



**PEDRO YURI CAVASIN**

**EFEITO MATERNO PARA A CARACTERÍSTICA DE  
TOLERÂNCIA À TERMOINIBIÇÃO EM SEMENTES DE  
ALFACE (*Lactuca sativa*)**

**LAVRAS – MG  
2019**

**PEDRO YURI CAVASIN**

**EFEITO MATERNO PARA A CARACTERÍSTICA DE TOLERÂNCIA À  
TERMOINIBIÇÃO EM SEMENTES DE ALFACE (*Lactuca sativa*)**

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

Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2019**

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

Cavasin, Pedro Yuri.

Efeito materno para a característica de tolerância à  
termoinibição em sementes de alface (*Lactuca sativa*) / Pedro Yuri  
Cavasin. - 2019.

39 p. : il.

Orientador(a): Luiz Antônio Augusto Gomes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Termodormência. 2. Cruzamentos recíprocos. 3. Altas  
temperaturas. I. Gomes, Luiz Antônio Augusto. II. Título.

**PEDRO YURI CAVASIN**

**EFEITO MATERNO PARA A CARACTERÍSTICA DE TOLERÂNCIA À  
TERMOINIBIÇÃO EM SEMENTES DE ALFACE (*Lactuca sativa*)**

**MATERNAL EFFECT FOR CHARACTERISTIC OF THERMALIBILITY  
TOLERANCE IN LETTUCE (*Lactuca sativa*) SEEDS**

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

APROVADA em 12 de julho de 2019.

Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes UFLA

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos UFLA

Dra. Ana Carolina Silva Siquieroli UFU

Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2019**

*Aos meus pais, Pedro e Rita, por todo amor, carinho, apoio e por  
serem meus maiores exemplos de vida.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

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

Aos meus pais, Pedro e Rita, por dedicarem suas vidas a mim, e por acreditarem no meu potencial.

À minha irmã Maiara, por sempre estar presente nos momentos de dificuldades.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e a CAPES e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À UFLA e, principalmente, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, pelo incentivo e pelos ensinamentos.

Ao meu orientador Luiz Antônio e à professora Heloisa Oliveira dos Santos, pelos conhecimentos transmitidos e por serem um exemplo de dedicação, humildade e profissionalismo.

À secretaria de Pós-Graduação, Marli, pela amizade e atenção durante o curso de mestrado.

À minha família, pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

Aos amigos, que mesmo distantes, sempre me incentivaram a seguir meus sonhos;

Aos amigos, Gabriel Araújo, André Boscolo, Matheus Artur, Diogo Mendes e Breno Terra. pelos momentos de descontração. e por tornaram essa jornada mais fácil e mais leve.

Ao grupo de Melhoramento de Hortaliças, Daniela Santos, Sylmara Silva, André Alvarenga, Gabriel Lasmar, Giuliana Duarte e Breno Terra. pelo companheirismo e pela ajuda nos diversos experimentos.

Sou grato a todos que fizeram parte desta caminhada e que de alguma forma me ajudaram chegar até aqui.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

A alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa mais importante no mundo e a mais comercializada no Brasil. A baixa germinação, devido a temperaturas elevadas (acima de 25 °C) se apresenta como um grande gargalo na produção de sementes desta hortaliça no país. O clima tropical é predominante no território brasileiro e proporciona um meio favorável à inativação da germinação por meio da termodormência e ou termoinibição. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de cultivares cuja germinação ocorra de forma satisfatória em temperaturas mais elevadas, proporcionando melhorias na produção, e maior uniformidade no estande de mudas. As sementes podem apresentar características de origem materna e a existência deste efeito pode ser testada por cruzamentos recíprocos. Muitos trabalhos reportam que o endosperma é um dos fatores de resistência à germinação em temperaturas elevadas, sendo este, herdado, em grande parte, do genitor feminino. Desta forma, o estudo do controle genético é necessário para que se confirme se há ou não o efeito materno na tolerância à termoinibição em sementes de alface, bem como definir adequadamente a geração para se iniciar a seleção, além de encontrar possíveis marcadores enzimáticos.

**Palavras-chave:** Termodormência. Cruzamentos recíprocos. Altas temperaturas.

## ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa*) is the most important leafy vegetable in the world and the most commercialized in Brazil. The low germination due to high temperatures ( $> 25^{\circ}\text{C}$ ) is one of the most serious problem in the lettuce seeds production in the country. In Brazil the tropical climate is predominant which provides a favorable environment for the germination inactivation by thermodormancy and or thermoinhibition. Therefore, it is important the development of cultivars whose germination occurs satisfactorily at higher temperatures, providing improvements in production and greater seedlings stand uniformity. The Everglades cultivar presents tolerance to the thermoinhibition and is a reference in studies on lettuce germination at high temperatures. Seeds may have traits with maternal origin and the existence of this can be tested by reciprocal crosses. Many studies report that the endosperm is one of the factors of resistance to high temperatures germination, which is inherited from the the female parent. Thus, the study of genetic control is necessary to confirm the existence of a maternal effect on the tolerance to thermoinhibition in lettuce seeds as well as to define the generation to start the selection, and find possible enzyme markers.

**Key works:** Thermodormancy. Reciprocal crosses. High temperatures.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primeira contagem de germinação (04 dias), germinação (07 dias) e índice de velocidade de germinação (IVG 32) de sementes de alface das cultivares Everglades e Veronica e de seus híbridos recíprocos, F <sub>1</sub> (Everglades ♀ x Veronica ♂) e F <sub>1</sub> (Veronica ♀ x Everglades ♂), à temperatura de 32°C e germinação (14) e índice de velocidade de germinação (IVG Final) à temperatura de 20°C. Coeficiente de variação (CV%). .....	31
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Eletroforese de enzima catalase mais o gráfico da quantificação da expressão pós avaliação com auxílio do software ImageJ®. Resultados seguidos da mesma letra minúscula não diferenciam entre si a 5% de probabilidade no teste de Tukey. F1{(Everglades ♀ x Veronica ♂) - F1 (ExV)}, F1{(Veronica ♀ x Everglades ♂) - F1 (VxE)}. ..... 33
- Figura 2 - Imagem da eletroforese da enzima esterase mais o gráfico da quantificação da expressão pós avaliação com auxílio do software ImageJ®. Resultados seguidos da mesma letra minúscula não diferenciam entre si a 5% de probabilidade no teste de Tukey. F1(Everglades ♀ x Veronica ♂) (F1(ExV)), F1(Veronica ♀ x Everglades ♂) (F1(VxE))...... 35
- Figura 3 - Imagem da eletroforese da enzima Superóxido dismutase mais o gráfico da quantificação da expressão pós avaliação com auxílio do software ImageJ®. Resultados seguidos da mesma letra minúscula não diferenciam entre si a 5% de probabilidade no teste de Tukey. F1(Everglades ♀ x Veronica ♂) (F1(ExV)), F1(Veronica ♀ x Everglades ♂) (F1(VxE))...... 36

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO..... 12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO ..... 14</b>
<b>2.1</b>	<b>A cultura da alface..... 14</b>
<b>2.2</b>	<b>Qualidade de sementes de alface ..... 15</b>
<b>2.3</b>	<b>Efeito materno..... 18</b>
	<b>REFERÊNCIAS..... 21</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO * ..... 24</b>
	<b>Artigo 1 - Efeito materno para a característica de tolerância à terminibição em sementes de alface ..... 25</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO..... 26</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS ..... 28</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 30</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES..... 36</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS..... 37</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as hortaliças folhosas, a alface se destaca como a de maior importância no mercado mundial e nacional. Apesar de existir uma grande variação de condições edafoclimáticas no Brasil, a alface é produzida em quase todo o território nacional, o que é possível graças a utilização de cultivares mais adaptadas, principalmente no que diz respeito à tolerância ao pendoamento precoce.

Devido a sua vida de pós-colheita ser curta, normalmente as zonas produtoras se concentram perto de áreas metropolitanas, os chamados 'cinturões-verdes'. No entanto, hoje a alface é produzida praticamente o ano todo, em quase todo o território nacional, facilitando sua distribuição. Por causa da grande extensão territorial do Brasil e a diversidade climática existente, há necessidade de semeadura em épocas ou regiões com temperaturas mais elevadas, embora a alface seja uma espécie oriunda de regiões de clima temperado.

