



HUGO CESAR RODRIGUES MOREIRA CATÃO

**TERMOTOLERÂNCIA NA GERMINAÇÃO E
NO ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE
ALFACE**

LAVRAS - MG

2013

HUGO CESAR RODRIGUES MOREIRA CATÃO

**TERMOTOLERÂNCIA NA GERMINAÇÃO E NO ARMAZENAMENTO
DE SEMENTES DE ALFACE**

Tese 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 doutor.

Orientador

Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Catão, Hugo Cesar Rodrigues Moreira.

Termotolerância na germinação e no armazenamento de
sementes de alface / Hugo Cesar Rodrigues Moreira Catão. – Lavras
: UFLA, 2013.

91 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luiz Antonio Augusto Gomes.

Bibliografia.

1. Alface - Sementes - Germinação. 2. Alface - Sementes -
Termodormência. 3. Alface - Sementes - Armazenamento. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

HUGO CESAR RODRIGUES MOREIRA CATÃO

**TERMOTOLERÂNCIA NA GERMINAÇÃO E NO ARMAZENAMENTO
DE SEMENTES DE ALFACE**

Tese 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 doutor.

Aprovada em 05 de novembro de 2013

| | |
|--|---------|
| Dr. Rovilson José de Souza | UFLA |
| Dr. Renato Mendes Guimarães | UFLA |
| Dr. Ernani Clarete da Silva | UFSJ |
| Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa | EMBRAPA |

Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes

Orientador

**LAVRAS - MG
2013**

*A minha mãe Alinete e aos meus avós José e Agostinha,
Pelo exemplo de vida e sabedoria,
Aos meus irmãos Jefferson Júnior e Ana Paula,
Pela força e companheirismo,
E a minha namorada Franciele
Pelo amor, carinho.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem realizado na minha vida;

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, por possibilitar a realização do doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da Bolsa de estudos;

Ao Professor Luiz Antônio Augusto Gomes, pelos ensinamentos, confiança, amizade e orientação na realização do trabalho;

Aos Professores Renato Mendes Guimarães e Heloisa Oliveira dos Santos, pelos ensinamentos, amizade e ajuda na realização do experimento;

Aos Professores do Setor de Sementes, João Almir Oliveira, Maria Laene Moreira de Carvalho, Édila Vilela de Rezende Von Pinho, pelos ensinamentos, contribuições e amizade;

À pesquisadora Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pelos conselhos e amizade;

À Empresa HortiAgro Sementes Ltda., pela disponibilização da área experimental, insumos e equipamentos utilizados na condução do experimento;

Aos funcionários Vicente, Paulo, Ná, Delei, Naldo da Empresa HortiAgro Sementes Ltda., pela disponibilidade e atenção durante a realização dos experimentos;

Ao Laboratório Central de Sementes, pela disponibilização de material e equipamentos utilizados na condução do experimento;

Aos funcionários Elenir, Dona Elza, Walbert do Laboratório Central de Sementes, pela disponibilidade e atenção durante a realização dos experimentos;

Ao bolsista Pedro Henrique e a todos os estudantes de iniciação científica e estagiários do grupo de melhoramento de alface, pelo companheirismo e ajuda nos experimentos;

Aos meus amigos de Pós-graduação Alexandre, Josué, Marcelo, Celso, Márcia e Cleiton, pelos conselhos e auxílios nas disciplinas e na condução do experimento;

À secretária de Pós-graduação, Marli, pela atenção durante o curso de Doutorado;

A minha família, principalmente minha mãe Alinete e meus avós José e Agostinha, que sempre me apoiaram e me ensinaram a valorizar o estudo como forma de crescimento pessoal e profissional;

A minha namorada, Franciele, pela paciência, atenção, amor e carinho que tem comigo em todos os momentos;

A todos os meus amigos, mesmo aqueles que estão longe, sempre torcem por mim e me incentivam a buscar novos desafios...

Muito Obrigado!

RESUMO GERAL

A alface é uma espécie de grande importância econômica e social, sendo cultivada e consumida em várias regiões do mundo. Seu cultivo é realizado com a utilização de sementes, para isso, se faz necessário, sementes de alta qualidade fisiológica. No entanto, sementes de alface apresentam sensibilidade às altas temperaturas, com manifestação de dormência sob tal condição. A dormência de sementes de alface é controlada pelo genótipo, mas sempre associada a fatores ambientais tal como a temperatura e fatores físicos como a espessura do tegumento. Em altas temperaturas a germinação é reduzida ou nula, podendo ocorrer alterações fisiológicas e nos padrões proteicos e/ou enzimáticos. Mesmo com avanços nas pesquisas, a dormência em sementes de alface ainda não é um processo bem esclarecido, não se sabe se esta é adquirida somente na germinação ou também, se pode ser imposta pela temperatura elevada durante o armazenamento. Logo, objetivou-se com o presente trabalho avaliar mudanças fisiológicas e bioquímicas em sementes de alface associadas à germinação e ao armazenamento em temperaturas elevadas. Nos experimentos foram utilizadas sementes de alface das cultivares Everglades, Babá de Verão, Elisa, Luiza, Grand Rapids, Hortência, Salinas 88 e Rubete. No primeiro experimento foi investigada a associação entre a tolerância às altas temperaturas de germinação e os padrões eletroforéticos de proteínas tolerantes ao calor e a atividade da enzima endo- β -mananase. Conclui-se que, sob temperatura de 35 °C, a maior porcentagem de germinação é observada na cultivar Everglades, portanto, considerada como termotolerante; os padrões de proteínas tolerantes ao calor em sementes de alface apresentam bandas específicas na cultivar Everglades na temperatura de 35 °C; a atividade da enzima endo- β -mananase é maior na cultivar Everglades na temperatura de 35 °C. No segundo experimento verificou-se a influência dos períodos e dos ambientes de armazenamento na qualidade e dormência de sementes de diferentes cultivares de alface, bem como alterações na atividade enzimática. Conclui-se que, o período de armazenamento, de até 120 dias, não tem influência na viabilidade e vigor de sementes de alface quando armazenadas na temperatura de 15 °C; as sementes de alface armazenadas em ambientes com temperatura superior a 25 °C não toleram o armazenamento a partir de 60 dias o que compromete a germinação e o vigor; a cultivar Everglades é tolerante à condição de germinação a 35 °C e mantém sua qualidade ao longo do armazenamento, de até 120 dias, em temperatura de 15 °C; a temperatura elevada induz à termodormência em cultivares de alface durante o armazenamento, uma vez que as sementes não germinadas estavam viáveis; ocorrem alterações enzimáticas em sementes de alface armazenadas em altas temperaturas devido à deterioração.

Palavras chave: *Lactuca sativa*. Dormência. Temperatura.

GENERAL ABSTRACT

Lettuce is a species of great economic and social importance, being cultivated and consumed in various regions of the world. Its cultivation is performed with the use of seed for this it is necessary, seed physiological quality. However, lettuce seeds are insensitive to high temperatures, with such manifestations of numbness under condition. The dormancy of lettuce seeds is controlled by genotype, but always associated with environmental factors such as temperature and physical factors such as the thickness of the integument. At high temperatures germination is low or absent, and the physiological protein and / or enzymatic patterns changes may occur. Even with advances in research, dormancy in lettuce seeds is a process not yet fully understood, it is unclear whether this is gained only in germination or also can be imposed by the high temperature during storage. Therefore, the objective of this work was to evaluate the physiological and biochemical changes associated with lettuce seed germination and storage at elevated temperatures. In experiments seeds of lettuce cultivars Everglades, Nanny Summer, Elisa, Luiza, Grand Rapids, Hortência, Salinas 88 and Rubete were used. In the first experiment we investigated the association between tolerance to high temperatures for germination and electrophoretic patterns of proteins and heat tolerant endo- β -mannanase activity. We conclude that, at temperature of 35 °C, the highest percentage of germination is observed in cultivar Everglades therefore considered thermotolerant; patterns of heat tolerant proteins in lettuce seeds have specific bands in farming Everglades at 35 °C, the activity endo- β -mannanase also higher in the Everglades at 35 °C. In the second experiment we verified the influence of periods and storage environments in quality and dormancy of seeds of different lettuce cultivars, as well as changes in enzyme activity. It is concluded that the storage period of 120 days, has no influence on viability and vigor of lettuce seeds when stored at a temperature of 15 °C; lettuce seeds stored in ambient temperatures exceeding 25°C not tolerate storage from 60 days which hinders germination and vigor; cultivating Everglades is tolerant to the condition of germination at 35 °C and maintains its quality during storage, up to 120 days at 15 °C, the high temperature induces thermodormancy cultivars lettuce during storage, since the non-germinated seeds were viable , enzymatic changes in lettuce seeds stored at high temperatures due to deterioration occurs.

Keywords: *Lactuca sativa*. Dormancy. Temperature.

SUMÁRIO

| | | | |
|------------|--|---|----|
| | CAPÍTULO 1 | Introdução geral | 11 |
| 1 | INTRODUÇÃO | | 12 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | | 14 |
| 2.1 | Aspectos gerais da cultura | | 14 |
| 2.2 | Influência da temperatura na germinação de sementes de alface | | 15 |
| 2.3 | Dormência de sementes | | 17 |
| 2.4 | Armazenamento de sementes | | 19 |
| | REFERÊNCIAS | | 21 |
| | CAPÍTULO 2 | Influência da temperatura em aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de alface | 25 |
| 1 | INTRODUÇÃO | | 28 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | | 29 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | | 34 |
| 4 | CONCLUSÕES | | 41 |
| | REFERÊNCIAS | | 42 |
| | CAPÍTULO 3 | Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de alface durante o armazenamento em diferentes temperaturas | 46 |
| 1 | INTRODUÇÃO | | 49 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | | 50 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | | 54 |
| 4 | CONCLUSÕES | | 79 |
| | REFERÊNCIAS | | 80 |
| | ANEXOS | | 84 |

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é considerada a olerícola folhosa mais importante na alimentação do brasileiro, o que lhe assegura expressiva importância econômica, ocupando dentro do grupo das hortaliças folhosas o posto de líder nacional em comercialização e consumo. Em 2011, o volume de alface comercializado no CEAGESP - SP foi de 28.811 toneladas (ANUÁRIO..., 2012). Estima-se que o Brasil possua uma área cultivada de cerca de 50 mil hectares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMERCIO DE SEMENTES E MUDAS - ABCSEM, 2010). Seu cultivo é intensivo e o mercado de sementes de alface no Brasil é estimado em torno de US\$ 2.000.000,00/ano (COSTA; SALA, 2005). O segmento de alface predominante no Brasil é do tipo crespa, liderando 70% do mercado. O tipo americana detém 15%, a lisa 10%, enquanto outras (vermelha, mimosa etc.) correspondem a 5% do mercado (SALA; COSTA, 2005).

Apesar de números expressivos, muitas regiões do país apresentam limitações no cultivo impostas pelas condições ambientais, que podem prejudicar a germinação das sementes. Os fatores ambientais como oxigênio, temperatura e água têm influência direta sobre a germinação das sementes. A temperatura ideal para a germinação de sementes de alface é de 20 °C (DENG; SONG, 2012). Temperatura acima de 25 °C (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010), afeta a germinação total, a velocidade de germinação, a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas, que determinam todo o processo germinativo (BERTAGNOLLI et al., 2003).

O embrião da semente de alface é completamente envolvido pelo endosperma, deve ser atravessado pela radícula para que ocorra a germinação. Assim, o endosperma pode retardar ou impedir a germinação das sementes, atuando como uma barreira física à emissão da radícula, especialmente sob

condições desfavoráveis (SUNG et al., 2008). Em altas temperaturas a germinação pode ser errática ocasionando dormência nas sementes (KOZAREWA et al., 2006).

Cantliffe, Sung e Nascimento (2000) relataram que os processos fisiológicos e bioquímicos que controlam a dormência e o possível mecanismo da germinação, principalmente sob condições de altas temperaturas, não eram bem elucidados. Mesmo com avanços nas pesquisas, a dormência nas sementes de alface ainda não é um processo bem compreendido e não se sabe ao certo, se esta é adquirida somente na germinação em altas temperaturas, ou também pode ser imposta pela temperatura elevada durante o armazenamento.

Muitos produtores de alface, após a semeadura, armazenam as embalagens contendo o restante das sementes em locais não apropriados, onde normalmente a temperatura do ambiente é elevada, podendo ser verificada na próxima semeadura que a qualidade destas sementes é comprometida. Ressalta-se, que o armazenamento visa a conservar da qualidade inicial do lote de sementes, para isso é necessário o controle das condições ambientais para a manutenção da viabilidade do produto armazenado. Altas temperaturas durante o armazenamento pode alterar processo fisiológico e metabólico das sementes e sua minimização deve ser requerida, quando se objetiva armazenar e preservar a qualidade das sementes (CARVALHO; PINHO, 2000).

Diante disto, a identificação de genótipos que tolerem temperaturas mais elevadas, seja na germinação ou armazenamento, torna-se de grande importância como subsídio para o desenvolvimento de programas de melhoramento de alface para regiões tropicais e subtropicais, com vistas à obtenção de cultivares de melhor qualidade. Logo, objetivou-se com presente trabalho avaliar mudanças fisiológicas e bioquímicas em sementes de alface na germinação e no armazenamento em temperaturas elevadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura

A alface (*Lactuca sativa* L.) é originária de regiões amenas do Mediterrâneo. Pertence à família *Asteraceae* e é uma planta anual que floresce sob dias longos e temperaturas altas. Condições ambientais de temperaturas amenas e dias curtos favorecem a etapa vegetativa do ciclo (FILGUEIRA, 2003). A temperatura ideal para o desenvolvimento está na faixa de 15,5 e 18,3 °C, apesar de tolerar faixas entre 26,6 a 29,4 °C, por alguns dias, desde que as temperaturas noturnas sejam baixas (SANDERS, 2013).

Sendo a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, ela é produzida em cinturões verdes próximos aos grandes centros consumidores por causa de sua rápida perecibilidade no período pós-colheita, devido ao seu alto teor de água e grande área foliar (SANTOS et al., 2001). A alface é uma razoável fonte de vitaminas e sais minerais, cujo aproveitamento pelo organismo é favorecido por ser consumida crua, destacando-se o seu elevado teor em pró-vitamina A, que alcança 4.000 UI em 100 gramas de folhas verdes (cerca de quatro vezes o teor do tomate) sendo, porém, bem mais baixo o teor dessa vitamina nas folhas internas brancas das alfaces repolhudas (CAETANO et al., 2001).

A planta é herbácea, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas são amplas e crescem em roseta, em volta do caule, podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma "cabeça", com coloração em vários tons de verde, ou roxa, conforme a cultivar. O sistema radicular é muito ramificado e superficial, explorando apenas os primeiros 25 cm de solo, quando a cultura é transplantada. Em sementeira direta, a raiz pivotante pode atingir até 60 cm de profundidade (FILGUEIRA, 2003).

A inflorescência é uma panícula constituída por diversos botões florais denominados de capítulos, sendo cada capítulo composto por 10 a 25 floretes. O florete apresenta uma única pétala amarela, envolvida por brácteas imbricadas que formam um involúcro. O estilete é bifurcado no ápice e o ovário contém um único óvulo; que posteriormente dá origem a uma única semente. A antese ocorre pela manhã e cada flor se abre apenas uma vez, garantindo a autofecundação e conferindo à planta a autogamia por cleistogamia (RYDER, 1999).

Os frutos de alface são do tipo aquênios e a sua maturação fisiológica é em média 12 dias após a antese do florete. Uma planta de alface pode produzir até 20 gramas de aquênios, dependendo do período do florescimento e do tipo varietal (COSTA; SALA, 2005).

2.2 Influência da temperatura na germinação de sementes de alface

As sementes de alface apresentam alta sensibilidade às condições do ambiente e tal fato ocasiona problemas na germinação. A temperatura ótima situa-se em torno de 20 °C, sendo que a maioria das cultivares não germina em temperaturas superiores a 30 °C (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002) decrescendo a velocidade ou a porcentagem de germinação (NASCIMENTO, 2003).

Quando ocorrem condições de altas temperaturas durante a embebição das sementes de alface, dois fenômenos podem ser observados: a termoinibição, um processo reversível, uma vez que a germinação ocorre quando a temperatura reduz para um nível mais adequado e/ou a termodormência, também chamada de dormência secundária, onde as sementes não germinarão, mesmo após a redução da temperatura (CANTLIFFE; SUNG; NASCIMENTO, 2000).

O mecanismo de ação da germinação de sementes de alface em altas temperaturas parece estar relacionado com o enfraquecimento do endosperma, o qual permite o crescimento do embrião em temperaturas elevadas. O embrião da alface é completamente incluído dentro do endosperma onde a radícula deve penetrar para crescer e terminar a germinação, sendo assim, as primeiras horas de embebição são críticas para sementes de alface germinarem sob condições de altas temperaturas (NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2004).

A parede celular do endosperma é de hemicelulose composta por: manose, galactoses, fucose, arabinose entre outros açúcares (DUTTA; BRADFORD; NEVINS, 1994), principais constituintes de reserva para o embrião. No entanto, o endosperma se apresenta como o principal órgão que impede o crescimento do embrião em sementes de alface (SUNG et al., 2008). Para que possa ocorrer a germinação, há a necessidade que o embrião consiga romper as barreiras físicas, as quais o envolvem. Entretanto, o embrião não possui essa capacidade para romper essas barreiras (HACISALIHOGU et al., 1999). Assim, a atividade de enzimas promove o enfraquecimento da parede que envolve o embrião, tornando seu desenvolvimento possível.

A principal enzima que está envolvida com o enfraquecimento da parede celular do endosperma de sementes de alface é a endo- β -mananase (SUNG et al., 2008). De acordo com Nascimento, Cantliffe e Huber (2001) existe relação entre a atividade da endo- β -mananase antes da protrusão radicular e a diminuição da resistência do endosperma com a germinação em altas temperaturas. E essa atividade está intimamente ligada à composição da parede do endosperma, a qual é determinada pelo genótipo. Assim, cultivares de alface termosensíveis apresentam maior quantidade de manose e galactose na parede celular que os genótipos termotolerantes. Por este motivo, maiores quantidades de manose e galactose requerem um maior tempo para a mananase completar a hidrólise (NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2001). Diante do exposto, sementes

de cultivares termotolerantes, como a Everglades (KOZAREWA et al., 2006; NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2001), exibiram muito maior atividade de endo- β -mananase do que as sementes da cultivar Dark Green Boston (termossensível) (NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2001).

