuído à existência de indivíduos que

eventualmente poderiam estar em diferente condição homozigótica para o(s) loco(s) que controla(m) o processo de tolerância à termoinibição nessa cultivar.

Resultados encontrados por Oliveira (2014), avaliando a germinação em temperatura de 35 °C de sementes das cultivares Everglades e Verônica, logo após a colheita, mostraram que a média de germinação das sementes de ambas as cultivares colhidas em plantas oriundas de sementes que germinaram a temperatura 35 °C foi ligeiramente superior à daquelas colhidas em plantas oriundas de sementes germinadas a 20 °C. No entanto, a autora relata que não foi possível confirmar que sementes providas de plantas cujas sementes que as originaram teriam germinado a 35 °C, originam sementes tolerantes à termoinibição. Isso, devido à possibilidade de existência de dormência primária, para germinação a 35 °C, já que é comum sementes da cultivar Everglades depois de armazenadas por algum tempo alcançarem germinação acima de 60% em condições de 35 °C (OLIVEIRA, 2014). Portanto, mesmo após meses de armazenamento não se observa relação entre a capacidade de germinação na geração anterior com o aumento da tolerância à termoinibição em progênies da cultivar Everglades.

#### **4.2 Germinação a 35 °C ao longo do período de armazenamento**

De acordo com análise de variância houve diferença significativa para a germinação das sementes das progênies dentro de cada época em que se procedeu à análise (tabela 2) e também entre essas épocas, com interação entre progênies e época (figura 1). As equações de regressões e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) podem ser verificados na tabela 3.

Tabela 2 - Porcentagem de germinação a 35 °C de progênies de alface da cultivar Everglades, armazenadas durante quatro períodos de tempo.

Progênies	Períodos de Armazenamento (Dias)			
	70	130	190	400
1	90 a	90 a	97 a	93 a
2	77 b	84 b	99 a	89 a
3	21 d	44 d	100 a	90 a
4	29 d	74 b	100 a	98 a
5	23 d	59 c	88 b	86 b
6	29 d	35 d	33 c	67 c
7	34 c	87 a	100 a	92 a
8	14 e	61 c	95 a	99 a
9	43 c	62 c	97 a	77 b
10	38 c	53 c	86 b	84 b
11	87 a	88 a	89 b	93 a
12	69 b	82 b	93 a	80 b
13	37 c	46 c	82 b	98 a
14	26 d	80 b	91 b	95 a
15	41 c	75 b	87 b	82 b
16	96 a	93 a	95 a	94 a
17	9 e	68 c	95 a	95 a
18	52 c	98 a	98 a	99 a
19	40 c	94 a	96 a	100 a
20	19 d	52 c	77 b	85 b
Médias	43,7	71,3	89,9	89,8

Cv (%) = 11,16

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 95 % de probabilidade.

Após o período de 70 dias da colheita, quando foi realizado o primeiro teste de germinação, observou-se variação nas porcentagens de germinação das sementes de diferentes progênies, com valores entre 9 e 96%. As progênies 1, 11 e 16 foram as que apresentaram maiores porcentagens de germinação, ao

contrário das progênes 8 e 17, que apresentaram os menores valores. Nesse período de 70 dias após a colheita pode-se verificar, de forma geral, uma reduzida germinação para a maioria das progênes. Isso pode ser devido a uma provável ocorrência de dormência primária, comum em sementes de alface logo após a colheita, o que prejudica a porcentagem de germinação e consequentemente a produção de mudas. No entanto, esse fenômeno não ocorreu em todas as progênes como pode ser observado pelos resultados das progênes 1, 11 e 16 que apresentaram germinações superiores a 80%, valor considerado mínimo para a comercialização de sementes de alface (Brasil, 1986).

Aos 130 dias após a colheita, a variação na porcentagem de germinação entre as progênes foi menor, reduzindo para o intervalo de 35 a 98% (tabela 2). Paralelamente observa-se também que ocorre um aumento na porcentagem de germinação para todas as progênes em relação aos 70 dias. As progênes que já apresentavam germinação mais alta permaneceram, e outras progênes, como a 7, 18 e 19 apresentaram níveis satisfatórios. O mesmo aconteceu aos 190 dias, quando apenas a progênie 6 apresentou baixa germinação. As demais apresentaram germinações superiores a 77%, e a grande maioria acima de 90%. As progênes 3, 4 e 7 se destacaram por atingirem a germinação máxima.

Aos 400 dias o comportamento é bem semelhante, com uma menor germinação das sementes da progênie 6, porém pode-se verificar que em todas as épocas esta apresentou germinações inferiores. Vale ressaltar que a análise após o período de 400 dias de armazenamento é importante para confirmar a possível quebra de dormência e a manutenção da qualidade das sementes. O armazenamento em condições ideais é capaz de manter a qualidade das sementes, sem, no entanto, contribuir para sua melhoria (VILLELA; PEREZ, 2004). De acordo com Groot (2003), a capacidade de armazenamento das sementes varia entre as espécies, entre e dentro dos lotes.