Normalmente, os problemas com germinação de sementes de alface podem ser atribuídos a dois fenômenos distintos, a termodormência e a termoinibição. A termodormência, também chamada de dormência secundária, normalmente ocorre quando as sementes ficam expostas a temperaturas elevadas durante o armazenamento. Ao serem colocadas para germinar, mesmo em temperaturas favoráveis, a germinação não ocorre. A retomada da germinação só se dá por meio de um tratamento para a superação desta dormência. Já a termoinibição consiste na incapacidade de as sementes germinarem sob alta temperatura, sendo considerado um fenômeno reversível, uma vez que esta capacidade pode ser restabelecida após a redução da temperatura a níveis adequados. A temperatura ótima para a germinação das sementes de alface se encontra em torno dos 20 °C, sendo que a maioria das cultivares apresentam sensibilidade à termoinibição, não germinando satisfatoriamente em condições de temperaturas mais elevadas, próxima de 30 °C.

O impedimento ou a redução da germinação das sementes quando a embebição ocorre sob temperaturas elevadas, torna-se um relevante problema, pois reduz a emergência de plântulas, ocasionando desuniformidade no estande final em campo, o que resulta em perdas econômicas e de produção.

Por outro lado, sabe-se que existe variabilidade genética para tolerância à germinação em temperaturas elevadas, e que alguns genótipos, como é o caso da cultivar Everglades, chegam a germinar mais de 70% de suas sementes em temperaturas acima de 30 °C. Estes genótipos, no entanto, não apresentam características comerciais desejáveis e não ainda estão

bem elucidados na literatura os mecanismos genéticos envolvidos no controle da tolerância à termoinibição.

Uma das dúvidas que surge, diz respeito à contribuição dos tecidos maternos da semente no mecanismo de resistência à termoinibição. Como o estudo de controle genético da característica envolve o cruzamento entre genitores contrastantes, torna-se importante conhecer o comportamento das sementes oriundas dos cruzamentos recíprocos entre estes genitores. Só assim, é possível compreender melhor o comportamento das gerações oriundas do cruzamento e estabelecer os métodos de melhoramento mais adequados.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se ocorre efeito materno para a característica de tolerância à termoinibição em sementes de alface.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa*) pertencente à família Asteraceae, originária da região do mediterrâneo, e é a hortaliça folhosa mais importante no mundo e a mais comercializada no Brasil, sendo consumida, principalmente, *in natura*, na forma de saladas (SALA; COSTA, 2012; SANTI et al., 2013).

Dentre os estimados 25 milhões de toneladas de hortaliças produzidas no Brasil, incluindo batata e batata doce, a alface contribui com 575.529 toneladas (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI, 2019).

A fase de importância econômica se encontra na fase vegetativa, caracterizada pela produção de folhas. A alface é agrupada em grupos morfológicos de acordo com o tipo de folha e a formação ou não de cabeça, assim os principais grupos são repolhuda lisa, repolhuda crespa ou americana, solta lisa, solta crespa, solta crespa roxa e do tipo romana. No Brasil, as alfaces mais consumidas são do tipo repolhuda solta, crespa solta, repolhuda crespa e solta lisa, mediante o uso de cultivares para as quais foi realizado melhoramento genético para promover maior adaptação em regiões tropicais. A alface crespa repolhuda, também chamada de alface ‘americana’ é muito utilizada em *fast food* devido a sua textura, sabor e facilidade para processamento (HENZ; SUINAGA, 2009).

A evolução da alficultura no Brasil se iniciou com a do tipo repolhuda lisa, porém, devido a sérios problemas no cultivo, ligados a altas temperaturas e altos índices de pluviosidade, os produtores adotaram a lisa solta, assim, reduzindo alguns problemas fitossanitários. Posteriormente, com a ajuda do melhoramento genético, foi possível alcançar maior tolerância ao pendoamento precoce e uma maior resistência das folhas às injúrias mecânicas na alface crespa, ganhando mercado. Outros ramos promissores no mercado de alface são as mini, *baby leaf*, *frizze* e crocante. A crocante se destaca pela grande aceitação no mercado consumidor, já que possui características associadas à da alface crespa e americana, além da contribuição para alficultura brasileira, por visar a adaptação às condições climáticas de cultivo no Brasil, e por ser a primeira alface considerada longa vida (SALA; COSTA, 2012).

O final da fase vegetativa e início da fase reprodutiva da alface, se inicia com a produção e acúmulo de látex, que promove o sabor amargo às folhas e a indução da haste floral. Sua inflorescência é capituliforme, com três brácteas que abrigam de 10 a 25 flores cada. Suas

sementes são do tipo aquênio ou fruto seco, tendo tamanho e massa bastante reduzidos (SALA; NASCIMENTO, 2014).

De acordo com a Conab (2019), o setor hortifrutigranjeiro é o item com maior representatividade nas compras do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), chegando a 63% do total de alimentos comprados. No caso das hortaliças, a alface é a que apresenta o maior valor para apoio, com orçamento que chega a R\$ 2 milhões em todo o país. Como a cultura da alface se propaga via semente, o setor sementeiro se destaca, porém, o mercado brasileiro sementeiro de alface ainda é insuficiente, dependendo de importação, mas a exigência do mercado consumidor do Brasil não acompanha a preferência do mercado externo.

Um grande entrave para o setor sementeiro que trabalha com alface no Brasil é o clima, já que a cultura tem seu desenvolvimento ótimo de germinação por volta dos 20 °C. Kozarewa et al. (2006) relataram que algumas cultivares expressam redução na germinação acima de 25 °C e, com o aumento para 27 °C, pode ocorrer a completa inibição da germinação. Bufalo et al. (2012) relataram que sementes de alface a 20 e 25°C possuem germinação acima de 90%, já em temperaturas de 30° sofrem uma redução de aproximadamente 40% e quando em 35 °C não há germinação. Villela et al. (2010) comentaram que em relação à temperatura ideal e limite de germinação, existem diversos fatores relacionados, porém, o genótipo, é o principal determinante.

## **2.2 Qualidade de sementes de alface**

Genótipos cuja germinação não é afetada por altas temperaturas são considerados termotolerantes, termo pouco discutido quanto a sua definição. Já os genótipos termosensíveis apresentam dificuldade de germinação em altas temperaturas e há uma drástica redução na porcentagem de germinação. Sung, Cantliffe e Nagata (1998) afirmaram que, quando a temperatura de germinação em sementes de alface sobe 2 e 3 °C acima da temperatura máxima para um genótipo específico, a germinação cai rapidamente.

A não germinação de sementes termosensíveis pode estar ligada à dormência primária ou à dormência secundária. A dormência primária se desenvolve na semente ainda na fase de maturação antes de se desconectar da planta mãe. Esta impede a germinação da semente logo após colheita. Kano et al. (2011) comentam que a dormência primária é superada naturalmente após alguns dias, ou em poucos meses, não sendo necessário nenhum tratamento para que a semente germine. Mesmo em condições favoráveis, se a dormência primária está presente nas sementes não há germinação, isto se deve a diversos fatores, como imaturidade fisiológica,



física, morfológica, química, mecânica ou a combinação destas. Para Bentsink e Koornneef (2008) a dormência primária é importante para a perpetuação da espécie, permitindo a sobrevivência das sementes em condições desfavoráveis, além de impedir a germinação na planta mãe, fenômeno conhecido como viviparidade.

Já a dormência secundária ocorre após a semente ter atingido a maturidade e estar apta a germinar. Essa dormência ocorre se a semente passa por um período de estresse ambiental, o qual induz um mecanismo de proteção na semente, impedindo a germinação em condições desfavoráveis para sua sobrevivência. Lopes e Nascimento (2012) observaram que este processo envolve várias modificações fisiológicas, físicas e químicas.

A dormência secundária, ou também conhecida como termodormência, pode ser adquirida no armazenamento desta. A termodormência é induzida por períodos prolongados de altas temperaturas (CATÃO et al., 2016, NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002). A dormência pode ocorrer de forma mais branda ou profunda, dependendo da intensidade e do tempo de exposição.

Já a termoinibição, para Sung, Cantliffe e Nagata (1998), é uma condição transitória da termodormência. Os autores acreditam que prevenindo a termoinibição evita-se a termodormência. Assim, a termoinibição é a inabilidade branda e temporária de germinação, devido a temperaturas desfavoráveis naquele momento, que pode ser superada de forma simples e natural, por meio do reestabelecimento de temperaturas adequadas para a germinação, não havendo necessidade de tratamentos específicos. A termodormência, por outro lado, é considerada uma forma profunda de inatividade, pois necessita de tratamento para a semente sair desta condição e germinar.