Assim, a temperatura máxima e crítica para a germinação das sementes de alface dependem do genótipo (THOMPSON; COX; SANDERSON, 1979). Além disso, a temperatura no ambiente de desenvolvimento da planta mãe também influencia na tolerância da germinação das sementes em altas temperaturas. As cultivares de alface Dark Green Boston (termossensível) e Everglades (termotolerante) foram expostas a temperaturas diurna e noturna de 30 °C/20 °C e 20 °C/10 °C durante a fase reprodutiva. Em ambas as cultivares houve aumento na germinação de sementes quando estas se desenvolveram a 30 °C/20 °C. A cultivar termotolerante elevou a germinação de 31,3% a 20 °C/10 °C para 97,7% a 30 °C/20 °C (KOZAREWA et al., 2006). Assim, dependendo do local e da época de semeadura, a germinação das sementes pode ser reduzida ou nula, comprometendo a população de plantas da cultura.

2.3 Dormência de sementes

Pela definição de Carvalho e Nakagawa (2000), dormência é o fenômeno pelo qual, sementes de uma determinada espécie, mesmo sendo viáveis e tendo todas as condições ambientais favoráveis deixam de germinar. Esse processo é caracterizado pelo atraso da germinação ou até mesmo sua ausência mesmo estando estas sementes em condições ambientais satisfatórias para a germinação (BEWLEY; BLACK, 1994). Ecologicamente tem o papel de distribuir a germinação no tempo, no entanto, sob o ponto de vista da tecnologia de sementes, a dormência pode levar a perdas na semeadura e na formação de mudas comprometendo a implantação da cultura.

Vale ressaltar que a dormência não deve ser somente associada com a ausência de germinação. Preferivelmente, tem sido associada a uma característica da semente que determina as condições requeridas para a germinação (FENNER; THOMPSON, 2005).

Existem dois tipos de dormência, a primária e a secundária. As sementes apresentam dormência primária quando são dispersas da planta-mãe em estado de dormência (SIMPSON, 1990). Logo, a dormência primária é induzida durante o desenvolvimento e deve-se a presença do ácido abscísico (ABA) durante a maturação das sementes na planta-mãe (HILHORST, 1995). A dormência adquirida após a dispersão é caracterizada como dormência secundária (SIMPSON, 1990) e pode estar relacionada a fatores que são, geralmente, usados em laboratório para a quebra da dormência como a secagem ou a embebição.

Além das dormências primária e secundária têm-se ainda outros diferentes tipos de dormência. Nikolaeva (2004) propôs um sistema de classificação da dormência considerando o fato de que a mesma é determinada tanto por propriedades morfológicas quanto fisiológicas das sementes. Baseados nesse sistema, Baskin e Baskin (2004) propuseram um sistema de classificação que compreende cinco tipos de dormência de sementes: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e a combinação da física e fisiológica.

A dormência, ainda pode ser classificada com base nos componentes que inibem a germinação: embrião (endógenos) e tegumento da semente, endosperma, perisperma, entre outros (exógenos). E também de acordo com as condições ambientais em que se apresentam: fotodormência (ausência de luz), termodormência (temperaturas altas) dentre outros tipos (HILHORST; KARSSSEN, 1992). Esses sistemas de classificação mostram a diversidade de fatores morfológicos e fisiológicos envolvidos no controle da dormência em resposta às diferentes condições ambientais. Para a compreensão dos diferentes

tipos de dormência de sementes, é necessário o conhecimento dos mecanismos que regulam esse fenômeno.

Estudos relacionados aos mecanismos de dormência de sementes, em nível molecular, são escassos, entretanto, em algumas pesquisas têm sido fornecidos subsídios para o seu entendimento (BETHKE; LIBOUREL; JONES, 2007). Nesses trabalhos são mostrados que os mecanismos que determinam a dormência podem atuar nos componentes do embrião e/ou do tegumento (BEWLEY, 1997; HILHORST, 1995).

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 a controlam. Atualmente, com as novas tecnologias, alguns estudos têm correlacionado a dormência com mudanças na expressão gênica, atividade enzimática e acúmulo de hormônios, o que deve conduzir a uma definição mais clara da dormência (FINKELSTEIN et al., 2008). Dessa forma, o conceito de dormência ainda aguarda por novas pesquisas para ser refinado ou reestruturado, adequando-se aos novos resultados os mecanismos e processos que levam a semente viva a uma condição metabólica 'de espera'.

2.4 Armazenamento de sementes

O armazenamento é um fator de suma importância para a manutenção da qualidade fisiológica das sementes é o armazenamento. Esta etapa visa manter a conservação da qualidade, utilizando o controle das condições ambientais para a manutenção da viabilidade do produto armazenado. Com isso, temperatura e umidade do armazém são os dois fatores mais importantes para a manutenção da qualidade das sementes.

A capacidade de uma semente manter sua qualidade durante o armazenamento depende da longevidade inerente à espécie e da sua qualidade

inicial, mas as condições do armazenamento podem modificar o seu potencial de conservação (CARVALHO; PINHO, 2000).

Para Carvalho e Pinho (2000) a temperatura representa um dos fatores condicionantes de manutenção da viabilidade das sementes, principalmente por sua influência na umidade do produto e conseqüentemente, no seu metabolismo. As altas temperaturas aceleram o processo fisiológico da respiração e sua minimização deve ser requerida, quando se objetiva armazenar e preservar a qualidade das sementes.

A elevação da temperatura no armazenamento diminui a umidade relativa do ar, em conseqüência causa a migração da umidade das sementes para o ar, tornando-o úmido. A água então move do ar úmido novamente para as sementes adjacentes. A migração da umidade pode ser um problema, pois ocasiona desintegração do sistema de membranas celulares, possivelmente por alterações nos lipídeos que as constituem. Altas temperaturas podem também diminuir a solubilidade e a capacidade de ligação das proteínas (PEPLINSKI et al., 1994), causar dano tanto na estrutura da mitocôndria, refletindo na taxa respiratória (BURRIS; PETERSON; PERDOMO, 1997), como em outros sistemas subcelulares.

Com a elevação da temperatura os processos metabólicos se intensificam e como conseqüência da respiração da semente, da atividade de microrganismos e insetos, a velocidade de deterioração pode ser maior. Para Baudet (2003), a deterioração da semente é um processo irreversível, não se pode impedi-la, mas é possível retardar sua velocidade com o controle das condições ambientais durante o armazenamento de forma eficiente.

REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2012. 137 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **ABCSEM comemora 40 anos na Hortitec**. Campinas, 2010. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=986>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 1-16, Mar. 2004.
- BAUDET, L. Armazenamento de sementes. In: PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G. M. (Ed.). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: UFPel, 2003. p. 369-418.
- BERTAGNOLLI, C. M. et al. Desempenho de sementes nuas e pelotizadas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a estresses hídrico e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 7-13, 2003.
- BETHKE, P. C.; LIBOUREL, I. G.; JONES, R. L. Nitric oxide in seed dormancy and germination. In: BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. (Ed.). **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 153-171.
- BEWLEY, J. D. Breaking down the walls: a role for endo- β -mannase in release from seed dormancy? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 464-469, Dec. 1997.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BURRIS, J. S.; PETERSON, J. M.; PERDOMO, A. Morphological and physiological changes associated with desiccation in maize embryos. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEEDS: BASIC AND APPLIED ASPECTS OF SEED BIOLOGY, 5., 1995, Reading. **Proceedings...** Reading: University of Reading, 1997. p. 103-111.
- CAETANO, L. C. S. et al. **A cultura da alface: perspectivas, tecnologias e viabilidade**. Niterói: PESAGRO-RIO, 2001. 23 p.

CANTLIFFE, D. J.; SUNG, Y.; NASCIMENTO, W. M. Lettuce seed germination. **Horticultural Reviews**, New York, v. 24, n. 1, p. 229-275, Nov. 2000.

CARVALHO, M. L. M.; PINHO, E. V. R. von. **Armazenamento de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 39 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 158-159, 2005.

DENG, Z.; SONG, S. Sodium nitroprusside, ferricyanide, nitrite and nitrate decrease the thermo-dormancy of lettuce seed germination in a nitric oxide-dependent manner in light. **South African Journal of Botany**, Brisbane, v. 78, n. 1, p. 139-146, June 2012.

DUTTA, S.; BRADFORD, K. J.; NEVINS, D. J. Cell-wall autohydrolysis in isolated endosperms of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 2, p. 623-628, 1994.

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds**. Cambridge: Cambridge University, 2005. 260 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2003. 412 p.

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. et al. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 387-415, 2008.

HACISALIHOGU, G. et al. Embryo elongation and germination rates as sensitive indicators of lettuce seed quality: priming and aging studies. **Hortscience**, Alexandria, v. 34, n. 7, p. 1240-1243, 1999.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy: primary dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 61-73, Mar. 1995.

HILHORST, H. W. M.; KARSSSEN, C. M. Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 225-238, 1992.

KOZAREWA, I. et al. High maturation temperature of lettuce seeds during development increased ethylene production and germination at elevated temperatures. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 564-570, Feb. 2006.

NASCIMENTO, W. M. Preventing thermoinhibition in a thermosensitive lettuce genotype by seed imbibition at low temperature. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 477-480, 2003.

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.; HUBER, D. J. Endo-beta-mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermotolerant lettuce genotypes in response to seed priming. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 3, p. 255-264, 2001.

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

NIKOLAEVA, M. G. On criteria to use in studies of seed evolution. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 4, p. 315-320, Dec. 2004.

PEPLINSKI, A. J. et al. Drying of high moisture corn: changes in properties and physical quality. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 71, n. 2, p. 129-133, 1994.

RYDER, E. J. **Lettuce, endive, and chicory**. Wallingford: CABI, 1999. 208 p.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. 'Piraroxa': cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 158-159, jan./mar. 2005.

SANDERS, D. C. **Lettuce production**. Disponível em:
<<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/hil/hil=11>>. Acesso em: 10 set. 2013.

SANTOS, R. H. S. et al. Conservação pós-colheita de alface cultivada com composto orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 521-525, mar. 2001.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. A genetic locus and gene expression patterns associated with the priming effect on lettuce seed germination at elevated temperatures. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 73, n. 1/2, p. 105-118, 2010.

SIMPSON, G. M. **Seed dormancy in grasses**. New York: Cambridge University, 1990. 297 p.

SUNG, Y. et al. 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.

THOMPSON, P. A.; COX, S. A.; SANDERSON, R. H. Characterization of the germination responses to temperature of lettuce (*Lactuca sativa* L.) achenes. **Annals of Botany**, London, v. 43, p. 319-334, 1979.

**CAPÍTULO 2 Influência da temperatura em aspectos fisiológicos e bioquímicos da
germinação de sementes de alface**

RESUMO

A germinação de sementes de alface em temperaturas elevadas é um problema enfrentado por agricultores e produtores de sementes. Em altas temperaturas a germinação é reduzida ou nula, podendo ocorrer alterações fisiológicas e nos padrões proteicos e/ou enzimáticos. Diante disto objetivou-se com o presente trabalho avaliar os padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor e atividade da enzima endo- β -mananase em sementes de alface associadas com a tolerância da germinação em alta temperatura. Foram utilizadas sementes de oito cultivares de alface submetidas aos testes de germinação, primeira contagem e emergência em duas temperaturas (20 e 35 °C). Foi calculado também o IVG e IVE. Sementes das oito cultivares foram embebidas nas temperaturas citadas para a extração das proteínas resistentes ao calor e da enzima endo- β -mananase. O delineamento experimental utilizado nos testes para a avaliação da qualidade das sementes foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x8, cujos fatores foram duas temperatura (20 e 35 °C) e oito cultivares. A maior germinação a 35 °C é observada na cultivar Everglades, portanto considerada termotolerante. Os padrões de proteínas resistentes ao calor são estáveis, em sementes de alface, e estes apresentam bandas específicas na cultivar Everglades na temperatura de 35 °C. A atividade da enzima endo- β -mananase é maior na cultivar Everglades na temperatura de 35 °C. Esta cultivar tem potencial para utilização em programas de melhoramento de alface visando à tolerância à germinação em temperaturas elevadas.

Palavras-chave: Termoinibição. Proteínas tolerantes ao calor. Endo- β -mananase. Germinação.

ABSTRACT

The germination of lettuce seeds at high temperatures is a problem faced by farmers and seed producers. At high temperatures germination is low or absent, and the physiological protein and/or enzymatic patterns changes may occur. Given this objective with this study was to evaluate the electrophoretic patterns of the heat-resistant proteins and endo- β -mannanase in lettuce seeds associated with tolerance of germination at high temperature activity. Seeds eight lettuce cultivars subjected to germination, first count and emergence tests at two temperatures (20 and 35 °C) were used. IVG and the IVE was also calculated. Seeds of the eight cultivars were soaked in temperatures cited for the extraction of heat resistant and endo- β -mannanase proteins. The experiment tests for assessing the quality of seeds was completely randomized , factorial 2x8, whose two factors were temperature (20 and 35 °C), and eight cultivars. The highest germination at 35 °C is observed in cultivar Everglades therefore considered thermotolerant. The patterns of heat-resistant proteins are stable in lettuce seeds, and these present specific bands in farming in Everglades 35°C. The activity of endo- β -mannanase also higher in the Everglades at 35°C. This cultivar has potential for use in breeding of lettuce aiming tolerance to high temperatures for germination programs.

Keywords: Thermoinhibition. Heat tolerant proteins. Endo- β -mannanase, Germination.

1 INTRODUÇÃO

As sementes de alface apresentam sensibilidade às variações na umidade e temperatura no meio onde germinam, podendo afetar sua qualidade (BERTAGNOLLI et al., 2003). Tal fato ocasiona problemas na germinação sendo responsável pela má qualidade e atraso na produção de mudas (MENEZES et al., 2000) e conseqüentemente queda na produtividade, com prejuízos diretos para o produtor (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2001).

De acordo com Finch-Savage e Leubner-Metzger (2006) a dormência de sementes é controlada pelo genótipo, mas sempre associado a fatores ambientais tais como temperatura, fatores físicos como espessura do tegumento e regulação de hormônios como ácido abscísico e giberelina. Quando as sementes de alface são expostas a temperaturas elevadas durante a embebição, pode ocorrer uma inibição temporária (termoinibição) ou completa da germinação (termodormência) (KOZAREWA et al., 2006), e isso acontece devido à rigidez do endosperma que acaba restringindo a protrusão da radícula (NASCIMENTO, 2003).

A parede celular do endosperma das sementes de alface é constituída, principalmente, de galactomananos (DUTTA; BRADFORD; NEVINS, 1994) e supõe-se que a enzima endo- β -mananase pode desempenhar importante papel neste mecanismo de degradação (DUTTA; BRADFORD; NEVINS, 1997; NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2004). A atividade desta enzima em cultivares germinadas em temperaturas elevadas é um diferencial na seleção de cultivares termotolerantes.

Apesar de as enzimas proporcionarem uma discriminação mais rápida, a estabilidade das mesmas varia com as condições de temperatura. Dessa forma, é necessário também avaliar marcadores que sejam polimórficos, estáveis e de baixo custo. Com isso, um dos mecanismos mais estudados na adaptação dos

organismos à condição de estresse são as proteínas tolerantes ao calor, a exemplo das *heat shock proteins* (HSP). Esta é uma importante ferramenta para a identificação de cultivares que tolerem altas temperaturas, visto que estas proteínas conservam sua natureza, mantêm suas propriedades físicas e abundância em condições de estresse (JOSÉ et al., 2004).

Segundo Vertucci e Farrant (1995), as proteínas tolerantes ao calor têm sido relacionadas com a preservação e com o reparo das estruturas macromoleculares durante a desidratação ou reidratação, respectivamente.

Diante disto, a identificação de genótipos capazes de germinar em temperaturas mais elevadas torna-se de grande importância como subsídio para o desenvolvimento de programas de melhoramento de alface para regiões tropicais e subtropicais, com vistas à obtenção de cultivares mais tolerantes e de melhor qualidade quanto à germinação. Assim, objetivou-se com este trabalho investigar tolerância de sementes de alface quanto à germinação sob altas temperaturas associadas a padrões eletroforéticos de proteínas tolerantes ao calor e a atividade da enzima endo- β -mananase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em área experimental no município de Ijaci - MG e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

O processo de produção de sementes de alface foi conduzido no município de Ijaci – MG entre os meses de outubro de 2011 e fevereiro de 2012, em área da Fazenda Palmital, localizado na latitude: 21° 9'24" Sul, longitude 44° 55' 34" Oeste, onde o solo é classificado como latossolo vermelho de textura argilosa.

Inicialmente, realizou-se a produção de mudas de diferentes cultivares, sendo lisa (Everglades, Babá de Verão, Elisa e Luiza), crespa (Grand Rapids e Hortência) e americana (Salinas 88 e Rubete) semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Multiplant®-hortaliças, sendo que em cada célula foram colocadas três sementes de cada cultivar. Após sete dias realizou-se desbaste deixando somente uma planta, que aos 21 dias foi transplantada para canteiros em área sob cultivo protegido.

O preparo do solo foi feito mediante gradagem e levantamento de canteiros com rotoencanteiradora, onde foram incorporados fertilizantes seguindo as normas da 5ª aproximação para a cultura da alface. Adubações complementares via fertirrigação foram realizadas no período reprodutivo da cultura. Foi utilizado o espaçamento de 0,4 metros entre plantas por 0,6 metros entre linhas, com seis plantas por parcela. Cada parcela tinha uma área de 7,2 m², seguindo o delineamento em blocos casualizados com três repetições. Foram feitos desbastes de folhas velhas após o início do pendoamento, assim como o tutoramento das plantas. Durante o processo de produção de sementes a temperatura média máxima e mínima do ar medida a um metro e meio do solo foi respectivamente 45,6 e 31,2 °C. A medição da temperatura foi feita utilizando termômetro de máximas e mínimas mediante um sensor colocado junto a este.

As sementes de cada planta da mesma cultivar foram colhidas individualmente dentro de cada bloco e depois misturadas homogeneamente compondo um único lote de sementes, que foi utilizado nos experimentos seguintes.

As sementes das diferentes cultivares após a colheita foram submetidas à determinação do teor de água, avaliação da qualidade fisiológica e bioquímica.