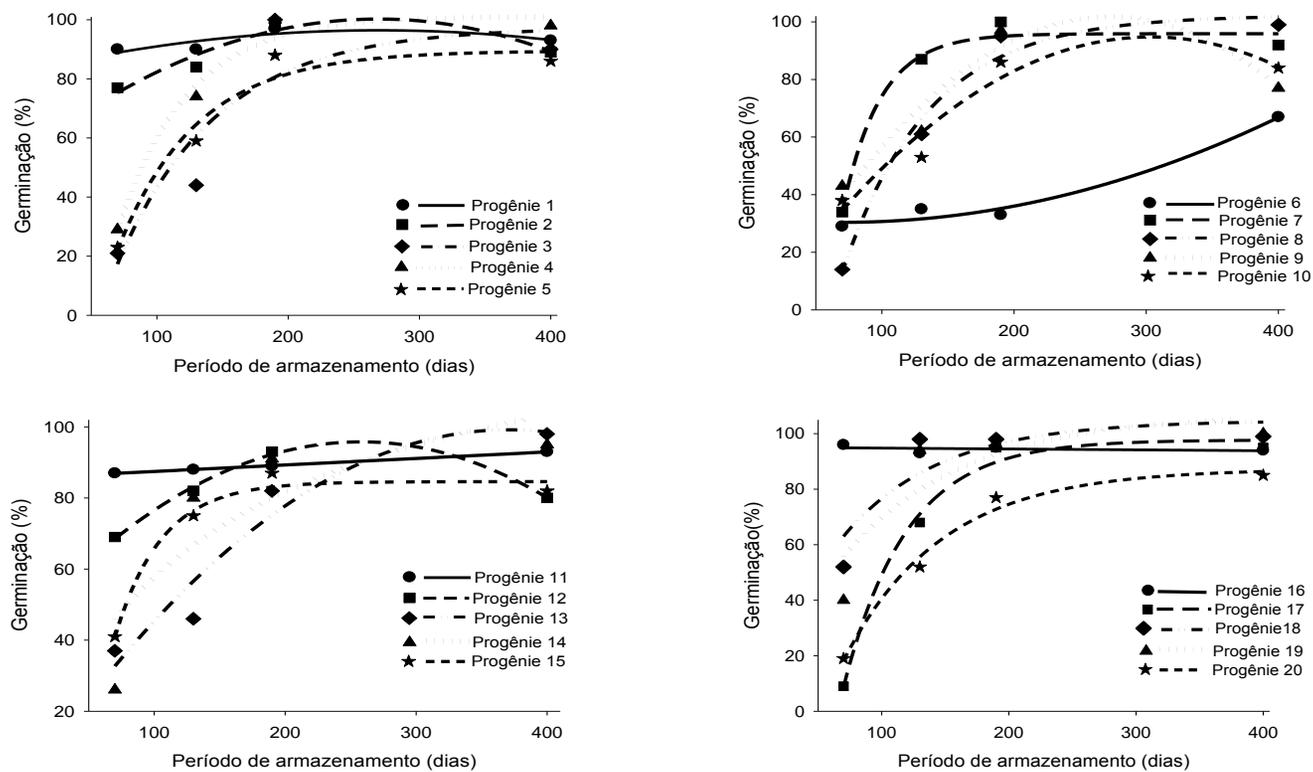


Figura 1 - Porcentagem de germinação a 35 °C de 20 de progênies da cultivar Everglades em função dos períodos de armazenamento (70, 130, 190 e 400 dias após colheita).

Tabela 3 - Equações de regressão ajustadas do índice de porcentagem de germinação a 35 °C em função do período de armazenamento de 20 progênies da cultivar Everglades.

Progênies	Equações de Regressão	R <sup>2</sup>
1	$Y = 0,0008x^2 + 0,2518x + 74,4865$	0,9897
2	$Y = 0,006x^2 + 0,3402x + 54,6080$	0,9463
3	$Y = -101,693 + 199,129x(1 - E(-0,0130X))$	0,9121
4	$Y = -174,658 + 275,779*(1 - E(-0,0190*x))$	0,9902
5	$Y = -125,826 + 215,323*(1 - E(-0,0166*x))$	0,9814
6	$Y = 0,0003x^2 - 0,0472x + 32,056$	0,9899
7	$Y = -616,230 + 712,117*(1 - E(-0,0349*x))$	0,9921
8	$Y = -157,037 + 259,331*(1 - E(-0,0152*x))$	0,9905
9	$Y = -0,0016x^2 - 0,8434x - 12,2129$	0,9505
10	$Y = -0,0011x^2 + 0,6709x - 7,0228$	0,9652
11	$Y = 0,0183x + 85,635$	0,9995
12	$Y = -0,0008x^2 + 0,3992x + 44,3730$	0,9962
13	$Y = -0,0007x^2 + 0,5460x - 1,937$	0,9642
14	$Y = 140,003x / (142,731 + x)$	0,8658
15	$Y = -225,938 + 310,541*(1 - E(-0,0280*x))$	0,9906
16	$Y = -0,0032x + 95,1224$	0,9506
17	$Y = -267,031 + 364,768*(1 - E(-0,0201*x))$	0,9955
18	$Y = 104,7142*(1 - E(-0,0131*x))$	0,9017
19	$Y = 107,0718*(1 - E(-0,0105*x))$	0,8926
20	$Y = -84,3648 + 171,6880*(1 - E(-0,0130*x))$	0,9937

Observou-se um aumento na média de germinação das sementes das progênies da cultivar Everglades ao longo do período de armazenamento, a exemplo do que normalmente ocorre quando as sementes apresentam dormência primária. As médias de germinação foram crescentes dos 70, 130 até os 190 dias, sendo de 43,7; 71,3; 89,9 respectivamente. E para 400 dias foi de 89,8.