O clima tropical é predominante em grande parte do território brasileiro e proporciona um meio favorável à inativação da germinação por meio da termodormência e termoinibição. Diferentes estudos evidenciam a necessidade do desenvolvimento de novas cultivares para as quais a germinação ocorra em temperaturas mais elevadas, proporcionando melhorias na produção, uma vez que a germinação está intimamente relacionada à uniformidade da produção e aos parâmetros esperados no estande de plantas (ARGYRIS et al., 2008; CATÃO et al., 2014; KOZAREWA et al., 2006; SUNG; CANTLIFFE; NAGATA, 1998). Sendo assim, diversas medidas são propostas para que a germinação em sementes de alface ocorra em altas temperaturas, visando a maximização da produção.

Sung, Cantliffe e Nagata (1998) utilizaram genótipos termosensíveis e termotolerantes de alface para verificar a influência da condição ambiental durante a maturação das sementes, na temperatura limite de germinação. Demonstraram que as cultivares termosensíveis

aumentaram a porcentagem de germinação ou apresentaram germinação em altas temperaturas, quando produzidas em altas temperaturas. Enquanto que as sementes dos genótipos termosensíveis, que foram produzidos em condições ambientais em baixa temperatura, não germinaram sob altas temperaturas. Os autores ressaltaram ainda, que o genótipo limita o alcance de máxima temperatura em que se pode atingir a germinação.

Sung et al. (2008) verificaram que sementes com genótipos termosensíveis e com genótipos termotolerantes produzidas e, posteriormente embebidas em condições de altas temperaturas, quando submetidas ao *priming* têm suas estruturas modificadas no endosperma, perto da região radicular, sugerindo a realização de *priming* como alternativa para contornar a termodormência e termoinibição.

Bufalo et al. (2012) mencionaram formas que vêm sendo utilizadas para promover a germinação em altas temperaturas, apontando o condicionamento osmótico, reguladores vegetais, ajustes na produção de sementes e também genótipos termotolerantes, como alternativas para contornar as limitações da temperatura. Kozarewa et al. (2006) contribuíram identificando mecanismos para promover o aumento da temperatura limite de germinação em sementes de alface, por meio do estudo de inibidores de etileno e etileno exógeno durante a maturação de sementes em altas e baixas temperaturas.

Argyris et al. (2008), trabalhando com sementes de alface *Lactuca sativa* da cultivar Salinas, verificaram que as mesmas não conseguiam germinar em temperaturas acima de 25 °C a 30 °C, devido a termoinibição. Porém, as sementes de um acesso de *Lactuca serriola* (UC96US23) não apresentaram termoinibição com temperaturas de até 37 °C. Na presença de temperaturas elevadas, constataram que esses genótipos apresentaram sensibilidades diferentes ao ácido abscísico (ABA) e à giberelina (GA) para a germinação. A expressão gênica também variou entre os genótipos, sendo que os genes relacionados com ABA foram mais altamente expressos quando a germinação foi inibida, e os genes relacionados com GA e etileno foram mais altamente expressos quando a germinação ocorreu. A cultivar Everglades representa um dos principais materiais de estudos no entendimento do complexo mecanismo referente à germinação de alface em altas temperaturas, sendo considerada tolerante à termoinibição (CATÃO et al., 2014; NASCIMENTO; CANTLIFFE; HUBER, 2000; NASCIMENTO; PEREIRA, 2007; SUNG; CANTLIFFE; NAGATA, 1998), apresentando porcentagens de germinação relevantes quando embebidas em temperatura de 35 °C. Catão et al. (2014) constataram que a cultivar Everglades se diferenciou estatisticamente das demais cultivares em relação a atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase nesta temperatura.

Catão et al. (2016), em experimento com sementes de alface, realizaram ensaios com seis cultivares como Babá de Verão, Elisa, Everglades, Grand Rapids, Hortência e Salinas 88, com períodos de armazenamento de 30, 60, 90 e 120 dias, sob temperaturas de armazenamento de 15, 25 e 35 °C. Verificou-se que a associação de longos períodos de armazenamento com altas temperaturas acarretaram em perdas na qualidade fisiológica e alterações nos padrões das enzimas catalase, esterase, álcool desidrogenase e malato desidrogenase. Observou-se que a cultivar Everglades possui certo nível de tolerância ao armazenamento sob altas temperaturas.

Há a necessidade de variabilidade genética para o sucesso na obtenção de genótipos superiores em programas de melhoramento (SOUZA et al., 2008). Apesar de grande parte das cultivares de alface utilizadas serem sensíveis à termoinibição, encontram-se na literatura diversos relatos de genótipos cujas sementes são capazes de germinar sob temperaturas elevadas. Como exemplo, há o acesso de *Lactuca serriola* UC96US23, capaz de germinar em temperaturas próximas aos 37 °C (ARGYRIS et al., 2011), o acesso primitivo de *Lactuca sativa* L. PI251246, capaz de germinar acima de 33 °C (YOONG et al., 2016), e a cultivar de alface do tipo lisa, Everglades, cuja germinação das sementes é superior a 70% à temperatura de 35 °C (CATÃO et al., 2014; SUNG et al., 2008) e de 100% à temperatura de 32 °C (QUEIROZ, 2017). No entanto, outras cultivares como a cultivar Veronica possui germinação abaixo de 80% a 32 °C. Essas informações demonstram que há variabilidade genética entre sementes de alface para tal característica.

### 2.3 Efeito materno

Os embriões podem ser influenciados pelo ambiente materno em que se desenvolvem. Mesmo quando removidos precocemente do corpo da mãe recebem citoplasma e nutrientes da mãe, e a influência sobre a ação gênica já pode ter ocorrido. Uma predeterminação dos genes da mãe, ao invés dos genes da descendência, é chamada de efeito materno (VEIT et al., 1993). A existência do efeito materno pode ser testada por cruzamentos recíprocos. Quando há efeito materno para uma determinada característica, os cruzamentos recíprocos resultarão em respostas diferentes um do outro para aquela característica, com os genes da mãe sendo envolvidos (NASCIMENTO et al., 2016).

Características relacionadas às sementes podem apresentar efeito materno, o que eventualmente poderia influenciar na interpretação de resultados relacionados à geração F<sub>1</sub>. A expressão dessas diferenças em sementes pode ser esperada, uma vez que é influenciada pelo genótipo de três tecidos com composição genética variável: a parte feminina da planta, que

porta o fruto e que contém as sementes em desenvolvimento contribui com a testa; o endosperma, triplóide, que nutre o embrião em desenvolvimento, e o embrião, diploide (ORSI; TANKSLEY, 2009).

Nascimento et al. (2016), em experimento para verificar a ocorrência de termoinibição em sementes de tomate, utilizaram sementes oriundas de cruzamentos recíprocos entre as cultivares San Vito e Fontana, e observaram efeito materno nos híbridos.

Alguns trabalhos citam que a característica de termoinibição em sementes de alface pode ser devido à dificuldade de rompimento do endosperma (CATÃO et al., 2016; CATÃO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2002). Nas condições que favorecem a termoinibição, parece que o endosperma atua como uma barreira física, dificultando ou impedindo a protrusão da radícula. A adição de etileno na germinação de sementes de uma cultivar sensível à termoinibição promoveu um aumento na ação da enzima endo- $\beta$ -mananase, contribuindo para o enfraquecimento do endosperma e, conseqüentemente, para um aumento na germinação sob alta temperatura (NASCIMENTO et al., 2004). Sendo o endosperma de origem triploide, o resultado da germinação em sementes  $F_1$ , neste caso, pode ser em parte ou totalmente influenciado pelo genótipo materno.

A verificação da qualidade fisiológica de sementes, bem como características genéticas, como é o caso do efeito materno, além da avaliação direta da germinação, podem ser feitos também por meio de análises enzimáticas. A análise da expressão de determinadas enzimas e proteínas pode proporcionar a discriminação de genótipos, o que possibilita identificar variações relacionadas a fatores abióticos, como é o caso de temperaturas elevadas de germinação. Dessa forma, é possível identificar também, marcadores que possam se tornar ferramenta para seleção de materiais tolerantes a altas temperaturas de germinação (ROVERI et al., 2004).

Segundo McDonald (1999), as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) constituem mecanismos eficientes para desintoxicação, atuando na remoção de radicais livres. O estresse causado pela temperatura elevada em sementes pode induzir processos oxidativos e produção de radicais livres. Isso pode ser evidenciado indiretamente pela maior ativação da enzima catalase (CAT). Sendo assim, em sementes mais deterioradas observa-se redução acentuada na atividade dessa enzima.