Teor de água das sementes: foi avaliado em estufa, a 105 °C, durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras de cada tratamento, conforme as

Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média por tratamento.

Teste de germinação: a semeadura foi realizada sobre duas folhas de papel mata-borrão para germinação, umedecidas com água, na proporção de 2,5 vezes o peso do substrato seco, em caixas plásticas tipo gerbox. As caixas com as sementes foram mantidas em germinadores sob-regime, alternado de luz e temperatura, 12 horas no escuro e 12 horas na presença de luz, em 20 e 35 °C. Aos 4 e 7 dias, procedeu-se a avaliação das plântulas, segundo Brasil (2009). Cada tratamento foi composto de quatro subamostras de 50 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Teste de tetrazólio: foi realizado com as sementes remanescentes (sementes que não germinaram) do teste de germinação, sendo retirados os tegumentos e os embriões submetidos ao teste. A coloração foi realizada em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio em concentração de aproximadamente 1%, durante 3 horas no escuro, a 30 °C. Após este período, verificado a coloração, os embriões foram lavados em água corrente e mantidos submersos em água até sua avaliação, quando foram analisados individualmente para verificar sua viabilidade. A interpretação foi realizada com auxílio de lupa com iluminação fluorescente, de acordo com as RAS (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem de sementes viáveis.

Teste de emergência: a semeadura foi realizada em caixas plásticas tipo gerbox, contendo substrato comercial (Multiplant®-hortaliças) com a capacidade de retenção de água ajustada para 60%. Os gerboxs foram mantidos em BOD, nas temperaturas de 20 °C e de 35 °C. Colocou-se no interior de cada BOD um recipiente contendo água para manter a umidade. Para cada tratamento foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes. Foram realizadas avaliações diárias a partir do início da emergência, computando-se o número de plântulas emersas até a estabilização do estande.

Índice de velocidade de germinação e de emergência: as avaliações da velocidade de germinação e de emergência foram realizadas simultaneamente aos testes de germinação e de emergência, computando-se, diariamente e no mesmo horário, o número de plântulas que apresentavam dois folíolos completamente abertos. Os cálculos dos índices foram realizados de acordo com formula proposta por Maguire (1962).

Eletroforese de proteínas resistentes ao calor: para a extração as sementes de alface de cada tratamento foram colocadas para embeber por um período de cinco horas, nas temperaturas de 20 e de 35 °C, em caixas plásticas sobre papel mata-borrão umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Após a embebição, 150 sementes de cada cultivar foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido e PVP. 100 mg do pó macerado foram adicionados a 1000 µL de tampão de extração (50 mM tris-HCl-7,5; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM PMSF), em seguida microtubos de 2 mL foram agitados em Vortex e centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então incubado em banho-maria a 85 °C por 15 minutos e novamente centrifugado por 30 minutos como acima descrito. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação, os microtubos contendo 70 mL do 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 de bromofenol, completando o volume para 25 mL de água destilada) foram levados ao banho-maria em ebulição por 5 minutos. Foram, então, aplicados 50 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador), sendo a revelação para detecção das proteínas resistentes ao calor, conduzida segundo metodologia descrita por Alfenas (2006).

Análise da enzima endo-β-mananase: para a extração as sementes de alface de cada tratamento foram colocadas para embeber por um período de

cinco horas, nas temperaturas de 20 e de 35 °C, em caixas plásticas sobre papel mata-borrão umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Após a embebição, 150 sementes de cada cultivar foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido e PVP. Em cada microtubo com 100 mg de pó de cada amostra foi adicionado 300 µL de tampão de extração (0,1 M HEPES/ 0,5 M NaCl e ácido ascórbico (5 mg de ácido ascórbico por mL de tampão), pH 8,0). Em seguida os microtubos foram centrifugados por 30 minutos a 14000 rpm e 2 µL do sobrenadante foram aplicados em gel contendo 6 mL de LBG (Locust Bean Gum), 0,24 g de agarose e 24 mL de tampão pH 5,0 (1 M Ácido Cítrico/ 0,4 M de Na₂HPO₄ 2 H₂O). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador. O gel foi incubado por 21 h e revelado segundo metodologia proposta de Silva et al. (2004). A atividade da enzima endo-β-mananase foi calculada de acordo com Downie, Hilhorst e Bewley (1994).

Delineamento experimental: nos testes para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes de alface utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x8, cujos fatores foram duas temperatura (20 e 35 °C) e oito cultivares de alface. Foi realizada a análise de variância para todos os testes, utilizando-se o programa estatístico *Sisvar*[®] (FERREIRA, 2000). Para a comparação entre as médias, empregou-se o Teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. A avaliação dos padrões proteicos foi feita de acordo com a intensidade das bandas, utilizando-se transiluminador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos teores de água das sementes das diferentes cultivares, após a secagem variaram de 5,2 a 6,3%, percentuais também relatados por Barbosa, Costa e Sá (2011) em diferentes lotes de sementes de alface.

Com base na análise de variância foi possível observar diferenças significativas entre as cultivares e entre as temperaturas, assim como para a interação dos fatores avaliados ($p < 0,05$) (Tabela 1A), o que pode ser verificado pelo teste de média (Tabela 1).

Em estudos realizados por Nascimento, Croda e Lopes (2012), avaliando a germinação de sementes de alface sob altas temperaturas, também foram observadas diferenças entre cultivares. É evidente o decréscimo que ocorre na germinação e no vigor das sementes quando a temperatura de germinação foi elevada de 20 °C para 35 °C. A alta temperatura à qual foram expostas as sementes afetou a qualidade das mesmas, no entanto em menor intensidade na cultivar Everglades. Porcentagens reduzidas de germinação e emergência de plântulas em altas temperaturas podem estar associadas à dormência (termodormência), pois, durante a avaliação do teste de germinação, foi observada a presença de sementes embebidas sem protrusão radicular. Por meio do teste de tetrazólio (Tabela 2), verificou-se que a maioria das sementes embebidas estavam viáveis. De acordo com Dias e Alves (2008) o teste de tetrazólio e germinação são complementares e que em conjunto permitem avaliar a qualidade fisiológica das sementes por meio de sua viabilidade. Neste trabalho fica evidente como esses testes foram primordiais para avaliar a qualidade das sementes, principalmente na temperatura de 35 °C (Tabela 2), o que pode ser inferido que as mesmas estavam termodormentes.

Tabela 1- Resultados dos testes de primeira contagem de germinação (PCG), germinação (GER), índice de velocidade de germinação (IVG), emergência (EMERG) e índice de velocidade de emergência (IVE) em oito cultivares de alface em função da temperatura (20 e 35 °C).

| Cultivares | PCG (%) | | GER (%) | | IVG | | EMERG (%) | | IVE | |
|-------------------|---------|-------|---------|-------|--------|--------|-----------|-------|--------|-------|
| | 20 | 35 | 20 | 35 | 20 | 35 | 20 | 35 | 20 | 35 |
| Luiza | 94 aA | 11 bB | 94 aA | 21 bB | 23,3aD | 2,6 bB | 90 aB | 17 bB | 9,1aC | 1,5bB |
| Elisa | 78 aC | 9 bB | 82 aC | 23 bB | 18,5aE | 2,8 bB | 78 aC | 13 bB | 6,35aF | 1,0bB |
| G. Rapids | 96 aA | 0 bC | 97 aA | 2 bC | 37,2aB | 0,1 bC | 88 aB | 0 bC | 6,9aE | 0,0bC |
| B. Verão | 96 aA | 3 bC | 98 aA | 4 bC | 31,7Ac | 0,4 bC | 91 aB | 0 bC | 7,9aD | 0,0bC |
| Hortência | 98 aA | 0 bC | 98 aA | 0 bC | 41,9Aa | 0 bC | 84 aC | 0 bC | 7,8aD | 0,0bC |
| Rubete | 97 aA | 0 bC | 99 aA | 0 bC | 23,0Ad | 0 bC | 95 aA | 0 bC | 10,5aB | 0,0bC |
| Salinas 88 | 87 aB | 0 bC | 90 aB | 0 bC | 22,9aD | 0 bC | 80 aC | 0 bC | 7,4aD | 0,0bC |
| Everglades | 98 aA | 60 bA | 99 aA | 74 bA | 44,4aA | 24,1bA | 98 aA | 65 bA | 11,1aA | 5,7bA |
| CV | 7,79 | | 6,12 | | 10,96 | | 6,31 | | 7,70 | |

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Tabela 2 - Viabilidade (%) pelo teste de tetrazólio em sementes de alface remanescentes do teste de germinação (N) em oito cultivares de alface em função da temperatura (20 e 35 °C).

| Cultivares | 20°C | | | 35°C | | |
|-------------------|------|-------------|------------|------|-------------|------------|
| | N | Viáveis (%) | Mortas (%) | N | Viáveis (%) | Mortas (%) |
| Luiza | 12 | 0 | 100 | 158 | 83 | 17 |
| Elisa | 36 | 36 | 64 | 154 | 49 | 51 |
| G. Rapids | 6 | 25 | 75 | 196 | 82 | 18 |
| B. Verão | 4 | 67 | 33 | 192 | 90 | 10 |
| Hortência | 4 | 75 | 25 | 200 | 47 | 53 |
| Rubete | 2 | 0 | 100 | 200 | 52 | 48 |
| Salinas 88 | 20 | 16 | 84 | 200 | 68 | 32 |
| Everglades | 2 | 0 | 100 | 52 | 87 | 13 |

* Número de sementes não germinadas num total de 200 sementes.

As cultivares Elisa e Salinas 88 apresentam as menores porcentagens de germinação, além de baixo vigor verificados pelo teste de emergência e índices de velocidade de germinação e de emergência em temperatura de 20 °C. Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Villela et al. (2010) verificou que a cultivar Elisa apresentou elevados índices de germinação e de vigor a 20 °C.

Verificou-se na temperatura de 20 °C, recomendada para a germinação de sementes de alface, obtiveram-se as maiores porcentagens de germinação com valores acima de 80%, valor este considerado mínimo para comercialização de sementes desta espécie. Já na temperatura de 35 °C apenas a cultivar Everglades manteve valores de germinação de 74% o que corrobora com trabalhos que caracterizam esta cultivar como termotolerante (GONAI et al., 2004; KOZAREWA et al., 2006; NASCIMENTO, 2003). A germinação das cultivares Luiza e Elisa a 35 °C foi intermediária em relação às outras cultivares, que foram inibidas (termoinibidas) devido à condição de estresse empregada.

Sementes da cultivar Luiza já foram citadas apresentando alta viabilidade e vigor na temperatura de 35 °C (VILLELA et al., 2010).

A germinação de sementes de alface é extremamente dependente da temperatura, e sob condições de altas temperaturas, a germinação da maioria dos genótipos pode ser errática ou completamente inibida (NASCIMENTO, 2003). O mecanismo de ação da germinação em altas temperaturas está relacionado com o enfraquecimento do endosperma, o qual não permite o crescimento do embrião e restringe a protrusão radicular (NASCIMENTO, 2003; SUNG et al., 2008).

Em estudos realizados com alface, Franzin et al. (2004) relatam que a emergência de plântulas pode ser usada na avaliação do potencial fisiológico de sementes. No presente trabalho, esse teste também foi eficiente para diferenciar o vigor das sementes e pode-se observar o vigor mais alto em sementes da cultivar Everglades em ambas as temperaturas em que o teste foi conduzido.

Os índices de velocidade de germinação e de emergência também foram reduzidos quando se aumentou a temperatura para 35 °C. Bertagnolli et al. (2003) e Bufalo et al. (2012) analisando o desempenho de sementes de alface submetidas ao estresse térmico, também concluíram que em temperaturas iguais ou superiores a 25 °C houve redução na velocidade e porcentagem de germinação e a 35 °C ocorreu paralisação da germinação das sementes.

Em sementes cuja germinação é limitada pela presença do endosperma há necessidade do enfraquecimento desse tecido para que haja a protrusão da radícula. Esse papel é desempenhado por várias enzimas a exemplo da endo- β -mananase, que está presente no endosperma em diferentes isoformas, sendo duas dessas, inibidas pelo ácido abscísico na fase de enfraquecimento do endosperma na região próxima à radícula, inibindo o potencial de pressão da radícula (SILVA et al., 2004).

Groot e Karssen (1987), Nonogakii, Matsushima e Morohashi (1992) e Toorop, Van e Hilhorst (2000) avaliando a atividade da endo- β -mananase em sementes de tomate verificaram que o enfraquecimento do endosperma está diretamente ligado ao aumento da atividade dessa enzima.

Dutta, Bradford e Nevins (1997) trabalhando com sementes de alface, afirmam que a endo- β -mananase esta envolvida no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma das sementes quando estas foram germinadas a temperaturas elevadas. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho quando se observa que a maior atividade desta enzima foi nas sementes da cultivar Everglades embebidas a 35 °C, quando comparada com as outras sete cultivares testadas, seguidas das cultivares Elisa e Luisa (Figura 1). A cultivar Hortência foi a que apresentou menor atividade da endo- β -mananase. Nascimento, Cantliffe e Huber (2000) observaram uma maior atividade enzimática nos genótipos termotolerantes comparados com aqueles termosensíveis. Os resultados de maior atividade endo- β -mananase seguem a mesma tendência com os maiores resultados de germinação a 35 °C (Tabela 1), assim como nos resultados observados por Nascimento e Cantliffe (2001). Nascimento, Cantliffe e Huber (2004) verificaram que altas temperaturas induzem a dormência de sementes de alface termosensíveis, o que também foi confirmado neste estudo.

No entanto, quando estas sementes foram embebidas a temperatura de 20 °C foi observado que a atividade desta enzima manteve-se elevada, com relação direta a taxa de germinação nas mesmas condições, para todas as cultivares.

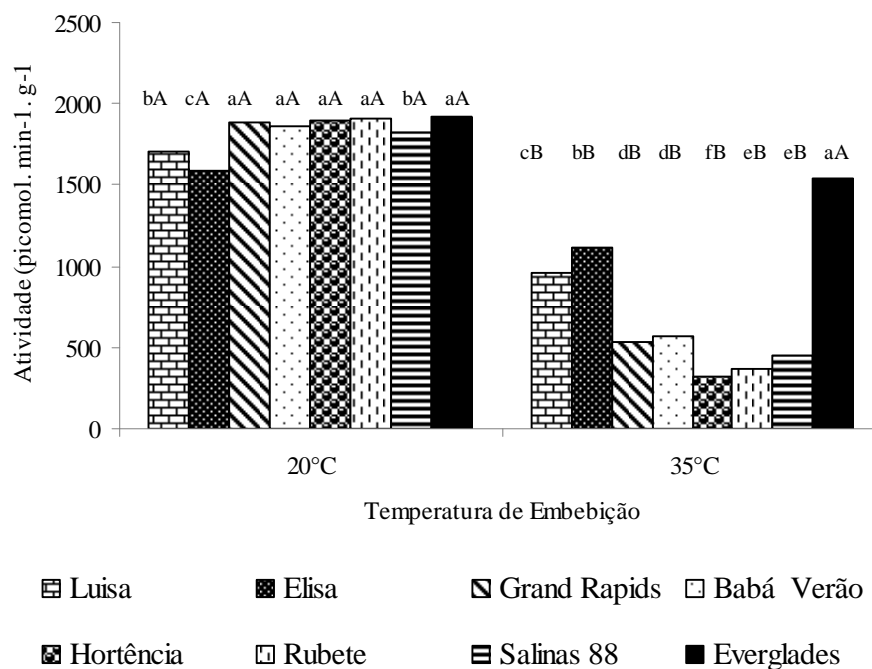


Figura 1- Atividade da enzima endo- β -mananase (picomol. min-1. g-1) em oito cultivares de alface em função da temperatura de embebição (20 e 35 °C).

Proteínas tolerantes ao calor são acumuladas durante os estádios finais da maturação, no momento em que a semente começa a perder água, e que suas propriedades físicas de estabilidade e hidrofobicidade e sua abundância lhe sugerem um importante papel na tolerância a dessecação (BLACK et al., 1999). No entanto, no presente trabalho foi possível observar que a temperatura do ambiente a qual a semente se encontra submetida durante o processo de embebição pode também alterar a expressão destas proteínas (Figura 3).

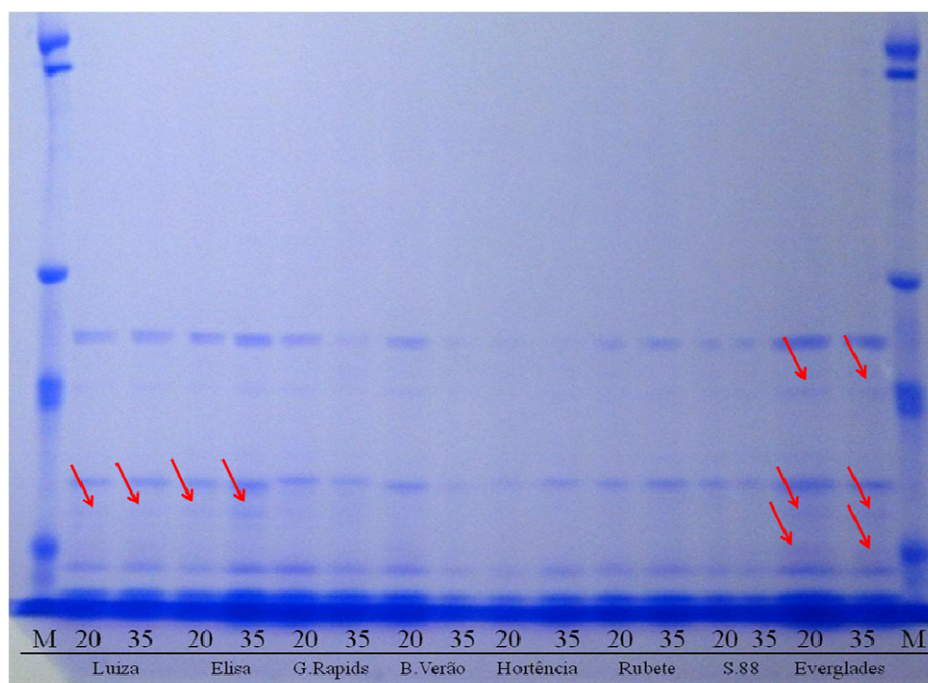


Figura 3- Perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor extraídas de sementes de oito cultivares de alface em função da temperatura (20 e 35 °C).

