



ALINE DA CONSOLAÇÃO SAMPAIO CLEMENTE

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À ROTA
BIOSSINTÉTICA DO ÁCIDO ABSCÍSIKO,
GIBERELINA E ETILENO DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE ALFACE**

**LAVRAS- MG
2012**

ALINE DA CONSOLAÇÃO SAMPAIO CLEMENTE

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À ROTA BIOSINTÉTICA DO
ÁCIDO ABCÍSICO, GIBERELINA E ETILENO DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO 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. Renato Mendes Guimarães

**LAVRAS- MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Clemente, Aline da Consolação Sampaio.

Expressão de genes associados à rota biossintética do ácido abs
císico, giberelina e etileno durante o desenvolvimento e germinação
de sementes de alface / Aline da Consolação Sampaio Clemente. –
Lavras : UFLA, 2012.

97 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Renato Mendes Guimarães.

Bibliografia.

1. *Lactuca sativa*. 2. Dormência. 3. Fitormônios. 4. qRT-PCR. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.5221

ALINE DA CONSOLAÇÃO SAMPAIO CLEMENTE

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À ROTA BIOSSINTÉTICA DO
ÁCIDO ABCÍSIKO, GIBERELINA E ETILENO DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO 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 12 de março de 2012

Dr. João Almir Oliveira	UFLA
Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes	UFLA
Dr. José Marcio Rocha Faria	UFLA
Dr. Antônio Rodrigues Vieira	EPAMIG

Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

**LAVRAS- MG
2012**

*Aos meus pais Hélio e Maria Consoladora,
Pelo exemplo de vida e sabedoria,
Aos meus irmãos Águida, Adelson, Áurea e Álisson,
Pela força e companheirismo,
E ao meu esposo Jeberson
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 Renato Mendes Guimarães, pelos ensinamentos, confiança e orientação na realização do trabalho.

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

Aos pesquisadores Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa e Antônio Rodrigues Vieira, pelos conselhos e amizade.

Ao Professor Luiz Antônio Augusto Gomes pelos ensinamentos, conselhos e ajuda na realização do experimento.

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

Aos funcionários do Laboratório Central de Sementes, pela disponibilidade e atenção durante a realização dos experimentos.

À bolsista Denize e a todos os estudantes de iniciação científica e estagiários pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

Ao doutorando André Lima pelos ensinamentos e contribuições neste trabalho.

Aos meus colegas de Pós-graduação pelos conselhos e auxílios nas disciplinas e na condução do experimento.

À secretária de Pós-graduação Marli, pela atenção e paciência durante os cursos de Mestrado e Doutorado.

A minha família, principalmente meu pai Hélio e minha mãe Maria Consoladora que sempre me apoiaram e me ensinaram a valorizar o estudo, como forma de crescimento pessoal e profissional.

Ao meu esposo Jeberson, 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 Obrigada!

"Não me sinto obrigado a acreditar que o mesmo Deus que nos dotou de sentidos, razão e intelecto, pretenda que não os utilizemos."

(Galileu Galilei)

RESUMO GERAL

A alface é uma cultura de grande importância econômica e social, sendo cultivada e consumida em várias regiões do mundo. O cultivo da alface é realizado com a utilização de sementes, para isso, se faz necessário, sementes de alta qualidade fisiológica. No entanto, sementes de alface apresentam sensibilidade a altas temperaturas, com manifestação de dormência quando estão embebidas sob tal condição. Os fatores ambientais e internos como os fitormônios são responsáveis pela regulação das características de germinação e dormência nas sementes, sendo que a presença e a interação entre os fitormônios podem definir o grau de dormência e a habilidade de germinação em condições adversas. Essas características são adquiridas ao longo do desenvolvimento e podem acentuar ou diminuir após a maturação das sementes. O desequilíbrio hormonal entre inibidores de germinação e promotores de crescimento é a principal causa da indução ou superação da dormência de sementes. Estudos com aplicação exógena desses fitormônios têm sido realizados para entender o papel de cada fitormônio durante a germinação, porém ainda carece estudos em nível molecular para melhor compreender a atuação desses fitormônios durante o desenvolvimento de sementes e germinação. Com isso, objetivou-se analisar a expressão dos genes *LsNCED*, *LsGA₃ox1* e *ACO-B* ligados à rota biossintética do ácido abscísico, giberelina e etileno respectivamente, durante o desenvolvimento, germinação e dormência de sementes de alface por meio da técnica *quantitative real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Para isso, no primeira fase utilizaram-se sementes das cultivares Everglades, Grand Rapids, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Colorado e Regina 71, colhidas em quatro estágios de maturação (5, 10, 15 e 20 dias após a antese - DAA). Concluiu-se que, a expressão do gene *LsNCED* está relacionada com a imposição da dormência nos estágios finais do desenvolvimento; a expressão do gene *LsGA₃ox1* se dá nos estágios iniciais do desenvolvimento; a expressão do *ACO-B* é observado em maior frequência nos estágios iniciais (5 DAA) e tardios (20 DAA) durante o desenvolvimento, induzindo a germinação. O perfil de expressão dos genes *LsNCED*, *LsGA₃ox1* e *ACO-B* é dependente da cultivar. No segundo experimento, a expressão dos mesmos genes foi analisada em sementes germinadas e dormentes. Concluiu-se que, expressão do gene *LsNCED* se dá em sementes dormentes e está ligado à imposição da dormência em sementes de alface; a expressão do gene *LsGA₃ox1* é maior em sementes germinadas. O gene *ACO-B* se expressa de forma diferente nas sementes germinadas e dormentes dependendo do genótipo, indicando ações mistas nas diferentes características. Além disso, a sensibilidade aos fitormônios parece ser mais importante que o nível de expressão dos genes *LsNCED*, *LsGAox* e *ACO-B* entre as cultivares.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*, fitormônios, dormência

GENERAL ABSTRACT

Lettuce is a crop of great economic and social importance, and is cultivated and consumed in various regions of the world. The lettuce cultivation is accomplished with the use of seeds, for this, it is necessary, seeds of high physiological quality. However, lettuce seeds show sensibility to high temperatures, with dormancy expression when they are embedded on this condition. The environmental and internal factors such as phytohormones are responsible for regulating the characteristics of germination and seed dormancy, and the presence and interaction among the phytohormones can define the degree of dormancy and germination ability in adverse conditions. These characteristics are acquired during development and may increase or decrease after seed maturation. The hormonal imbalance between germination inhibitors and growth promoters is the main cause of inducing or overcoming seed dormancy. Studies with exogenous application these phytohormones have been conducted to understand the role of each phytohormone during seed germination, but still lacks studies on the molecular level to understand better the act of these phytohormones during seed development and germination. Thus, the objective was to analyze the genes expression *LsNCED*, *LsGA₃ox1* and *ACO-B* connected to the biosynthetic pathway of abscisic acid, gibberellin and ethylene respectively, during development, germination and dormancy of lettuce seeds by means quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique. For this, in the first stage were used seeds of the from cultivars Everglades, Grand Rapids, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Colorado e Regina 71, harvested at four maturation stages (5, 10, 15 and 20 days after anthesis - DAA.) It was concluded that gene expression *LsNCED* is related to the dormancy imposition in the final stages of development; *LsGA₃ox1* gene expression occurs in the early stages of seed development, the *ACO-B* expression is observed a higher frequency at the early stages (5 DAA) and late (20 DAA) during development, inducing germination. The genes expression profile *LsNCED*, *LsGA₃ox1* and *ACO-B* is dependent on the cultivate. In the second experiment, the expression of same genes was analyzed in seeds germinated and dormant. It was concluded that gene expression *LsNCED* occurs in dormant seeds and is connected to the imposition of dormancy in lettuce seeds; *LsGA₃ox1* gene expression is highest in seeds germinated. The *ACO-B* gene expressed at a different way in the germinated seeds and dormant, depending on the genotype, indicating mixed actions on different characteristics. Furthermore, sensibility to phytohormones appears to be more important than the gene expression level *LsNCED*, *LsGAox* and *ACO-B* among the cultivars.

Keywords: *Lactuca sativa*, phytohormone, dormancy

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Sequências dos oligonucleotídeos sintetizados especificamente para amplificar os genes ligados a biossíntese de ABA, GA, ET e genes de referência.....	47
Figura 1	Porcentagens de germinação e sementes dormentes de alface, cultivar Everglades, Grand Rapids, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, durante quatro épocas de desenvolvimento (5, 10, 15 e 20 dias após antese – DAA)	54
Figura 2	Perfil da expressão por <i>qRT-PCR</i> de <i>LsNCED</i> , em sementes de sete cultivares de alface, sendo quatro estágios de desenvolvimento (5, 10, 15, 20 dias após a antese –DAA)	55
Figura 3	Perfil da expressão por <i>qRT-PCR</i> de <i>LsGA3ox1</i> , em sementes de alface, cultivar Everglades, Grand Rapids, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, sendo quatro estágios de desenvolvimento (5, 10, 15, 20 dias após a antese –DAA)	56
Figura 4	Perfil da expressão por <i>qRT-PCR</i> de <i>ACO-B</i> , em sementes de alface, cultivar Everglades, Grand Rapids, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, sendo quatro estágios de desenvolvimento (5, 10, 15, 20 dias após a antese –DAA)	58

CAPÍTULO 3

Figura 1	Porcentagens de germinação e sementes dormentes de alface, cultivar Everglades, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, sob três temperaturas (20, 30 e 35°C).....	80
Figura 2	Perfil da expressão relativa por <i>qRT-PCR</i> de <i>LsNCED</i> , em sementes germinadas e dormentes de alface das cultivares Everglades, Colorado, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Regina.....	83
Figura 3	Perfil da expressão relativa por <i>qRT-PCR</i> de <i>LsGA3ox1</i> , em sementes germinadas e dormentes de alface das cultivares Everglades, Colorado, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Regina.....	84
Figura 4	Perfil da expressão relativa por <i>qRT-PCR</i> de <i>ACO-B</i> , em sementes germinadas e dormentes de alface das cultivares Everglades, Colorado, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Regina.....	86

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	15
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.2	Desenvolvimento de sementes	20
2.3	Biossíntese do ácido abscísico, giberelina e etileno	22
2.4	Influências de fatores ambientais	24
2.5	Germinação e dormência	26
2.6	Análise da expressão gênica	28
	REFERÊNCIAS	30
	CAPÍTULO 2 Expressão de genes associados à rota biossintética do ácido abscísico, giberelina e etileno durante o desenvolvimento de sementes de alface	38
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1	Material vegetal	45
2.2	Teste de germinação	46
2.3	Genes analisados	46
2.4	Extração do RNA total	47
2.5	Tratamento com DNase e síntese de cDNA	48
2.6	qRT-PCR	49
2.7	Análise dos dados	51
3	RESULTADOS	52
4	DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63

	CAPÍTULO 3 Expressão de genes associados à rota biossintética do ácido abscísico, giberelina e etileno na germinação de sementes de alface	68
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1	Teste de germinação	74
2.2	Genes avaliados	75
2.3	Extração do RNA total	75
2.4	Tratamento com DNase e síntese de cDNA	76
2.5	<i>qRT-PCR</i>	77
2.6	Análise dos dados	79
3	RESULTADOS	80
4	DISCUSSÃO	87
5	CONCLUSÕES	91
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
	REFERÊNCIAS	94

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Alface (*Lactuca sativa* L.) é uma importante olerícola cultivada comercialmente em várias regiões do mundo e em grande variedade de ambientes. Entre as hortaliças folhosas, é a mais importante economicamente para o Brasil, sendo ainda uma cultura de grande importância social na agricultura familiar e para a alimentação humana. O mercado de sementes de alface movimentou 22,9 milhões de reais em 2009, atendendo uma área cultivada de aproximadamente 51 mil ha em 2008, sendo as regiões Sul e Sudeste do Brasil as maiores produtoras da hortaliça (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS - ABCSEM, 2011).

A cultura da alface é anual e condições ambientais com dias longos e temperaturas elevadas podem favorecer o florescimento precoce. Dias curtos e temperatura amenas ou baixas, geralmente favorecem a etapa vegetativa do ciclo da maioria das cultivares. Porém, a ocorrência de temperaturas mais elevadas acelera o ciclo da cultura e, dependendo do genótipo, pode resultar em plantas menores, porque o pendoamento ocorre mais precocemente (FILGUEIRA, 2003). Devido à sensibilidade a altas temperaturas, o cultivo da alface é limitado nas regiões quentes, diminuindo o desempenho das sementes e reduzindo a oferta em determinadas épocas do ano.

As sementes de alface também se mostram sensíveis a altas temperaturas. Quando são expostas a essa condição durante a embebição, pode ocorrer uma inibição temporária (termoinibição) ou completa da germinação (termodormência) (KOZAREWA et al., 2006). A intensidade da dormência é regulada principalmente pelo genótipo. Porém, estudos têm demonstrado que além do genótipo, a temperatura durante a produção das sementes pode

contribuir para a imposição ou superação da termodormência (CONTRERAS; BENNETT; TAY, 2009).

A luz é mais um fator ambiental que pode influenciar no desempenho de sementes de alface. A duração do dia e a qualidade da luz (comprimento de onda) podem influenciar nas características adquiridas ao longo do desenvolvimento da semente (BASKIN; BASKIN, 1998; CONTRERAS et al. 2009; FENNER, 1991). Isto acontece devido à influência desses fatores ambientais nos mecanismos endógenos das sementes através da regulação da biossíntese e catabolismo de diferentes fitormônios, em distintas fases de desenvolvimento e durante a germinação das sementes. Dessa forma, a interação entre fatores ambientais e os fatores endógenos é que determina os níveis de dormência das sementes.

O ácido abscísico (ABA) é apontado como principal inibidor da germinação, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento, impedindo assim a germinação precoce. Já a classe das giberelinas (GA) atuam antagonicamente ao ABA, promovendo a germinação das sementes (CADMAM et al., 2006; KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005). Também tem sido sugerida a participação do etileno (ET) em múltiplas respostas hormonais, interagindo com a giberelina na promoção da germinação e/ou inibindo a ação do ABA, induzindo a superação da dormência (GHASSEMIAN et al., 2000; IGLESIAS-FERNÁNDEZ; MATILLA, 2010).

A complexidade das respostas hormonais e suas sobreposições funcionais sustentam a ideia de intensas interações entre as sinalizações hormonais (RAZEM; BARON; HILL, 2006; WEISS; ORI, 2007). Essas interações entre ET, GA e ABA pareceu ocorrer em *Arabidopsis* (DE GRAUWE et al., 2005, 2008), mas precisa ser melhor investigada durante o desenvolvimento e germinação de sementes.

Com isso, o objetivo neste trabalho foi analisar a expressão de genes ligados à biossíntese do ácido abscísico, giberelina e etileno durante o desenvolvimento, germinação e dormência de sementes de alface, por meio da técnica de *quantitative real time polymerase chain reaction - qRT PCR*.

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 alface é adaptada a temperaturas amenas, sendo que a ideal para o desenvolvimento está na faixa de 15,5 e 18,3°C, apesar de tolerar temperaturas entre 26,6 a 29,4°C, por alguns dias, desde que as temperaturas noturnas sejam baixas (SANDERS, 2006). Temperaturas acima de 20°C induzem o florescimento precoce, antecipando a colheita (VIGGIANO, 1990). O pendoamento precoce provoca o alongamento do caule, reduz o número de folhas, afeta a formação da cabeça comercial e estimula a produção de lactonas a qual confere sabor amargo na folha (COCK et al., 2002) o que prejudica a produção da folhosa em regiões com temperaturas elevadas. Além da temperatura, o fotoperíodo também pode influenciar no cultivo da alface, com dias curtos favorecendo a fase vegetativa e dias longos favorecendo o florescimento (CONTRERAS et al., 2009).

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 (RYDER,1999; VIGGIANO,1990). 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).

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

2.2 Desenvolvimento de sementes

Durante o desenvolvimento das sementes, os diferentes processos metabólicos que ocorrem nos tecidos (cobertura protetora, endosperma e embrião) contribuem para o desempenho das mesmas (DUBREUCQ et al., 2010) que depende de um rígido controle durante a morfogênese do embrião, maturação e germinação (SANTOS-MENDOZA et al., 2008).