De acordo com Fridovich (1986), a catalase, por ser uma enzima envolvida no processo de remoção do peróxido de hidrogênio, desempenha controle desses peróxidos endógenos por meio do ciclo óxido-redução. Sendo assim, a redução na atividade dessa enzima poderá resultar na diminuição da prevenção de danos oxidativos.

Diniz et al. (2009), trabalhando com armazenamento de sementes de alface, afirmaram que as esterases são o grupo de enzimas mais importantes na germinação desta espécie. Temperaturas elevadas, assim como condições de estresse, causam alterações nos padrões da esterase (EST), estas são evidências da ocorrência de eventos deteriorativos, pois é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres e está diretamente ligada ao metabolismo de lipídios e ao processo degenerativo de membranas (SANTOS; MENEZES; VILELA, 2005).

A verificação da existência de efeito materno para a característica de tolerância à termoinibição em sementes de alface é de suma importância, uma vez que esses materiais podem ser utilizados como fonte de alelos em programas de melhoramento, visando a obtenção de cultivares de alface que possuam bons atributos agronômicos, e sejam tolerantes à termoinibição. Entretanto, os mecanismos relacionados ao controle genético dessa característica ainda não foram suficientemente estudados (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002), tornando-se necessário a realização de estudos que permitam avançar em pesquisas que visem elucidar estes mecanismos, bem como estabelecer estratégias de melhoramento genético adequadas para o desenvolvimento de novas linhagens de alface tolerantes à termoinibição.

## REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI 2019. **Brazilian Horti & Fruti Yearbook 2019**. Editora Gazeta, 31 de julho de 2019. p. 1-53. Disponível em: <<http://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-de-horti-fruti-2019/>>. Acesso em: 31 jul. 2019.
- ARGYRIS, J.; TRUCO, M.J.; OCHOA, O.; MCHALE, L.; DAHAL, P.; VAN DEYNZE, A.; BRADFORD, K.J. A gene encoding an abscisic acid biosynthetic enzyme (LsNCED4) collocalizes with the high temperature germination locus Htg6. 1 in lettuce (*Lactuca* sp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, n. 1, p. 95-108, 2011.
- ARGYRIS, J.; DAHAL, P.; HAYASHI, E.; STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 926-947, 2008.
- BENTSINK, L.; KOORNNEEF, M. Seed Dormancy and Germination. In: WINCHESTER, N.; McCAULEY, D. **The Arabidopsis Book. The American Society of Plant Biologists**, v. 6, p.18, 2008.
- BUFALO, J. et al. Períodos de estratificação na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) sob diferentes condições de luz e temperatura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 931-940, 2012.
- CATÃO, H.C.R.M.; GOMES, L.A.A.; GUIMARÃES, R.M.; FONSECA, P.H.F.; CAIXETA, F.; MARODIN, J.C. Physiological and isoenzyme alterations in lettuce seeds under different conditions and storage periods. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 305-313, 2016.
- CATÃO, H.C.R.M.; GOMES, L.A.A.; DOS SANTOS, H O.; GUIMARÃES, R.M.; FONSECA, P.H.F.; CAIXETA, F. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de alface em diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 316-322, 2014.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Agricultura Familiar. Programa de Aquisição de Alimentos - PAA: Resultados das ações da Conab em 2018. **Compêndio de Estudos Conab/Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 20, p. 24, 2019.
- DINIZ, K. A. et al. Qualidade de sementes de alface enriquecidas com micronutrientes e reguladores de crescimentos durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 228-238, 2009.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 147, n. 1, p. 1-11, May 1986.
- HENZ, G.P.; F. SUINAGA. **Tipos de alface cultivada no Brasil**. Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2009.

KANO, C.; CARDOSO, A.I.I.; BOAS, R.L.V.; HIGUTI, A.R.O. Germinação de sementes de alface obtidas de plantas cultivadas com diferentes doses de fósforo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 591-598, 2011.

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

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

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

NASCIMENTO, W.M.; ANDRADE, K.P.; FREITAS, R.A.; SILVA, G.O.; BOITEUX, L.S. Effects of temperature on tomato seed germination: Phenotypic variability and heterosis. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 216-222, 2016.

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

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

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

NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER, D.J. Thermotolerance in lettuce seeds: association with ethylene and endo- $\beta$ -mannanase. **Journal American Society Horticulture Sciences**, v. 125, n. 4, p. 518-524, 2000.

ORSI, C.H.; TANKSLEY, S.D. Natural variation in an ABC transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. **PLoS Genet**, v. 5, n. 1, p. e1000347, 2009.

QUEIROZ, D. A. **Armazenamento de sementes e temperatura de germinação na tolerância à termoinibição em genótipos de alface**. 47 p. Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2017.

ROVERI, J.S.C.B.; VON PINHO, E.V.D R.; VON PINHO, R.G.; SILVEIRA, C.M.D. Electrophoretic patterns of the alpha-amylase enzyme in corn seeds submitted to high drying temperature. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 77-83, 2004.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 187-194, 2012.

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

SANTI, A.; SCARAMUZZA, W.L.M.P.; NEUHAUS, A.; DALLACORT, R.; KRAUSE, W.; TIEPPO, R.C. Desempenho agrônomico de alface americana fertilizada com torta de filtro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 338-343, 2013.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.104-114, 2005.

SOUZA, M.C.M.; RESENDE, L.V.; MENEZES, D.; LOGES, V.; SOUTE, T.A; SANTOS, V.F. Variabilidade genética para características agronômicas em progênies de alface tolerantes ao calor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 354-358, 2008.

SUNG, Y.; CANTLIFFE, D.J.; NAGATA, R.T. Seed developmental temperature regulation of thermotolerance in lettuce. **Journal American Society Horticulture Sciences**, v. 123, n. 4, p. 700-705, 1998.

SUNG, Y. et al. Structural changes in lettuce seed during germination at high temperature altered by genotype, seed maturation temperature, and seed priming. **Journal American Society Horticulture Sciences**, v. 133, n. 2, p. 300-311, 2008.

VEIT, B.; SCHMIDT, R.J.; HAKE, S.; YANOFSKY, M.F. Maize floral development: new genes and old mutants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1205-1215, 1993.

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

YOONG, F.Y.; O'BRIEN, L.K.; TRUCO, M.J.; HUO, H.; SIDEMAN, R.; HAYES, R.; MICHELMORE, R.W.; BRADFORD, K.J. Genetic variation for thermotolerance in lettuce seed germination is associated with temperature-sensitive regulation of Ethylene Response Factor 1 (ERF1). **Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p. 472-488, 2016.



**SEGUNDA PARTE – ARTIGO \***

## Artigo 1 - Efeito materno para a característica de tolerância à termoinibição em sementes de alface

### RESUMO

A temperatura ótima para germinação de sementes de alface situa-se em torno dos 20 °C. Em temperaturas superiores a 28 °C, comuns em diversas regiões do mundo, as sementes podem sofrer um processo de termoinibição, levando a uma redução significativa da germinação. Há poucos estudos sobre o controle genético da tolerância à termoinibição, e, sendo esta influenciada pelo endosperma, pode sofrer efeito materno. Neste caso, a comprovação da existência de efeito materno é de grande importância para o melhoramento, visando tolerância à termoinibição. Assim, objetivou-se verificar a ocorrência de efeito materno na tolerância à termoinibição em sementes de alface e encontrar um marcador enzimático. Foram utilizadas sementes das cultivares Everglades (tolerante à termoinibição/folhas lisas) e Veronica (sensível à termoinibição/folhas crespas), além dos híbridos recíprocos, oriundos do cruzamento entre as duas cultivares. As sementes foram submetidas aos testes de germinação, vigor pelo índice de velocidade de germinação (IVG) e testes enzimáticos. Os testes de germinação e IVG foram submetidos à análise de variância. As médias das bandas das análises enzimáticas foram quantificadas por meio do software ImageJ® e submetidas ao teste de Tukey. Observou-se que ao se utilizar a cultivar Veronica como genitor feminino, as sementes híbridas apresentam suscetibilidade à germinação em altas temperaturas com menor expressão da enzima esterase sendo semelhante à própria cultivar. Por outro lado, quando o genitor feminino foi a cultivar Everglades, as sementes do híbrido apresentaram maior tolerância à germinação em temperatura elevada e maior expressão da enzima esterase, semelhante à Everglades. Os resultados indicam que existe efeito materno para a tolerância à termoinibição em sementes de alface, e que a esterase pode ser utilizada como marcador de seleção assistida em gerações mais avançadas, para identificação de progênies homozigotas para esta característica.