Primeiramente descobertas em embriões de algodão, as proteínas resistentes ao calor foram detectadas em várias outras espécies, como ervilha, soja, colza, cenoura, mamona, arabdopsis, beterraba (BLACKMAN; OBENDORF; LEOPOLD, 1995; CAPRON et al., 2000; KOORNNEEF et al., 1989), em estádios tolerantes à dessecação, durante o desenvolvimento das sementes ou após o início de embebição.

Foi possível observar também a presença de bandas específicas quando as sementes foram embebidas a temperatura de , com destaque a cultivar Everglades que, além de apresentar bandas específicas tanto a 20 como a , também apresentou maior quantidade destas proteínas, tendo relação direta, tanto com a germinação a alta temperatura como também a maior atividade da

enzima endo- β -mananase, podendo assim caracterizar este material como termotolerante, quando comparado às demais cultivares testadas. Ressalta-se ainda, que proteínas resistentes ao calor estão associadas com a tolerância à dessecação em sementes sob altas temperaturas (BLACKMAN et al., 1991; KIGEL; GALILI, 1995).

Nessa perspectiva a cultivar Everglades torna-se importante para utilização em programas de melhoramento de alface para obtenção de cultivares de melhor qualidade quanto à germinação em regiões tropicais e subtropicais.

4 CONCLUSÕES

A tolerância de sementes de alface de germinar sob altas temperaturas estão associadas com proteínas tolerantes ao calor e com a atividade da enzima endo- β -mananase.

A maior germinação é observada na cultivar Everglades em temperatura de 35 °C, portanto considerada como termotolerante.

Os padrões de proteínas tolerantes ao calor em sementes de alface apresentam bandas específicas na cultivar Everglades na temperatura de 35 °C.

A atividade da enzima endo- β -mananase é maior na cultivar Everglades na temperatura de 35 °C.

As cultivares Luiza e Elisa são intermediárias quanto à tolerância a altas temperaturas de germinação.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- BARBOSA, R. M.; COSTA, D. S.; SÁ, M. E. Envelhecimento acelerado em sementes de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1899-1902, nov. 2011.
- BERTAGNOLLI, C. M. et al. Desempenho de sementes nuas e peletizadas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a estresses hídrico e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 7-13, 2003.
- BLACK, M. et al. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 120, n. 22, p. 463-471, June 1999.
- BLACKMAN, S. A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, n. 3, p. 868-874, July 1991.
- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 630-638, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 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.
- CAPRON, I. et al. Sugarbeet seed priming: effects of priming conditions on germination, solubilization of 11-S globulin and accumulation of LEA proteins. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 243-254, 2000.
- DIAS, M.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 152-158, 2008.

DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- α -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, New York, v. 36, n. 1, p. 829-835, 1994.

DUTTA, S.; BRADFORD, K. J.; NEVINS, D. J. Cell-wall autohydrolysis in isolated endosperms of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 2, p. 623-628, 1994.

DUTTA, S.; BRADFORD, K. J.; NEVINS, D. J. Endo- β -mannanase present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 1, p. 155-161, Jan. 1997.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**. Versão 4.2. Lavras: UFLA, 2000. Software.

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.

FRANZIN, S. M. et al. Métodos para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 63-69, dez. 2004.

GONAI, T. et al. Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 394, p. 111-118, 2004.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberelin-deficient mutants. **Planta**, Berlin, v. 171, p. 525-531, 1987.

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.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. 853 p.

KOORNNEEF, M. et al. In vivo inhibition of seed development and protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 2, p. 463-469, 1989.

KOZAREWA, I. et al. High maturation temperature of lettuce seeds during development increased ethylene production and germination at elevated temperatures. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 564-570, Feb. 2006.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.

MENEZES, N. L. et al. 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. Preventing thermoinhibition in a thermosensitive lettuce genotype by seed imbibition at low temperature. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 477-480, 2003.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J. Composição química do endosperma, atividade enzimática e sua associação com a germinação das sementes de alface em altas temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 121-126, 2001.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Ethylene evolution and endo- β -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.; HUBER, D. J. Thermotolerance in lettuce seeds: association with ethylene and endo- β -mannanase. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, n. 4, p. 518-524, 2000.

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

NONOGAKI, H.; MATSUSHIMA, H.; MOROHASHI, Y. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 167-172, June 1992.

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

SUNG, Y. et al. 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.

TOOROP, P. E.; VAN, A. A. C.; HILHORST, H. W. M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germinations is under control of ABA. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1371-1379, Aug. 2000.

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

VILLELA, R. P. et al. Produção e desempenho de sementes de cultivares de alface em duas épocas de plantio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 158-169, 2010.

CAPÍTULO 3 Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de alface durante o armazenamento em diferentes temperaturas

RESUMO

A dormência é um processo que ainda não é completamente compreendido em sementes de alface. Alterações fisiológicas e enzimáticas ocorrem durante a germinação das sementes em altas temperaturas. Não se sabe, se a dormência também pode ser adquirida durante o armazenamento em temperaturas elevadas, assim como acontecem na germinação. Com isso, objetivou-se verificar a influência dos períodos e dos ambientes de armazenamento na qualidade e dormência de sementes de diferentes cultivares de alface, bem como alterações na atividade enzimática. Foram utilizadas sementes de oito cultivares de alface das quais se avaliou a qualidade fisiológica em diferentes períodos e ambientes de armazenamento, esquema fatorial 4x8x3 em delineamento experimental inteiramente casualizado. A atividade enzimática foi avaliada pela expressão das enzimas esterase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, superóxido desmutase, catalase e endo- β -mananase. Verificou-se que o período de armazenamento até os seis meses mantém a viabilidade e vigor de sementes de alface, quando armazenadas na temperatura de 15 °C. As sementes armazenadas em ambientes com temperatura superior a 25 °C não toleram ao armazenamento a partir de 60 dias o que compromete a germinação e o vigor. A cultivar Everglades é tolerante a condição de germinação a 35 °C e mantém sua qualidade ao longo do armazenamento em temperatura 15 °C. A temperatura acima de 25 °C induz à termodormência das sementes nas cultivares de alface durante o armazenamento. Ocorrem alterações enzimáticas nas sementes armazenadas em temperatura de 35 °C devido à dormência.

Palavras-chave: Armazenamento. Temperatura. Termotolerância. Atividade enzimática.

ABSTRACT

Dormancy is a process that is not yet fully understood in lettuce seeds. Physiological and enzymatic changes occur during seed germination at high temperatures. It is not known if the dormancy may also be acquired during storage at elevated temperatures as occur in germination. Thus, the objective was to verify the influence of periods and storage environments in quality and dormancy of different lettuce cultivars, as well as changes in enzyme activity. Eight seeds of lettuce cultivars which evaluated the physiological quality in different periods and storage environments, 4x8x3 factorial in a completely randomized design were used. The enzymatic activity was assessed by the expression of esterase enzymes, alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, superoxide dismutase, catalase, endo- β -mannanase. It was found that the storage period up to six months maintains the viability and vigor of seeds of lettuce, when stored at a temperature of 15 °C. The seeds stored in ambient temperatures exceeding 25 °C not tolerate storage from 60 days which compromises the germination and vigor. The Everglades is tolerant cultivar condition of germination at 35 °C and maintains its quality during storage at temperature 15 °C. The temperature of above 25 °C induces thermodormancy seeds of lettuce cultivars during storage. Enzymatic changes occur in seeds stored at a temperature of 35 °C due to dormancy.

Keywords: Storage. Temperature. Thermal tolerance. Enzymatic activities.

1 INTRODUÇÃO

A alface é a hortaliça folhosa mais importante na dieta do povo brasileiro, consumida principalmente na forma de salada (NASCIMENTO; CRODA; LOPES, 2012). Estima-se uma área cultivada de cerca de 50 mil hectares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMERCIO DE SEMENTES E MUDAS - ABCSEM, 2010) realizada durante todo o ano, em diferentes regiões e em diferentes condições edafoclimáticas (NASCIMENTO; PEREIRA, 2007). Sabe-se que temperaturas elevadas tem grande influência na germinação de sementes de alface podendo ocasionar dormência nas mesmas. No entanto, a dormência não é ainda um processo bem elucidado e não se sabe se ela também é adquirida durante o armazenamento em temperaturas elevadas. As condições ambientais de armazenamento como temperatura do ar e umidade relativa são fatores preponderantes para a conservação das sementes até a semeadura (CARVALHO; PINHO, 2000).

Os produtores de alface após realizarem a semeadura, armazenam as embalagens contendo o restante das sementes em locais não apropriados, onde normalmente a temperatura do ambiente é elevada, verificando posteriormente, por ocasião da próxima semeadura que a qualidade das sementes foi comprometida.

A elevação da temperatura além de provocar a dormência em sementes de alface, acelera também as reações químicas e intensifica os processos metabólicos. Por consequência desses eventos metabólicos a respiração da semente é maior o que proporciona aumento da velocidade de deterioração. No processo de deterioração das sementes, um dos primeiros eventos de degradação é a perda da permeabilidade de membrana. Esta perde sua seletividade e, as enzimas e proteínas tornam-se menos eficientes nas atividades catalíticas (SMITH; BERJAK, 1995).

Algumas destas enzimas e proteínas podem ser usadas para medir a qualidade das sementes (vigor), mesmo quando há queda de reservas durante o armazenamento em altas temperaturas (MARCOS FILHO, 2005). Assim, o conhecimento da qualidade fisiológica e bioquímica das sementes pode esclarecer, se a dormência em sementes de alface pode ser adquirida durante o armazenamento. Logo, objetivou-se verificar a influência do período e do ambiente de armazenamento na qualidade fisiológica, bioquímica e dormência de sementes de diferentes cultivares de alface.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em área experimental no município de Ijaci – MG e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

O processo de produção de sementes de alface foi conduzido no município de Ijaci – MG entre os meses de outubro de 2011 e fevereiro de 2012, em área da Fazenda Palmital, localizado na latitude: 21° 9'24" Sul, longitude 44° 55' 34" Oeste, onde o solo é classificado como latossolo vermelho de textura argilosa.

Inicialmente, realizou-se a produção de mudas de diferentes cultivares, sendo lisa (Everglades, Babá de Verão, Elisa e Luiza), crespa (Grand Rapids e Hortência) e americana (Salinas 88 e Rubete) semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Multiplant®-hortaliças, sendo que em cada célula foram colocadas três sementes de cada cultivar. Após sete dias realizou-se desbaste deixando somente uma planta, que aos 21 dias foi transplantada para canteiros em área sob cultivo protegido.

O preparo do solo foi feito mediante gradagem e levantamento de canteiros com rotoencanteiradora, onde foram incorporados fertilizantes

seguinte as normas da 5ª aproximação para a cultura da alface. Adubações complementares via fertirrigação foram realizadas no período reprodutivo da cultura. Foi utilizado o espaçamento de 0,4 metros entre plantas por 0,6 metros entre linhas, com seis plantas por parcela. Cada parcela tinha uma área de 7,2 m², seguindo o delineamento em blocos casualizados com três repetições. Foram feitos desbastes de folhas velhas após o início do pendoamento, assim como o tutoramento das plantas. Durante o processo de produção de sementes a temperatura média máxima e mínima do ar medida a um metro e meio do solo foi respectivamente 45,6 e 31,2 °C. A medição da temperatura foi feita utilizando termômetro de máximas e mínimas mediante um sensor colocado junto a este.

As sementes de cada planta da mesma cultivar foram colhidas individualmente dentro de cada bloco e depois misturadas homogeneamente compondo um único lote de sementes. Posteriormente, as sementes foram previamente tratadas com fungicida de princípio ativo Carboxin antes do armazenamento. O produto foi aplicado manualmente às sementes, contidas em sacos plásticos de composição química neutra, com agitação até completa distribuição dos mesmos.

Posteriormente, as sementes de cada uma das oito cultivares de alface foram submetidas à homogeneização, acondicionadas em embalagens individuais de papel *Kraft* e armazenadas em câmaras do tipo BOD por um período de tempo de 30, 60, 90 e 120 dias nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C. As sementes das diferentes cultivares após a colheita foram submetidas à determinação do teor de água, avaliação da qualidade fisiológica e bioquímica.

Em cada período de armazenamento foram realizadas as seguintes análises:

Teor de água das sementes: foi determinado pelo método de estufa a 105 °C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras para cada tratamento,

conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Teste de germinação: a semeadura foi realizada sobre duas folhas de papel filtro para germinação, umedecidas com água, na proporção de 2,5 vezes o peso do substrato seco, em caixas plásticas tipo gerbox. As caixas com sementes foram mantidas em germinadores em regime alternado de luz e temperatura, 12 horas no escuro e 12 horas na presença de luz, e mantidas a temperatura de 20 e de 35 °C. Aos 4 e 7 dias, procedeu-se à avaliação das plântulas, segundo Brasil (2009). Cada tratamento foi composto de quatro subamostras de 50 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Teste de tetrazólio: foi realizado com as sementes remanescentes (sementes que não germinaram) do teste de germinação, sendo retirados os tegumentos e os embriões submetidos ao teste. A coloração foi realizada em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, em concentração de aproximadamente 1%, durante 3 horas no escuro, a 30 °C. Após este período, e verificado a coloração, os embriões foram lavados em água corrente e mantidos submersos em água até sua avaliação, quando foram analisados individualmente para verificar a viabilidade. A interpretação foi realizada com auxílio de lupa com iluminação fluorescente, de acordo com as RAS (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem de sementes viáveis.

Teste de emergência: foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes distribuídas em bandejas multicelulares de poliestireno com células separadas, contendo substrato comercial tipo Multiplant®-hortaliça. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação dotada de sistema de nebulização intermitente. Foram realizadas avaliações diárias a partir do início da emergência das plântulas, computando-se o número de plântulas emersas até a estabilização do estande.

Índice de velocidade de germinação e de emergência: para o cálculo do índice de velocidade de germinação e de emergência as avaliações foram realizadas simultaneamente aos testes de germinação e de emergência, computando-se, diariamente e sempre nos mesmos horários, o número de plântulas que apresentavam dois folíolos completamente abertos. Os cálculos dos índices foram realizados de acordo com formula proposta por Maguire (1962).

Avaliação da expressão das enzimas esterase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, superóxido desmutase e catalase: duas amostras de 20 gramas de sementes de cada tratamento foram armazenadas à temperatura de -86 °C em *deep freezer* e as análises realizadas por meio da técnica de eletroforese. As sementes foram trituradas em cadinho, na presença de PVP e nitrogênio líquido, sendo armazenado à temperatura de -86 °C. Para a extração das enzimas, foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2 M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250 µL por 100 mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido *overnight*, em geladeira, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador), sendo utilizado o sistema gel/eletrodo Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 120 V por 5 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas esterase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e catalase, conforme Alfenas (2006).

Análise da enzima endo-β-mananase: as sementes de alface de cada tratamento foram colocadas para embeber em caixas plásticas sobre papel mata-borrão, umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As sementes foram mantidas em germinador a 20 °C,

durante 24 horas e após a embebição, 150 sementes de cada cultivar foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido e PVP. Em cada microtubo com 100 mg de pó de cada amostra foram adicionados 300 µL de tampão de extração (0,1 M Hepes/ 0,5 M NaCl e ácido ascórbico (5 mg de ácido ascórbico por mL de tampão), pH 8,0). Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 30 minutos a 14000 rpm e 2 µL do sobrenadante foram aplicados em gel contendo 6 mL de LBG (Locust Bean Gum), 0,24 g de agarose e 24 mL de tampão pH 5,0 (1 M Ácido Cítrico/ 0,4 M de Na₂HPO₄ 2 H₂O). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador. O gel foi incubado por 21 h e revelado segundo metodologia proposta de Silva et al. (2004). A atividade da enzima endo-β-mananase foi calculada de acordo com Downie, Hilhorst e Bewley (1994).

Delineamento experimental: nos testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes de alface utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x8x3, cujos fatores foram quatro períodos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias), oito cultivares de alface e três ambientes de armazenamento. Análises de variância foram realizadas utilizando-se o programa estatístico *Sisvar*® (FERREIRA, 2000). Para a comparação entre as médias, empregou-se o teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade para variáveis qualitativas. Para variáveis quantitativas empregou-se análise de regressão. A avaliação dos padrões enzimáticos foi feita de acordo com a intensidade das bandas, utilizando-se um transiluminador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água das sementes, após a secagem variaram de 5,6 a 6,1%, percentuais também relatados por Barbosa, Costa e Sá (2011) em diferentes lotes de sementes de alface. Com base na análise de variância observaram-se

diferenças significativas entre as cultivares, períodos de armazenamento e ambientes de armazenamento, assim como para a interação entre os fatores ($p < 0,05$) (Tabela 2A). As equações de regressão e os coeficientes de determinação (R^2) podem ser observados na Tabela 3A. Os valores médios de germinação (%) a 20 °C nas sementes de cultivares de alface armazenada em diferentes ambientes podem ser verificados na Tabela 1.

Na germinação a 20 °C (Tabela 1), independentemente do período de armazenamento, o ambiente de 15 °C conservou a qualidade das sementes de todas as cultivares. De acordo com Nascimento et al. (2006) para sementes armazenadas em câmara fria, a germinação não sofre influência de determinados fatores, o que contribui para reduzir a velocidade dos processos deteriorativos. Já para as sementes armazenadas a 25 °C, verificou-se que a partir dos 60 dias de armazenamento a qualidade das sementes foi comprometida, exceto das cultivares Everglades, Luiza e Babá de Verão, que apresentaram as maiores porcentagens de germinação com valores acima de 80%, valor este considerado mínimo para comercialização de sementes desta espécie (BRASIL, 1986). Contudo aos 120 dias de armazenamento a 25 °C, ocorreu decréscimo da germinação da cultivar Babá de Verão reduzindo sua viabilidade para 51%. Sendo assim, apenas as cultivares Everglades e Luiza atendem aos padrões mínimos para a comercialização (Tabela 1; Figura 1) quando armazenadas nesta temperatura por 120 dias.

Já com o aumento da temperatura de armazenamento, de 25 para 35 °C, houve interferência na viabilidade das sementes de todas as cultivares de alface, exceto para a cultivar Everglades (Tabela 1). Para Martins e Lago (2008) a alta temperatura de armazenamento tem grande influência na conservação da semente, influenciando as reações bioquímicas que regulam seu metabolismo.