O desenvolvimento da semente é dividido em duas fases principais: desenvolvimento do embrião e endosperma (ou morfogênese) e maturação das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994; GUTIERREZ et al., 2007). Embriogênese começa com a formação do zigoto e termina na fase coração, quando todas as estruturas do embrião já estão formadas. Isso é seguido por uma fase de desenvolvimento do saco embrionário. No final da fase de crescimento do embrião, as divisões celulares cessam (RAZ; BERGERVOET; KOORNNEEF, 2001), quando começa então a fase de maturação.

A primeira fase da maturação das sementes é caracterizada por um período de acumulação de reservas de substâncias, incluindo a reorganização metabólica e síntese de compostos de armazenamento, como amido, proteínas de armazenamento e ácidos graxos. No momento em que se observa o máximo peso seco, que ocorre no final da fase de expansão, é chamado de ponto de maturidade fisiológica (PMF). O PMF representa um marco importante no

desenvolvimento da semente, porque tem sido proposto como o momento em que as sementes atingem máximo desempenho (BLACK; BEWLEY; HALMER, 2006; TEKRONY; EGLI, 1997).

Posteriormente, uma grande perda de água leva à aquisição de tolerância à desidratação nas sementes consideradas ortodoxas (toleram desidratação). Paralelamente, a iniciação e o estabelecimento de dormência seguem durante as duas fases de maturação das sementes. Assim, aquisição da tolerância à dessecação é altamente associada com a dormência, permitindo a manutenção da viabilidade do embrião na fase latente. A dormência das sementes é máxima no estágio final da maturação, mas depois diminui durante o armazenamento, na fase pós-maturação (ANGELOVICI et al., 2010; FINKELSTEIN et al., 2008; HOLDSWORTH; BENTSINK; SOPPE, 2008; KARSSSEN et al., 1983).

Sementes maduras contêm um grande número de espécies de mRNA, que são principalmente associados com o metabolismo, a síntese proteica e degradação, e assim fornecem transcrições importante para estágios iniciais de germinação (NAKABAYASHI et al., 2005).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que desempenha um papel crucial durante o desenvolvimento da semente, especialmente durante a maturação (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002; MCCARTY, 1995). Os níveis de ácido abscísico (ABA) variam ao longo da maturação da semente, sendo observados altos índices nos estágios iniciais, suprimindo a germinação precoce e regulando a expressão do gene. Nessa fase do desenvolvimento da semente (maturação precoce), quando ocorre o crescimento do embrião e desenvolvimento das sementes, o acúmulo de muitos compostos de armazenamento na semente tem sido associado a um aumento do teor de ABA (FINKELSTEIN, 2004). Na fase final de desenvolvimento (maturação tardia), ocorre a redução dos níveis de ABA, momento em que as sementes adquirem tolerância à dessecação e tornam-se quiescentes (MCCARTY, 1995). Com isso,

mesmo com a redução dos níveis de ABA endógeno, a dessecação garante a dormência das sementes e serve de limite entre maturação e germinação (KANNO et al., 2010).

Outros hormônios, além de ABA estão envolvidos em processos de desenvolvimento e interações hormonais em relação à dormência das sementes e germinação (FINKELSTEIN, 2004; FINKELSTEIN et al., 2008). As giberelinas são necessárias durante a embriogênese (SINGH et al., 2002), porém, em fases posteriores da embriogênese, sua síntese é reduzida concomitantemente com a imposição da dormência. A biossíntese novamente de giberelinas é imprescindível durante a germinação das sementes. Em mutantes de *Arabidopsis* deficientes na biossíntese de GA, foram observados baixos índices de germinação (FINKELSTEIN et al., 2008). A regulação da biossíntese das giberelinas ocorre devido às interações com outros hormônios vegetais, tais como ABA, etileno e auxina (CURABA et al., 2004).

A ação do ABA é oposta a ação da GA e ambos podem ser influenciados pela presença do etileno (ET). Possivelmente, o etileno interfere com a capacidade do ABA para estabelecer a dormência das sementes (GHASSEMIAN et al., 2000), ou ainda, dependendo do desenvolvimento e estímulos ambientais, ET e GA podem ter efeitos aditivos ou sinérgicos, ou seja, um hormônio aumenta a capacidade de resposta do outro, induzindo a superação da dormência e promovendo a germinação (DE GRAUWE et al., 2008; SAIBO et al., 2003; VRIEZEN et al., 2004).

2.3 Biossíntese do ácido abscísico, giberelina e etileno

Ácido abscísico é um fitormônio vegetal que desempenha um papel crucial durante o desenvolvimento da semente, especialmente durante a maturação (FINKELSTEIN et al., 2002). Está envolvido na regulação de vários

processos fisiológicos dos vegetais, como a dormência das sementes, germinação, senescência, e respostas adaptativas ao estresse ambiental (SEILER et al., 2011).

A biossíntese de ABA ocorre nos plastídeos com exceção das duas últimas etapas onde o xanthoxin é convertido em ABA no citosol (MARIN et al., 1996; SEO; KOSHIBA, 2002). A primeira etapa da biossíntese do ABA é a conversão de zeaxantina em violaxantina, um processo de epoxidação de duas etapas com a participação da zeaxantina epoxidase (ZEP/AtABA1) (AUDRAN et al., 2001; MARIN et al., 1996). A próxima etapa é a conversão de violaxantina a 9-cis-violaxantina ou 9-cis-neoxantina, porém ainda não se tem conhecimento de qual é a enzima envolvida. A 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (NCED) catalisa o próximo passo, a clivagem oxidativa de 9-cis-violaxantina e / ou 9-cis-neoxantina para produzir xantoxal. Essa reação é considerada a principal etapa, sendo limitante na produção de ABA (CHERNYS; ZEEVAART, 2000; IUCHI et al., 2001; QIN; ZEEVAART, 2002). A seguir, o xantoxal é exportado para o citosol, onde é convertido para aldeído abscísico por uma desidrogenase/reductase de cadeia curta (SDR/AtABA2) (CHENG et al., 2002; GONZÁLEZ-GUZMAN et al., 2002). O aldeído abscísico é então oxidado a ABA pela enzima aldeído oxidase (AAO / AO) (SEO et al., 2006).

A atuação do ABA é essencial durante o desenvolvimento das sementes, porém a presença de outros fitormônios como a GA e o ET parece regular a biossíntese do ABA ou inibir sua ação em determinados estágios de desenvolvimento e condições ambientais.

As Giberelinas são essenciais durante o processo de germinação das sementes, mas também atuam em outras fases do desenvolvimento e maturação das sementes. As GAs biologicamente ativas, tais como GA₁ e GA₄, são diterpenoides tetracíclicos que são biossintetizadas a partir do geranyl-geranyl

difosfato (GGDP), um precursor comum dos diterpenoides. A via biossintética do GA pode ser dividida em três fases: na primeira etapa ocorre nos plastídios, onde o difosfato geranyl-geranyl é convertido a ent-kaureno, através das enzimas ent-copalil difosfato sintase (CPS) e ent-kaureno sintase (KS). Em seguida, o ent-kaureno é oxidado a GA₁₂ pela citocromo P450 monooxigenase P450 e ent-kaureno oxidase (KO) e, finalmente, GA₁₂ é convertido em GA ativo no citosol pela oxidação do C-20 e C-3 pela GA 20-oxidase (GA20 ox) e GA 3-oxidase (GA3 ox) (OLSZEWSKI; SUN; GUBLER, 2002; TOH et al., 2008).

Outro fitormônio muito estudado em sementes é o ET, com as funções de estimular a germinação e superação da dormência em muitas espécies (ABELES; MORGAN; SALTVEIT JÚNIOR, 1992; ESASHI, 1991). A biossíntese do etileno em plantas ocorre pela conversão de S-adenosilmetionina para ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) via ACC sintase (ACS) e do ACC para etileno via ACC oxidase (ACO). A conversão de S-adenosilmetionina para ACC pelo ACS é o passo limitante da produção de etileno, sendo que os dois genes que codificam a ACS (LsACS1 e LsACS2) têm sido relatados em alface (TAKAHASHI et al., 2003).

2.4 Influências de fatores ambientais

Fatores ambientais, eventualmente, podem influenciar níveis relativos de fitormônios como o ácido giberélico (GA) e ácido abscísico (ABA) bem como interferir nos diferentes aspectos da qualidade das sementes, incluindo a germinabilidade, dormência, tamanho e a composição química (BASKIN; BASKIN, 1998; GUTTERMAN, 2000; PISKUREWICZ et al., 2008). Dentre os vários fatores ambientais que podem interferir no desempenho das sementes, a temperatura pode ter grande influência nos eventos de germinação e dormência, provavelmente regulando a biossíntese de alguns fitormônios. Toh et al. (2008)

observaram que GAs bioativos permanecem em níveis baixos quando sementes de *Arabidopsis* foram expostas a altas temperaturas, causando dormência nas sementes. Presumivelmente, isso acontece devido à supressão de genes que codificam as GA₂₀-oxidases (GA₂₀OX₁, GA₂₀OX₂ e GA₂₀OX₃) e GA₃-oxidase (GA₃OX₁ e GA₃OX₂). Por outro lado, tem sido observado que a altas temperaturas durante o desenvolvimento de sementes de alface, são geralmente associados com níveis mais baixos de dormência (CONTRERAS et al., 2009). Essas respostas poderiam ser devido à redução da síntese de compostos inibitórios em altas temperaturas, como ácido abscísico, ou maior síntese de substâncias promotoras de germinação, como exemplo a giberelina (NASCIMENTO, 2000).

A luz é outro fator ambiental que afeta o desempenho das sementes de alface durante o desenvolvimento. Contreras et al. (2009) observaram que sementes de alface produzida sob dias curtos (8h - luz fluorescente) se apresentaram com reduzida termoinibição e fotodormência, quando comparadas com sementes produzidas sob dias longos (4h de luz incandescente + 8h luz fluorescente + 4h de luz incandescente). De acordo com o autor, os efeitos dos tratamentos de duração de dia parecem ocorrer no final do desenvolvimento, após o ponto de maturidade fisiológica das sementes, sugerindo a presença de mecanismos internos que ocorrem durante a maturação, associados aos fatores ambientais sob os quais as sementes são produzidas e que interfere diretamente no desempenho das sementes.

Assim, características como a habilidade de germinação ou a dormência, dentre outros atributos de qualidade, são influenciados pela interação das condições ambientais durante a produção das sementes pelos diferentes mecanismos internos envolvidos em cada processo metabólico e nas diferentes fases do desenvolvimento da semente.

Alguns estudos tem mostrado a influência da luz na ação do ABA com implicações na germinação e dormência de sementes de alface. Uma análise

genética de um acesso (UC96US23) derivado do cruzamento de *L. serriola* com *L. sativa* cv. Salinas, identificou um *locus* de característica quantitativa (QTL) para altas temperaturas (Htg6.1) (ARGYRIS et al., 2005, 2008). Também foi identificado um membro da família de genes NCED em alface (*LsNCED4*) que é regulado por fitocromo, sendo induzido por luz vermelha distante e reprimido pela luz vermelha (SAWADA et al., 2008). O *LsNCED4* foi localizado no mapa da mesma região genética como Htg6.1 e é induzido por embebição em alta temperatura em genótipos suscetíveis para termoinibição, resultando em elevado conteúdo de ABA nas sementes e com isso, impedindo a germinação nessas condições (ARGYRIS et al., 2008).

Os altos níveis de ABA durante a germinação podem estar associados com baixos níveis de outros reguladores que promovem a germinação, como é o caso do etileno. Nascimento, Cantliffe e Huber (1998) observaram que genótipos termotolerantes de alface produziram mais etileno durante a germinação das sementes sob temperaturas altas do que os termosensitivos.

A biossíntese e catabolismo da GA também podem variar de acordo com as condições ambientais, as quais as sementes são expostas. Argyris et al. (2008) também observaram que a expressão de *LsGA3ox1* aumenta durante a embebição na presença de luz, porém é reprimido em sementes de alface embebidas em altas temperaturas, possivelmente através da ação inibitória do ABA (SAWADA et al., 2008; TOH et al., 2008).

2.5 Germinação e dormência

Existem vários tipos de dormência, que podem ser classificadas com base nos componentes que inibem a germinação: embrião (endógenos) e tegumento da semente, assim como o endosperma, perisperma, entre outros (exógenos); nas condições ambientais em que se apresentam: fotodormência

(ausência de luz), termodormência (temperaturas altas) dentre outros tipos (HILHORST; KARSSSEN, 1992).

Dormência endógena é o tipo mais comum de dormência encontrada em sementes e acredita-se que é geralmente regulada pela existência de inibidores de crescimento, promotores ou ainda o equilíbrio entre eles (COPELAND; MCDONALD, 2001; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

A dormência é observada em sementes de alface quando são expostas às altas temperaturas que causam a termoinibição (temporária) ou termodormência (permanente); e ausência de luz que causa a fotodormência. Ambas comumente afetam a velocidade e uniformidade de germinação de muitos genótipos (NASCIMENTO, 2003; RYDER, 1999). Os níveis de termoinibição e fotodormência em sementes têm sido observados não só entre os genótipos, mas também entre lotes de sementes de um mesmo genótipo, indicando um amplo efeito das condições ambientais nas quais as sementes são produzidas (CONTRERAS et al., 2009; KOZAREWA et al., 2006).

Nos últimos anos, têm sido realizadas pesquisas para melhor compreensão dos reguladores de crescimento ligados à imposição ou superação da dormência. Entre os compostos estudados, o ácido abscísico (ABA) parece ser o principal componente atuando na indução da dormência em sementes, devido a sua presença ou ação inibitória ao crescimento do embrião. Os estudos também sugerem que a giberelina (GA) é um promotor da germinação (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005). Isso tem sido observado, por exemplo, em linhas de *Arabidopsis* e tomate deficientes em GA, que não são capazes de germinar sem a adição externa desse componente (NI; BRADFORD, 1993; TESNIER et al., 2002) ou ainda com a aplicação de inibidores da síntese de GA, tais como paclobutrazol, inibindo a germinação (STEINBACH; BENECH-ARNOLD; SÁNCHEZ, 1997; WHITE et al., 2000; WHITE; RIVIN, 2000).

Adicionalmente, alguns estudos sugerem que a dormência de sementes é determinada pelo equilíbrio entre ABA e GA, durante o desenvolvimento da semente (CADMAN et al., 2006). Parece que a dormência das sementes e o controle da germinação são controlados pela relação de ABA: GA, em vez de apenas um componente hormonal (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

Tendo em vista que existem diferentes mecanismos endógenos que se manifestam de formas distintas, de acordo com a temperatura, induzindo a dormência ou capacidade de germinação em sementes de alface, é de grande importância o estudo desses mecanismos.

2.6 Análise da expressão gênica

Atualmente, avançadas técnicas vêm sendo utilizadas na Biologia Molecular, com aplicação em plantas, e especificamente em sementes. Essas técnicas são desenvolvidas a partir da pesquisa básica em diferentes campos da atividade científica e são de grande importância para auxiliar no entendimento de processos biológicos importantes como a identificação de vias bioquímicas, de sinalização e níveis de transcrição integrados no funcionamento da célula.

Nos últimos anos, o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (*PCR- Polymerase Chain Reaction*), foi muito importante na evolução dos estudos em técnicas moleculares. Esse método, caracterizado pela clonagem *in vitro*, foi proposto por Kary Mullis em 1984 (MULLIS; FALLOONA, 1987). A técnica de *PCR* é uma metodologia poderosa para a amplificação, *in vitro*, de sequências de DNA usando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de sequência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo, em ciclos repetidos. Com o uso da tecnologia de *PCR*, pequenos

fragmentos de DNA podem ser seletivamente amplificados em alguns milhões de vezes, em poucas horas (MULLIS, 1991).

Com a ampliação de novas tecnologias, a técnica de *PCR* foi aprimorada, visando proporcionar resultados mais rápidos através da nova técnica de *qRT-PCR*, também chamado *PCR* em tempo real. O *qRT-PCR* é baseado no processo de transcrição reversa seguida das reações em cadeia de DNA-polimerase com a incorporação de moléculas fluorescentes covalentes ligadas ou não a nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação. Os produtos formados são monitorados a cada ciclo, o que permite a mensuração rápida e precisa dos produtos formados. É considerada a técnica mais sensível e específica na análise de transcritos (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004).