Os menores valores para germinação a 35 °C foram constatados nas análises realizadas mais próximo da colheita (70 e 130 dias), o que poderia levar à hipótese da ocorrência de dormência primária, citada para sementes de alface logo após a colheita, a exemplo de trabalhos de outros autores (DORIGUÊTTO, 2014; REZENDE, 2013). Há de se considerar que essa dormência normalmente ocorre em temperatura ideal para germinação (20 °C). Observa-se, no entanto, que as sementes remanescentes, após a redução da temperatura para 20 °C (temperatura ideal para germinação de sementes de alface), retomaram a germinação. Nesse caso, à temperatura de 20 °C não houve indícios de dormência primária (Figuras 2 e 3).

A dormência primária pode ter acontecido, para temperatura 35 °C, até período de 70 dias de armazenamento, já que essa dormência é quebrada de forma natural após um período de tempo. De acordo com Eira e Marcos Filho (1990), a quebra de dormência primária ocorre após um período de 4 meses, outros autores como Popinigis (1977) relatam a superação da dormência após 3 a 9 meses dependendo da cultivar, e Resende (2013), evidenciou que após 6 meses de armazenamento a maioria das cultivares apresentaram germinações elevadas, superiores ao observado logo após a colheita. Neste trabalho foi possível constatar que a 20 °C as sementes germinaram normalmente, porém o processo de germinação normal para temperatura de 35 °C só ocorreu a partir da análise efetuada aos 190 dias após a colheita. Assim pode-se levantar a hipótese de que sementes de alface de cultivar tolerante à termoinibição apresentam dormência primária para germinação à 35 °C.

Além de uma possível dormência primária, outro fator considerado é a termoinibição, que refere-se a uma inibição no momento da germinação provocada por temperatura elevada. Nas figuras 2 e 3 observa-se as diferenças na porcentagem de germinação nas temperaturas de 35 °C e 20 °C. Em 35 °C

nos primeiros períodos de armazenamento as sementes apresentam uma menor germinação, porém quando a temperatura é reduzida para níveis considerados ideais (20 °C), todas as sementes retomam o processo germinativo, o que confirma a ocorrência de termoinibição e/ou dormência primária, pois as sementes obtiveram germinação próxima aos 100%, nessa condição, assim como chegaram a mais de 90% de germinação, mesmo a 35 °C após 190 dias de armazenamento.

A termoinibição já foi descrita em inúmeros trabalhos, Bufalo et al. (2012), analisaram sementes de alface nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, verificaram que aos 30 °C ocorreu redução na germinação de cerca de 50% e aos 35 °C apresentou valores muito reduzidos. O que corrobora com Nunes et al. (2015), que utilizaram quatro cultivares de alface nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, sendo que na maior temperatura houve para 3 das cultivares germinação zero e para uma delas de 40%, valor considerado muito baixo. Além desses trabalhos outros demonstram a inibição da germinação em temperaturas elevadas (MENEZES et al., 2000; NASCIMENTO; PEREIRA, 2007; KANO et al., 2011).

As sementes remanescentes, que não germinaram a 20 °C, foram submetidas ao teste tetrazólio (Tabela 4). Esse teste determina a viabilidade das sementes, mediante a qualidade fisiológica, sendo um teste rápido e eficiente (MENDONÇA et al., 2001; DIAS; ALVES, 2008; BRASIL, 2009; GUEDES et al., 2010). A constatação da viabilidade se fez necessária, pois as sementes poderiam apresentar termodormência, e mesmo com a temperatura ideal, não germinariam. No entanto, verificou-se que a maior parte das sementes encontrava-se não viáveis.