**Palavras-chave:** Altas temperaturas. Índice de velocidade de germinação. Enzima esterase.

### ABSTRACT

The optimum temperature for lettuce seeds germination is around 20 °C. At temperatures over 28°C, common in several regions of the world, the seeds face to the process of thermoinhibition, which leads to a significant germination reduction. There are few studies on the genetic control of the tolerance to thermoinhibition which is influenced by the endosperm and may have maternal effect. In this case, the proof of maternal effect is very important for breeding program aiming tolerance to the thermoinhibition. Thus, the aim of the study is to verify the occurrence of maternal effect in the tolerance to the thermoinhibition in lettuce seeds and to find an enzyme marker. Seeds of the cultivars Everglades (tolerant to thermoinhibition / flat leaves) and Veronica (susceptible to thermoinhibition / curly leaves) and the reciprocal hybrids from the crosses between the two cultivars were used. Germination, vigor (germination speed index - GSI) and enzymatic tests were performed. The germination and GSI tests were submitted to variance analysis. The bands of the enzymatic analyzes were quantified using the ImageJ® software and the means submitted to the Tukey test. It was observed that when the Veronica cultivar was used as the female genitor, the hybrid seeds present susceptibility to germination

at high temperatures with less expression of the esterase enzyme being like the cultivar. On the other hand, when the female genitor was the Everglades cultivar, the hybrid seeds presented higher tolerance to germination at high temperature and greater expression of the esterase enzyme, like Everglades. The results showed the existence of a maternal effect for the tolerance to thermoinhibition in lettuce seeds. The esterase can be used as a selective marker assisted in more advanced generations to identify homozygous progenies for this trait.

**Key works:** High temperatures. Germination speed index. Esterase enzyme.

## 1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa*) é uma espécie anual pertencente à família Asteraceae cuja importância econômica e comercial diz respeito ao grande consumo do produto *in natura*, que são suas folhas colhidas ainda na fase vegetativa. Seu centro de diversidade se encontra no leste asiático, se estendendo para a região do mediterrâneo, podendo também ser encontrado no Egito (FILGUEIRA, 2008).

A temperatura ideal para o desenvolvimento vegetativo da alface se encontra entre 15 a 18 °C com no máximo 24 °C (BRUNINI et al., 1976). Temperaturas acima de 22 °C favorecem o florescimento precoce e antecipa a colheita (MOTA et al., 2003). O pendoamento, ou início do crescimento da haste floral, é marcado pelo fim do estágio comercial, ocorrendo um aumento no teor de látex nas folhas, o que confere um sabor amargo às mesmas e tornando-as impróprias para a comercialização (MALUF, 1994).

Quando o objetivo é a produção de sementes de alface, o ciclo da cultura do plantio até se obter as sementes, pode demorar até 170 dias, podendo este tempo ser reduzido dependendo da temperatura, da cultivar, e da região de plantio. Se a produção de sementes for feita em ambiente protegido, o prazo para obtenção das mesmas pode ser reduzido para até 100 dias (MENEZES et al., 2001). No que tange à germinação, os principais fatores a serem considerados são oxigênio, temperatura e umidade. A temperatura influencia diretamente na germinação, sendo uma média 20 °C considerada ideal (NASCIMENTO; CANTLIFFE, 2002). As sementes da maior parte das cultivares são termoinibidas, e em temperaturas superiores a 28 °C a germinação tende a não acontecer (YOONG et al., 2016).

A termoinibição é um fenômeno em que a semente é incapaz de germinar em altas temperaturas, podendo ser reversível com a redução da temperatura a níveis adequados. Por outro lado, quando se trata de termodormência, mesmo em temperaturas favoráveis não há a retomada da germinação, e, portanto, há a necessidade de instituir um tratamento específico

para a quebra desta dormência. Os dois fenômenos podem acontecer de diferentes formas, envolvendo o embrião, impossibilitando a protrusão da radícula, envolvendo a interação de diversos fatores, ou pela presença de genes inibidores da germinação que podem ser regulados pela temperatura (HILLS et al., 2003).

Há a necessidade de variabilidade genética para o sucesso na obtenção de genótipos superiores em programas de melhoramento (SOUZA et al., 2008). Apesar de grande parte das cultivares de alface utilizadas serem sensíveis à termoinibição, encontram-se na literatura diversos relatos de genótipos cujas sementes são capazes de germinar sob temperaturas elevadas. Como exemplo, há o acesso de *Lactuca serriola* UC96US23, capaz de germinar em temperaturas próximas aos 37 °C (ARGYRIS et al., 2011), o acesso primitivo de *Lactuca sativa* L. PI251246, capaz de germinar acima de 33 °C (YOONG et al., 2016), e a cultivar de alface do tipo lisa, Everglades, cuja germinação das sementes é superior a 70% à temperatura de 35 °C (CATÃO et al., 2016; CATÃO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2004).

Óvulos e embriões podem ser influenciados pelo ambiente materno em que se desenvolveram. Mesmo quando removidos precocemente do corpo da mãe, recebem citoplasma e nutrientes do óvulo da mãe, e influência sobre a ação gênica já pode ter ocorrido. Uma predeterminação dos genes da mãe ao invés dos genes da descendência é chamada de efeito materno. A existência do efeito materno pode ser testada por cruzamentos recíprocos. Se realmente houver o efeito materno, os resultados dos cruzamentos serão diferentes uns dos outros com os genes da mãe sendo envolvidos (NASCIMENTO et al., 2016).

Características relacionadas às sementes podem apresentar efeito materno, o que eventualmente poderia influenciar na interpretação de resultados relacionados à geração F<sub>1</sub>. A expressão dessas diferenças em sementes pode ser esperada, uma vez que é influenciada pelo genótipo de três tecidos com composição genética variável: a parte feminina da planta, que porta o fruto e que contém as sementes em desenvolvimento contribui com a testa; o endosperma, triploide, que nutre o embrião em desenvolvimento, e o embrião, diploide (ORSI; TANKSLEY, 2009).

Além de testes relacionados à germinação, outro meio de se verificar a variação na qualidade fisiológica e características genéticas inerentes às sementes, como é o caso do efeito materno, é por meio de análises enzimáticas. A análise da expressão de enzimas e proteínas pode proporcionar a discriminação das cultivares, o que possibilita identificar variações relacionadas a fatores abióticos, como temperaturas elevadas de germinação. Dessa forma, é possível identificar marcadores que possam se tornar ferramenta para seleção de materiais tolerantes a altas temperaturas de germinação (ROVERI et al., 2004).

Os mecanismos relacionados ao controle genético da característica de tolerância à termoinibição em sementes de alface ainda não foram suficientemente elucidados, tornando-se importante a realização de estudos neste sentido, para se estabelecer metodologias adequadas para programas de melhoramento genético, que visam a incorporação desta característica em novas linhagens de alface. Para avançar nestes estudos, por outro lado, torna-se importante a verificação da existência ou não de efeito materno associado à característica, em vista deste fenômeno estar diretamente relacionado à escolha correta das gerações a serem utilizadas nos estudos de controle genético, quanto na escolha da geração para se iniciar os processos de seleção.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito materno na característica de tolerância à termoinibição em sementes de alface e encontrar um marcador enzimático.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de alface: Everglades, que apresenta folhas lisas e é considerada tolerante à termoinibição, e a Veronica, que possui folhas crespas e é sensível à termoinibição, além de sementes dos híbridos recíprocos resultantes do cruzamento entre as duas cultivares.

Para a obtenção das sementes, inicialmente fez-se a semeadura das cultivares Everglades e Veronica, em bandejas de poliestireno com 128 células, semeando-se três sementes por células. Após a germinação e emergência das plântulas foi feito o desbaste, deixando apenas uma planta por célula. Em vista da maior precocidade da cultivar Everglades, o semeio foi escalonado, parcelando as 128 células em 28 dias, semeando 32 células por semana, para garantir maior possibilidade de coincidência no florescimento das cultivares, no momento dos cruzamentos.

A produção das mudas foi realizada em casa de vegetação da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As mudas ficaram dispostas sobre bancadas de concreto, acima das quais foi instalada uma tela de sombreamento Sombrite® 30%, para diminuir a incidência da radiação solar. As mudas foram irrigadas conforme a necessidade e 25 dias após a germinação foram transplantadas para vasos de 10 litros, preenchidos com uma mistura na proporção 2:1:1 de solo, areia e composto orgânico, respectivamente.