A *qRT-PCR* é de grande importância no aperfeiçoamento dos conhecimentos na era pós-genômica, sendo utilizada principalmente na mensuração da expressão de genes, validação de experimentos de microarranjos e monitoramento de biomarcadores (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008) e tem sido empregada com sucesso na análise da expressão de vários genes relacionados aos diferentes processos fisiológicos de sementes de plantas-modelo como a *Arabidopsis* e alface (ARGIRIS et al., 2008; BARRERO et al., 2010; DAVE et al., 2011; HUNDERTMARK et al., 2011; SAWADA et al., 2008).

REFERÊNCIAS

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT JÚNIOR, M. E. **Ethylene and plant biology**. 2nd ed. San Diego: Academic, 1992.

ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 211–218, 2010.

ARGYRIS, J. et al. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 148, p. 2 926-947, Oct. 2008.

ARGYRIS J. et al. Quantitative trait loci associated with seed and seedling traits in *Lactuca*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 1365–1376, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS. **Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças: ano calendário 2008**. 2011. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/docs/pesquisa_mercado_2008.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2012.

AUDRAN, C. et al. Localization and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in *Arabidopsis* in response to drought stress and during seed development. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 1161-1173, 2001.

BARRERO, J. M. et al. Gene expression profiling identifies two regulatory genes controlling dormancy and ABA sensitivity in *Arabidopsis* seeds. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 611–622, 2010.

BASKIN, C. C.; J. M. BASKIN. **Seeds, ecology, biogeography, and evolution of seed dormancy and germination**. San Diego: Academic, 1998.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994.

BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. **The encyclopedia of seeds: science, technology and uses**. Wallingford: CAB International, 2006.

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

CHENG, W. H. et al. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 11, p. 2723–2743, Nov. 2002.

CHERNYS, J. T.; ZEEVAART, J. A. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 124, n.1, p. 343-53. Sept. 2000.

COCK, W. R. et al. Biometrical analysis of phosphorus use efficiency in lettuce cultivars adapted to high temperatures. **Euphytica**, Wageningen, v. 126, n. 133, p. 299-308, 2002.

CONTRERAS, S.; BENNETT, M. A.; TAY, D. Temperature during seed development affects weight, germinability and storability of lettuce seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 37, n. 2, p. 398-412, July 2009.

CONTRERAS, S. et al. Red to Far-red Ratio During Seed Development Affects Lettuce Seed Germinability and Longevity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 1, p. 130-134, Feb. 2009.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. Boston: Kluwer Academic, 2001.

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

CURABA, J. et al. AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 136, p. 3660-3669, 2004.

DAVE, A. et al. 12-Oxo-Phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 2, p. 583-599, Feb. 2011.

DE GRAUWE, L. et al. Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the *Arabidopsis* hypocotyl. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, p. 827-836, 2005.

DE GRAUWE, L. et al. Reduced gibberellin response affects ethylene biosynthesis and responsiveness in the *Arabidopsis* gai eto2-1 double mutant. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, p. 128–141, 2008.

DUBREUCQ, D. et al. Seed development. **Plant developmental biology - Biotechnological perspectives**, Berlin, v. 1, p. 341-359, 2010.

ESASHI, Y. Ethylene and seed germination. In: MATTOO, A. K.; SUTTLE, J. C. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 133-157.

FENNER, M. The effects of the parent environment on seed germinability. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 1, p. 75- 84, 1991.

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

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

FINKELSTEIN, R. R. et al. Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI) 4 is tightly regulated post-transcriptionally. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, n. 11, p. 3971-3979, Apr. 2011.

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

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S.; ROCK C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 15–45, 2002. Suppl.

FINKELSTEIN, R. R. The role of hormones during seed development and germination. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 513-537.

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

GHASSEMIAN, M. et al. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 7, p. 1117–1126, July 2000.

GONZÁLEZ-GUZMÁN, M. et al. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 8, p. 1833–1846, Aug. 2002.

GUTIERREZ, L. et al. Combined networks regulating seed maturation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 294–300, July 2007.

GUTTERMAN, Y. Maternal effects on seeds during development. In: FENNER, M. (Ed.). **Seeds: the ecology of regeneration in plant communities**. New York: CABI, 2000. p. 59–84.

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.

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

HUNDERTMARK, M. et al. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 21, p. 165–173, 2011.

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

IUCHI, S. et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 325–333, Aug. 2001.

KANNO, Y. et al. Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: examination of the site of ABA Biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, p. 1988–2001, 2010.

KARSSSEN, C. M. et al. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic-acid – studies on abscisic-acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Planta**, Berlin, v. 157, p. 158–165, 1983.

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, p. 564-570, 2006.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v.15, p. 281-307, 2005.

MARIN, E. et al. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana glumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 15, p. 2331-2342, 1996.

MCCARTY, D. R. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 71-93, 1995.

MOTA, J. H. et al. Avaliação de cultivares de alface americana durante o verão em Santana da Vargem, MG. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 234-237, 2003.

MULLIS, K. B.; FALLOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335, 1987.

MULLIS, K. B. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 1, p. 1-4, 1991.

NAKABAYASHI, K. et al. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, p. 697–709, 2005.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Endo- β -mannanase activity and seed germination of thermosensitive lettuce genotype in response to temperature and seed priming. **HortScience**, Alexandria, v. 33, p. 542, 1998.

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. Temperatura x germinação. **Seed News**, Pelotas, v. 4, n. 4, p. 44-45, 2000.

NI, B. R.; BRADFORD, K. J. Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin, and water potential. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 101, p. 607-617, 1993.

OLSZEWSKI, N.; SUN, T. P.; GUBLER, F. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 61-80, 2002. Suppl.

PISKUREWICZ, U. et al. The Gibberellic acid signaling repressor RGL2 Inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 10, p. 2729-2745, Oct. 2008.

QIN, X.; ZEEVAART, J. A. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 128, n. 2, p. 544-51, Feb. 2002.

RAZ, V.; BERGERVOET, J. H.; KOORNNEEF, M. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 2, p. 243-252, Jan. 2001.

RAZEM, F. A.; BARON, K.; HILL, R. D. Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 454-459, 2006.

RYDER, E. J. **Lettuce, endive, and chicory**. Wallingford: CABI, 1999.
SAIBO, N. et al. Growth and stomata formation of *Arabidopsis* hypocotyls is controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 989-1000, 2003.

SANDERS, D. C. **Lettuce production**. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/hil/hil=11>>. Acesso em: 10 fev. 2012.

SANTOS-MENDOZA, M. et al. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 608–620, 2008.

SAWADA, Y. et al. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p. 3383–3393, 2008.

SEILER, C. et al. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, n. 8, p. 2615-2632, 2011.

SEO, M. et al. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: Phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. **The Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 354–366, Nov. 2006.

SEO, M.; KOSHIBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 41-48, 2002.

SINGH, D. P. et al. Gibberellins Are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 12, p. 3133-3147, Dec. 2002.

STEINBACH, H. S.; BENECH-ARNOLD, R. L.; SÁNCHEZ, R. A. Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 113, p. 149- 154, 1997.

TAKAHASHI, H. et al. Isolation and characterization of the ACC synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.), and the involvement in low pH-induced root hair initiation. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, p. 62–69, 2003.

TEKRONY, T. M.; EGLI, D. B. Accumulation of seed vigour during development and maturation. In: ELLIS, R. H. et al. (Ed.). **Basic and applied aspects of seed biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 369-384.

TESNIER, K. H. M. et al. A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 30, p. 149- 165, 2002.

TOH, S. et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 146, n. 3, p. 1368–1385, Mar. 2008.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, Natick, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

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

VRIEZEN, W. H. et al. Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings is gibberellin dependent. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 505-516, 2004.

WEISS, D.; ORI, N. Mechanisms of cross talk between gibberellins and other hormones. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 144, p. 1240–1246, 2007.

WHITE, C. N. et al. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/ abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 122, p. 1081-1088, 2000.

WHITE, C. N.; RIVIN, C. J. Gibberellins and seed development in maize. II. Gibberellin synthesis inhibition enhance abscisic acid signaling in culture embryos. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 122, p. 1089-1097, 2000.

CAPÍTULO 2 Expressão de genes associados à rota biossintética do ácido abscísico, giberelina e etileno durante o desenvolvimento de sementes de alface

RESUMO

O desenvolvimento de sementes pode ser dividido entre morfogênese do embrião e maturação de sementes, ao mesmo tempo em que diversos genes são ligados e desligados com a finalidade de promover a realização de tais processos. Características como tolerância à dessecação, dormência e capacidade de germinação são adquiridas ao longo do desenvolvimento e maturação, e são reguladas pela presença e interação de fitôrmonios, como ácido abscísico (ABA), giberelina (GA) e etileno (ET). Nesta pesquisa, objetivou-se analisar a expressão de genes ligados à biossíntese do ABA, GA e ET durante o desenvolvimento de sementes de alface. Para isso, a expressão dos genes *LsNCED*, *LsGAox* e *ACO-B* foi avaliada em sementes das cultivares Everglades, Grand Rapids, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Colorado e Regina 71, colhidas em quatro estágios de maturação (5, 10, 15 e 20 dias após a antese) por meio da técnica de *quantitative real time polymerase chain reaction – qRT-PCR*. As sementes também foram submetidas ao teste de germinação. Pode-se concluir que, a expressão do gene *LsNCED* está relacionada com a imposição da dormência nos estágios finais do desenvolvimento; a expressão do gene *GA3ox* em alface, se dá nos estágios iniciais do desenvolvimento das sementes; O envolvimento do etileno é observado em maior frequência nos estágios iniciais (5 DAA) e tardios (20 DAA) durante o desenvolvimento, induzindo a germinação. O perfil de expressão dos genes *LsNCED*, *LsGA3ox* e *ACO-B* é dependente do genótipo.

Palavras-chave: *qRT-PCR*, maturação de sementes, expressão gênica

ABSTRACT

The seeds development can be divided among embryonic morphogenesis and seeds maturation, at the same time in that several genes are connected and disconnected in order to promote the achievement of such processes. Features such as desiccation tolerance, dormancy and germination capacity are acquired during development and maturation, and are regulated by the presence and interaction of phytohormones, such as abscisic acid (ABA), gibberellin (GA) and ethylene (ET). This research had as objective to analyze the genes expression connected to the biosynthesis of ABA, GA and ET during development of lettuce seeds. For this, the genes expression *LsNCED*, *LsGAox* and *ACO-B* was evaluated in seeds from cultivars Everglades, Grand Rapids, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Colorado e Regina 71, harvested at four maturation stages (5, 10, 15 and 20 days after anthesis) by quantitative real time polymerase chain reaction – qRT-PCR technique. The seeds were also subjected to germination tests. It can be concluded that gene expression *LsNCED* is related to the imposition of dormancy in the final development stages; *GA3ox* gene expression in lettuce, occurs in early stages of seeds development. The ethylene involvement is observed in a higher frequency in the initial stages (5 DAA) and late (20 DAA) during development, induce the germination. The genes expression profile *LsNCED*, *LsGA3ox* and *ACO-B* is dependent on genotype.

Keywords: *qRT-PCR*, seeds maturation, gene expression

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças mais importantes economicamente no Brasil. A cultura é multiplicada por sementes, de forma que sementes com alto desempenho são necessárias para seu cultivo. As sementes de alface (aquênios) são produzidas dentro da panícula que contém de 10 a 25 flores autógamas (BLACK et al., 2006), e após a autofecundação, a maturação das sementes é realizada durante os próximos 12 a 17 dias (RYDER, 1999). Durante o desenvolvimento das sementes de alface, a aquisição de atributos como germinação e dormência podem ser reguladas pela presença e atuação dos fitormônios ABA, GA e ET que vão influenciar diretamente no desempenho das sementes.

O desenvolvimento da semente em início com o processo de dupla fertilização que ocorre dentro do óvulo e termina com uma semente quiescente, nas sementes ortodoxas, a qual tem potencial para gerar uma nova planta (GOLDBERG; PAIVA; YADEGARI, 1994; RAGHAVAN, 2006). Diversos eventos ocorrem durante o desenvolvimento da semente, tais como a histodiferenciação - divisão celular, a expansão de sementes - genes expressos para a síntese de reservas (proteínas, lipídios, carboidratos) e acúmulo de reservas, e finalmente ocorre a maturação, caracterizada pela perda de água no embrião, momento em que adquire a tolerância à dessecação e se torna quiescente. Na última fase, o metabolismo é drasticamente reduzido. Concomitantemente às etapas de desenvolvimento das sementes, diversos genes são ligados e desligados com a finalidade de promover a realização de tais processos (SANTOS-MENDOZA et al., 2008).

Estudos genéticos realizados em plantas-modelo são de grande importância para conhecer genes que têm funções importantes durante o desenvolvimento das sementes e os mecanismos reguladores desses genes.

Em *Arabidopsis*, vários genes foram identificados durante o desenvolvimento da semente (DEVIC, 2008; JENIK; GILLMOR; LUKOWITZ, 2007; MEINKE et al., 2008), incluindo aqueles que governam a formação de endosperma (GEHRING; CHOI; FISCHER, 2004; HUH et al., 2008), diferenciação do embrião (BRAYBROOK; HARADA, 2008; BREUNINGER et al., 2008), e o desenvolvimento do tegumento (HAUGHN; CHAUDHURY, 2005). Além disso, os estudos moleculares com plantas de *Arabidopsis* e em outras espécies identificaram genes ligados às proteínas de armazenamento, como também, genes que desempenham um papel na sua regulação (KAWASHIMA et al., 2009; KROJ et al., 2003; MÖNKE et al., 2004).

Assim, as etapas do desenvolvimento das sementes, bem como, a sinalização de genes estão sujeitas a uma complexa rede reguladora que, em alguns casos, depende da ação de uma variedade de hormônios vegetais. Essa regulação é, geralmente, associada com mudanças nas concentrações desses hormônios, entre eles o ácido abscísico, giberelinas, etileno, auxinas e os brassinosteroides (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002).

O ABA é um hormônio vegetal que desempenha um papel crucial durante o desenvolvimento da semente, especialmente durante a maturação (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002). Dentre suas funções inclui o acúmulo de componentes de reserva, aquisição da tolerância à dessecação, indução da dormência primária e supressão da germinação precoce (KANNO et al., 2010).

Em *Arabidopsis*, foram observados maiores níveis de ABA endógeno durante estágios intermediários do desenvolvimento das sementes, momento em que suas funções são mais demandadas. Nos estágios finais do desenvolvimento, os níveis de ABA endógeno na semente tendem a diminuir gradualmente (GAZZARRINI et al., 2004). As variações dos níveis de ABA ocorrem devido à regulação da sua biossíntese, através da participação de alguns genes, dentre

eles, o ABA1, as dioxigenases 9-cis-epoxycarotenoide (NCEDs) e ABA2/GIN1/SDR1 (NAMBARA; MARION-POLL, 2005). A dioxigenase 9-cis-epoxycarotenoide (NCED) codificada pelos genes *AtNCED6* e *AtNCED9* em *Arabidopsis* tem sido apontada como a principal enzima reguladora da biossíntese do ABA no desenvolvimento de sementes (LEFEBVRE et al., 2006).

Além de ABA, outros hormônios estão envolvidos nos processos de desenvolvimento de sementes e interações hormonais em relação à dormência das sementes e germinação. As giberelinas são indispensáveis durante a embriogênese (SINGH et al., 2002) e a produção destas no embrião e, ou endosperma é necessária para a formação de sementes normais (SINGH et al., 2002; SWAIN; REID; KAMIYA, 1997). A regulação da biossíntese das giberelinas ocorre devido interações com outros hormônios vegetais, tais como ABA, etileno e auxina (CURABA et al., 2004).

Alguns estudos têm detectado a presença do etileno em diversos tecidos de sementes. Porém, há poucas evidências na literatura a respeito da função do etileno durante a maturação de sementes. Quantidades significativas de etileno foram encontradas em semente de mostarda e canola durante a embriogênese, (JOHNSON-FLANAGAN; SPENCER, 1994). Já nos estágios finais da maturação, foi observada redução dos níveis de etileno (MEAKIN; ROBERTS, 1990). Há evidências de que o etileno esteja envolvido no desenvolvimento normal do embrião (RAYS et al., 2000).