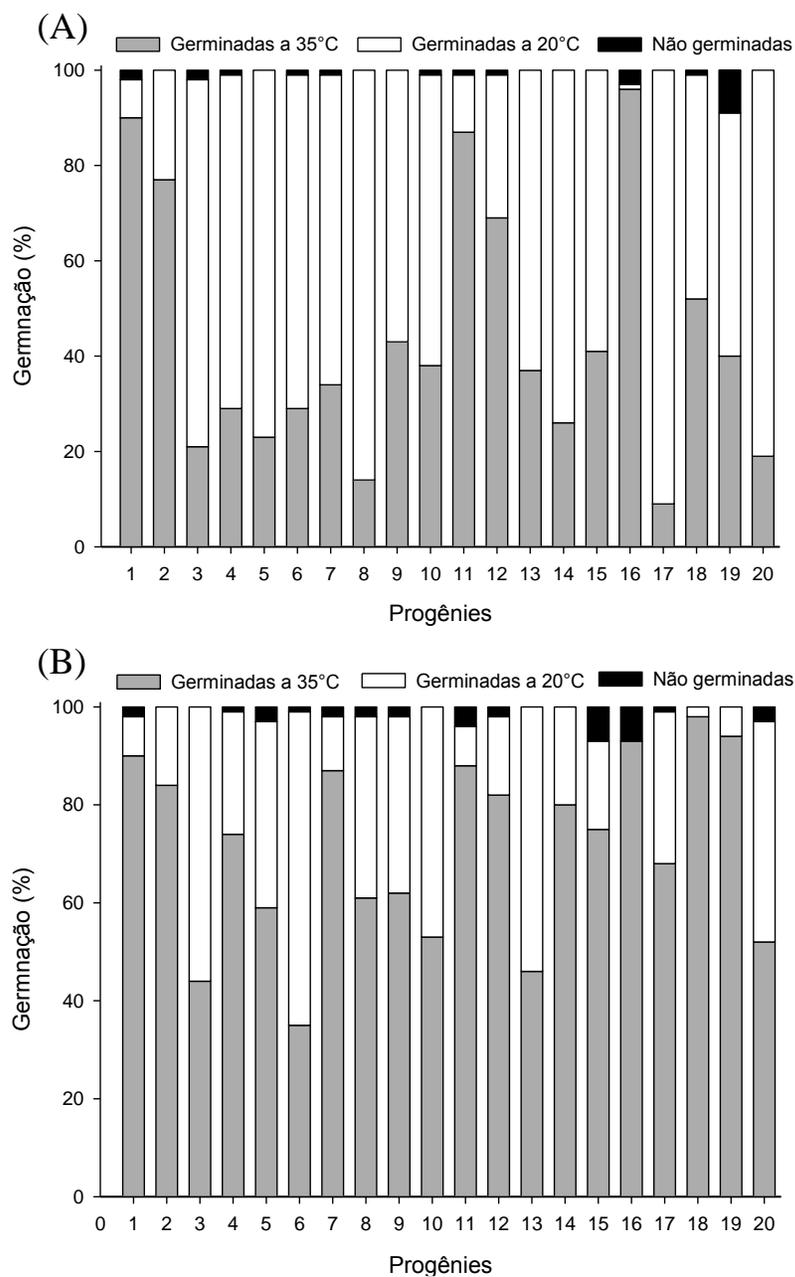


Figura 2 - Porcentagem de germinação das sementes de 20 progênies da cultivar Everglades nas temperaturas de 35 e 20 °C, nos períodos de armazenamento de 70 (A) e 130 (B) dias após colheita.

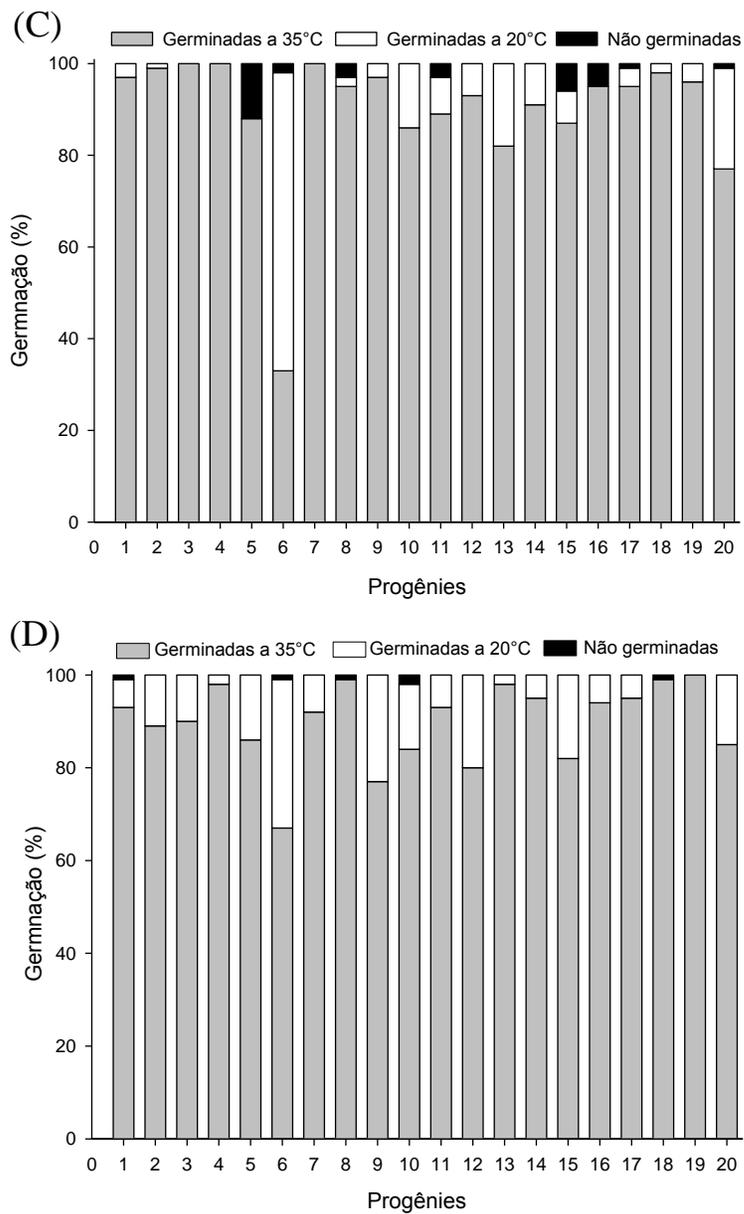


Figura 3 - Porcentagem de germinação das sementes de 20 progênes da cultivar Everglades nas temperaturas de 35 e 20 °C, nos períodos de armazenamento de 190 (C) e 400 (D) dias após colheita.

Tabela 4 - Porcentagem de sementes viáveis (V) e mortas (M) pelo teste de tetrazólio em sementes remanescentes do teste de germinação a 35 e 20 °C de sementes de alface da cultivar Everglades armazenadas em quatro períodos de tempo após a colheita.