Tabela 1- Percentuais médios de germinação a 20°C de sementes de alface armazenadas em diferentes temperaturas.

| Cultivares | Períodos de armazenamento (dias) | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 30 | | | 60 | | | 90 | | | 120 | | |
| | Temperaturas de armazenamento (°C) | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 |
| Luiza | 94 Ba | 94Ba | 81Cb | 91Ba | 89Ba | 80Bb | 91Ba | 86Bb | 75Bc | 90Ba | 82Ab | 69Bc |
| Elisa | 84Ca | 82Ca | 76Db | 84Ca | 75Db | 68Cc | 80Ca | 76Ca | 63Cb | 81Ca | 70Bb | 59Cc |
| G. Rapids | 96Aa | 92Ba | 70Eb | 95Aa | 73Db | 53Ec | 90Ba | 51Eb | 28Ec | 88Ba | 42Db | 15Ec |
| B. Verão | 96Aa | 93Ba | 70Eb | 95Aa | 83Cb | 60Dc | 89Ba | 80Cb | 60Cc | 90Ba | 51Cb | 32Dc |
| Hortência | 97Aa | 94Ba | 88Bb | 94Aa | 76Db | 62Dc | 91Ba | 63Db | 50Dc | 88Ba | 22Eb | 11Fc |
| Rubete | 98Aa | 78Cb | 60Fc | 96Aa | 64Eb | 44Fc | 94Aa | 51Eb | 21Fc | 91Ba | 19Eb | 9Fc |
| Salinas 88 | 92Ba | 89Ba | 70Eb | 88Ba | 59Fb | 44Fc | 89Ba | 51Eb | 18Fc | 85Ca | 17Eb | 12Fc |
| Everglades | 99Aa | 100Aa | 99Aa | 98Aa | 99Aa | 99Aa | 96Aa | 92Ab | 90Ab | 97Aa | 83Ab | 84Ab |
| CV | | | | | | | | | | | | 3,89 |

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

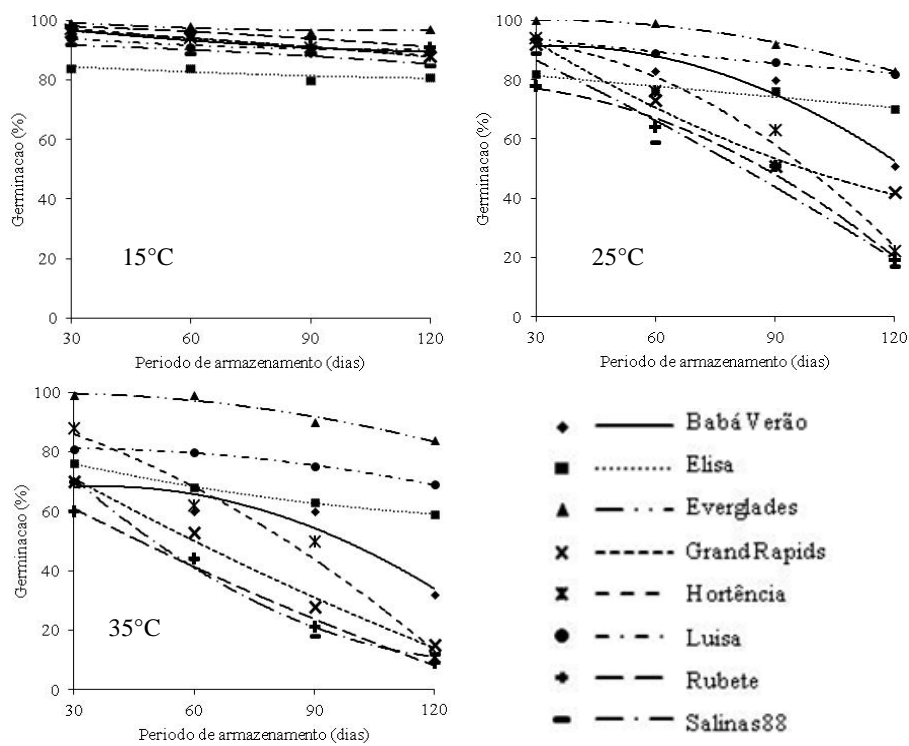


Figura 1 Porcentagem de germinação a 20 °C de sementes de oito cultivares de alface em função dos ambientes (15, 25 e 35°C) e dos períodos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias).

Como pode ser observado, a temperatura alta do ambiente de armazenamento apresentou grande influência sobre a germinação já aos 30 dias, sendo que apenas as cultivares Everglades, Luiza e Hortência mantiveram a qualidade nestas condições de armazenamento (Tabela 1; Figura 1). Contudo, após 60 dias de armazenamento a cultivar Hortência passa a não tolerar o ambiente de 35 °C e para a cultivar Luiza a partir dos 90 dias de armazenamento. Verificando então que somente a cultivar Everglades, após 90 dias de armazenamento, atende aos padrões mínimos de comercialização, com 84% de germinação a 20 °C.

Nascimento, Croda e Lopes (2012) também relataram que poucos genótipos de alface atendiam aos padrões mínimos de comercialização quando a germinação era efetuada em temperatura elevada. De acordo com o este autor, estes padrões foram de 98%, 93% e 82% para as cultivares Vitória de Verão, Camila e Vitória Verdinha, respectivamente.

O ambiente de armazenamento em temperatura elevada contribuiu para a redução da germinação das sementes da maioria das cultivares, principalmente em Hortência, Rubete e Salinas 88 que apresentaram as menores porcentagens de germinação (Tabela 1; Figura 1). Percebe-se que estas cultivares tiveram germinação inibidas (termoinibição), pois quando seu armazenamento foi em ambiente mais ameno (15 °C) sua viabilidade foi mantida.

Observou-se na Tabela 2, germinação a 35 °C, que as cultivares Grand Rapids, Hortência, Babá de Verão, Rubete e Salinas 88 apresentaram porcentagem de germinação igual ou próxima à zero ao longo de todo o período de armazenamento mesmo quando estas foram armazenadas em ambiente ameno (15 °C) (Figura 2). Cultivares termosensíveis apresentam maior quantidade de manose e galactose na parede celular, isso causa enrijecimento do endosperma e impede da protrusão radicular (NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2001).

Tabela 2 - Percentuais médios de germinação a 35°C de sementes de alface armazenadas em diferentes temperaturas.

| Cultivares | Períodos de armazenamento (dias) | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | 30 | | | 60 | | | 90 | | | 120 | | |
| | Temperaturas de armazenamento (°C) | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 |
| Luiza | 22Ba | 16Bb | 11Bc | 22Ba | 12Bb | 7Bc | 18Ba | 3Bb | 1Bb | 19Ba | 1Bb | 0Bb |
| Elisa | 23Ba | 17Bb | 9Cc | 19Ca | 11Bb | 8Bc | 18Ba | 5Bb | 0Bc | 18Ba | 1Bb | 0Bb |
| G. Rapids | 3Da | 1Da | 0Da | 1Da | 1Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba |
| B. Verão | 7Ca | 3Cb | 1Dc | 2Da | 1Ca | 0Ca | 2Ca | 0Ca | 0Ba | 1Ca | 0Ba | 0Ba |
| Hortência | 0Ea | 0Ea | 0Da | 2Da | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba |
| Rubete | 0Ea | 0Ea | 0Da | 0Da | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba |
| Salinas 88 | 0Ea | 0Ea | 0Da | 0Da | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba |
| Everglades | 74Aa | 67Ab | 40Ac | 72Aa | 63Ab | 39Ac | 73Aa | 55Ab | 35Ac | 68Aa | 40Ab | 33Ac |
| CV | | | | | | | | | | | | 16,86 |

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

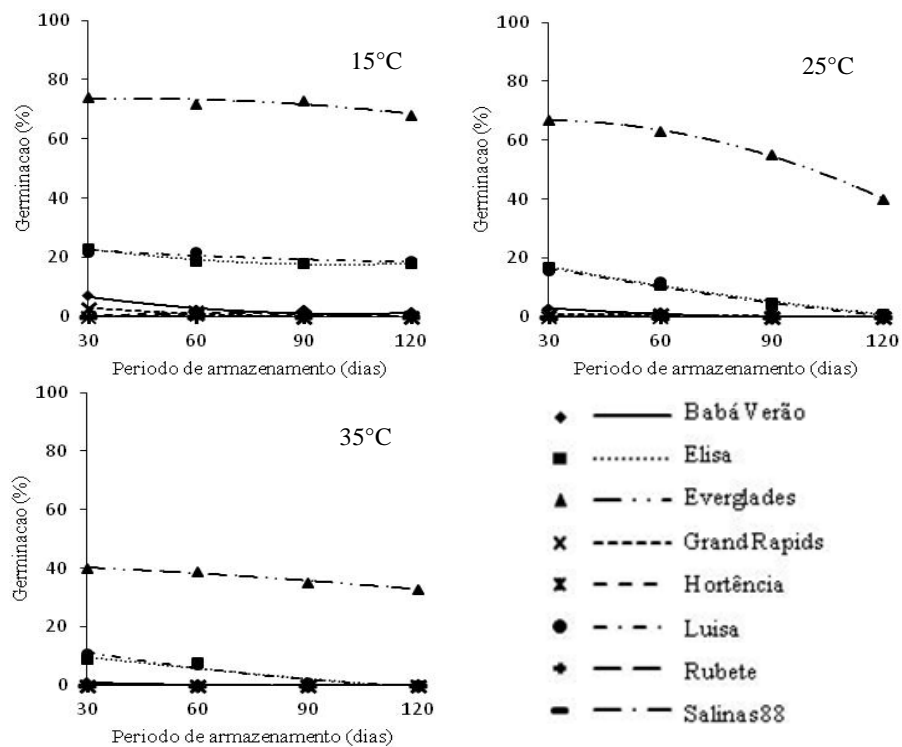


Figura 2 Porcentagem de germinação a 35 °C de sementes de oito cultivares de alface em função dos ambientes (15, 25 e 35°C) e dos períodos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias).

A temperatura de germinação a 35 °C auxilia na identificação de cultivares termotolerantes, a exemplo da cultivar Everglades (KOZAREWA et al., 2006; NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2001). Observa-se que as sementes dessa cultivar apresentaram porcentagem de germinação superior a 30% mesmo quando foram armazenadas a 35 °C (Tabela 2), enquanto das outras cultivares foi zero ou próximo a zero. Verificou-se ainda que a cultivar Everglades manteve a porcentagem de germinação ao longo do armazenamento em todos os ambientes (Figura 2).

Ressalta-se também que a germinação das sementes da cultivar Everglades, decresceu de 74% de germinação para 68% ao longo do armazenamento, indicando a superioridade dessas sementes em tolerar condições adversas (Tabela 2), como também foi constatado por outros trabalhos (GONAI, 2004; KOZAREWA et al., 2006; NASCIMENTO, 2003). Isso indica que esta cultivar pode ser de grande importância para utilização em programas de melhoramento de alface.

De acordo com a Tabela 3, o índice de velocidade de germinação aos 20 °C foi influenciado pelo período e ambiente de armazenamento. À medida que a temperatura do ambiente aumentou de 15 para 35 °C ocorreu decréscimo na velocidade de germinação em cultivares mais suscetíveis (Tabela 3) o que corrobora com o trabalho de Villela et al. (2010). Porém, nas cultivares Everglades, Luiza e Elisa o índice de velocidade de germinação foi mantido ao longo do período de armazenamento (Figura 3).

Tabela 3 - Índices médios de velocidade de germinação a 20°C de sementes de alface armazenadas em diferentes temperaturas.

| Cultivares | Períodos de armazenamento (dias) | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 30 | | | 60 | | | 90 | | | 120 | | |
| | Temperaturas de armazenamento (°C) | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 |
| Luiza | 39,7Ca | 25,2Da | 39,6Cb | 44,5Aa | 30,1Cb | 39,1Bc | 44,5Aa | 29,7Cb | 37,0Ac | 44,2Ba | 29,0Bb | 31,4Bb |
| Elisa | 37,2Ca | 37,6Ca | 37,6Da | 23,1Db | 34,0Ba | 32,3Ca | 22,7Da | 34,Bb | 29,9Bc | 39,3Ca | 28,5Bb | 25,5Cb |
| G. Rapids | 48,0Aa | 45,2Ba | 34,7Eb | 36,1Ca | 31,2Cb | 23,0Ec | 34,2Ca | 19,7b | 7,4Dc | 23,9Da | 18,6Cb | 4,9Dc |
| B. Verão | 42,7Ba | 37,6Cb | 30,5Fc | 42,1Ba | 34,7Bb | 28,4Dc | 32,4Ca | 22,4Db | 21,5Cb | 43,7Ba | 17,1Cb | 11,1Dc |
| Hortência | 46,9Aa | 44,9Ba | 43,2Ba | 40,9Ba | 37,2Bb | 28,3Dc | 34,1Ca | 30,6Cb | 19,9Cc | 40,8Ca | 10,6Db | 3,7Dc |
| Rubete | 48,4Aa | 37,9Cb | 29,7Fc | 47,4Aa | 24,7Db | 21,3Ec | 34,8Ca | 22,6Db | 8,9Dc | 43,3Ba | 5,8Eb | 3,2b |
| Salinas 88 | 41,3Ba | 38,4Ca | 34,0Eb | 37,8Ca | 28,2Cb | 21,4Ec | 33,2Ca | 22,1Db | 7,8Dc | 38,0Ca | 6,4Eb | 4,4Db |
| Everglades | 48,7Aa | 48,6Aa | 48,7Aa | 41,9Bb | 46,8Aa | 42,3Ab | 37,6Ab | 45,0Aa | 39,9Ab | 47,5Aa | 39,8Ab | 40,2Ab |
| CV | | | | | | | | | | | | 7,03 |

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

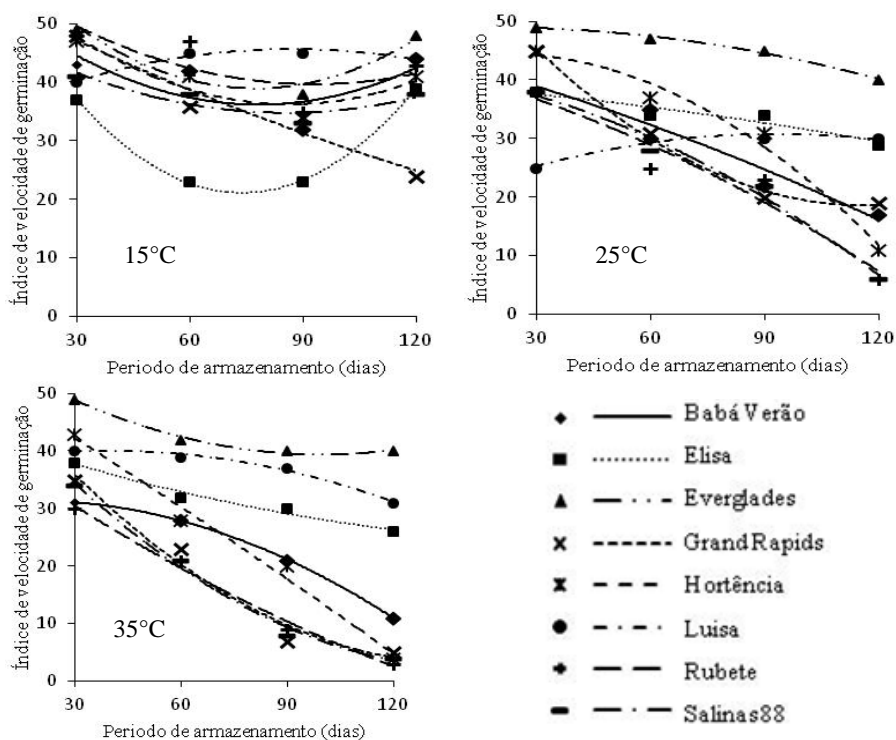


Figura 3 Índice de velocidade de germinação a 20 °C de sementes de oito cultivares de alface em função dos ambientes (15, 25 e 35°C) e dos períodos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias).

Já para o índice de velocidade de germinação a 35 °C (Tabela 4) houve redução acentuada no vigor das sementes, o que indica que a temperatura de germinação das sementes contribuiu para causar termodormência nas sementes de alface. Mesmo em Everglades (termotolerante) a temperatura do ambiente de armazenamento contribuiu dentro de cada período para reduzir seu vigor (Figura 4). As demais cultivares de alface apresentaram redução no vigor, independentemente do período e ambiente em que foram armazenadas, com maiores reduções ao final do armazenamento, em ambientes de 25 e 35 °C (Figura 4).