Há relatos também da interação do ET com o ABA e GA. O etileno pode agir contrariamente ao ABA, dificultando o estabelecimento da dormência em sementes (GHASSEMIAN et al., 2000) ou ainda dependendo do desenvolvimento e estímulos ambientais, ET e GA podem ter efeitos aditivos ou sinérgicos, induzindo a superação da dormência e promovendo a germinação (DE GRAUWE et al., 2008; SAIBO et al., 2003; VRIEZEN et al., 2004).

A formação de etileno em plantas ocorre através da conversão de S-adenosilmetionina para um aminociclopropano- 1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC sintase (ACS) e de ACC para etileno via ACC oxidase (ACO). A conversão de S-adenosilmetionina para ACC pelo ACS é o passo limitante da produção do etileno, e dois genes ACS (ACS1 e ACS2) foram relatados em alface (TAKAHASHI et al., 2003).

Especula-se que as ações de ABA, GA e ET sejam desencadeadas por alterações dos níveis hormonais. Assim, a análise da biossíntese do ABA, GA e ET torna-se importante para uma maior compreensão dos mecanismos de regulação e interação entre esses fitormônios nos diferentes estádios do desenvolvimento de sementes. O conhecimento do momento da atuação de fitormônios e a relação com as características como germinabilidade e dormência das sementes é importante para uma melhor compreensão dos possíveis papéis desses hormônios no desenvolvimento das sementes de alface.

Diante do exposto, objetivou-se analisar a expressão dos genes *ACO-B*, *LsNCED* e *LsGAox* ligados à biossíntese dos fitormônios ET, ABA e GA em sementes de alface colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, relacionando com germinação e dormência.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O experimento foi realizado na Estação Experimental da HortiAgro Sementes Ltda., em Ijaci (MG), e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Sete cultivares de alface, com diferentes características quanto à termossensibilidade foram utilizadas para produção de sementes: Everglades (termotolerante quanto à germinação das sementes), Grand Rapids (termossensível quanto ao florescimento), Babá de Verão (termotolerante quanto ao florescimento), Verônica (termotolerante quanto ao florescimento), Salinas 88 (termossensível quanto ao florescimento), Colorado (termossensível quanto ao florescimento) e Regina 71 (termotolerante quanto ao florescimento), sendo o cultivo realizado no inverno de 2011. As sementeiras ocorreram no mês de abril em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 128 células, utilizando-se o substrato *Plantmax*. As mudas foram transplantadas para o solo, em condições de casa de vegetação.

Após o início do florescimento, procedeu-se à marcação das flores, que foi realizada individualmente, no dia da antese. Para isso, utilizou-se linhas de cores diferentes para as diferentes datas de marcação. As coletas das sementes foram realizadas em quatro épocas: 5, 10, 15 e 20 dias após a antese, correspondendo ao estágio inicial, intermediário, ponto de maturidade fisiológica (PMF) e tardio respectivamente.

Uma porção das sementes foi armazenada em *deep-freezer* (-80°), para posterior estudo da expressão gênica e a outra porção foi destinada ao teste de germinação.

2.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes colocadas sobre duas folhas de papel *germibox*, previamente umedecidos com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel, em caixas acrílicas do tipo *gerbox*. As sementes foram levadas para a BOD à temperatura de 20°C e as avaliações realizadas aos quatro e sete dias após a semeadura, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Juntamente com o teste de germinação, as sementes dormentes foram contabilizadas aos sete dias de incubação. Para isso, as sementes que não germinaram foram pressionadas e classificadas como mortas ou dormentes, sendo consideradas dormentes, as sementes firmes e não deterioradas.

2.3 Genes analisados

Os genes candidatos relacionados à biossíntese e sinalização do ABA, GA e ET para as análises de expressão por *quantitative real time polymerase chain reaction - qRT-PCR* (tabela 1), foram selecionados a partir de um estudo realizado por Argyris et al. (2008). Também foram testados cinco genes para serem utilizados como referência (*18s1*, *ACT7*, *TUB2*, *UBC₂₁*, *PP_{2A}*) de acordo com a eficiência de amplificação e estabilidade entre os tratamentos. Os genes *UBC₂₁*, *PP_{2A}* se mostram mais estáveis e foram utilizados como genes de referência.

Tabela 1 Sequências dos oligonucleotídeos sintetizados especificamente para amplificar os genes ligados a biossíntese de ABA, GA, ET e genes de referência

Gene	Produto do gene	Sequências
<i>LsNCED4</i>	<i>L. sativa</i> dioxygenase 9-cis-epoxycarotenoide 4	F- TGATCCAGCGGTTTCAGCTAA R- TCACCAATTACCTCCAGACCAT
<i>LsGA3ox1</i>	<i>L. sativa</i> gibberellin 3 β -hydroxylase 1	F- GGTGACCTCCTCCACATATTATCC R-TGTTGGGTTCCGGTTCACCAT
<i>ACO-B</i>	ACC oxidase	F- AGCGGTCTTCAGCTTCTCAAAG R- CGAGATTGATGACGATGGAATG
<i>PP_{2A}</i>	Proteína fosfatase 2	F- TTGACGGAATCGGAGGTAATAA R- CCGGCTGCACATTCCATT
<i>UBC₂₁</i>	Ubiquitina ligase	F- TCTTAGATCACCGTCCCATCGT R-TCTGAGATTGTCCGAGGATATGAG

2.4 Extração do RNA total

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)*. Foram macerados 100 mg de sementes em nitrogênio líquido e transferidos para microtubos, juntamente com 500 μ L do reagente *Concert™* gelado (4° C) e homogeneizados em vórtex. Seguindo, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por dois minutos, à temperatura ambiente, com velocidade de 12.000 g, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de NaCl 5 M e as amostras homogeneizadas em vórtex, por cinco segundos. Na sequência, foram adicionados 300 μ L de clorofórmio e os tubos foram submetidos à inversão por 5 X. Para separar as fases, as amostras foram submetidas à centrifugação de 12.000 g, durante dez minutos, à temperatura de 4° C, e a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado um volume equivalente à fase aquosa de isopropanol gelado e homogeneizados em vórtex, durante cinco segundos. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por dez minutos e posteriormente centrifugadas por dez minutos a 4° C e 12.000

g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75%, gelado e os tubos foram submetidos à centrifugação por 1 minuto, à temperatura ambiente (12.000 g). O líquido residual foi removido do tubo com a pipeta e o RNA foi ressuspensionado em 20 µL de água ultrapura autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20° C.

Para a avaliação da integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/ml) posteriormente visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000), utilizando-se comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, observando as razões 260/280. Foram consideradas de alta qualidade, as amostras com valores entre 1,8 e 2,1. Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Diethyl pirocarbonato) e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento para inativar RNases.

2.5 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com *DNase DNA free* (Ambion), para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico que possa ter acontecido durante o processo de extração. Para obtenção de RNA livre de DNA foi utilizado 10 µg do RNA total sendo adicionados 1µL de DNase I + 10µL de tampão DNase 10x e completando a reação para 100 µL com água tratada com DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37° C por 30 min. Após esse período, foi adicionado 10 µL de acetato de potássio 2M e os tubos incubados em gelo por 15 min. Depois, realizou-se a centrifugação por 10 min. e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foram

adicionados três vezes o seu volume etanol 100% e incubado a -80°C por duas horas. Em seguida, centrifugou-se por 30 min. a 4°C a 14000rpm. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado $400\mu\text{L}$ de etanol 70%, agitando gentilmente o tubo para soltar o *pellet*. Centrifugou-se novamente por 10 min. a 4°C a 14000rpm. Logo após, o sobrenadante foi descartado e os tubos deixados abertos para secar. Então o RNA foi ressuscendido em $20\mu\text{L}$ de água DEPC.

Para verificar a pureza do RNA após o tratamento com DNase, foi realizada uma *PCR* convencional utilizando *primers* de controle endógeno. Foram consideradas livres de DNA, as amostras que não apresentavam amplificação após a *PCR*.

Para síntese de cDNA foi utilizado o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de $1\mu\text{g}$ em um volume final de $10\mu\text{L}$. Após essa etapa, foi preparado um *mix* contendo $2\mu\text{L}$ do tampão 10X da enzima, $2\mu\text{L}$ do *primer RT Random Primers 10X*, $0,8\mu\text{L}$ do mix dNTP (100 mM), $1\mu\text{L}$ *MultiScribeTM Reverse Transcriptase*, e água para um volume final de $10\mu\text{L}$ /amostra. Para cada solução preparada de $10\mu\text{L}$ de RNA a $1\mu\text{g}$, foram acrescentados $10\mu\text{L}$ desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador *Multigene Gradient Labnet*, programado com três etapas: 10 min a 25°C para o anelamento dos *primers*; 2 h a 37°C para ação da enzima e 5 min. a 85°C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20°C .

2.6 qRT-PCR

Para a análise da expressão gênica quantitativa por *qRT-PCR* foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 *Real-Time PCR (Applied Biosystems)*, utilizando o sistema de detecção *SYBR Green* e o cDNA obtido a partir de RNA

extraído de sementes em diferentes estágios de desenvolvimento. Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG* com *ROX (Invitrogen)* para um volume final 10,0 µL/amostra. A amplificação dos fragmentos foi realizada com um ciclo inicial de 2 minutos a 50°C, período de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software (Versão 2.1)*. Controles negativos e curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. Todo o experimento de *qRT-PCR*, para cada gene em estudo, foi conduzido a partir de cDNAs diferentes obtidos de cada amostra, com três replicatas técnicas para cada uma, sendo os resultados normalizados usando *CTs (Ciclo Threshold)* obtidos pela expressão dos genes de referência proteína fosfatase 2 (*PP_{2A}*) e a ubiquitina ligase (*UBC₂₁*) (ARGYRIS et al., 2008). A escolha dos controles endógenos se deu através de testes prévios de possíveis *primers*, sendo escolhidos aqueles que apresentaram menor variação entre tratamentos e cultivares.

O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (*threshold*). O método que foi usado é o do CT comparativo.

Como um dos requisitos necessários para a utilização desse método foi realizado um experimento de validação para mostrar as eficiências de amplificação dos genes-alvo e de referências. Para isso, foram realizadas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da diluição do cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 1:5. A concentração de cada *primer* utilizado foi de 1,5 µM.

A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (amostra) - ΔCT (calibrador), sendo o calibrador, uma das amostras usada como base para resultados de expressão comparativa. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.7 Análise dos dados

Os dados foram apresentados através de curvas de porcentagens acumuladas de germinação e dormência de cada tratamento, com a utilização do programa *SigmaPlot* 11.0. Os desvios-padrão foram apresentados na forma de barras para facilitar a interpretação dos dados.

Os dados da expressão relativa foram apresentados na forma de gráficos de barra. A análise dos resultados de expressão de cada gene é realizada de forma comparativa, sendo utilizada como calibrador a amostra com menor expressão para cada gene.

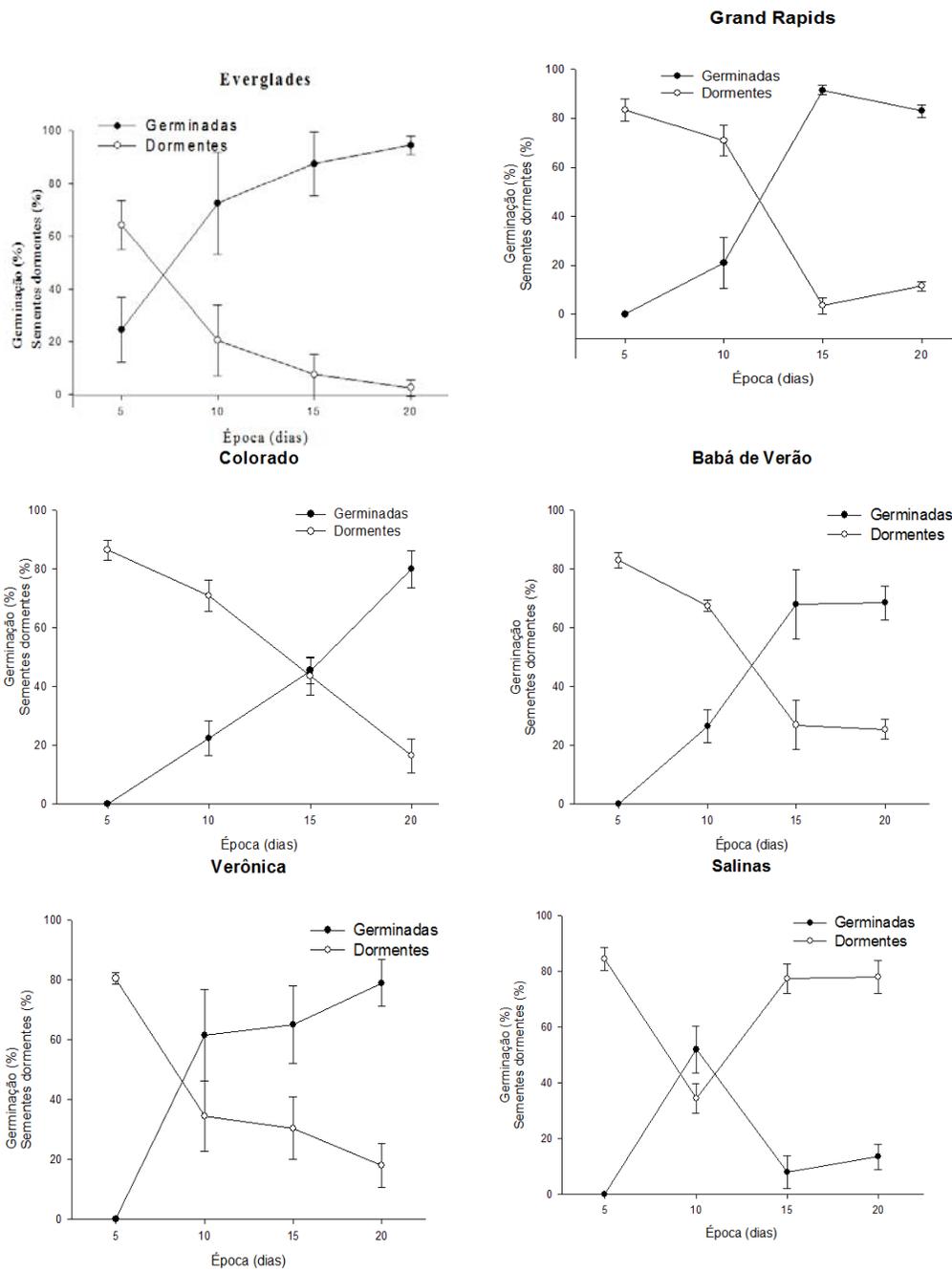
3 RESULTADOS

A germinação e dormência das sementes de alface foram analisadas durante quatro estágios de desenvolvimento, nas diferentes cultivares (Figura 1). Pode-se observar que os resultados da germinação e dormência são inversamente proporcionais ao longo do desenvolvimento das sementes.

As porcentagens de germinação das cultivares Everglades, Colorado e Verônica aumentaram ao longo do desenvolvimento, atingindo o pico aos 20 dias após a antese (DAA), aproximadamente 95% de germinação na cultivar Everglades, 85% para a cultivar Colorado e 80% na cultivar Verônica. Já as porcentagens de sementes dormentes diminuíram ao longo do desenvolvimento, com valores próximos a zero, no último estágio para todas as cultivares.

Nas cultivares Grand Rapids e Babá de Verão, são observados valores máximos de germinação aos 15 DAA (90 % e 70 %), ocorrendo uma leve redução dos valores de germinação e aumento de sementes dormentes aos 20 DAA.

Sementes das cultivares Salinas 88 e Regina 71 se comportaram de forma semelhante, com valores de germinação próximos de 50% aos 10DAA, e acentuada redução do potencial germinativo nos estágios seguintes. Já as porcentagens de sementes dormentes atingem seu pico nos últimos estágios de desenvolvimento.