Planta	P	70		P	130		P	190		P	400	
		V	M		V	M		V	M		V	M
1	2	1	1	2	-	2	-	-	-	1	-	1
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1	-	1	1	-	1	1	-	1	-	-	-
5	-	-	-	3	1	2	12	8	4	-	-	-
6	1	-	1	1	-	1	2	-	2	1	-	1
7	1	-	1	2	-	2	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	2	-	2	3	-	3	1	-	1
9	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-
10	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2	-	2
11	1	-	1	4	1	3	3	1	2	-	-	-
12	1	-	1	2	-	2	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	7	1	6	6	1	5	-	-	-
16	3	1	2	7	3	4	5	2	3	-	-	-
17	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-	-	-
18	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1
19	9	1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	3	1	1	1	-	1	-	-	-

\*P (Porcentagem de sementes não germinadas submetidas ao teste)

### **4.3 Proteínas resistentes ao calor e enzima endo- $\beta$ -mananase em 11 progênies da cultivar Verônica e em 11 da cultivar Everglades**

Como pode ser observado na figura 5, de forma geral, a cultivar Everglades possui uma maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase quando comparada com a cultivar Verônica. As médias das atividades foram diferentes, significativamente, sendo de 2,96 e 1,90 (picomol por min g<sup>-1</sup>), respectivamente. A maior ou menor atividade deve-se ao fato de a tolerância/sensibilidade à germinação em altas temperaturas, uma vez que a Everglades é considerada tolerante à termoinibição e à Verônica termosensível. Os resultados encontrados seguem a mesma tendência da germinação, em que a cultivar Everglades apresenta germinação em torno de 74%, mesmo em temperaturas de 35 °C. Resultados semelhantes foram observados por Catão et al. (2014), que verificaram que as maiores atividades enzimáticas seguiam o mesmo padrão de maiores germinações em temperaturas elevadas.

Esse resultado corrobora com diferentes autores que trabalharam avaliando cultivares sensíveis e tolerantes à germinação em altas temperaturas, bem como a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase. Os autores Nascimento et al. (2000), constataram maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em genótipos tolerantes comparado com aqueles termosensíveis. Assim como Villela (2009), que utilizou duas cultivares para estudo: a Luisa (termotolerante) e a Verônica (termosensível) e verificou que a maior atividade enzimática ocorreu na cultivar termotolerante (Luisa). O mesmo ocorreu no trabalho de Catão et al. (2014), que compararam 8 cultivares de alface e confirmaram que a maior atividade da enzima ocorreu na cultivar Everglades (termotolerante), embebidas a 35 °C do que nas demais.

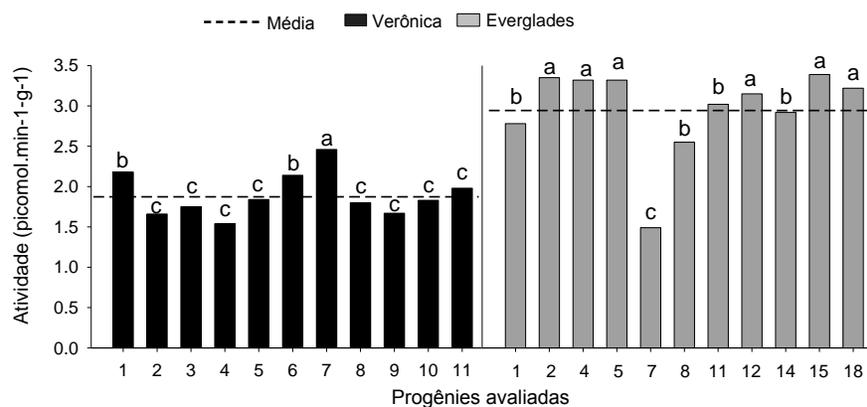


Figura 4 - Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em 11 progênies de alfaca da cultivar Verônica e 11 da Everglades.

Na figura 6 pode-se observar as bandas proteicas das proteínas resistentes ao calor (LEA), onde verifica-se que houve diferença entre os padrões eletroforéticos das sementes da cultivar Everglades quando comparada com as da cultivar Verônica. As proteínas auxiliam na identificação de cultivares que toleram elevadas temperaturas, devido às características dessas proteínas em conservar sua natureza, manter suas propriedades físicas e de ser abundantes em condição de estresse (JOSÉ et al., 2004). Também têm sido associadas essas proteínas com tolerância à dessecação em sementes em condições de altas temperaturas (BLACKMAN et al., 1991). No presente trabalho foi possível verificar as diferenças entre as cultivares, sendo que maiores intensidades de bandas foram verificadas para as sementes da cultivar Everglades, tendo relação direta com a porcentagem de germinação, e com as atividades da enzima endo- $\beta$ -mananase, resultados estes que corroboram com Catão et al. (2014), que constataram que a cultivar Everglades apresentou relação entre a porcentagem de germinação, maior intensidade das proteínas resistentes ao calor, assim com maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase.

Portanto, a cultivar Everglades é um material termotolerante, que pode ser utilizada em futuros programas de melhoramento genético que envolvam a germinação em regiões onde temperaturas elevadas possam ser encontradas com frequência durante todo ano. No entanto, são necessários outros estudos que possam elucidar melhor os fatores que envolvam a germinação dessa cultivar em altas temperaturas.