Tabela 4 - Índices médios de velocidade de germinação a 35°C de sementes de alface armazenadas em diferentes temperaturas.

| Cultivares | Períodos de armazenamento (dias) | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| | 30 | | | 60 | | | 90 | | | 120 | | |
| | Temperaturas de armazenamento (°C) | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 |
| Luiza | 3,3Bb | 2,3Bc | 4,8Ba | 2,2Ba | 1,1Bb | 0,7Bb | 1,5Ba | 0,2Bb | 0,1Bb | 1,9Bb | 0,1Ba | 0Ba |
| Elisa | 2,1Ca | 1,5Ba | 0,9Cb | 1,7Ba | 1,1Ba | 0,8Ba | 1,7Ba | 0,5Bb | 0Bb | 1,5Ba | 0,1Bb | 0Bb |
| G. Rapids | 0,2Da | 0,1Ca | 0Ca | 0,2Ca | 0,1Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba | 0Cb | 0Bb | 0Bb |
| B. Verão | 0,7Da | 0,3Ca | 0,1Ca | 0,2Ca | 0Ca | 0Ba | 0,2Ca | 0Ba | 0Ba | 0,1Cb | 0Bb | 0Bb |
| Hortência | 0Da | 0Ca | 0Ca | 0,3Ca | 0Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba | 0Cb | 0Bb | 0Bb |
| Rubete | 0Da | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba | 0Cb | 0Bb | 0Bb |
| Salinas 88 | 0Da | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ca | 0Ba | 0Ca | 0Ba | 0Ba | 0Cb | 0Bb | 0Bb |
| Everglades | 22,4Aa | 19,3Ab | 9,1Ab | 22,2Aa | 18,7Ab | 12,9Ac | 18,3Aa | 14,4Ab | 4,1Ac | 12,3Aa | 10,7Ab | 10,1Ab |
| CV | | | | | | | | | | | | 27,35 |

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

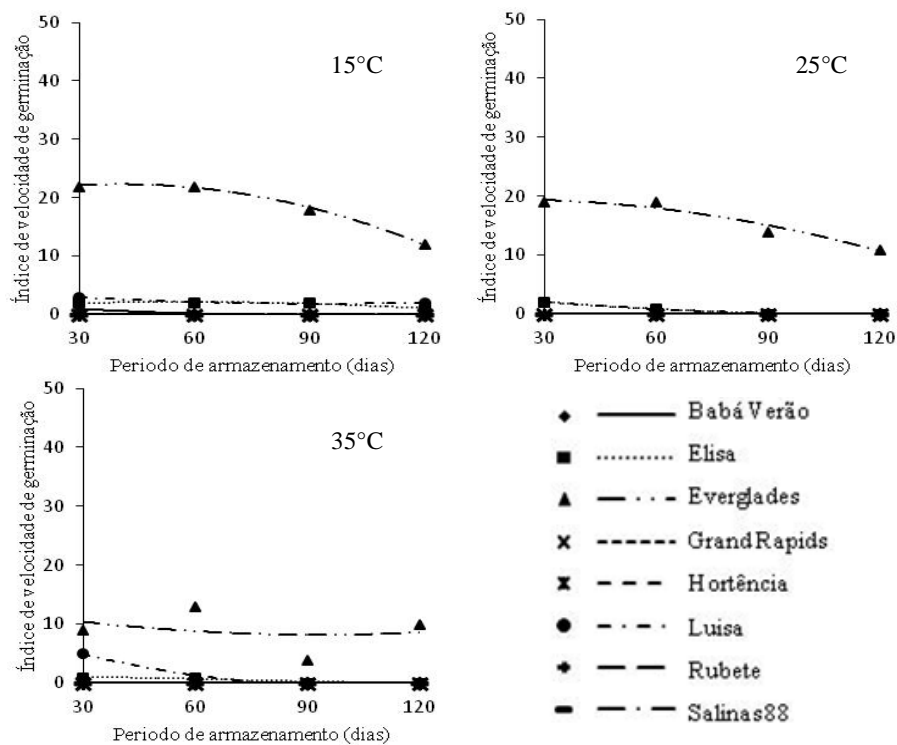


Figura 4 Índice de velocidade de germinação a 35 °C de sementes de oito cultivares de alface em função dos ambientes (15, 25 e 35°C) e dos períodos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias).

Ao longo dessa discussão foram citadas inúmeras vezes que a temperatura da germinação, do ambiente, assim como os períodos mais longos de armazenamento comprometeram a qualidade das sementes de alface, reduzindo assim sua viabilidade. Para Harrington (1972) a cada 5,5 graus de decréscimo na temperatura, aumenta-se o dobro o potencial de armazenamento. Tal afirmativa se justifica ao analisar o teste de tetrazólio nas sementes remanescentes do teste de germinação a 20 e 35 °C (Tabelas 5 e 6), respectivamente.

Tabela 5 - Porcentagem de sementes viáveis (V) e mortas (M) pelo teste de tetrazólio em sementes remanescentes do teste de germinação (N) a 20°C de sementes de alface armazenadas em diferentes temperaturas.

| Cult. | A (°C) | 30 | | | N | 60 | | | N | 90 | | | N | 120 | | |
|---------------|-----------|----|----|-----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|---|---|
| | | N | V | M | | N | V | M | | N | V | M | | N | V | M |
| Luiza | 15 | 12 | 25 | 75 | 18 | 22 | 78 | 18 | 39 | 61 | 20 | 30 | 70 | | | |
| Elisa | 15 | 32 | 31 | 69 | 32 | 19 | 81 | 40 | 13 | 88 | 38 | 42 | 58 | | | |
| G. R. | 15 | 8 | 0 | 100 | 10 | 40 | 60 | 20 | 45 | 55 | 24 | 38 | 63 | | | |
| B. V. | 15 | 8 | 38 | 63 | 10 | 30 | 70 | 22 | 41 | 59 | 20 | 35 | 65 | | | |
| Hort. | 15 | 6 | 0 | 100 | 12 | 33 | 67 | 18 | 39 | 61 | 24 | 38 | 63 | | | |
| Rub. | 15 | 4 | 25 | 75 | 8 | 13 | 88 | 12 | 33 | 67 | 18 | 39 | 61 | | | |
| Sali. | 15 | 16 | 25 | 75 | 24 | 42 | 58 | 22 | 36 | 64 | 30 | 43 | 57 | | | |
| Everg. | 15 | 2 | 0 | 100 | 4 | 25 | 75 | 8 | 25 | 75 | 6 | 33 | 67 | | | |
| Luiza | 25 | 12 | 58 | 42 | 26 | 73 | 27 | 28 | 61 | 39 | 36 | 67 | 33 | | | |
| Elisa | 25 | 36 | 69 | 31 | 50 | 64 | 36 | 48 | 65 | 35 | 60 | 60 | 40 | | | |
| G. R. | 25 | 16 | 81 | 19 | 54 | 83 | 17 | 98 | 73 | 27 | 116 | 68 | 32 | | | |
| B. V. | 25 | 14 | 79 | 21 | 34 | 56 | 44 | 40 | 58 | 43 | 98 | 64 | 36 | | | |
| Hort. | 25 | 12 | 75 | 25 | 48 | 58 | 42 | 74 | 61 | 39 | 156 | 62 | 38 | | | |
| Rub. | 25 | 44 | 59 | 41 | 72 | 61 | 39 | 98 | 77 | 23 | 162 | 64 | 36 | | | |
| Sali. | 25 | 22 | 64 | 36 | 82 | 70 | 30 | 98 | 66 | 34 | 166 | 61 | 39 | | | |
| Everg. | 25 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100 | 0 | 16 | 75 | 25 | 34 | 65 | 35 | | | |
| Luiza | 35 | 38 | 61 | 39 | 40 | 63 | 38 | 50 | 76 | 24 | 62 | 66 | 34 | | | |
| Elisa | 35 | 48 | 58 | 42 | 64 | 69 | 31 | 74 | 76 | 24 | 82 | 57 | 43 | | | |
| G. R. | 35 | 60 | 82 | 18 | 94 | 82 | 18 | 144 | 83 | 17 | 170 | 77 | 23 | | | |
| B. V. | 35 | 60 | 88 | 12 | 80 | 76 | 24 | 80 | 61 | 39 | 136 | 63 | 38 | | | |
| Hort. | 35 | 24 | 88 | 13 | 76 | 64 | 36 | 100 | 72 | 28 | 178 | 72 | 28 | | | |
| Rub. | 35 | 80 | 63 | 38 | 112 | 65 | 35 | 158 | 87 | 13 | 182 | 69 | 31 | | | |
| Sali. | 35 | 80 | 85 | 15 | 112 | 71 | 29 | 164 | 85 | 15 | 176 | 70 | 30 | | | |
| Everg. | 35 | 2 | 0 | 100 | 2 | 100 | 0 | 20 | 85 | 15 | 32 | 63 | 38 | | | |

* Número de sementes não germinadas num total de 200 sementes.

Tabela6 - Porcentagem de sementes viáveis (V) e mortas (M) pelo teste de tetrazólio em sementes remanescentes do teste de germinação (N) a 35°C de sementes de alface armazenadas em diferentes temperaturas.

| Cult. | A (°C) | N | 30 | | N | 60 | | N | 90 | | N | 120 | |
|---------------|-----------|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|-----|----|
| | | | V | M | | V | M | | V | M | | V | M |
| Luiza | 15 | 156 | 57 | 43 | 156 | 79 | 21 | 164 | 76 | 24 | 162 | 55 | 45 |
| Elisa | 15 | 154 | 62 | 38 | 162 | 70 | 30 | 164 | 78 | 22 | 164 | 58 | 42 |
| G. R. | 15 | 194 | 59 | 41 | 198 | 71 | 29 | 200 | 58 | 43 | 200 | 56 | 44 |
| B. V. | 15 | 186 | 60 | 40 | 196 | 69 | 31 | 196 | 63 | 37 | 198 | 57 | 43 |
| Hort. | 15 | 200 | 64 | 36 | 196 | 62 | 38 | 200 | 60 | 40 | 200 | 64 | 37 |
| Rub. | 15 | 200 | 68 | 33 | 200 | 64 | 37 | 200 | 67 | 34 | 200 | 62 | 38 |
| Sali. | 15 | 200 | 59 | 42 | 200 | 67 | 34 | 200 | 68 | 32 | 200 | 61 | 39 |
| Everg. | 15 | 52 | 60 | 40 | 56 | 63 | 38 | 54 | 59 | 41 | 64 | 55 | 45 |
| Luiza | 25 | 168 | 62 | 38 | 176 | 72 | 28 | 194 | 64 | 36 | 198 | 61 | 39 |
| Elisa | 25 | 166 | 69 | 31 | 178 | 61 | 39 | 190 | 66 | 34 | 198 | 62 | 38 |
| G. R. | 25 | 198 | 61 | 39 | 198 | 67 | 33 | 200 | 64 | 36 | 200 | 66 | 35 |
| B. V. | 25 | 194 | 63 | 37 | 198 | 64 | 36 | 200 | 65 | 36 | 200 | 64 | 36 |
| Hort. | 25 | 200 | 68 | 32 | 200 | 59 | 41 | 200 | 68 | 32 | 200 | 66 | 34 |
| Rub. | 25 | 200 | 71 | 30 | 200 | 60 | 41 | 200 | 62 | 38 | 200 | 63 | 38 |
| Sali. | 25 | 200 | 59 | 42 | 200 | 66 | 35 | 200 | 70 | 30 | 200 | 67 | 34 |
| Everg. | 25 | 66 | 59 | 41 | 74 | 68 | 32 | 90 | 62 | 38 | 120 | 54 | 46 |
| Luiza | 35 | 178 | 61 | 39 | 186 | 61 | 39 | 198 | 77 | 23 | 200 | 86 | 15 |
| Elisa | 35 | 182 | 63 | 37 | 184 | 64 | 36 | 200 | 80 | 21 | 200 | 89 | 11 |
| G. R. | 35 | 200 | 61 | 40 | 200 | 60 | 41 | 200 | 84 | 17 | 200 | 91 | 9 |
| B. V. | 35 | 198 | 71 | 29 | 200 | 66 | 35 | 200 | 81 | 19 | 200 | 93 | 8 |
| Hort. | 35 | 200 | 66 | 35 | 200 | 63 | 37 | 200 | 81 | 20 | 200 | 94 | 7 |
| Rub. | 35 | 200 | 56 | 44 | 200 | 55 | 45 | 200 | 84 | 17 | 200 | 93 | 8 |
| Sali. | 35 | 200 | 57 | 43 | 200 | 67 | 34 | 200 | 81 | 19 | 200 | 93 | 8 |
| Everg. | 35 | 120 | 62 | 38 | 122 | 57 | 43 | 130 | 65 | 35 | 134 | 72 | 28 |

* Número de sementes não germinadas num total de 200 sementes.

Na germinação a 20 °C, fica evidente que os ambientes de 25 e 35 °C proporcionaram maior dormência nas sementes não ocorrendo à germinação das mesmas, o que pode ser verificada pela porcentagem de sementes viáveis (Tabela 5). À medida que aumentou o período de armazenamento a temperatura elevada do ambiente, ocasionou maior número de sementes não germinadas, sendo a maior porcentagem dessas sementes viáveis (Tabela 5).

Já para germinação a 35 °C observou-se pelo teste de tetrazólio que apesar das sementes não terem germinado, estas ainda estavam viáveis (Tabela 6). As cultivares Hortênciã, Rubete e Salinas 88 não germinaram desde os trinta dias de armazenamento, mesmo no ambiente de 15 °C, porém em torno de 60% das sementes ainda estavam viáveis, como observado na Tabela 6. Isto possivelmente ocorreu devido à dormência das sementes de alface imposta pelo estresse térmico. Dias e Alves (2008) afirmam que o teste de tetrazólio e germinação podem ser considerados como complementares e em conjunto permitem avaliar a qualidade fisiológica das sementes por meio de sua viabilidade. É interessante que sejam utilizados os dois testes, tetrazólio e germinação, para saber a porcentagem de sementes viáveis e dormentes, informações essenciais para o controle de qualidade.

Em relação ao teste de emergência (Tabela 7) ressalta-se que sementes armazenadas por 30 dias a uma temperatura de 25 e 35 °C, possuem menor vigor do que as armazenadas a 15 °C. Analisando cada cultivar, percebe-se que a temperatura do ambiente também reduziu o vigor das sementes de alface. Somente a cultivar Everglades, tolerou por mais tempo o estresse térmico do ambiente, sendo que ocorreu redução de sua emergência a partir de 90 dias de armazenamento nas temperaturas de 25 e 35 °C. Comparando as cultivares constatou-se que Everglades é mais vigorosa em temperaturas elevadas, independente do período de armazenamento (Figura 5).

Tabela 7 - Percentuais médios de emergência de plântulas de sementes de alface armazenadas em diferentes temperaturas.

| Cultivares | Períodos de armazenamento (dias) | | | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 30 | | | 60 | | | 90 | | | 120 | | |
| | Temperaturas de armazenamento (°C) | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 | 15 | 25 | 35 |
| Luiza | 93Aa | 83Cb | 66Cc | 94Aa | 83Bb | 52Bc | 93Ba | 69Cb | 36Cc | 84Ba | 53Cb | 26Bc |
| Elisa | 93Aa | 82Cb | 55Dc | 93Aa | 83Bb | 50Bc | 91Ba | 75Bb | 40Bc | 83Ba | 72Bb | 28Bc |
| G. Rapids | 91Ba | 78Db | 65Cc | 89Ba | 75Cb | 47Bc | 87Ba | 68Cb | 30Dc | 80Ba | 54Cb | 8Cc |
| B. Verão | 94Aa | 87Bb | 73Bc | 90Ba | 86Bb | 48Bc | 87Ba | 68Cb | 36Cc | 78Ca | 50Db | 8Cc |
| Hortência | 90Ba | 83Cb | 58Dc | 88Ba | 84Bb | 40Cc | 83Ca | 69Cb | 30Dc | 82Ba | 53Cb | 4Cc |
| Rubete | 95Aa | 74Db | 65Cc | 92Aa | 73Cb | 41Cc | 89Ca | 67Cb | 31Dc | 82Ba | 54Cb | 7Cc |
| Salinas 88 | 91Ba | 81Cb | 54Dc | 87Ba | 75Cb | 41Cc | 87Ca | 63Db | 32Dc | 76Ca | 48Db | 6Cc |
| Everglades | 96Aa | 95Aa | 93Aa | 97Aa | 93Aa | 95Aa | 96Aa | 83Ab | 85Ab | 94Aa | 81Ab | 79Ab |
| CV | | | | | | | | | | | | 3,99 |

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

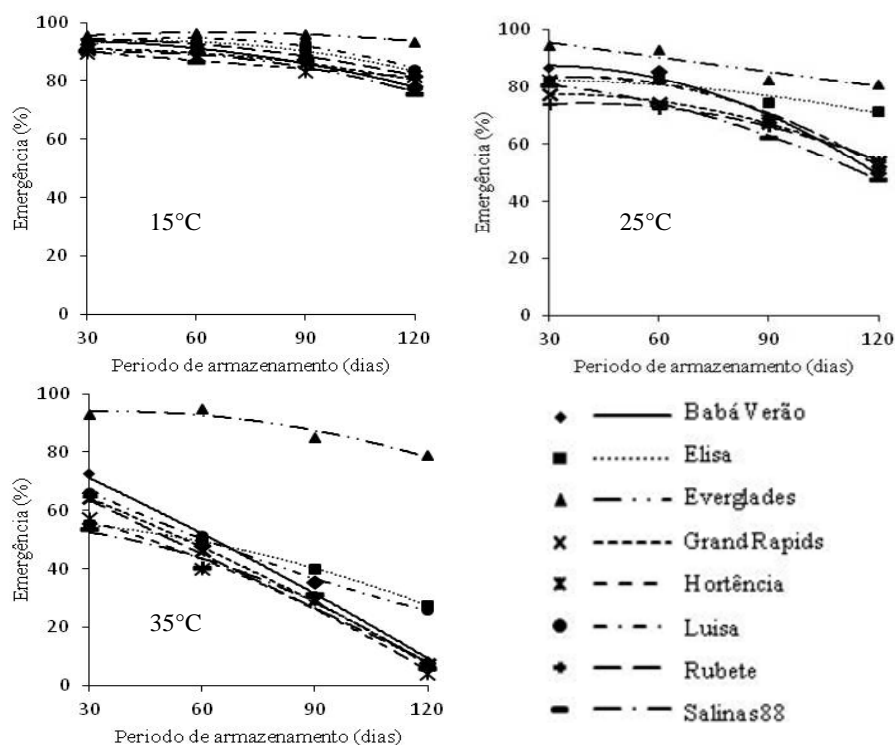


Figura 5 Porcentagem de emergência de plântulas de sementes de oito cultivares de alface em função dos ambientes (15, 25 e 35°C) e dos períodos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias).

Aos 120 dias a 35 °C cultivares suscetíveis (Grand Rapids, Babá de Verão, Hortência, Rubete e Salinas 88) apresentaram baixa porcentagem de emergência.

O teste de emergência ao ser realizado nas condições de casa de vegetação simulou o mesmo ocorrido com produtores rurais ao armazenar suas sementes em temperaturas elevadas. Verificou-se neste trabalho que a temperatura de armazenamento reduziu a qualidade e provocou a dormência (termodormência) nas sementes de alface.

Resultados semelhantes foram observados por Ferreira et al. (2013) no desempenho de plântulas de tomate. Para o autor, a emergência e a velocidade

de emergência é afetada por temperaturas acima de 33 °C, isso devido a essas temperaturas afetarem a velocidade de reorganização das membranas celulares, alterando assim o metabolismo das sementes e com isso reduzindo a velocidade de emergência de plântulas. Também é necessário destacar que os lotes de sementes comportaram-se de forma diferenciada quanto aos efeitos das altas temperaturas, pois possuem histórico distinto, além do que a velocidade de deterioração das sementes é diferente, sendo que até as partes componentes de uma mesma semente deterioram em velocidades distintas (MARCOS FILHO, 2005) e isso interfere no potencial fisiológico e na capacidade de resistir às condições adversas, impostas no momento da germinação e emergência.