“continua”

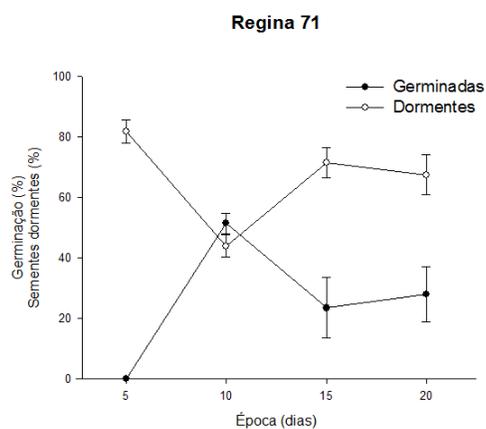


Figura 1 Porcentagens de germinação e sementes dormentes de alface, cultivar Everglades, Grand Rapids, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, durante quatro épocas de desenvolvimento (5, 10, 15 e 20 dias após antese – DAA)

Os resultados da análise quantitativa da expressão do gene *LsNCED*, ligado a biossíntese do ABA, nos diferentes estágios de desenvolvimento estão representados na figura 2. Pode-se observar uma expressão crescente do gene ao longo do desenvolvimento das sementes. Os maiores picos de expressão gênica do *LsNCED* foram encontrados nos últimos estágios, que corresponde ao ponto de maturidade fisiológica e maturação tardia. No entanto, não houve expressão no estágio inicial do desenvolvimento (5 DAA).

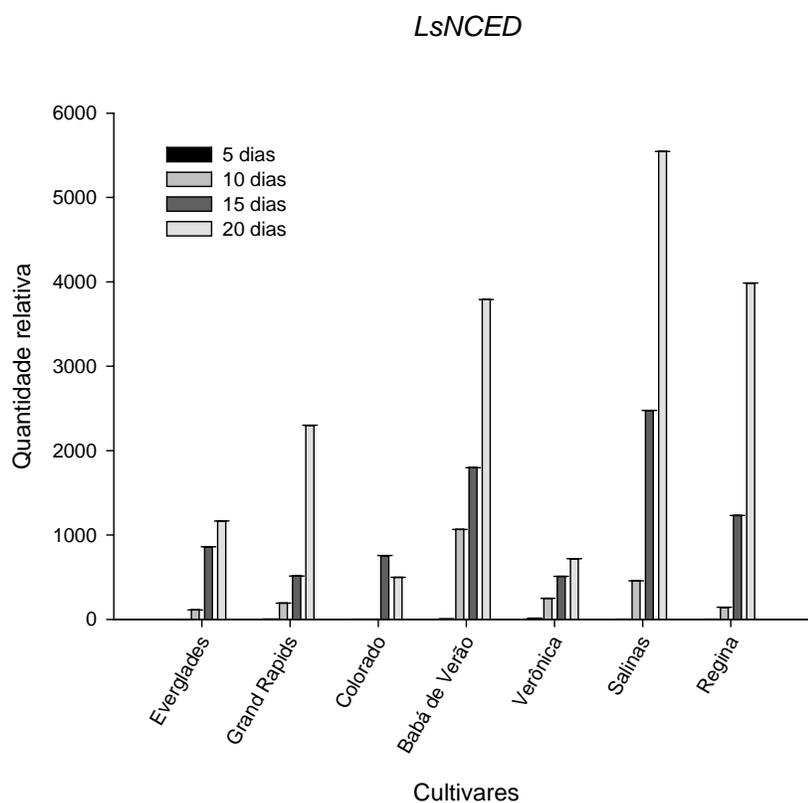


Figura 2 Perfil da expressão por *qRT-PCR* de *LsNCED*, em sementes de sete cultivares de alface, sendo quatro estágios de desenvolvimento (5, 10, 15, 20 dias após a antese –DAA)

As expressões relativas do gene *LsNCED* também variaram entre as cultivares. O maior índice de expressão foi observado na cultivar Salinas, principalmente no último estágio, onde a expressão é o dobro em relação ao ponto de maturidade fisiológica. Nas cultivares Regina e Babá de Verão os níveis de expressão relativa foram altos e semelhantes no último estágio, porém em relação ao estágio intermediário (10 DAA), pode-se observar expressão média do *LsNCED* na cultivar Babá de Verão, enquanto que na cultivar Regina, a expressão foi reduzida considerando o mesmo estágio.

Na Grand Rapids a expressão do *LsNCED* é relativamente baixa no estágio intermediário, aumentando no ponto de maturidade fisiológica e principalmente na maturação tardia, quando o índice de expressão é triplicado.

Nas cultivares Everglades, Colorado e Verônica são observados os menores níveis de expressão do *LsNCED*, sendo crescente ao longo dos estágios de maturação nas cultivares Everglades e Verônica. Na cultivar Colorado, a expressão do *LsNCED* foi apenas nos estágios 15 e 20 DAA, com índices semelhantes.

Os níveis de expressão do *LsGA3ox* foram analisados nas diferentes cultivares e estágios de desenvolvimento de sementes de alface (figura 3).

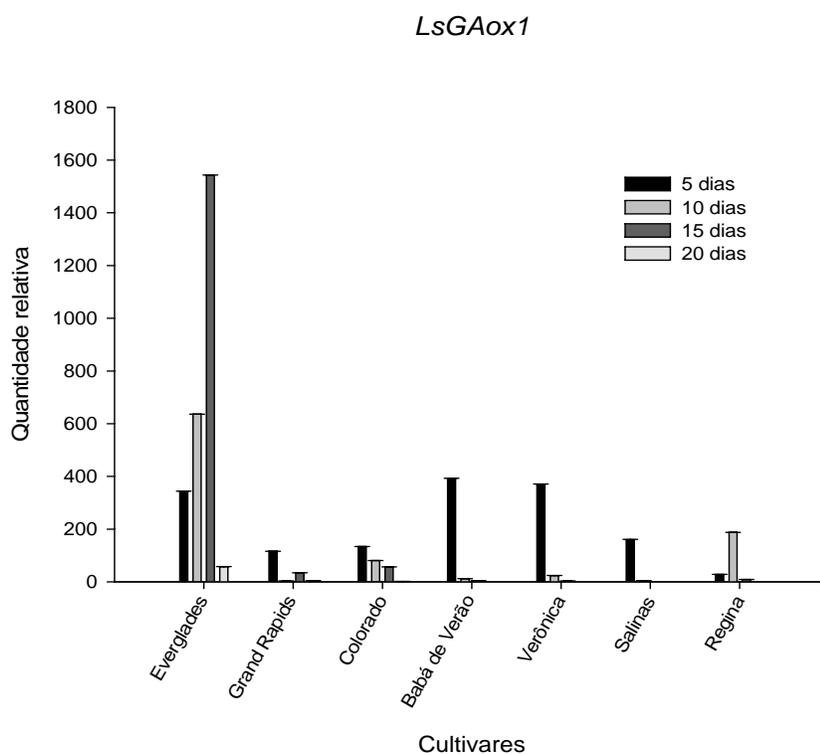


Figura 3 Perfil da expressão por *qRT-PCR* de *LsGA3ox1*, em sementes de alface, cultivar Everglades, Grand Rapids, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, sendo quatro estágios de desenvolvimento (5, 10, 15, 20 dias após a antese –DAA)

Pelos resultados, pode-se observar expressão reduzida do gene *GA3ox*, para a maioria das cultivares. Apenas na cultivar Everglades foram observados altos índices de expressão do gene, principalmente aos 15 DAA.

Com relação aos estágios de desenvolvimento, na cultivar Everglades, a expressão gênica do *LsGA3ox1* foi crescente nas três primeiras épocas, chegando ao pico no ponto de maturidade fisiológica. No entanto, no quarto estágio (maturação tardia) a expressão reduz acentuadamente.

Nas cultivares Babá de Verão, Verônica e Salinas, a expressão do *GA3ox* é observada apenas durante a embriogênese (5DAA), porém os níveis de expressão nas cultivares Babá de Verão e Verônica são semelhantes e aproximadamente o dobro da expressão da cultivar Salinas. Para a cultivar Grand Rapids é observado expressão no estágio inicial (5DAA) e reduzida no ponto de maturidade fisiológica, diferentemente, na cultivar Regina, na qual a expressão significativa é observada no estágio intermediário. Já na cultivar Colorado, observa-se expressão decrescente ao longo do desenvolvimento para os três primeiros estádios.

A ACC oxidase (*ACO*) participa da última etapa da biossíntese do ET, sendo responsável pela conversão do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (*ACC*) a etileno. Os índices de expressão do gene *ACO-B* nos diferentes estágios de desenvolvimento e genótipos estão representados na figura 4.

A expressão do gene se comporta de forma desigual para os diferentes estágios de desenvolvimento e genótipos. Na cultivar Everglades observa-se níveis consideráveis de expressão do *ACO-B* já na fase de embriogênese (5DAA) com ampliação da expressão aos 10 DAA e a partir desta fase, os níveis de expressão tendem a diminuir.

Nas cultivares Grand Rapids, Verônica, Salinas e Regina são observados comportamentos semelhantes, porém em proporções diferentes, com elevados níveis de expressão na embriogênese, redução nas fases intermediárias e

elevação no último estágio do desenvolvimento. Importante salientar que nas cultivares Grand Rapids e Regina, são observados níveis significativos expressão do gene *ACO-B* nas sementes com 5 dias de desenvolvimento.

Para as cultivares Colorado e Babá de Verão, a expressão gênica do *ACO-B* foi bastante limitada durante todo o desenvolvimento.

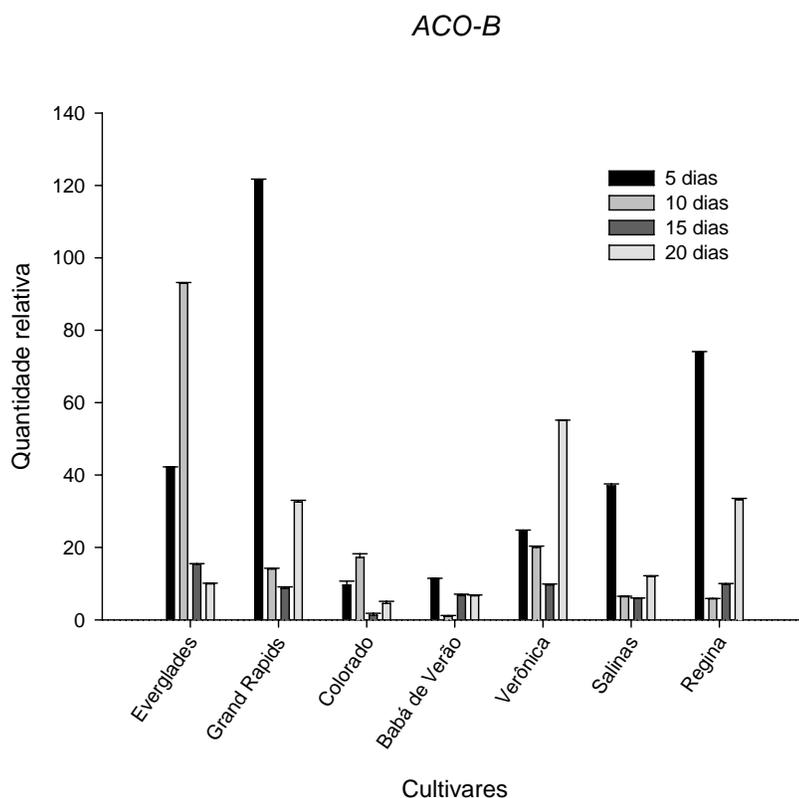


Figura 4 Perfil da expressão por *qRT-PCR* de *ACO-B*, em sementes de alface, cultivar Everglades, Grand Rapids, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, sendo quatro estágios de desenvolvimento (5, 10, 15, 20 dias após a antese –DAA)

4 DISCUSSÃO

O potencial germinativo de sementes de alface varia de acordo com o genótipo e as condições ambientais sob as quais as sementes são produzidas (CONTRERAS et al., 2009; KOZAREWA et al., 2006; NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002). A interação desses fatores contribui para a imposição da dormência e capacidade de germinação, sendo esperadas variações dessas características entre as cultivares. Além disso, fatores endógenos como os fitormônios pode interagir com fatores externos aumentando ou diminuindo as respostas hormonais, induzindo a dormência ou promovendo a germinação (DE GRAUWE et al., 2008).

Estudos fisiológicos em sementes de *Arabidopsis*, cevada, trigo e *Nicotiana plumbaginifolia* têm demonstrado que o ABA desempenha um papel fundamental no mecanismo de dormência do embrião (CHONO et al., 2006; FREY et al., 2004; KAWAKAMI; MIYAKE; NODA, 1997; MCCARTY, 1995). Além disso, o controle dos níveis de ABA durante o desenvolvimento está relacionado com a regulação de processos fisiológicos que vão promover o completo desenvolvimento, maturação e tolerância à dessecação (LEFEBVRE et al., 2006). Essas características ocorrem nos estágios intermediários e tardios das sementes, correlacionado com a presença do ABA em maiores níveis no final do desenvolvimento, o que foi observado nesta pesquisa.

Interessante notar nas cultivares Salinas 88 e Regina 71 os índices de expressão do *LsNCED* foram maiores nos últimos estágios. Também foram observados redução dos percentuais de germinação (15% e 25%) e maiores índices de sementes dormentes (80% e 70%). Já nas cultivares Everglades, Colorado e Verônica, o desempenho das sementes foi maior nos últimos estágios, ao mesmo tempo em que é observada expressão reduzida do gene ligado à biossíntese de ABA (Figura 1 e 2). Os resultados do presente trabalho

corroboram com os de Contreras et al. (2008) que observaram altos níveis de ABA endógeno nos estágios intermediários e tardios do desenvolvimento, momento em que as sementes de alface (*Lactuca sativa* cv. “Tango”) adquiriram tolerância à dessecação e dormência.

Porém nas cultivares Grand Rapids e Babá de Verão e os níveis de expressão do *LsNCED* também são elevados aos 20DAA, no entanto, os índices de germinação atingiram 70% e 85% respectivamente nessa fase. Por meio destes resultados pode-se inferir que algumas cultivares podem apresentar diferentes sensibilidades à ação do fitormônio ABA, como é relatado também por Argyris et al. (2008) e Barbedo e Marcos Filho (1998).

A GA 3-oxidase (GA3 ox) participa da última etapa da biossíntese do GA (TOH et al., 2008), sendo a produção do GA necessária para a sobrevivência das sementes durante a embriogênese (SAWADA et al., 2008; SINGH et al., 2002). Além disso, o estabelecimento de dormência durante a maturação das sementes é regulada por interações entre o GA e ABA, quando o ABA induz a dormência e o GA promove a germinação (HOLDSWORTH; BENTSINK; SOPPE, 2008).

A comparação dos dados de expressão dos genes GA3ox (figura 3), *LsNCED* (figura 2) e os dados de germinação (figura 1) da cultivar Everglades permite uma melhor compreensão da interação do ABA e GA, durante o desenvolvimento de sementes de alface.

De acordo com Singh et al. (2002) o GA tem papel essencial no início do desenvolvimento de sementes, enquanto que o ABA é requerido durante a maturação. No entanto, os níveis de GA reduzem ao longo do desenvolvimento das sementes, ao mesmo tempo em que é imposta a dormência primária, pela ação do fitormônio ABA, como foi observado neste trabalho, com falhas ou expressões reduzidas nos últimos estádios de desenvolvimento para a maioria das cultivares.

Nesta pesquisa, pode-se observar que a expressão do *LsGAox* se dá principalmente na primeira fase nas cultivares Grand Rapids, Babá de Verão, Verônica e Salinas (figura 3), podendo indicar o importante papel do hormônio GA durante a embriogênese das sementes de alface, como já foi observado em outras espécies. Estudos realizados em ervilha demonstraram que a produção de GA no embrião e / ou endosperma são necessários para o crescimento normal e sobrevivência de sementes (SWAIN; REID; KAMIYA, 1997), sendo notados altos índices de aborto nas fases iniciais de desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis*, deficientes de GA (SINGH et al., 2002).

O etileno presente em sementes tem como funções promover a germinação, contribuindo com a atuação da GA e atuar como um antagonista da ABA, na superação da dormência (LINKIES; LEUBNER-METZGER, 2011). Estudos têm mostrado a atuação do ET na germinação de sementes de alface (ARGYIRIS et al., 2008; NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002), porém, em algumas sementes em que se desenvolve a dormência primária, a síntese de etileno pode estar entre os pré-requisitos para quebra de dormência (MATTILA, 2000).