Durante a condução das plantas, até o momento da colheita de sementes, foram realizadas pulverizações, adubações e irrigação, de acordo com a necessidade da cultura.

Na época do florescimento foram realizados os cruzamentos pela manhã, com emasculação das flores dos genitores femininos, feita antes do nascer do sol, iniciada por volta das 4h, para evitar o corte de estigmas. A coleta de flores nos genitores masculinos para realizar a polinização, foi realizada após a abertura das flores, por volta de 8h30.

Cada botão floral emasculado foi identificado com lã colorida amarrando-a em seu pedúnculo. Após o desenvolvimento dos estigmas, quando houve a abertura das flores e estes se encontravam bífidus, foram polinizados. A polinização foi feita manualmente utilizando uma flor aberta do outro genitor esfregando-a diretamente nos estigmas da flor emasculada do genitor feminino. Após o desenvolvimento e amadurecimento das sementes, estas foram colhidas nos dois genitores e identificadas como F<sub>1</sub> (Everglades x Veronica), correspondendo às sementes colhidas em flores emasculadas de plantas da cultivar Everglades e polinizadas com flores da cultivar Veronica; F<sub>1</sub> (Veronica x Everglades), correspondendo às sementes colhidas em flores emasculadas de plantas da cultivar Veronica e polinizadas com flores da cultivar Everglades; Veronica, correspondendo às sementes oriundas de autofecundação da cultivar Veronica e Everglades, correspondendo às sementes oriundas de autofecundação da cultivar Everglades. Estas sementes foram limpas, secas, embaladas e armazenadas em câmara fria a 15 °C e 50% UR.

A confirmação da pureza das sementes F<sub>1</sub> foi feita mediante a sementeira das cultivares e das gerações F<sub>1</sub>, em bandeja de poliestireno, verificando se houve contaminação, por meio da observação das diferenças da borda das folhas. Sabendo-se que a cultivar Veronica possui borda repicada e a cultivar Everglades borda lisa, confirmou-se que 100% das sementes dos híbridos recíprocos apresentaram folhas com borda intermediária.

A verificação da ocorrência ou não do efeito materno para a característica de tolerância à termoinibição, foi feita mediante a realização dos testes de primeira contagem de germinação, germinação e índice de velocidade de germinação (IVG), que corresponde ao vigor, além de testes enzimáticos.

Para os testes de primeira contagem de germinação, germinação e vigor (IVG) foram utilizadas sementes de cada tratamento {F<sub>1</sub>(Everglades x Veronica); F<sub>1</sub>(Veronica x Everglades), Veronica e Everglades}, dispostas no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições (caixa gerbox) de 50 sementes cada, perfazendo um total de 20 parcelas. As sementes foram distribuídas em papel mata borrão dentro de caixas tipo gerbox. O papel mata borrão foi previamente umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. As caixas gerbox foram colocadas em câmaras tipo B.O.D. em temperatura de 32 °C com fotoperíodo de 12 horas. Foram feitas contagens diárias de sementes germinadas até o sétimo

dia para verificar os valores das porcentagens de germinação (G) e vigor (IVG). Após o sétimo dia a temperatura de 32 °C foi reduzida para 20 °C para verificar a viabilidade das sementes remanescentes, continuando o processo de contagem diariamente, por mais sete dias.

Os mesmos tratamentos foram também dispostos, da mesma forma, em B.O.D. em temperatura de 20 °C, para se verificar as condições de germinação e vigor das sementes em temperatura ideal.

Para as análises enzimáticas foram utilizadas três amostras de 350 sementes de cada um dos tratamentos {F<sub>1</sub>(Everglades x Veronica); F<sub>1</sub>(Veronica x Everglades), Veronica e Everglades}, que foram armazenadas à temperatura de -86 °C. Para a análise eletroforética de enzimas, as sementes foram trituradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em cadinho de porcelana sobre gelo e, posteriormente, armazenado à temperatura de -86 °C. Para a extração das enzimas, foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 60 minutos, a 4 °C. A corrida eletroforética ocorreu em sistema de géis descontínuos de poli(acrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por 6 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas -, catalase (CAT), esterase (EST), - e superóxido dismutase (SOD) (ALFENAS et al., 2006). A mensuração das bandas foi feita com o auxílio do software ImageJ® (RASBAND, 2016), resultando em uma média de densidade para cada tratamento determinada pela quantidade de pixels.

Todos os dados foram computados e as análises de variância e testes de média (Tukey 5%) foram realizados utilizando o programa R para Windows.

A verificação da ocorrência de efeito materno foi feita mediante a comparação das médias dos tratamentos para as diferentes características avaliadas. Espera-se que ocorram diferenças significativas entre as sementes das cultivares genitoras (Everglades e Veronica), e entre seus híbridos recíprocos.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Na análise de variância houve diferenças significativas para todas as características avaliadas, germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação.

Verifica-se uma superioridade das sementes da cultivar Everglades para todas as características avaliadas, quando submetidas à temperatura de 32 °C. Por outro lado, nota-se que ao reduzir a temperatura para 20 °C, as sementes remanescentes, tanto da cultivar Everglades, quanto da cultivar Veronica e dos seus híbridos recíprocos, germinaram normalmente, chegando a 100% para a cultivar Everglades e seu híbrido recíproco, F<sub>1</sub>(Everglades ♀ x Veronica ♂), 97% para a cultivar Veronica e 96% para seu híbrido recíproco, F<sub>1</sub>(Veronica ♀ x Everglades ♂) (TABELA 1).

Tabela 1 - Primeira contagem de germinação (04 dias), germinação (07 dias) e índice de velocidade de germinação (IVG 32) de sementes de alface das cultivares Everglades e Veronica e de seus híbridos recíprocos, F<sub>1</sub>(Everglades ♀ x Veronica ♂) e F<sub>1</sub>(Veronica ♀ x Everglades ♂), à temperatura de 32°C e germinação (14) e índice de velocidade de germinação (IVG Final) à temperatura de 20°C. Coeficiente de variação (CV%).

	<b>IVG32</b>	<b>IVG Final</b>	<b>04</b>	<b>07</b>	<b>14</b>
<b>Everglades</b>	35,39 <b>a</b>	66,18 <b>a</b>	68 <b>a</b>	87 <b>a</b>	100 <b>a</b>
<b>Veronica</b>	4,30 <b>bc</b>	21,30 <b>c</b>	8 <b>b</b>	8 <b>c</b>	97 <b>ab</b>
<b>F1(ExV)</b>	11,30 <b>b</b>	34,07 <b>b</b>	16 <b>b</b>	37 <b>b</b>	100 <b>a</b>
<b>F1(VxE)</b>	2,30 <b>c</b>	18,82 <b>c</b>	5 <b>c</b>	5 <b>c</b>	96 <b>b</b>
<b>CV(%)</b>	35,09	16,37	41,75	22,76	1,69

Resultados seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferenciam entre si a 5% de probabilidade no teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2019).

Estes resultados confirmam a tolerância à termoinibição da cultivar Everglades, corroborando resultados obtidos por Nascimento et al. (2012), que, ao avaliar a germinação de sementes de alface em altas temperaturas, relataram diferenças entre cultivares, com redução na germinação e no vigor das sementes quando a temperatura de germinação foi elevada de 20 para 35 °C. A alta temperatura afetou a qualidade das sementes, porém, em menor intensidade na cultivar Everglades. Outros trabalhos que corroboram os resultados são os de Catão et al. (2014) e Catão et al. (2016).

Para as características de índice de velocidade de germinação a 32 °C (IVG32), índice de velocidade de germinação final após a redução da temperatura para 20 °C (IVG Final) e germinação aos sete dias (% de germinação) (TABELA 1), sementes do híbrido cujo genitor feminino foi a cultivar Everglades (F<sub>1</sub>(Everglades ♀ x Veronica ♂)) apresentaram valores de 11,30; 34,07 e 37% respectivamente, que foram inferiores aos apresentados pelas sementes do



genitor feminino, Everglades, os quais foram de 33,59; 66,18 e 87%, diferindo significativamente destes (Tukey, 5%). Quando se consideram os valores, para as mesmas características, das sementes do híbrido recíproco  $F_1$ (Veronica ♀ x Everglades ♂), que foram de 2,30; 18,82 e 5%, e do seu genitor feminino, cultivar Veronica, que foram de 4,30; 21,30 e 8% verifica-se que também diferiram da cultivar Everglades, porém, apresentando valores significativamente inferiores para todas as três características, diferindo também das sementes do híbrido  $F_1$ (Everglades ♀ x Veronica ♂), à exceção da característica IVG32, em que a cultivar Veronica apresentou um valor intermediário aos dois híbridos recíprocos (Tukey, 5%).