Além das alterações fisiológicas causadas pelas altas temperaturas nas sementes ocorrem ainda alterações nos padrões proteicos e/ou enzimáticos. Sementes de alface possuem a germinação limitada pela presença do endosperma, havendo assim a necessidade do amolecimento desse tecido para que ocorra a protrusão radicular. Esse papel é desempenhado por várias enzimas, a exemplo da endo- β -mananase, que está presente no endosperma em diferentes isoformas (SILVA et al., 2004). No início da germinação das sementes de alface, a embebição resulta na hidratação das matrizes, como as células da parede celular (NONOGAKI, 2008; NONOGAKI et al., 2010), compostas por manose, glucose, galactose e arabinose, que são degradadas pela endo- β -mananase (MO; BEWLEY, 2003).

Nas sementes de alface pré-embebidas a 20 °C foi possível observar redução na atividade da enzima endo- β -mananase ao longo do período de armazenamento quando estas sementes foram armazenadas em 25 e 35 °C (Figura 6), evidenciando o processo natural de deterioração que ocorre nas sementes, de acordo com os resultados de germinação e vigor (Tabela 1, 3 e 7; Figura 1, 3 e 5). Diniz et al. (2009) também observou que o armazenamento interfere na atividade da enzima endo- β -mananase em sementes de alface e por

Albuquerque et al. (2010) em sementes de tomate. Já quando as sementes foram armazenadas a 15 °C houve a manutenção na atividade desta enzima independente do período de armazenamento (Figura 6).

As sementes da cultivar Everglades mantiveram a atividade dessa enzima independentemente do ambiente de armazenamento e do período no qual essas foram armazenadas. Essa manutenção na atividade, para cultivar Everglades, corrobora com os melhores resultados de germinação observados na Tabela 1, onde não foi verificada diferença significativa ao longo dos 120 dias de armazenamento. Isso indica a importância da enzima endo- β -mananase para viabilidade de sementes de alface e é mais uma evidencia de que essa é uma cultivar termotolerante. Vale ressaltar ainda que esse comportamento pode variar de acordo com a espécie, com o genótipo, com a cultivar, principalmente quando existem diferenças nas temperaturas as quais as sementes são armazenadas.

Além de ocasionar dormência nas sementes de alface, a elevação da temperatura, acelera os processos metabólicos nas sementes de algumas cultivares, aumentando a respiração e conseqüentemente o processo de deterioração. Para Marcos Filho (2005), a deterioração é um processo determinado por uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas, com início a partir da maturidade fisiológica, que ocorre de maneira progressiva, determinando a queda da qualidade e culminando com a morte da semente. As principais alterações relacionadas ao processo de deterioração são degradação e inativação de enzimas (COPELAND; MCDONALD, 2001), redução da atividade respiratória (FERGUSON; TEKRONY; EGLI, 1990) e perda de integridade das membranas celulares (MCDONALD, 1999). Copeland e McDonald (2001) destacaram que para detectar o início da deterioração das sementes, as avaliações mais sensíveis são aquelas relacionadas à atividade de algumas enzimas.

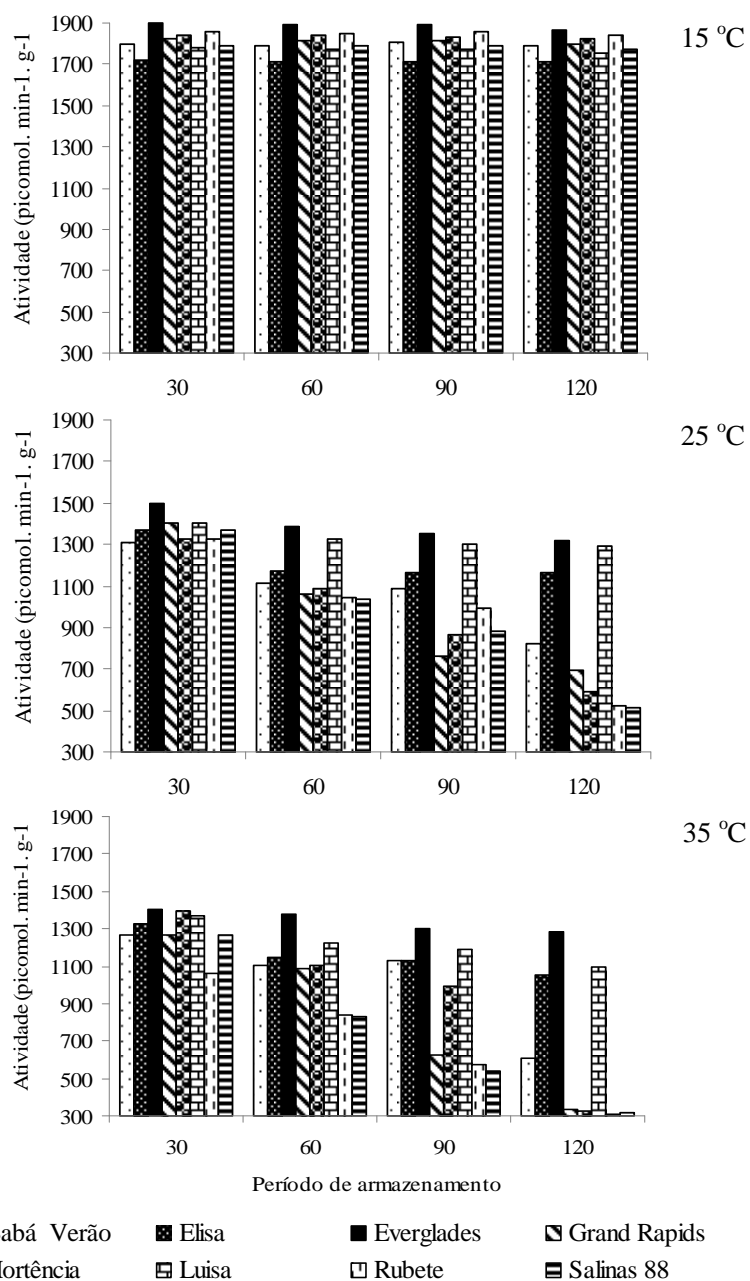


Figura 6 - Atividade da enzima endo- β -mananase (picomol. min-1. g-1) sementes de alface em função do ambiente e do armazenamento em diferentes temperaturas.

Segundo McDonald (1999), as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) constituem mecanismos eficientes para desintoxicação, atuando na remoção de radicais livres. No entanto, no presente trabalho não foi possível observar variações nos padrões de expressão da SOD, para todas as cultivares analisadas. Tal resultado pode ser devido a esta enzima estar presente em várias organelas, a exemplo das mitocôndrias e cloroplastos, além do citoplasma conferindo estabilidade à atividade dessa enzima (NEWTON et al., 1999).

O estresse causado pelo armazenamento em sementes de cultivares de alface, em especial quando as sementes foram armazenadas a temperatura de 35 °C pode ter induzido processos oxidativos e produção de radicais livres. Isto pode ser evidenciado indiretamente pela maior atividade da enzima catalase (CAT) até 30 dias de armazenamento, independentemente da temperatura. Nas épocas subsequentes há uma redução da atividade da catalase, podendo esta redução estar associada à disponibilidade de oxigênio, bem como ao nível de deterioração. Em sementes mais deterioradas observa-se redução acentuada na atividade dessa enzima chegando até a não ativação, como visto nas sementes armazenadas por período de 120 dias a temperatura de 35 °C (Figura 7).

Segundo Fridovich (1986), a catalase, por ser uma enzima envolvida no processo de remoção do peróxido de hidrogênio, desempenha controle desses peróxidos endógenos por meio do ciclo óxido-redução. Sendo assim, a redução na atividade dessa enzima, poderá resultar na diminuição da prevenção de danos oxidativos. Ao exemplo do ocorrido com as sementes de alface para todas as cultivares trabalhadas. Sendo assim, a enzima catalase pode ser utilizada para a avaliação da deterioração em sementes de alface ao longo do armazenamento, esses resultados também corroboraram com o trabalho descrito por Muniz et al. (2007) onde esta enzima está envolvida na remoção de radicais livres durante o processo de deterioração das sementes de alface.

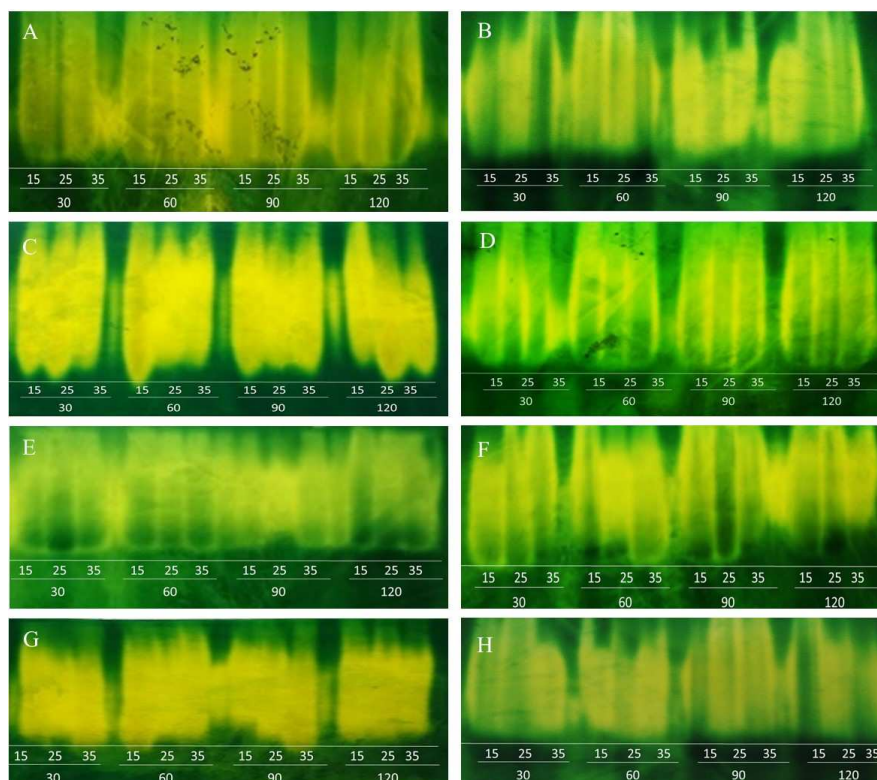


Figura 7 - Padrões isoenzimáticos de sementes de alfaca cultivares, Babá de verão (A), Elisa (B), Everglades (C), Grand Rapids (D), Hortência (E), Rubete (F), Salinas 88 (G) e Luiza (H), submetidas às diferentes épocas de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias) e ambientes de armazenamento (15, 25 e 35 °C) reveladas para Catalase (CAT).

Para todas as cultivares testadas observou-se aumento na atividade da ADH nas sementes mantidas a temperatura de 35 °C no decorrer do tempo de armazenamento, a exceção da cultivar Everglades. Isto se justifica nessa condição, pois há redução da disponibilidade de oxigênio, causando assim a ativação da rota anaeróbica de respiração (Figura 8).

Os perfis isoenzimáticos obtidos para sementes de alfaca, de todas as cultivares analisadas, em função do armazenamento revelaram, para a malato desidrogenase (MDH), ausência de qualquer alteração no número e intensidade

de bandas que pudesse ser associada à condição de armazenamento e à qualidade das sementes.

A MDH desempenha papel significativo no ciclo de Krebs, uma vez que catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, produzindo NADH, que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (TAIZ; ZEIGER, 2004). Portanto, esta enzima poderia se constituir em eficiente marcador da respiração aeróbica das sementes durante o armazenamento. Talvez isso se deva ao fato de que esta enzima, assim como a SOD, é encontrada em associação a uma grande quantidade de organelas o que pode conferir uma estabilidade na atividade dessa enzima no decorrer no armazenamento (SCANDALIOS, 1974).

Alterações nos padrões da esterase (EST) são evidências da ocorrência de eventos deteriorativos, pois é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres e está diretamente ligada ao metabolismo de lipídios e ao processo degenerativo de membranas (SANTOS; MENEZES; VILELA, 2004).

Maior atividade da enzima esterase foi observada nas sementes das cultivares de alface, armazenadas por 120 dias. Taylor (1997) relata que as sementes de alface são compostas por aproximadamente 38% de lipídeos. O alto teor de óleo em sementes, como é o caso da alface, favorece esse grupo de enzimas hidrolíticas na liberação de ácidos graxos que são usados na beta oxidação, como fonte de energia para a germinação. Muitos desses lipídios são constituintes de membranas, cuja degradação aumenta com a deterioração (MARCOS FILHO, 2005). Vale ressaltar que Diniz et al. (2009), trabalhando com armazenamento de sementes de alface afirmam que as esterases são o grupo de enzimas mais importantes na germinação desta espécie (Figura 9).

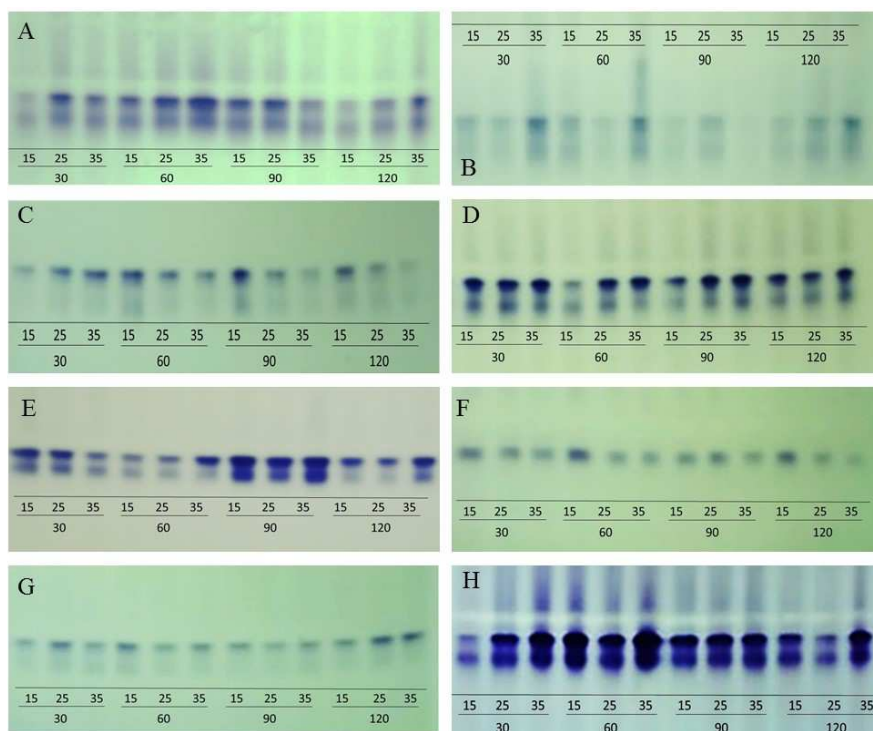


Figura 8 - Padrões isoenzimáticos de sementes de alfaca cultivares, Babá de verão (A), Elisa (B), Everglades (C), Grand Rapids (D), Hortência (E), Rubete (F), Salinas 88 (G) e Luiza (H), submetidas a diferentes épocas de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias) e ambientes de armazenamento (15, 25 e 35 °C) reveladas para Álcool desidrogenase (ADH).

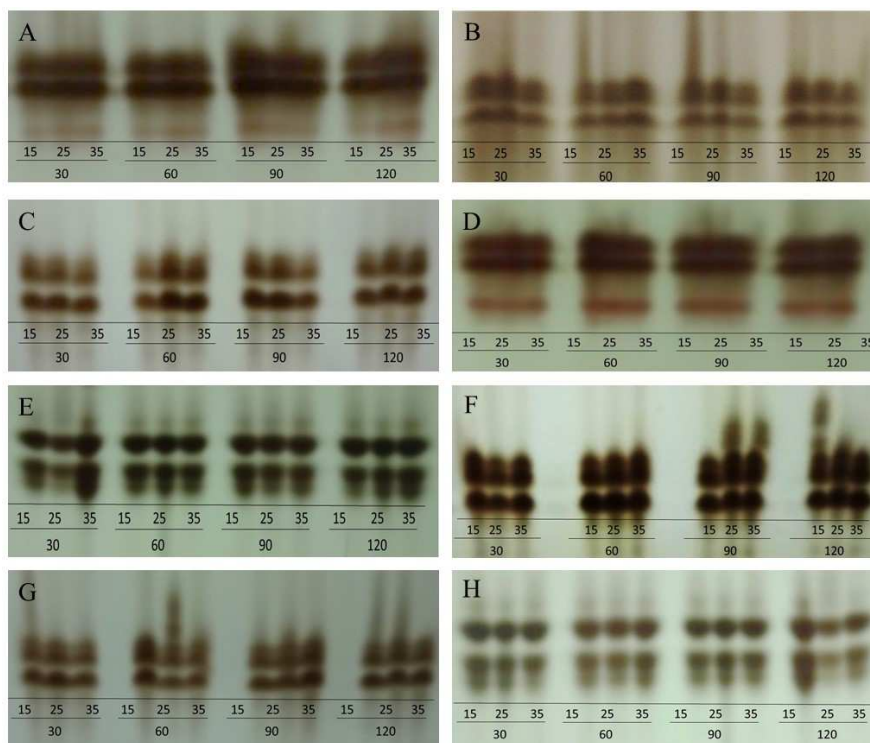


Figura 9 - Padrões isoenzimáticos de sementes de alfaca cultivares, Babá de verão (A), Elisa (B), Everglades (C), Grand Rapids (D), Hortência (E), Rubete (F), Salinas 88 (G) e Luiza (H), submetidas às diferentes épocas de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias) e ambientes de armazenamento (15, 25 e 35 °C) reveladas para Esterase (EST).

Com base em todos os resultados fisiológicos e bioquímicos discutidos acima, fica evidente que a temperatura de armazenamento é fundamental conservar a qualidade de sementes de alfaca, pois atua sobre a viabilidade, vigor e reações bioquímicas que determinam todo esse processo.

4 CONCLUSÕES

O período de armazenamento até os seis meses mantém a viabilidade e vigor de sementes de alface, quando armazenadas na temperatura de 15 °C.

As sementes de alface armazenadas em ambientes com temperatura superior a 25 °C não toleram ao armazenamento a partir de 60 dias o que compromete a germinação e o vigor.

A cultivar Everglades é tolerante à condição de germinação a 35 °C e mantém sua qualidade ao longo do armazenamento em temperatura de 15 °C.

A temperatura acima de 25 °C induz a termodormência em cultivares de alface durante o armazenamento, uma vez que as sementes não germinadas estavam viáveis.