Nas sementes das cultivares Grand Rapids, e Regina, são observadas expressões significativas do gene *ACO-B* aos 20 DAA (figura 4), provavelmente, atuando antagonicamente ao ABA, (*LsNCED*) para induzir a quebra de dormência e promover a germinação. Já na cultivar Verônica a expressão do *ACO-B* atinge o máximo, no último estágio de desenvolvimento. Esse resultado pode estar relacionado com a produção de ET, que atua induzindo a germinação das sementes, como pode ser confirmado pelos resultados de germinação dessa cultivar através da figura 1.

5 CONCLUSÕES

A expressão do gene *LsNCED* em sementes de alface está relacionada com a imposição da dormência nos estágios finais do desenvolvimento nas cultivares Salinas 88 e Regina 71.

A expressão do gene *LsGA3ox1*, ligado à biossíntese de GA em alface, se dá nos estágios iniciais do desenvolvimento das sementes da maioria das cultivares.

A expressão do gene *ACO-B* é observada em maior frequência nos estágios iniciais (5 DAA) e tardios (20 DAA) durante o desenvolvimento de sementes de alface, e está ligado à indução da germinação.

O perfil de expressão dos genes *LsNCED*, *LsGA3ox1* e *ACO-B* é dependente da cultivar.

REFERÊNCIAS

- ARGYRIS, J. et al. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 148, p. 2 926-947, Oct. 2008.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 12, p. 145-164, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.
- BRAYBROOK, S. A.; HARADA, J. J. LECs go crazy in embryo development. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, p. 624–630, Nov. 2008.
- BREUNINGER, H. et al. Differential expression of WOX genes mediates apical-basal axis formation in the Arabidopsis embryo. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 14, p. 867–87, 2008.
- CHONO, M. et al. Field studies on the regulation of abscisic acid content and germinability during grain development of barley: molecular and chemical analysis of pre-harvest sprouting. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2421–2434, 2006.
- CONTRERAS, S. et al. Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 845-852, 2008.
- CONTRERAS, S. et al. Red to Far-red Ratio During Seed Development Affects Lettuce Seed Germinability and Longevity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 1, p. 130-134, Feb. 2009.
- CURABA, J. et al. AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 136, p. 3660-3669, 2004.
- DE GRAUWE, L. et al. Reduced gibberellin response affects ethylene biosynthesis and responsiveness in the Arabidopsis gai eto2-1 double mutant. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, p. 128–141, 2008.

DEVIC, M. The importance of being essential: EMBRYO-DEFECTIVE genes in Arabidopsis. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n. 10, p. 726–736, 2008.

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S. L.; ROCK, C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 15-45, 2002. Suppl.

FREY, A. et al. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 958–964, 2004.

GAZZARRINI, S. et al. The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 7, p. 373-385, 2004.

GEHRING, M.; CHOI, Y.; FISCHER, R. L. Imprinting and seed development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 203–213, 2004. Suppl.

GHASSEMIAN, M. et al. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 7, p. 1117–1126, July 2000.

GOLDBERG, R. B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, Washington, v. 266, p. 605–614, 1994.

HAUGHN, G.; CHAUDHURY, A. Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 10, p. 472–477, 2005.

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

HUH, J. H. et al. Cellular programming of plant gene imprinting. **Cell**, v. 132, Cambridge, n. 5, p.735–744, 2008.

JENIK, P. D.; GILLMOR, C. S.; LUKOWITZ, W. Embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 23, p. 207–236, Nov. 2007.

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; SPENCER, M. S. Ethylene production during development of mustard (*Brassica juncea*) and canola (*Brassica napus*) seed.

Plant Physiology, Waterbury v. 106, n. 2, p. 601-606, Oct. 1994.

KANNO, Y. et al. Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: examination of the site of ABA Biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, p. 1988-2001, 2010.

KAWAKAMI, N.; MIYAKE, Y.; NODA, K. ABA insensitivity and low ABA levels during grain development of non-dormant wheat mutants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 1415–1421, 1997.

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, p. 564-570, 2006.

KROJ, T. et al. Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 130, p. 6065–6073, 2003.

LEFEBVRE, V. et al. Functional analysis of *Arabidopsis NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 309-319, 2006.

LINKIES, A.; LEUBNER-METZGER, G. **Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination.** *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 31, n. 2, 253-270, 2011.

MCCARTY, D. R. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 71-93, 1995.

MEAKIN, P. J.; ROBERTS, J. A. Dehiscence of fruit in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 1003–1011, 1990.

MEINKE, D. et al. Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 13, p. 483–491, 2008.

- MÖNKE, G. et al. Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: Molecular interaction with DNA. **Planta**, Berlin, v. 219, p. 158–166, 2004.
- NAMBARA, E. MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 165–185, 2005.
- 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.
- RAGHAVAN, V. **Double Fertilization**: embryo and endosperm development in flowering plants. Berlin: Springer, 2006.
- RAYS, D. B. et al. Role of ethylene in cotyledon development of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 352, p. 1851-1859, Nov. 2000.
- SAIBO, N. J. M. et al. Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 989–1000, 2003.
- SANTOS-MENDOZA, M. et al. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 608–620, 2008.
- SAWADA, Y. et al. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p. 3383–3393, 2008.
- SINGH, D. P. et al. Gibberellins are required for seed development and Pollen Tube Growth in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 12, p. 3133-3147, Dec. 2002.
- SWAIN, S. M.; REID, J. B.; KAMIYA, Y. Gibberellins are required for embryo and seed development in pea. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1329–1338, 1997.
- TAKAHASHI, H. et al. Isolation and characterization of the ACC synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.), and the involvement in low pH-induced root hair initiation. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, p. 62–69, 2003.

TOH, S. et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 146, n. 3, p. 1368–1385, Mar. 2008.

VRIEZEN, W. H. et al. Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is gibberellin dependent. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 505-516, 2004.

CAPÍTULO 3 Expressão de genes associados à rota biossintética do ácido abscísico, giberelina e etileno na germinação de sementes de alface

RESUMO

A germinação e dormência de sementes são características complexas controladas por diversos genes e fatores ambientais. Tais genes são sinalizados por fitormônios que interagem entre si, podendo induzir a dormência ou promover a germinação das sementes. Os principais fitormônios ligados à regulação da dormência e germinação são o ácido abscísico (ABA), giberelina (GA) e o etileno (ET) que atuam sinérgica ou antagonicamente, dependendo do genótipo e condições ambientais em que as sementes são expostas. Sementes de alface são reconhecidamente sensíveis a altas temperaturas apresentando dormência ou inibição temporária da germinação quando embebidas em temperaturas elevadas. A análise genética de fitormônios pode contribuir para melhor entendimento das funções e interações que implicam em tais características em sementes de alface. Nesta pesquisa objetivou-se avaliar a expressão de genes ligados à rota biossintética do ABA, GA e ET em sementes dormentes e germinadas de alface. Dessa forma, a expressão dos genes *LsNCED*, *LsGAox* e *ACO-B* foi avaliada em sementes germinadas e dormentes das cultivares Everglades, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Colorado e Regina 71. Pode-se concluir que a expressão dos genes *LsNCED*, *LsGAox* e *ACO-B* relacionados à biossíntese do ácido abscísico, giberelina e etileno é dependente do genótipo. A expressão do gene *LsNCED* se dá exclusivamente em sementes dormentes e está ligado à imposição da dormência em sementes de alface. Da mesma forma, a expressão do gene *LsGAox* se dá apenas em sementes germinadas e está ligado a germinação. O gene *ACO-B* envolvido na biossíntese do etileno se expressa de forma diferente nas sementes germinadas e dormentes dependendo do genótipo, indicando ações mistas nas diferentes características. Além disso, a sensibilidade aos fitormônios parece ser mais importante que o nível de expressão dos genes *LsNCED*, *LsGAox* e *ACO-B* entre as cultivares.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*. Dormência. Análise genética.

ABSTRACT

Germination and dormancy of seeds are complex characteristics controlled by many genes and environmental factors. Such genes are indicated by phytohormones that interact with each other and may cause dormancy or promote seeds germination. The main phytohormones connected to regulation of dormancy and germination are abscisic acid (ABA), gibberellin (GA) and ethylene (ET) that act synergistically or antagonistically, depending on genotype and environmental conditions in which the seeds are exposed. Lettuce seeds are known sensible to high temperatures presenting dormancy or temporary inhibition of germination when embedded at high temperatures. Genetic analysis of phytohormones may contribute to better understanding of the functions and interactions that imply in such characteristics in lettuce seeds. This research had as objective to evaluate the genes expression connected to the biosynthetic pathway of ABA, GA and ET in dormant and germinated lettuce seeds. Thus, the genes expression *LsNCED*, *LsGAox* and *ACO-B* was evaluated in germinating seeds and dormant from cultivars Everglades, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Colorado and Regina 71. It can be concluded that the genes expression *LsNCED*, *LsGAox* and *ACO-B* related to biosynthesis of abscisic acid, gibberellin and ethylene is dependent on genotype. The genes expression *LsNCED* occurs exclusively in dormant seeds and is connected to the dormancy imposition in lettuce seeds. In the same way, gene expression *LsGAox* occurs only in germinated seeds and is connected to germination. The *ACO-B* gene involved in ethylene biosynthesis is expressed differently in the germinated seeds and dormant depending on the genotype, indicating mixed actions on different characteristics. Furthermore, sensibility to phytohormones appears to be more important than the gene expression level *LsNCED*, *LsGAox* and *ACO-B* among the cultivars.

Keywords: *Lactuca sativa*. Dormancy. Genetic analysis.

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa L.*) é uma espécie de grande importância econômica no Brasil e no mundo. A área cultivada no Brasil foi de aproximadamente 51 mil ha em 2008, e o mercado de sementes movimentou 22,9 milhões de reais em 2009 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS- ABCSEM, 2008, 2009).

A utilização de sementes com alto desempenho é essencial para o sucesso no cultivo da alface. Porém, sementes de alface são reconhecidamente problemáticas em termos de qualidade fisiológica, com alta sensibilidade às condições de ambiente, o que dificultam a rápida emergência e uniformidade do estande (CONTRERAS et al., 2008, 2009; HAYASHI; AOYAMA; STILL; 2008; KOZAREWA et al., 2006).

O período de germinação das sementes está associado à presença ou ausência de dormência, que é a incapacidade temporária de uma semente viável e intacta germinar, sob condições favoráveis. Essa condição de dormência pode ser determinada por diversos fatores endógenos, ambientais, a combinação ou ainda a competição entre eles (HILHORST, 2007; FINKELSTEIN et al., 2008).

Estudos genéticos em diversas espécies têm identificado dezenas de genes que influenciam a imposição ou a liberação de dormência ou a habilidade de sementes de germinarem logo após a maturação. Muitos desses genes estão ligados aos hormônios vegetais, incluindo o ácido giberélico (GA), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), citocininas, brassinosteroides e auxina (ACHARD et al., 2006; ARGYRIS et al., 2008; FEURTADO; KERMODE, 2007; KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005; LINKIES; LEUBNER-METZGER, 2012; NAMBARA et al., 2010; SEO et al., 2006), bem como açúcares (DEKKERS et al., 2008), luz (CONTRERAS et al., 2009; OH et al., 2009; SAWADA et al., 2008), temperatura (CONTRERAS et al., 2009;

SCHWEMBER; BRADFORD, 2010; TOH et al., 2008) e outros fatores de regulamentação, que sob condições internas e externas irão determinar a germinação ou dormência.

A maioria desses estudos tem apontado os níveis de ABA e GA como os principais reguladores do estado de dormência, e o balanço interno desses fitormônios é que vão determinar o início, manutenção e o término da dormência (BASKIN; BASKIN, 2004). Além disso, o etileno (ET) também parece estar envolvido na superação da dormência em sementes de alface, quando estão embebidas sob altas temperaturas (KOZAREWA et al., 2006).

Análises do transcriptoma em sementes de *Arabidopsis* e *Nicotiana glumbaginifolia* indicaram que os genes *AtNCED* e *AtGA3ox* associados com biossíntese de GA e ABA estão associados com a imposição e liberação de dormência, sendo o acúmulo de ABA induzindo a imposição de dormência e acúmulo de GA promovendo a superação da dormência e promovendo a germinação (BOVE et al., 2005; CADMAN et al., 2006; FINCH-SAVAGE et al., 2007). O gene *AtNCED* codifica a 9-cis-epoxycarotenoide dioxygenases, enzima que atua na última etapa da biossíntese de ABA, enquanto que o gene *AtGA3ox* que codifica a enzima GA 3 β -hydroxylases é responsável pela conversão do GA₁₂ em GA ativo no citosol (TOH et al., 2008).

Os níveis de ABA e GA internamente nas sementes é que vão determinar a dormência ou a capacidade de germinação, porém a biossíntese desses fitormônios pode ser influenciada pela presença do ET. Estudos fisiológicos indicam o papel do ET na promoção da germinação, sendo que presença do ET pode regular negativamente a biossíntese de ABA, diminuindo o grau de dormência das sementes. O ET também pode agir neutralizando as respostas do ABA, induzindo a superação da dormência, mesmo que não ocorra a redução do ABA na semente (LINKIES; LEUBNER-METZGER, 2012). Para isso é necessário a conversão do ACC para etileno via ACC oxidase (ACO),

etapa fundamental de regulação da biossíntese de ET em sementes. A interação entre ABA e etileno parece ocorrer em vários níveis e é dependente do tecido e do processo que está ocorrendo (GHASSEMIAN et al., 2000; MATILLA; MATILLA-VÁZQUEZ, 2008).

Em relação a interações que ocorrem entre ET e GA, estudos têm demonstrado haver aditividade e sinergia entre os fitormônios. Dependendo do desenvolvimento e das condições ambientais, a presença de um fitormônio pode aumentar as respostas do outro (DE GRAUWE et al., 2008; VRIEZEN et al., 2004), como observado por Iglesias-Fernández e Matilla (2010), em que a presença do GA nos estágios iniciais da germinação induziu a biossíntese do ET em sementes de *Sisymbrium officinale* L.

Visto que a germinação e a dormência de sementes são reguladas por uma complexa rede de interações entre hormônios, estudos envolvendo análises da expressão de genes envolvidos na biossíntese desses fitormônios são de grande importância para a melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na regulação dos processos de germinação e dormência. Com isso, o objetivo, neste trabalho, foi analisar a expressão de genes *LsNCED*, *LsGAox1* e *ACO-B* relacionados à biossíntese do ABA, GA e ET respectivamente, em sementes dormentes e germinadas de alface.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Foram utilizadas sementes das cultivares Everglades (termotolerante), Babá de Verão (termotolerante), Verônica (termotolerante), Salinas (termossensível), Colorado (termossensível) e Regina 71 (termotolerante), as quais foram cultivadas no inverno de 2011 e colhidas no ponto comercial de colheita. As sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel *germibox*, previamente embebidos com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel, dentro de caixas acrílicas do tipo *gerbox*. Posteriormente as sementes foram incubadas em três temperaturas distintas (20, 30 e 35°C), e diariamente, sementes com protrusão de radícula foram coletadas e armazenadas em *deep-freezer* (-80°C), e aos 7 dias após o início da embebição foram coletadas as sementes dormentes.

2.1 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes distribuídas sobre duas folhas de papel *germibox*, previamente umedecidos com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel, em caixas acrílicas do tipo *gerbox*. As caixas contendo as sementes foram levadas à BOD à temperatura de 20, 30 e 35°C e as avaliações realizadas aos quatro e sete dias de incubação (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.2 Genes avaliados

Os genes relacionados à biossíntese do ABA, GA e ET escolhidos para as análises de expressão por *qRT-PCR* foram *LsNCED4*, *LsGA3ox1* e *ACO-B*. Além disso, os genes *PP_{2A}* e *UBC₂₁*, foram utilizados como genes de referência. Os produtos dos genes e as sequências iniciadoras estão representados na tabela 1, do capítulo anterior.