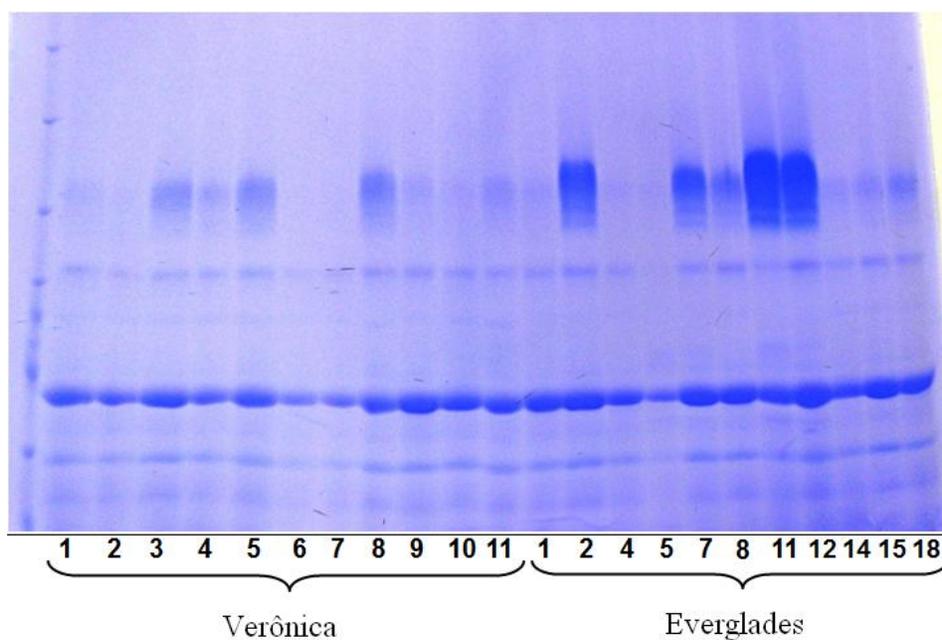


Figura 5 - Padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor em sementes de alfaca de 11 progênies da cultivar Verônica e em 11 progênies da cultivar Everglades.

## 5 CONCLUSÕES

- Os resultados dos testes de germinação à 35 °C confirmam a tolerância da cultivar Everglades à termoinibição.

- A posição em que as sementes são produzidas e colhidas, parte superior (ápice) ou parte inferior (basal) da inflorescência, não causa diferenças na germinação à temperatura de 35 °C.

- Sementes de progênies de plantas da cultivar Everglades mantêm as mesmas médias de germinação desta à temperatura de 35 °C, em torno de 70%, não se confirmando a hipótese de existência de linhas puras em diferentes condições de homozigose para tolerância à termoinibição.

- Os resultados sugerem que a dormência primária que ocorre em condições normais de germinação de sementes de alface à temperatura 20 °C, também acontece em sementes de genótipo tolerante à termoinibição em temperatura de 35 °C.

- A maior atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase ocorre na cultivar Everglades (termotolerante) do que na cultivar Verônica (termosensível), o mesmo comportamento ocorre para as proteínas resistentes ao calor, que apresentam maiores intensidades nos genótipos tolerantes à termoinibição.



## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 627.
- ALOHÓ, K. P.; ANITA, O. Effects of Planting Date and Fruit Position on Mother Plant on the Quality of Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) Seeds. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v.6, n.2, p. 18-28, 2016.
- ALVES, F. V. et al. Composição química e qualidade fisiológica de sementes de girassol de plantas submetidas à competição intraespecífica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n.3 p. 457 - 465, 2012.
- ARGYRIS, J.; DAHAL, P.; HAYASHI, E.; STILL, D.W.; BRADFORD, K. J. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiol.** v.148, n.2: p. 926-947. 2008.
- AZEVEDO, M. R. Q. A. et al. Influência das embalagens e condições de armazenamento no vigor de sementes de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v.7, n.3, p.519-524, 2003.
- BASKIN, CAROL C.; BASKIN, JERRY M. A Geographical Perspective on Germination Ecology : Temperate and Arctic Zones. *Seeds - Ecology, Biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego: **Academic Press**. p.668, 1998.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**. Wallingford, v.14, p. 1-16, 2004.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. Plenum Press, New York, USA, 1991. p.445.
- BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S .H.; OBENDORF, R .L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v.96, n.3, p.868-874, 1991.

BRANCALION, P. H. S.; MARCOS FILHO, J. Distribuição da germinação no tempo: causas e importância para a sobrevivência das plantas em ambientes naturais. **Informativo Abrates**. v.18, n.1,2,3 p.011-017, 2008.

BRASIL. 1986. Portaria n. 456, de 18 de dezembro de 1986. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 dez. 1986. p.19653.

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

BRYANT, J. A. **Fisiologia da semente**. São Paulo: EPU, 1989, 86 p.

BUFALO, J. et al. Períodos de estratificação na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) sob diferentes condições de luz e temperatura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 931-940, maio/jun. 2012.

CADMAN, C. S. C. et al. Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seed during cycling through dormant and non-dormant states indicate a common underlying dormancy control mechanism. **The plant journal, Oxford**, v.46, n.5,p.805-822, 2006.

CANSADO, J. C. A. **Sistema para experimentação de controle climático de casas de vegetação**. 2003. 118 p. Dissertação (Engenharia de computação e Sistemas digitais) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

CANTLIFFE, D. J.; NASCIMENTO, W. M.; SUNG, Y.; HUBER, D.J. Lettuce endosperm weakening: a role for endo- $\beta$ -mannanase in seed germination at high temperature. In: BLACK, M.; BRADFORD, K.J.; VÁSQUEZ-RAMOS, J., ed. **Seed Biology: Advances and applications**. Oxon: CABI, 2000. p. 277- 285.