Quando a temperatura foi diminuída para 20 °C e procedeu-se à nova avaliação da germinação das sementes remanescentes, sete dias após, verifica-se uma retomada na germinação das sementes de todos os genótipos, porém, ainda com uma ligeira superioridade da cultivar Everglades (100%) e do híbrido  $F_1$ (Everglades ♀ x Veronica ♂) (100%).

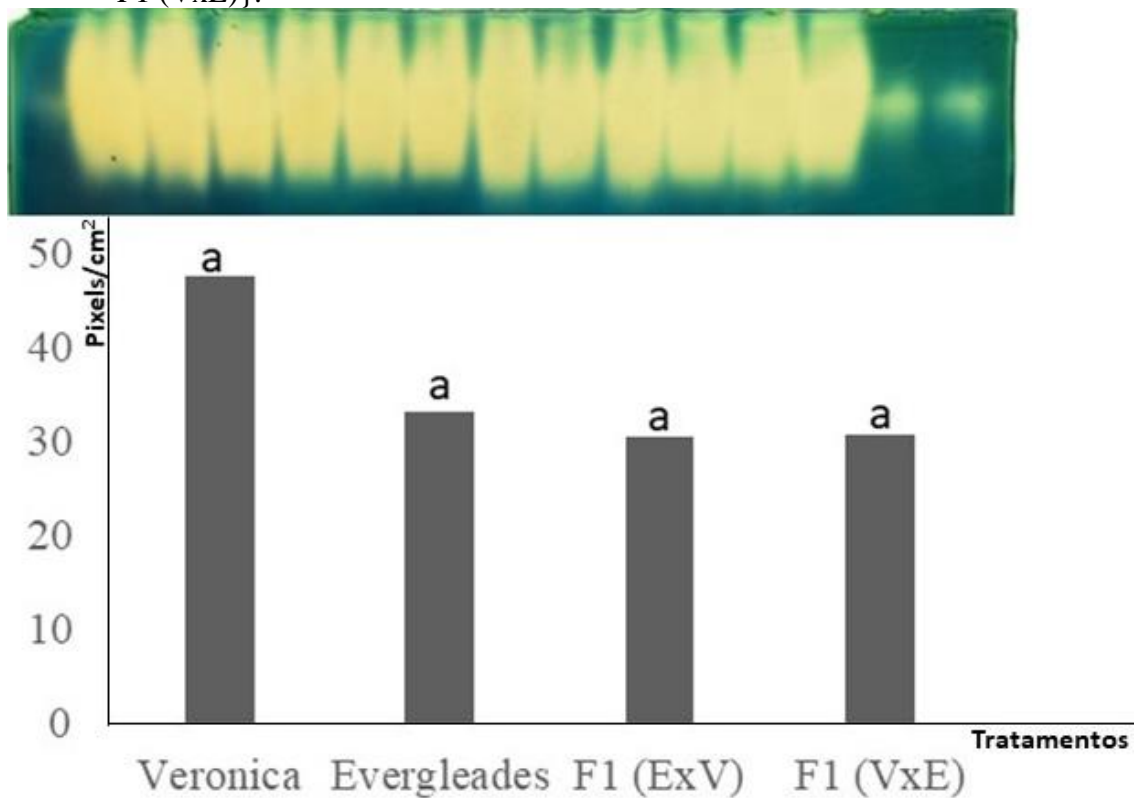
Os valores contrastantes para todas as características avaliadas em condições de 32 °C apresentados pelas sementes das cultivares Everglades e Veronica, bem como a retomada da germinação quando a temperatura, reduzida para 20 °C, confirmam, tanto a ocorrência do efeito da termoinibição em sementes de alface, quanto também da tolerância à termoinibição manifestada pelas sementes da cultivar Everglades, conforme já descrito em outros trabalhos (CATÃO et al., 2016, CATÃO et al., 2014, NASCIMENTO et al., 2012, SUNG et al., 2008).

Por outro lado, os baixos valores para todas as características avaliadas aos 32 °C, apresentados pelas sementes do híbrido que utilizou a cultivar Veronica como genitor feminino, em contraponto com os valores superiores apresentados pelas sementes do híbrido recíproco para o qual se utilizou a cultivar Everglades como genitor feminino, demonstram a influência do genótipo materno na expressão da característica de tolerância à termoinibição. Evidências de efeito materno quanto a reação à germinação em temperatura elevada, foram também observadas por Nascimento et al. (2016), que, trabalhando com qualidade e desempenho da germinação de sementes de tomateiro, utilizando temperatura elevada semelhante à utilizada neste trabalho, observaram que os resultados obtidos a partir de sementes originárias dos cruzamentos recíprocos (considerando o caráter temperatura), evidenciaram efeito dos parentais sobre as sementes dos híbridos, ocorrendo efeito materno significativo para as sementes das cultivares San Vito e Fontana. Em sementes de milho, diferenças na expressão fenotípica entre sementes de híbridos recíprocos foram observadas para a tolerância a alta temperatura de secagem, evidenciando a importância da escolha do genitor feminino quando da obtenção de híbridos (ROVERI, 2004). Em relação aos híbridos recíprocos, pode-se inferir

que o parental feminino possui influência direta na manutenção da tolerância a altas temperaturas durante a germinação.

Ao se considerar as análises enzimáticas realizadas, pode-se observar que, em relação à enzima catalase, não houve diferença significativa na expressão da mesma, independentemente dos genótipos das sementes avaliadas de acordo com os resultados expressos pelo gel de eletroforese, juntamente com o gráfico da quantificação da expressão, pelo auxílio do software ImageJ® (FIGURA 1).

Figura 1 - Eletroforese de enzima catalase mais o gráfico da quantificação da expressão pós avaliação com auxílio do software ImageJ®. Resultados seguidos da mesma letra minúscula não diferenciam entre si a 5% de probabilidade no teste de Tukey. F1{(Everglades ♀ x Veronica ♂) - F1 (ExV)}, F1{(Veronica ♀ x Everglades ♂) - F1 (VxE)}.



Fonte: Do autor (2019).

Segundo Fridovich (1995), a catalase, por ser uma enzima envolvida no processo de remoção do peróxido de hidrogênio, desempenha controle desses peróxidos endógenos por meio do ciclo óxido-redução.

Presumivelmente, a função da catalase é antioxidante e atua na manutenção de concentrações intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em níveis estacionários (TAN et al., 2002). Estudo em

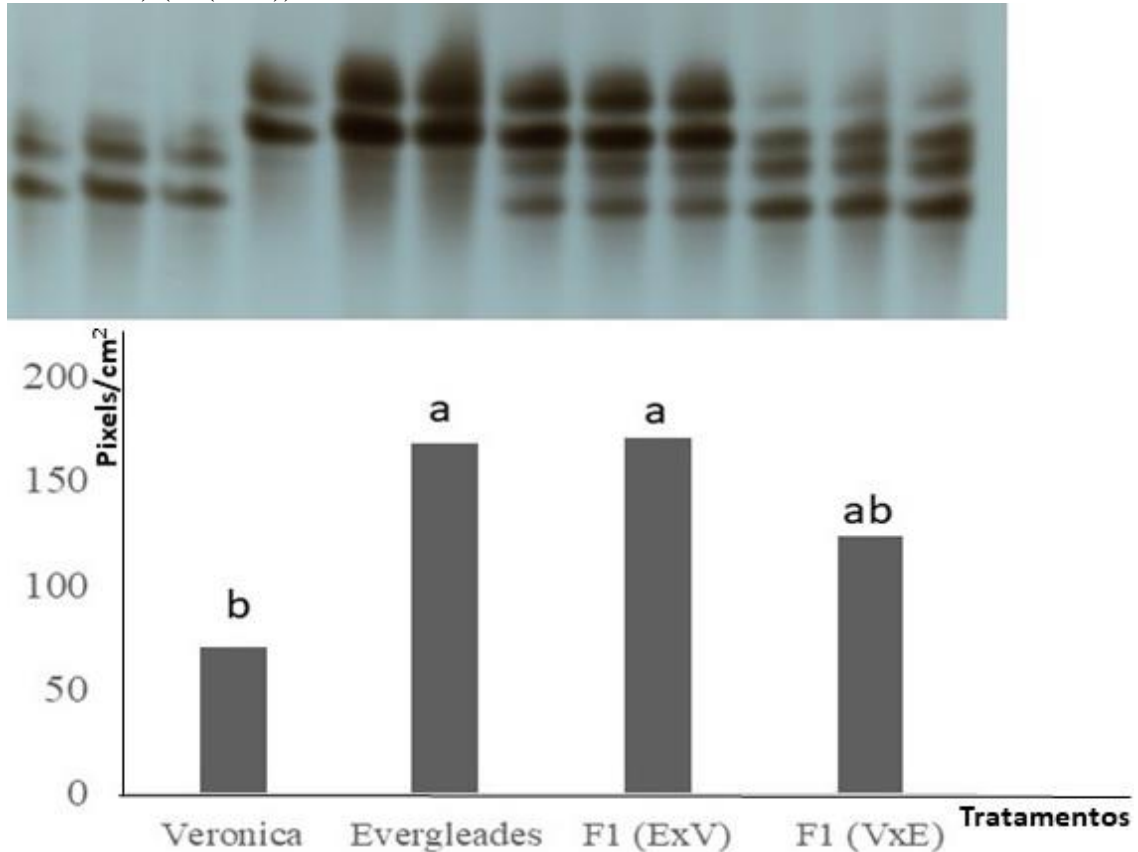
sementes de pepino indicou claramente a atividade das enzimas antioxidantes e seu papel significativo no fornecimento de defesa antioxidante (ZHANG et al., 2013).