2.3 Extração do RNA total

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o protocolo *Phenol-SDS*. Foram macerados 100 mg de sementes em nitrogênio líquido e transferidos para microtubos, juntamente com 0,5mL de tampão de extração (0,18M Tris, 0,09M LiCl, 4,5mM EDTA, 1% SDS, pH 8,2) + 1% β-mercaptoetanol, 50μL Acetato de Sódio 3M (pH 4,0) e 0,5mL de solução de fenol:clorofórmio (5:1). Em seguida foram homogeneizados em vórtex por 2 min. e centrifugados por 20 min. a 4°C e 10.000g. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para novo tubo no qual foi adicionado 0,5mL de solução de fenol:clorofórmio: álcoolisoamílico (25:24:1). Realizou-se novamente centrifugação por 20 min. a 4°C e 10.000g. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, transferido para novo tubo e adicionado um volume de clorofórmio igual do sobrenadante coletado. As amostras foram centrifugadas por 5min. a 4°C e 10.000g. O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo de 1,5mL ao qual foi adicionado 0,5 do volume final do sobrenadante de 8M de LiCl e incubado por 1 hora a -20°C para precipitação do RNA. Após esse período, centrifugou-se novamente por 30 min. a 4°C e 10.000g. O sobrenadante foi descartado e 1000μL de etanol 80% foi adicionado ao *pellet*. Em seguida, realizou-se a centrifugação por 5 min. a 4°C e 10.000g. Após a centrifugação, o

sobrenadante foi descartado e o RNA foi ressuspendido em 20 μL de água ultrapura tratada com DEPC e autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20°C .

Para a avaliação da integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com Brometo de Etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), posteriormente visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (*Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000*), utilizando-se comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, observando as razões 260/280. Foram consideradas de alta qualidade, as amostras com valores entre 1,8 e 2,1. Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Diethyl pirocarbonato) e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento para inativar RNases.

2.4 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Todas as amostras foram tratadas com DNase I *DNA free* (Ambion), com o objetivo de eliminar a contaminação das amostras com DNA. Para isso, 10 μg do RNA total foram pipetados e adicionados 1 μL de DNase I + 10 μL de tampão DNase 10x e completando a reação para 100 μL com água tratada com DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. Após esse período, foi adicionado 10 μL de Acetato de Potássio 2M e os tubos incubados em gelo por 15 min. Depois, realizou-se a centrifugação por 10 min. e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foram adicionados três vezes o seu volume com etanol 100% e incubado a -80°C por duas horas. Em seguida, centrifugou-se por 30 min. a 4°C a 14000rpm. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 400 μL de etanol 70%,

agitando levemente o tubo para soltar o *pellet*. Centrifugou-se novamente por 10 min. a 4°C a 14000rpm. Logo após, o sobrenadante foi descartado e os tubos deixados abertos para secar. Então o RNA foi ressuspendido em 20 µL de água DEPC.

Para verificar a pureza do RNA, foi realizada uma *PCR* convencional utilizando *primers* de controle endógeno. Foram consideradas livres de DNA, as amostras que não apresentavam amplificação após a *PCR*.

A síntese de cDNA foi realizada com *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi preparado um mix contendo 2 µL do tampão 10X da enzima, 2 µL do *primer RT Random Primers* 10X, 0,8 µL do mix dNTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador *Multigene Gradient Labnet*, programado com três etapas: 10 min. a 25°C para o anelamento dos *primers*; 2 h a 37°C para ação da enzima e 5 min. a 85°C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

2.5 qRT-PCR

Para a análise da expressão gênica quantitativa por *qRT-PCR* foi utilizado o modelo *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*, utilizando o sistema de detecção *SYBR Green* e o cDNA obtido a partir de RNA extraído de sementes germinadas e dormentes das diferentes cultivares. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa

7500 *Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação, foi utilizado 1,0 μL de cDNA, 0,2 μL de cada *primer* e 5,0 μL de *Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen)* para um volume final 10,0 μL /amostra. Controles negativos e curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. Todo o experimento de *qRT-PCR*, para cada gene em estudo, foi conduzido a partir de cDNAs diferentes obtidos de cada amostra, com três replicatas técnicas para cada uma, sendo os resultados normalizados usando CTs (Ciclo *Threshold*) obtidos pela expressão dos genes de referência proteína fosfatase 2 (*PP_{2A}*) e a ubiquitina ligase (*UBC₂₁*) (ARGYRIS et al., 2008).

O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (*threshold*). O método que foi usado é o do CT comparativo.

Como um dos requisitos necessários para a utilização deste método, foi realizado um experimento de validação para mostrar as eficiências de amplificação dos genes-alvo e de referência. Para isso, foram realizadas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da diluição do cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 1:5. A concentração de cada *primer* utilizado foi de 1,5 μM .

A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta\text{CT} = \text{CT} (\text{gene alvo}) - \text{CT} (\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} (\text{amostra}) - \Delta\text{CT} (\text{calibrador})$, sendo o calibrador a amostra de menor expressão, que foi utilizada como base para resultados de expressão comparativa. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

2.6 Análise dos dados

Os dados foram apresentados através de curvas de porcentagens acumuladas de germinação e dormência de cada tratamento, com a utilização do programa *SigmaPlot* 11.0. Os desvios-padrão foram apresentados na forma de barras para facilitar a interpretação dos dados.

Os dados da expressão relativa foram apresentados na forma de gráficos de barra. A análise dos resultados de expressão de cada gene é realizada de forma comparativa, sendo utilizada como calibrador a amostra com menor expressão para cada gene.

3 RESULTADOS

Os dados de germinação e de sementes dormentes de alface submetidas a três temperaturas estão representados na Figura 1.

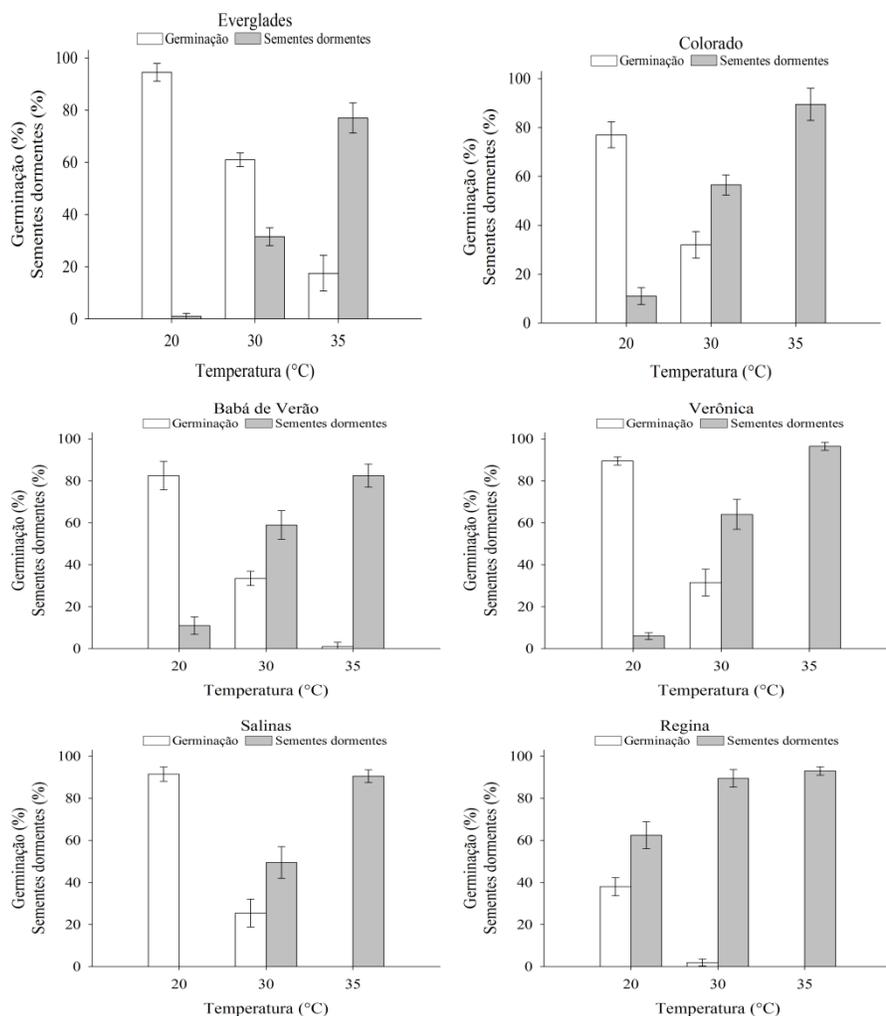


Figura 1 Porcentagens de germinação e sementes dormentes de alface, cultivar Everglades, Colorado; Babá de Verão; Verônica; Salinas; Regina, sob três temperaturas (20, 30 e 35°C)

Pelos resultados, pode-se observar a influência da temperatura nos níveis de dormência das sementes de alface de diferentes cultivares. Para todas as cultivares observa-se germinação máxima quando as sementes foram submetidas à temperatura de 20°C.

No caso da cultivar Everglades observa-se aproximadamente 95% de plântulas normais quando as sementes foram embebidas na temperatura de 20°C. Já na temperatura de 30°C, o potencial germinativo reduz a 60% e com manifestação de dormência em 30% das sementes. A dormência se torna mais evidente quando as sementes são expostas a 35°C, atingindo mais de 70% das sementes, e reduzida germinação (20%) nestas condições de elevadas temperaturas.

Na cultivar Colorado, a germinação é próxima a 80 % na temperatura de 20°C e um reduzido número de sementes dormentes (10%). Esse resultado é invertido quando as sementes são submetidas à temperatura de 30°C, com uma porcentagem maior de sementes dormentes (55%) do que plântulas normais (30%), e ampliação da dormência sob a temperatura de 35°C, atingindo valores próximos de 90% de sementes dormentes e ausência de germinação.

O desempenho da cultivar Babá de Verão foi semelhante ao da cultivar Verônica, com germinação próxima à 85% e reduzida dormência (10%) na condição de temperatura de 20°C. A tendência de elevação da dormência seguiu-se com o aumento da temperatura, chegando a valores de 60% de sementes dormentes e 35% de germinação, na temperatura de 30°C e maiores índices de dormência na temperatura de 35°C, com 80% de sementes dormentes na cultivar Babá de Verão e 95% de dormência para a cultivar Verônica.

O comportamento da cultivar Salinas foi bem característico com máxima germinação (90%) sob temperatura de 20°C, manifestação de dormência quando as sementes foram expostas à temperatura de 30°C, com

50% de sementes dormentes e 30% de germinação. Na temperatura de 35°C, a dormência é demonstrada em mais de 90% das sementes dessa cultivar.

A maior sensibilidade à temperatura é observada na cultivar Regina, com manifestação de dormência em níveis elevados (60%) na temperatura de 20°C, e dormência acima de 80% quando as sementes são expostas às temperaturas mais elevadas de 30 e 35°C.

Os perfis de expressão relativa do gene *LsNCED* em sementes germinadas e dormentes de alface estão representados na figura 2. Pode-se observar que nas sementes germinadas, não houve expressão do gene, enquanto que nas sementes dormentes a expressão variou entre as cultivares.

Os maiores níveis de expressão do gene *LsNCED* são observados nas cultivares Verônica, seguida da cultivar Everglades. Nas cultivares Salinas e Babá de Verão, a expressão do gene é mais uma vez reduzida, com os níveis de expressão semelhantes entre as duas cultivares. Índices mínimos de expressão do gene *LsNCED* são observados nas cultivares Regina e Colorado.

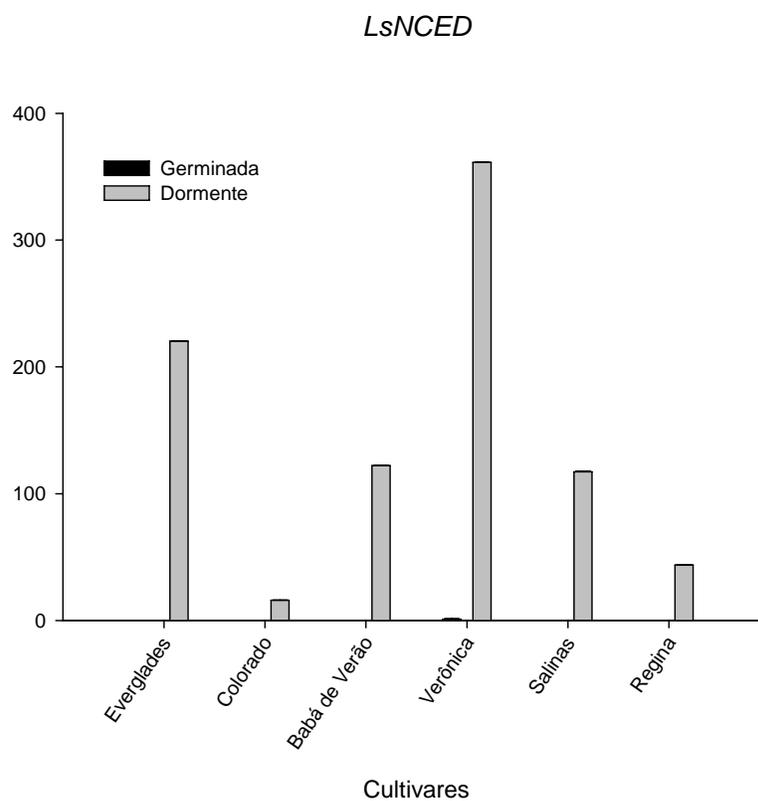


Figura 2 Perfil da expressão relativa por *qRT-PCR* de *LsNCED*, em sementes germinadas e dormentes de alface das cultivares Everglades, Colorado, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Regina

O perfil da expressão relativa do gene *LsGA3ox1*, que participa da última etapa da biossíntese do GA em sementes de alface germinadas e dormente é representado na figura 3. Nota-se que a manifestação desse gene se dá principalmente nas sementes germinadas e os níveis de expressão variam entre as diferentes cultivares.

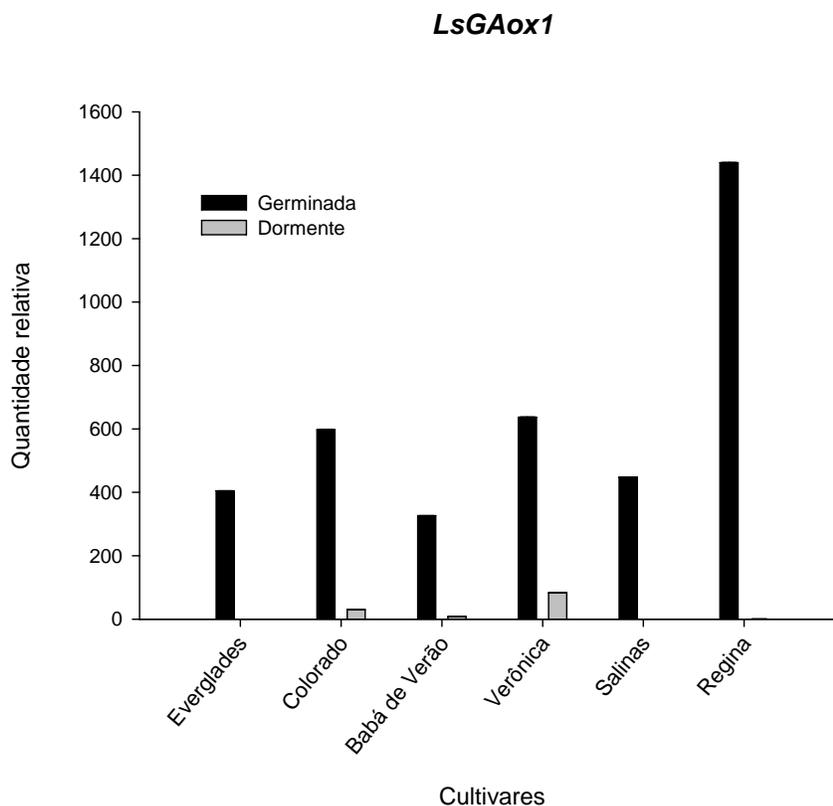


Figura 3 Perfil da expressão relativa por *qRT-PCR* de *LsGA3ox1*, em sementes germinadas e dormentes de alfaca das cultivares Everglades, Colorado, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Regina

A maior expressão do gene *LsGA3ox1* é observada na sementes germinadas da cultivar Regina, sendo duas vezes maior que o índice de expressão das cultivares Colorado e Verônica, com índices de expressão semelhantes entre si. Cabe destacar que houve pequenas expressões do gene *LsGA3ox1* em sementes dormentes das cultivares Colorado e Verônica, o que não foi observado nas demais.