Ocorrem alterações enzimáticas em sementes de alface armazenadas em altas temperaturas devido à dormência.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. A. D. et al. Armazenamento e qualidade de sementes de tomate enriquecidas com micronutrientes e reguladores de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 20-28, jan./fev. 2010.
- ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **ABCSEM comemora 40 anos na Hortitec**. Campinas, 2010. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=986>>. Acesso em: 1 out. 2013.
- BARBOSA, R. M.; COSTA, D. S.; SÁ, M. E. Envelhecimento acelerado em sementes de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1899-1902, nov. 2011.
- BRASIL. Portaria nº 456, de 18 de dezembro de 1986. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 dez. 1986. Seção 1, p. 19653.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.
- CARVALHO, M. L. M.; PINHO, E. V. R. von. **Armazenamento de sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 39 p.
- COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 4th ed. New York: Chapman & Hall, 2001. 467 p.
- DIAS, M.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 152-158, 2008.
- DINIZ, K. A. et al. Qualidade de sementes de alface enriquecidas com micronutrientes e reguladores de crescimento durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 228-238, 2009.
- DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- α -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, New York, v. 36, n. 1, p. 829-835, 1994.

FERGUSON, J. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. M. Changes during early soybean seed and axes deterioration: II., lipids. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 1, p. 179-182, 1990.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**. Versão 4.2. Lavras: UFLA, 2000. Software.

FERREIRA, R. L. et al. Temperatura inicial de germinação no desempenho de plântulas e mudas de tomate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 7, p. 1189-1195, 2013.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 147, n. 1, p. 1-11, May 1986.

GONAI, T. et al. Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 394, p. 111-118, 2004.

HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOSLOWSKI, T. T. (Ed.). **Seed biology**. New York: Academic, 1972. p. 145-245.

KOZAREWA, I. et al. High maturation temperature of lettuce seeds during development increased ethylene production and germination at elevated temperatures. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 564-570, Feb. 2006.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.

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

MARTINS, L.; LAGO, A. A. Conservação de semente de *Cedrela fissilis*: teor de água da semente e temperatura do ambiente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 161-167, 2008.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.

MO, B.; BEWLEY, J. D. The relationship between b-mannosidase and endo-b-mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 392, p. 2503-2510, 2003. Disponível em:

<<http://jxb.oxfordjournals.org/content/54/392/2503.full.pdf+html>>. Acesso em: 5 jul. 2010.

MUNIZ, F. R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 195-204, 2007.

NASCIMENTO, W. M. Preventing thermoinhibition in a thermosensitive lettuce genotype by seed imbibition at low temperature. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 477-480, 2003.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Endo-beta-mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermotolerant lettuce genotypes in response to seed priming. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 3, p. 255-264, 2001.

NASCIMENTO, W. M.; CRODA, M. D.; LOPES, A. C. A. Produção 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. et al. Colheita e armazenamento de sementes de coentro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 12, p. 1793-1801, dez. 2006.

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**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 175-179, 2007.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 140-145, Apr. 1999.

NONOGAKI, H. Seed germination and reserve mobilization. In: **ENCYCLOPEDIA of life sciences**. Chichester: J. Wiley, 2008. Disponível em: <<http://www.els.net>>. Acesso em: 17 set. 2011.

NONOGAKI, H. et al. Germination still a mystery. **Plant Science**, Shannon, v. 179, n. 1, p. 574-581, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945210000403>>. Acesso em: 15 ago. 2010.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 110-119, jun. 2004.

SCANDALIOS, J. G. Isoenzymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 25, p. 255-258, June 1974.

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

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with loss of viability of stored desiccation tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIEGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. p. 701-746.

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

TAYLOR, A. C. Seed storage, germination and quality. In: WIEN, H. C. (Ed.). **The physiological of vegetable crops**. New York: Wiley, 1997. p. 1-36.

VILLELA, R. P. et al. Produção e desempenho de sementes de cultivares de alface em duas épocas de plantio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 158-169, 2010.

ANEXOS

Tabela 1A Análise de variância dos dados obtidos nos testes para avaliação da qualidade fisiológica em oito cultivares de alface em função da temperatura de germinação (20 e 35 °C).

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | | | | |
|----------------------|----|------------------|----------------|---------------|---------------|-------------|
| | | PCG (%) | GER | IVG | EMERG | IVE |
| Cultivar | 7 | 1066.678571* | 1367.535714* | 496.625113* | 1417.908482* | 11.949048* |
| Temperatura | 1 | 109230.250000* | 100489.000000* | 11348.640900* | 92796.390625* | 240.676439* |
| Cult *Temp | 7 | 818.964286* | 1337.714286* | 167.706714* | 824.319196* | 2.388578* |
| ERRO | 48 | 16.125000 | 11.250000 | 3.499614 | 9.578125 | 0.037413 |
| CV (%) | | 7,79 | 6,62 | 10,26 | 6,21 | 7,08 |

*Significativo no nível de 5% de probabilidade pelo Teste F.

Tabela 2A Análise de variância dos dados obtidos nos testes para avaliação da qualidade fisiológica em sementes de alface armazenadas em diferentes ambientes por 30, 60, 90 e 120 dias.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | | | | |
|-------------------|-----|------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | | Germ 20 | IVG 20 | Germ 35 | IVG 35 | Emerg |
| Armazenamento | 3 | 15136.013889* | 4351.183559* | 413.625000* | 37.895693* | 12944.805556* |
| Cultivar | 7 | 7055.494048* | 1659.829728* | 16845.327381* | 1220.559442* | 4133.452381* |
| Ambiente | 2 | 38858.468750* | 6049.043379* | 2464.041667* | 75.930632* | 64438.291667* |
| Arm*Cult | 21 | 693.228175* | 267.575810* | 78.371032* | 17.860107* | 189.361111* |
| Arm*Amb | 6 | 2416.440972* | 645.256877* | 44.958333* | 3.697267* | 1819.138889* |
| Cult*Amb | 14 | 1889.873512* | 529.056673* | 654.541667* | 47.912000* | 1066.077381* |
| Arm*Cult*Amb | 42 | 167.607639* | 60.971283* | 19.061508* | 4.895347* | 62.146825* |
| ERRO | 288 | 8.041667* | 5.014902* | 2.708333* | 0.348429* | 7.500000 |
| CV (%) | | 3.89 | 7.03 | 16.86 | 27.35 | 3.99 |

*Significativo no nível de 5% de probabilidade pelo Teste F.

Tabela 3A Equações de regressão ajustadas do índice de velocidade de germinação a 20°C em função do período de armazenamento de sementes de alface.

| Fontes de Variação | Equações de regressão Germinação 20°C | R ² |
|--------------------|--|----------------|
| Babá Verão 15°C | $y = 0.5x^2 - 4.9x + 101$ | 0.8054 |
| Babá Verão 25°C | $y = -4.75x^2 + 10.85x + 85.25$ | 0.9443 |
| Babá Verão 35°C | $y = -4.5x^2 + 11.1x + 61.5$ | 0.9101 |
| Elisa 15 °C | $y = 0.25x^2 - 2.55x + 86.75$ | 0.6824 |
| Elisa 25 °C | $y = -3.6x + 85$ | 0.9 |
| Elisa 35 °C | $y = x^2 - 10.6x + 85.5$ | 0.9988 |
| Grand Rapids 15°C | $y = -0.25x^2 - 1.65x + 98.25$ | 0.9453 |
| Grand Rapids 25 °C | $y = 2.5x^2 - 29.7x + 120$ | 0.9916 |
| Grand Rapids 35 °C | $y = x^2 - 24x + 94$ | 0.9891 |
| Hortência 15 °C | $y = -1E-13x^2 - 3x + 100$ | 1 |
| Hortência 25 °C | $y = -5.75x^2 + 5.85x + 92.25$ | 0.9806 |
| Hortência 35 °C | $y = -3.25x^2 - 8.05x + 97.25$ | 0.9727 |
| Luisa 15 °C | $y = 0.5x^2 - 3.7x + 97$ | 0.9111 |
| Luisa 25 °C | $y = 0.25x^2 - 5.15x + 98.75$ | 0.9941 |
| Luisa 35 °C | $y = -1.25x^2 + 2.15x + 80.25$ | 0.995 |
| Rubete 15°C | $y = -0.25x^2 - 1.05x + 99.25$ | 0.9981 |
| Rubete 25°C | $y = -4.5x^2 + 3.5x + 78$ | 0.9895 |
| Rubete 35 °C | $y = 1x^2 - 22.6x + 82.5$ | 0.9897 |
| Salinas 88 15 °C | $y = -0.25x^2 - 0.85x + 92.75$ | 0.901 |
| Salinas 88 25 °C | $y = -x^2 - 17.4x + 105$ | 0.9562 |
| Salinas 88 35 °C | $y = 5x^2 - 45x + 111$ | 0.9906 |
| Everglades 15 °C | $y = 0.5x^2 - 3.3x + 102$ | 0.84 |
| Everglades 25 °C | $y = -2x^2 + 4.2x + 98$ | 0.9957 |
| Everglades 35 °C | $y = -1.5x^2 + 2.1x + 99$ | 0.9556 |

Tabela 3A, continua.

| Fontes de Variação | Equações de regressão | R ² |
|--------------------|---------------------------------|----------------|
| | IVG 20°C | |
| Babá Verão 15°C | $y = 3.25x^2 - 16.95x + 58.25$ | 0.4819 |
| Babá Verão 25°C | $y = -0.5x^2 - 5.1x + 44.5$ | 0.9471 |
| Babá Verão 35°C | $y = -1.75x^2 + 2.05x + 30.75$ | 0.9998 |
| Elisa 15°C | $y = 7.5x^2 - 36.9x + 66.5$ | 0.9991 |
| Elisa 25°C | $y = -0.25x^2 - 1.45x + 39.25$ | 0.9006 |
| Elisa 35°C | $y = 0.5x^2 - 6.3x + 43.5$ | 0.976 |
| Grand Rapids 15°C | $y = 0.5x^2 - 9.9x + 56.5$ | 0.9443 |
| Grand Rapids 25°C | $y = 3.25x^2 - 25.15x + 67.25$ | 0.9944 |
| Grand Rapids 35°C | $y = 2.5x^2 - 23.1x + 56.5$ | 0.9731 |
| Hortência 15°C | $y = 3.25x^2 - 18.75x + 63.25$ | 0.8673 |
| Hortência 25°C | $y = -3x^2 + 4.2x + 43$ | 0.9797 |
| Hortência 35°C | $y = -0.25x^2 - 11.25x + 53.75$ | 0.9858 |
| Luisa 15°C | $y = -1.5x^2 + 8.7x + 33$ | 0.9529 |
| Luisa 25°C | $y = -1.25x^2 + 7.75x + 18.75$ | 0.9333 |
| Luisa 35°C | $y = -1.25x^2 + 3.35x + 37.75$ | 0.9908 |
| Rubete 15°C | $y = 2.25x^2 - 13.95x + 61.25$ | 0.5413 |
| Rubete 25°C | $y = -x^2 - 4.8x + 42.5$ | 0.9347 |
| Rubete 35°C | $y = 0.75x^2 - 13.05x + 42.75$ | 0.9908 |
| Salinas 88 15°C | $y = 2x^2 - 11.4x + 51$ | 0.7818 |
| Salinas 88 25°C | $y = -1.5x^2 - 2.7x + 41.5$ | 0.9818 |
| Salinas 88 35°C | $y = 2.25x^2 - 21.55x + 53.75$ | 0.9927 |
| Everglades 15°C | $y = 4.25x^2 - 21.95x + 67.25$ | 0.9251 |
| Everglades 25°C | $y = -0.75x^2 + 0.85x + 48.75$ | 0.9899 |
| Everglades 35°C | $y = 1.75x^2 - 11.65x + 58.75$ | 0.9918 |

Tabela 3A, continua.

| Fontes de Variação | Equações de regressão | R ² |
|--------------------|--------------------------------|----------------|
| | Germinação 35°C | |
| Babá Verão 15°C | $y = x^2 - 6.8x + 12.5$ | 0.9182 |
| Babá Verão 25°C | $y = 0.5x^2 - 3.5x + 6$ | 1 |
| Babá Verão 35°C | $y = 0.25x^2 - 1.55x + 2.25$ | 0.9333 |
| Elisa 15°C | $y = x^2 - 6.6x + 28.5$ | 0.9882 |
| Elisa 25°C | $y = 0.5x^2 - 7.9x + 24.5$ | 0.9986 |
| Elisa 35°C | $y = 0.25x^2 - 4.75x + 14.25$ | 0.8454 |
| Grand Rapids 15°C | $y = 0.5x^2 - 3.5x + 6$ | 1 |
| Grand Rapids 25°C | $y = 2E-16x^2 - 0.4x + 1.5$ | 0.8 |
| Grand Rapids 35°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Hortência 15°C | $y = -0.5x^2 + 2.3x - 1.5$ | 0.4 |
| Hortência 25°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Hortência 35°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Luisa 15°C | $y = 0.25x^2 - 2.55x + 24.75$ | 0.6824 |
| Luisa 25°C | $y = 0.5x^2 - 7.9x + 24$ | 0.9532 |
| Luisa 35°C | $y = 0.75x^2 - 7.65x + 18.25$ | 0.9697 |
| Rubete 15°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Rubete 25°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Rubete 35°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Salinas 88 15°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Salinas 88 25°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Salinas 88 35°C | $y = 0$ | 0,0 |
| Everglades 15°C | $y = -0.75x^2 + 2.05x + 72.25$ | 0.8048 |
| Everglades 25°C | $y = -2.75x^2 + 4.85x + 64.75$ | 0.9989 |
| Everglades 35°C | $y = -0.25x^2 - 1.25x + 41.75$ | 0.9618 |

Tabela 3A, continua.

| Fontes de Variação | Equações de regressão | R ² |
|--------------------|--------------------------------|----------------|
| | IVG 35°C | |
| Babá Verão 15°C | $y = 0.25x^2 - 1.55x + 2.25$ | 0.9333 |
| Babá Verão 25°C | $y = 0$ | 0 |
| Babá Verão 35 °C | $y = 0$ | 0 |
| Elisa 15°C | $y = -0.25x^2 + 0.95x + 1.25$ | 0.9333 |
| Elisa 25°C | $y = 0.25x^2 - 1.95x + 3.75$ | 0.9818 |
| Elisa 35°C | $y = 2E-16x^2 - 0.4x + 1.5$ | 0.8 |
| Grand Rapids 15°C | $y = 0$ | 0 |
| Grand Rapids 25°C | $y = 0$ | 0 |
| Grand Rapids 35°C | $y = 0$ | 0 |
| Hortência 15°C | $y = 0$ | 0 |
| Hortência 25°C | $y = 0$ | 0 |
| Hortência 35°C | $y = 0$ | 0 |
| Luisa 15°C | $y = 0.25x^2 - 1.55x + 4.25$ | 0.9333 |
| Luisa 25°C | $y = 0.25x^2 - 1.95x + 3.75$ | 0.9818 |
| Luisa 35°C | $y = x^2 - 6.6x + 10.5$ | 0.9882 |
| Rubete 15°C | $y = 0$ | 0 |
| Rubete 25°C | $y = 0$ | 0 |
| Rubete 35°C | $y = 0$ | 0 |
| Salinas 88 15°C | $y = 0$ | 0 |
| Salinas 88 25°C | $y = 0$ | 0 |
| Salinas 88 35°C | $y = 0$ | 0 |
| Everglades 15°C | $y = -1.5x^2 + 4.1x + 19.5$ | 0.997 |
| Everglades 25°C | $y = -0.75x^2 + 0.85x + 19.25$ | 0.9476 |
| Everglades 35°C | $y = 0.5x^2 - 3.1x + 13$ | 0.0667 |

Tabela 3A, continua.

| Fontes de Variação | Equações de regressão | R ² |
|--------------------|-----------------------------------|----------------|
| | Emergência (%) | |
| Babá Verão 15°C | $y = -1.375x^2 + 1.625x + 93.375$ | 0.9810 |
| Babá Verão 25°C | $y = -4.125x^2 + 7.875x + 83.625$ | 0.9829 |
| Babá Verão 35°C | $y = -0.75x^2 - 16.85x + 88.75$ | 0.9831 |
| Elisa 15°C | $y = -1.875x^2 + 6.225x + 88.375$ | 0.9768 |
| Elisa 25°C | $y = -1.125x^2 + 1.775x + 81.625$ | 0.8683 |
| Elisa 35°C | $y = -1.75x^2 - 0.45x + 57.25$ | 0.9999 |
| Grand Rapids 15°C | $y = -1.125x^2 + 2.075x + 89.875$ | 0.9911 |
| Grand Rapids 25°C | $y = -2.625x^2 + 5.375x + 74.625$ | 0.9990 |
| Grand Rapids 35°C | $y = -1x^2 - 13.8x + 79$ | 0.9990 |
| Hortência 15°C | $y = -1E-13x^2 - 2.9x + 92.75$ | 0.9449 |
| Hortência 25°C | $y = -4x^2 + 9.5x + 78.25$ | 0.9825 |
| Hortência 35°C | $y = -2x^2 - 7.1x + 65.5$ | 0.9839 |
| Luisa 15°C | $y = -2.375x^2 + 9.125x + 85.875$ | 0.9555 |
| Luisa 25°C | $y = -4x^2 + 9.8x + 77.25$ | 0.9898 |
| Luisa 35°C | $y = 1.25x^2 - 19.85x + 85$ | 0.9966 |
| Rubete 15°C | $y = -1.25x^2 + 2.05x + 93.5$ | 0.9916 |
| Rubete 25°C | $y = -2.75x^2 + 7.15x + 69.5$ | 0.9992 |
| Rubete 35°C | $y = 0.125x^2 - 19.075x + 82.625$ | 0.9798 |
| Salinas 88 15°C | $y = -1.875x^2 + 4.925x + 86.625$ | 0.8926 |
| Salinas 88 25°C | $y = -2.25x^2 + 0.15x + 82.75$ | 0.9993 |
| Salinas 88 35°C | $y = -3.125x^2 + 0.475x + 55.125$ | 0.9826 |
| Everglades 15°C | $y = -0.875x^2 + 3.725x + 92.625$ | 0.9976 |
| Everglades 25°C | $y = -1E-13x^2 - 5.1x + 100.5$ | 0.8892 |
| Everglades 35°C | $y = -2x^2 + 4.8x + 91$ | 0.9220 |