CARDOSO, A. I. I. Produção e qualidade das sementes de cenoura das cultivares Brasília e Carandaí. **Bragantia**, Campinas, v.59, n.1, p. 77-81, 2000.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F.E. (orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CARVALHO, M. L.M.; VILELA, F.A. Armazenamento de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 70-75, maio/jun, 2006.

CARVALHO, M.L.M.; VON PINHO, E.V.R. **Armazenamento de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 67p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência e Tecnologia e produção**. 4. Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. Manual de Fisiologia Vegetal: **Teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agronomica Ceres. 2005. 650 p.

CATÃO, H. C. R. M. Et AL. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de alface em diferentes temperaturas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.49, n.4, p.316-322, abr. 2014.

COCK, W. R. S.; AMARAL JUNIOR, A. T.; BRESSAN-SMITH, R. E.; MONNERAT, P. H. Biometrical analysis of phosphorus use efficiency in lettuce cultivars adapted to high temperatures. **Euphytica** v.126, n.3, p. 299-308. 2002.

DELOUCHE, J. C.; MATTHES, R. K.; DOUGHERTY, G. M.; BOYD, A. H. Storage of seed in sub-tropical and tropical regions. **Seed science and technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 671-700, Nov.1973.

DIAS, D. C. F. S. Dormência em Sementes: mecanismos de sobrevivência das espécies. **Seed News**, jul/ago, 2005. Disponível em: 2005 (<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed94/artigocapa94.shtml>). Acesso em 16 de junho de 2015.

DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *panicum maximum* jacq pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 152-158, 2008.

DORIGUÊTTO, M. C. S. **Características comerciais e qualidade de sementes de linhagens avançadas de alface americana**. 2014. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DOWNIE, B.; HILHORST, H.W.M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying end - $\beta$ -d-mannanase activity using congo red dye. **Phytochemistry**, v.36, p.829-835, 1994.

EIRA, M. T. S. MARCOS FILHO, J. Condicionamento osmótico de sementes de alface, efeitos sobre a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília – DF, ano 12, n.1. 1990.

ESASHI, Y. Ethylene and seed germination, p.133-157. In: Mattoo, A.K. & Suttle, J.C. (Eds.) The plant hormone ethylene. **Boca Raton**, CRC Press, 1991. p.133-157.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **The New phytologist**, Cambridge, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.

FINKELSTEIN R.; REEVES W.; ARIIZUMI T.; STEBER C. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology** 59, 387–415. 2008.

FREITAS, T. P. et al. Morfologia e caracterização da germinação em função da posição das sementes no fruto de sabiá. **Scientia Plena**, v.9 n. 3, p. 039901, 2013.

GONG, X.; BASSEL, G. W.; WANG, A.; GREENWOOD, J. S.; BEWLEY, J. D. The emergency of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- $\beta$ -mannanase activity. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 1165-1173, Sept. 2005.

GROOT, S.P.C. et al. Gene expression during loss and regaining of stress tolerance at seed priming and drying. In: NICOLÁS, G. et al. (Eds.). **The biology of seeds**: recent research advances. Cambridge: CAB International, 2003. p.279-87.

GUEDES, R.S. et al. Metodologia para teste de tetrazólio em sementes *de Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. **Revista Brasileira Plantas Medicinai.**, Botucatu, v.12, n.1, p.120-126, 2010.

GUTTERMAN, YITZCHAK. Maternal Effects on Seeds During Development. International. **Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities**, 2ª edição, 2000. p. 59-84.

HUANG, X.-L. & KHAN, A.A. Alleviation of thermoinhibition in preconditioned lettuce seeds involves ethylene, not polyamine biosynthesis. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, n.5, p. 841- 845, 1992.

IGLESIAS – FERNÁNDEZ, R; MATILLA, A. J. Genes involved in ethylene and gibberellins metabolism are required for endosperm-limited germination of *Sisymbrium oYcinale* L. **Seeds. Planta**, Berlin, v.231, n. 3, p.653-664, Feb. 2010.

JOSÉ, S. C. B. R. Et al. Identificação de cultivares de milho por meio de proteínas resistentes ao calor . **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n.1, p. 1-9, 2004.

JOSÉ, S. C. B. R. **Tolerância a alta temperatura de secagem de sementes de milho**. 2003. 149 p. Tese (doutorado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras 2013.

KADER, A. A. Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. **HortScience**, v.20, n.1, p.54-57, 1985.

KANO, C. et al. Germinação de sementes de alface obtidas de plantas cultivadas com diferentes doses de fósforo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 591-598, abr/jun. 2011.

KHAN, A. A. Hormonal regulation of primary and secondary seed dormancy. Israel **Journal of Botany**, v. 29, n.1-4, p. 207-224, 1981.

LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v.186, p.817–831. 2010.

LOPES, A. C. A.; NASCIMENTO, W. M. Dormência em sementes de hortaliças. Brasília, DF: **Embrapa**, 2012. 28 p. – (Documentos / Embrapa Hortaliças ; 136).

LOPES, M. C.; FREIER, M.; MATTE, J. C.; GÄRTNER, M.; FRANZENER, G.; NOGAROLLI, E.L.; SEVIGNANI, A. Acúmulo de nutrientes por cultivares de alface em cultivo hidropônico no inverno. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 211-215, abr.-jun., 2003.