Nas cultivares Everglades e Salinas, os níveis de expressão relativa do gene *LsGAox* foram semelhantes e ligeiramente maior do que o perfil de

expressão da cultivar Babá de Verão, na qual foi observado o menor índice de expressão para sementes dormentes.

A participação do etileno durante a germinação de sementes de alface foi investigada através da análise da expressão do gene *ACO-B*, ligado a biossíntese do etileno (figura 4). Observa-se que as expressões relativas do gene *ACO-B* variam entre sementes dormentes e germinadas de acordo com a cultivar analisada.

Nas cultivares Everglades e Colorado, as expressões relativas do gene *ACO-B* foram semelhantes entre as cultivares e para sementes dormentes e germinadas. No entanto, na cultivar Babá de Verão a expressão do *ACO-B* foi duas vezes maior nas sementes germinadas em comparação com sementes dormentes. Esse resultado foi invertido na cultivar Verônica, com maior expressão do gene *ACO-B* nas sementes dormentes do que nas sementes germinadas desta cultivar.

A menor expressão relativa do gene *ACO-B* foi observada na cultivar Salinas, com pequenas diferenças entre as sementes dormentes e germinadas, sendo maior expressão nas sementes germinadas. Em contraste, a maior expressão relativa do gene *ACO-B* foi observada nas sementes germinadas da cultivar Regina, sendo esta aproximadamente dez vezes maior do que para as sementes dormentes.

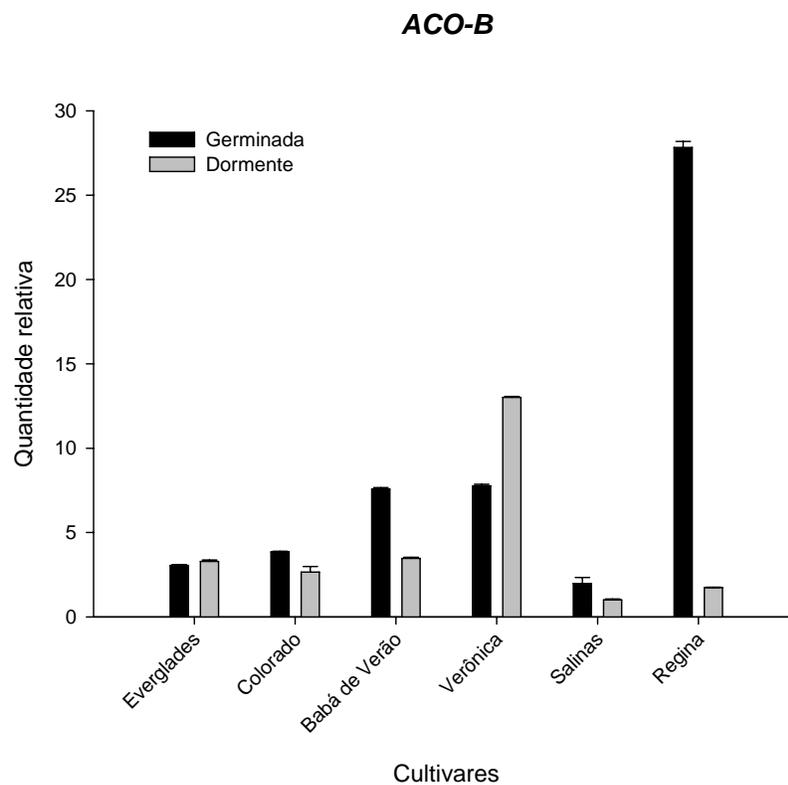


Figura 4 Perfil da expressão relativa por *qRT-PCR* de *ACO-B*, em sementes germinadas e dormentes de alfaca das cultivares Everglades, Colorado, Babá de Verão, Verônica, Salinas, Regina

4 DISCUSSÃO

As sementes da cultivar Everglades, mesmo sendo considerada termotolerante (NASCIMENTO; PEREIRA, 2007) apresentou dormência quando submetida a temperaturas elevadas (30 e 35°C), provavelmente porque as sementes utilizadas neste experimento foram produzidas no inverno (figura 1). De acordo com Contreras, Bennett e Tay (2009) e Kozarewa et al. (2006) melhores desempenho das sementes de alface são obtidos quando a produção é realizada sob altas temperaturas, diminuindo assim a termossensibilidade. Nessa cultivar, observou-se significativa expressão do gene *LsNCED* nas sementes dormentes (figura 2), e também alta expressão do *LsGA3ox1* em sementes germinadas (figura 3), o que pode ser um indicativo do envolvimento do ABA na imposição da dormência, assim como a participação do GA na indução da germinação, como foi observado por Argyris et al. (2008, 2011) e Sawada et al. (2006) também em sementes de alface. É relatado ainda, que o etileno pode atuar antagonicamente ao ABA na superação da dormência e sinergicamente ao GA na indução da germinação (IGLESIAS-FERNÁNDEZ; MATILLA, 2010; LINKIES et al., 2009). De acordo com os resultados desta pesquisa, a expressão do gene *ACO-B* foi semelhante em sementes germinadas e dormentes da cultivar Everglades (figura 4). Provavelmente, nesse caso, o ET atuou para a indução da germinação somente quando na presença de GA.

Na cultivar Colorado, a dormência ficou bem evidente quando as sementes foram embebidas sob altas temperaturas (30 e 35°C) (figura 1), demonstrando a influência de temperaturas altas na germinação de sementes de alface (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002). A expressão do *LsNCED* foi reduzida nas sementes dormentes (figura 2), no entanto foi observada consideráveis níveis de expressão do *LsGA3ox1* em sementes germinadas (figura 3) e *ACO-B* tanto nas sementes germinadas como dormentes dessa cultivar. De

acordo com Tarquis e Bradford (1992) há casos em que não se constatou relação entre a concentração de ABA, a sensibilidade do embrião a esse regulador de crescimento e a aptidão da semente em germinar precocemente, indicando variações na sensibilidade à ação do ABA em diferentes genótipos de alface. Contudo a participação do GA é essencial para a germinação de sementes de alface, como observado por Argyris et al.(2008). O mesmo autor, trabalhando com os genótipos Salinas e UC96US23, constatou que a expressão do *LsGA3ox1* foi elevada nas sementes embebidas a 20°C e reduzida expressão quando a temperatura foi elevada a 35°C, ocorrendo nesse momento o atraso da germinação das sementes de alface.

Sementes das cultivares Babá de Verão, Verônica apresentaram alta sensibilidade às temperaturas elevadas (30 e 35°C) (figura 1), apesar dessas cultivares serem consideradas tolerantes ao calor quanto ao florescimento (CARVALHO FILHO; GOMES; MALUF, 2009; VILLELA et al., 2010). Com esses resultados, pode-se notar que a sensibilidade a altas temperaturas no florescimento pode não estar relacionada com o grau de sensibilidade a altas temperaturas na germinação. Mesmo com resultados próximos de germinação, o perfil de expressão dos genes *LsNCED*, *LsGA3ox1* e *ACO-B* (figura 2, 3 e 4) variou acentuadamente entre as duas cultivares. Na cv. Verônica, a expressão do *LsNCED* foi aproximadamente três vezes maior que na cv. Babá de Verão, para sementes dormentes. Para o gene *LsGA3ox1*, a expressão foi ligeiramente maior na cv. Verônica, sendo que foi detectado expressão desse gene também nas sementes dormentes desta cultivar. Já para o gene *ACO-B*, a expressão foi igual nas sementes germinadas para as duas cultivares e nas sementes dormentes, maior expressão do *ACO-B* na cv. Verônica. Fica evidente a diferença da sensibilidade aos diferentes fitormônios, nos diferentes genótipos, com relação à germinação e dormência, como já verificado por Tarquis e Bradford (1992) com o fitormônio ABA.

Na cultivar Salinas, observou-se que as expressões do *LsNCED* nas sementes dormentes (figura 2) e *LsGA3ox1* nas sementes germinadas (figura 3) foram acentuadas, no entanto a expressão do *ACO-B* foi reduzida (figura 4) quando comparadas com as demais cultivares. Essa cultivar também se mostrou sensível às altas temperaturas, com acentuados níveis de dormência em 30 e 35°C (figura 1). Esses resultados sugerem que, na ausência do etileno, há uma maior dificuldade na superação da dormência nessa cultivar, indicando que o etileno desempenha um papel relativamente importante na liberação da dormência e germinação de sementes de alface como de muitas outras espécies (KEÇPCZYŃSKI; KEÇPCZYŃSKA, 1997).

O desempenho da cultivar Regina71 foi reduzido quando foi analisada a germinação sob altas temperaturas (figura 1), apesar de ser considerada uma planta tolerante às altas temperaturas quanto ao florescimento (CARVALHO FILHO; GOMES; MALUF, 2009). Parece que a cultivar Regina quando cultivada sob baixas temperaturas, pode não expressar suas características de termotolerância nas sementes. O mesmo foi observado por Pereira et al. (2010) na cultivar Luiza, considerada uma planta resistente ao calor na qual a termotolerância foi observada apenas nas sementes produzidas no Verão. Apesar do elevado índice de dormência das sementes da cultivar Regina 71, até mesmo na temperatura de 20°C, a expressão do gene *LsNCED* foi reduzida (figura 2), sugerindo que a participação do ABA é pouco significativa na imposição da dormência nas sementes dessa cultivar, ao passo que a atuação do *LsGA3ox1* (figura 3) e *ACO-B* (figura 4) teve ampla expressão nas sementes germinadas. Tarquis e Bradford (1992) observaram em sementes de alface que a programação genética para a germinação teve maior efeito do que a redução dos níveis de ABA endógeno, assim como foi observado na presente pesquisa, onde a provável redução do ABA não foi suficiente para promover a germinação das

sementes, sugerindo que outros fatores podem ter maior influência na germinação.

5 CONCLUSÕES

A expressão dos genes *LsNCED*, *LsGAox* e *ACO-B* relacionados à biossíntese do ácido abscísico, giberelina e etileno é dependente do genótipo.

A expressão do gene *LsNCED* se dá exclusivamente em sementes dormentes e está ligado à imposição da dormência em sementes de alface.

O gene *LsGA3ox1* ligado a biossíntese da giberelina tem maior expressão em sementes germinadas de alface.

O gene *ACO-B* envolvido na biossíntese do etileno se expressa de forma diferente nas sementes germinadas e dormentes dependendo do genótipo, indicando ações mistas nas diferentes características.

A sensibilidade aos fitormônios parece ser mais importante que o nível de expressão dos genes *LsNCED*, *LsGA3ox1* e *ACO-B* entre as cultivares.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa, foi possível melhor compreensão da atuação do ácido abscísico, giberelina e etileno durante os estágios de desenvolvimento e germinação de sementes de alface por meio da expressão de genes ligados à biossíntese desses fitormônios.

No desenvolvimento das sementes de alface observaram-se alterações nas expressões dos genes estudados, possivelmente indicando variações nas concentrações de cada fitormônio nos diferentes estágios de desenvolvimento. O gene *LsNCED* ligado à biossíntese do ácido abscísico teve maiores expressões nos estágios finais do desenvolvimento, podendo estar ligado com o grau de dormência em algumas cultivares. No entanto, o gene *LsGA3ox1* se expressa com frequência nos estágios iniciais do desenvolvimento de sementes de alface, sugerindo a atuação da giberelina na fase de embriogênese das sementes. Já a expressão do gene *ACO-B* ligado à biossíntese do etileno variou muito entre os diferentes estágios e cultivares, indicando ações mistas deste fitormônio.

Na análise da expressão dos genes *LsNCED*, *LsGA3ox1* em sementes germinadas e dormentes de alface, fica mais evidente a ligação do ácido abscísico com a dormência, bem como a atuação da giberelina na germinação de sementes. Para o gene *ACO-B* a expressão se dá em sementes germinadas e dormentes, mais uma vez, sugerindo diferentes ações do etileno.

Vale ressaltar que a presença ou ausência da expressão dos genes estudados não foi suficiente para determinar germinação ou dormência das sementes. Há evidências que a sensibilidade ao efeito do fitormônio também pode influenciar nas respostas fisiológicas durante o desenvolvimento e germinação das sementes de alface.

Assim, estudos futuros com expressão gênica de outros genes também correlacionados com a biossíntese dos fitormônios, bem como a quantificação

dos fitormônios em diferentes estágios de desenvolvimento e em sementes germinadas e dormentes, serão de grande importância para complementar as informações obtidas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ACHARD, P. et al. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. **Science**, Washington, v. 331, p. 91–94, 2006.
- ARGYRIS, J. et al. A gene encoding an abscisic acid biosynthetic enzyme (*LsNCED4*) collocates with the high temperature germination locus Htg6.1 in lettuce (*Lactuca sp.*), **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 122, n. 1, p. 95-108, 2011.
- ARGYRIS, J. et al. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 148, p. 2 926-947, Oct. 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS. **Dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil**. 2009. Disponível em: < http://www.abcsem.com.br/docs/direitos_reservados.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS. **Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças: ano calendário 2008**. 2011. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/docs/pesquisa_mercado_2008.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2012.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 1-16, Jan. 2004.
- BOVE, J. et al. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, p. 593–612, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p.
- CADMAN, C. S. C. et al. Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 805–822, 2006.

CONTRERAS, S.; BENNETT, M. A.; TAY, D. Temperature during seed development affects weight, germinability and storability of lettuce seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 37, n. 2, p. 398-412, July 2009.

CONTRERAS, S. et al. Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 845-852, 2008.

CONTRERAS, S. et al. Red to Far-red Ratio During Seed Development Affects Lettuce Seed Germinability and Longevity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 1, p.130-134, Feb. 2009.

DE GRAUWE, L. et al. Reduced gibberellin response affects ethylene biosynthesis and responsiveness in the Arabidopsis gai eto2-1 double mutant. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, p. 128–141, 2008.

DEKKERS, B. J. W. et al. Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 67, n. 1/2, p. 151–167, May 2008.

FEURTADO, J. A.; KERMODE, A. R. A merging of paths: abscisic acid and hormonal cross-talk in the control of seed dormancy maintenance and alleviation. In: BRADFORD, K. J.; NONOGAKI, H. (Ed.). **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 176–223.

FINCH-SAVAGE, W. et al. Seed dormancy release in Arabidopsis Cvi by dry afterripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, p. 60–78, 2007.

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

GHASSEMIAN, M. et al. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 7, p. 1117–1126, 2000.

HAYASHI, E.; AOYAMA, N.; STILL, D. W. Quantitative trait loci associated with lettuce seed germination under different temperature and light environments. **Genome**, Ottawa, v. 51, n. 11, p. 928–947, 2008.

HILHORST, H. W. Definitions and hypotheses of seed dormancy. In: BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. (Ed.). **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 50-67.

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

KEÇPCZYŃSKI, J.; KEÇPCZYŃSKA, E. Ethylene in seed dormancy and germination. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 101, p. 720–726, 1997.

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, p. 564-570, 2006.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v.15, p. 281-307, 2005.

LINKIES, A. et al. Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 3803–3822, 2009.

LINKIES, A.; LEUBNER-METZGER, G. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, p. 253–270, 2012.

MATILLA, A. J.; MATILLA-VAZQUEZ, M. A. Involvement of ethylene in seed physiology. **The Plant Science**, Limerick, v. 175, n. 1/2, p. 87–97, 2008.

NAMBARA, E. et al. The role of ABI3 and FUS3 loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. **Developmental Biology**, Orlando, v. 220, n. 2, p. 412–423, 2000.

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.; PEREIRA, R. S. Testes para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 175-179, 2007.

OH, E. et al. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 2, p. 403–419, 2009.

PEREIRA, R. V. 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.

SAWADA, Y. et al. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, p. 1386–1396, 2008.

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, 105-118, 2010.

SEO, M. et al. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. **The Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 354–366, 2006.

TARQUIS, A. M.; BRADFORD, K. J. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 307-317, 1992.

TOH, S. et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 146, n. 3, p. 1368–1385, Mar. 2008.

VRIEZEN, W. H. et al. Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings is gibberellin dependent. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 505-516, 2004.