MACHADO, C. G; MARTINS, C. C; CRUZ, S.C.S; NAKAGAWA, J; PEREIRA, F. R.S. Posição do racemo e do fruto na qualidade fisiológica de sementes de mamona durante o armazenamento. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 2, p. 301-312, abr./jun. 2010.

MANN, R. S. Diversidade do complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares. 2002. 146 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – **Universidade Federal de Lavras**, Lavras.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 395 p.

MATOS, E. H. S. F. Cultivo protegido de hortaliças. **Centro de apoio ao desenvolvimento tecnológico da universidade de Brasília – CDT – UNB**. Dossiê Técnico, p. 37, set, 2007.

MENDONÇA, E. A, F. viabilidade de sementes de *cordia trichotoma* (vellozo) arrabida ex steudel (louro-pardo) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 23, n. 2, p.64-71, 2001.

MENEZES, M; VON PINHO, E. V. R, PEREIRA, A.M.A.R; OLIVEIRA, J.A. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista brasileira de Sementes**, v.30 n.2, p. 111-122, 2008.

MENEZES, N. L. SANTOS, O. S; NUNES, E. P; SCHMIDT, D. Qualidade fisiológica de sementes de alface submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 6, p. 941-945, nov/dez. 2000.

NASCIMENTO, W. M. Ethylene and lettuce seed germination. **Scientia Agricola** [online], Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 601-606. 2003.

NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. S. Testes para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface e sua relação com a germinação sob temperaturas adversas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 175-179, 2007.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Ethylene evolution and endo- $\beta$ -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n. 2, p. 156-163, 2004.

NASCIMENTO, W. M; CANTLIFFE, D.J. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p.103-106, 2002.

NASCIMENTO, W. M; CANTLIFFE, D.J. Produção de etileno, atividade de endo- $\beta$ -mananase e germinação de sementes de alface em resposta a luz e a temperatura. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 22, n. 2, p.1-5, 2000.

NASCIMENTO, W. M; CRODA, M. D. LOPES, C. C. A. Produções de sementes, qualidade fisiológica e identificação de genótipos de alface termotolerantes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 510-517, 2012.

NASCIMENTO, W.M. Geminação de sementes de alface. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2002. 10 p. (**Embrapa** – Hortaliças. Circular Técnica, 29).

NASSIF, S. M. N.; VIEIRA, I. G.; FERNADES, G.D. Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes. **Informativo Sementes-IPEF**, 1998. Disponível em: <http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>. Acesso em 15 de abril de 2016.

NUNES, R. A. et al. Germinação de Sementes de Cultivares de Alface sob Diferentes Temperaturas. 9º FAPEG – **Fórum de ensino, pesquisa e gestão**. Campus Universitário professor Darcy Ribeiro. p.1- 3. Set. 2015.

OLIVEIRA, D. F. **Germinação de sementes de progênies de alface em temperatura alta**. 2014. 26 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PEREIRA, A. L. Localização dos frutos e sua influência sobre a qualidade das sementes de quiabo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 5, n.1, p. 23-29, 1983.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, agiplan, 1977, p. 289.

REZENDE, M. T. **Tolerância ao florescimento precoce e à termoinibição em genótipos de alface**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2013.

SALA, F. C; NASCIMENTO, M.W. Produção de sementes de alface. **Produção de sementes de hortaliças**. Brasília, DF:Embrapa, v. 1. p. 17-42, 2014.

SANDERS, D.C. **Lettuce production**. 2013. Disponível em <<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/hil/hil=11>> Acesso 20 de agosto de 2015.

SANTOS, L. L. JUNIOR, S. S; NUNES, M. C. M. Luminosidade, temperatura do ar e do solo em ambientes de cultivo protegido. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.8, n.1, p.83- 93, 2010.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SILVA, E. A. A. Et al. Abscisic acid controls embryo growth ptencial and endosperm cap weakening during coffea ((*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, v.220, n.2, p.251-261, 2004.

STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Endo- $\beta$ -mananase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to gennination rates. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 1, p. 21-29, Jan. 1997.

SUNG, Y; CANTLIFFE, D.J; NAGATA, R.T; NASCIMENTO, W. M. Structural changes in lettuce seed during germination at high temperature altered by genotype, seed maturation temperature, and seed priming. **Journal of the American Society for horticultural Science**, Alexandria, v. 133, n. 2. p.300-311, 2008.

SUNG, Y; CANTLIFFE, D.J; NAGATA, R.T. Using a puncture test to identify the role of seed coverings on thermotolerant lettuce seed germination. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** Florida , v.123, n.6, p.1102-1106, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre:Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, G. C. S. et al. Estudos de evapotranspiração em casa de vegetação. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.13; 2011.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271.

VIDIGAL,D.S.;DIAS,D.C.F.S.;VONPINHO,E.R.;DIAS, L.A.S. Sweet pepper seed quality and Lea-protein activity in relation to fruit and post-harvest storage. **Seed Science and Technology**, v.31, p.192-201, 2009.

VIGGIANO, J. Produção de sementes de alface. In: CASTELLANE,P.D. (Org). **Produção de sementes de Hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990. P. 1-15.

VILLELA, F. A.; PEREZ, W. B. Tecnologia de sementes – coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G. E BORGHETTI, F. (Coord.). Germinação – do básico ao aplicado. Porto Alegre: **Artmed**, 2004. p. 265-280.

VILLELA, R. P. **Influência da temperatura na produção e qualidade fisiológica de sementes de alface**. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2009.