De acordo com Lehninger (2006), a catalase é uma enzima intracelular, encontrada no glioxissoma nos vegetais, com capacidade de transformar formas reativas de oxigênio em formas inofensivas.

Nakada et al. (2010), trabalhando com sementes de pepino, verificaram o aumento da peroxidação de lipídios com o aumento da deterioração das sementes. Assim, a redução da atividade da catalase pode tornar as sementes mais sensíveis aos efeitos dos radicais livres e aumentar a formação de peróxido nas células, tornando as sementes mais sujeitas à perda de viabilidade.

Quando se avaliou a expressão da enzima esterase (EST), observou-se uma maior expressão em sementes colhidas em plantas da cultivar Everglades, tanto sementes originárias de autofecundação, quanto aquelas originárias da hibridação em que se utilizou a cultivar Veronica como genitor masculino e Everglades como genitor feminino. Verifica-se ainda, que não houve diferença significativa para expressão da enzima esterase em sementes destes dois genótipos (FIGURA 2).

Figura 2 - Imagem da eletroforese da enzima esterase mais o gráfico da quantificação da expressão pós avaliação com auxílio do software ImageJ®. Resultados seguidos da mesma letra minúscula não diferenciam entre si a 5% de probabilidade no teste de Tukey. F1(Everglades ♀ x Veronica ♂) (F1(ExV)), F1(Veronica ♀ x Everglades ♂) (F1(VxE)).



Fonte: Do autor (2019).

Por outro lado, observa-se que sementes da cultivar Veronica apresentaram menor nível de expressão da enzima esterase, enquanto sementes do híbrido, cujo genitor feminino foi a cultivar Veronica, apresentaram valor intermediário.

Os valores de expressão da enzima esterase para sementes dos diferentes genótipos demonstram que aqueles tolerantes à termoinibição (cultivar Everglades) apresentam maior expressão desta enzima, enquanto sementes de genótipos sensíveis à germinação em temperatura alta (cultivar Veronica) apresentam menor expressão.

Os resultados indicaram também a ocorrência de efeito materno, já que as sementes híbridas apresentaram valores intermediários em relação aos genitores, porém, com superioridade das sementes híbridas cujo genitor feminino foi a cultivar Everglades, tolerante à termoinibição.

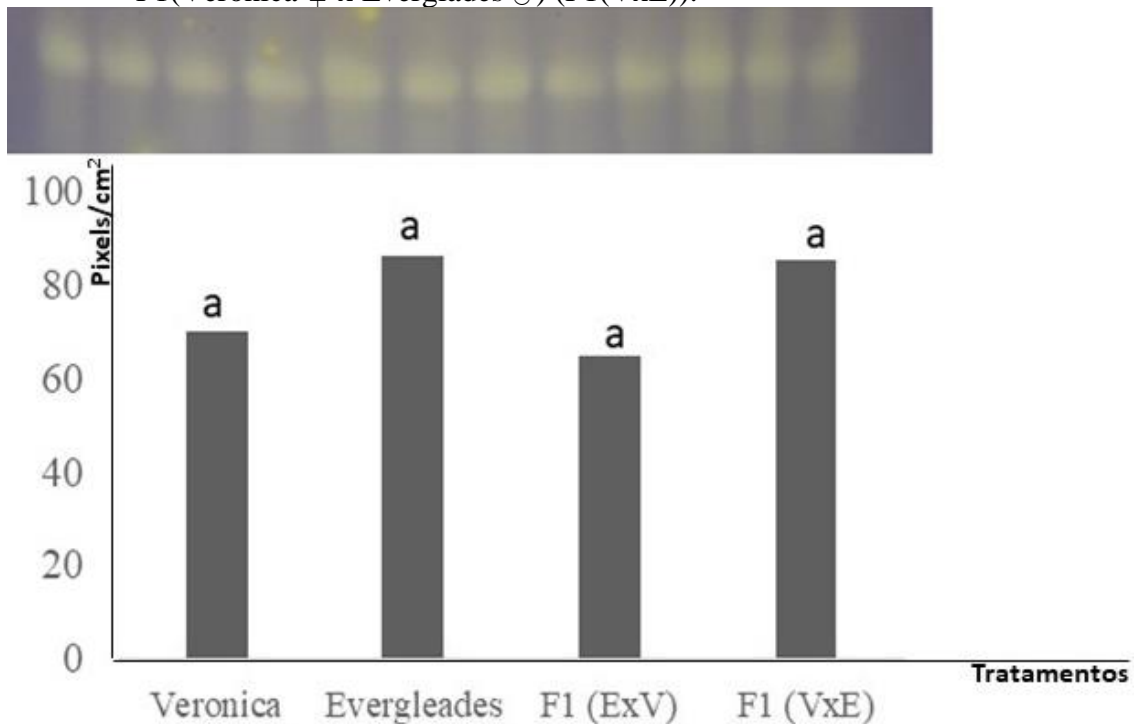
As esterases são representativas nas membranas celulares, hidrolisando os ésteres de membranas, atuando assim, diretamente no metabolismo de lipídios. Sua presença quando

identificada, demonstra a existência de peroxidação de lipídios (SANTOS et al., 2005; MERTZ et al., 2009).

Catão et al. (2016), também verificou em seu trabalho com sementes de alface em diferentes condições e períodos de armazenamento, que a enzima esterase foi eficiente como marcador bioquímico para a qualidade de sementes de alface quando submetida a altas temperaturas.

Já para a enzima superóxido dismutase (SOD) (FIGURA 3) não houve diferença significativa.

Figura 3 - Imagem da eletroforese da enzima Superóxido dismutase mais o gráfico da quantificação da expressão pós avaliação com auxílio do software ImageJ®. Resultados seguidos da mesma letra minúscula não diferenciam entre si a 5% de probabilidade no teste de Tukey. F1(Everglades ♀ x Veronica ♂) (F1(ExV)), F1(Veronica ♀ x Everglades ♂) (F1(VxE)).



Fonte: Do autor (2019).

#### 4 CONCLUSÕES

Existe efeito materno para a característica de tolerância à terminibição em sementes de alface.

A quantificação da enzima esterase pode ser utilizada como marcador para a seleção de progênies homozigotas para a característica de tolerância à terminibição.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. ampl. e atual. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ARGYRIS, J.; DAHAL, P.; HAYASHI, E.; STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 926-947, 2008.
- ARGYRIS, J.; TRUCO, M.J.; OCHOA, O.; MCHALE, L.; DAHAL, P.; VAN DEYNZE, A.; BRADFORD, K.J. 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**, v. 122, n. 1, p. 95-108, 2011.
- BRUNINI, O.; LISBÃO, R.S.; BERNAR-DI, J.B.; FORNASIER, J.B.; PEDRO JÚNIOR, M. J. Temperatura-base para alface cultivar "White Boston", em um sistema de unidades térmicas. **Bragantia**, v. 35, n. 1, p. 213-219, 1976.
- CATÃO, H.C.R.M.; GOMES, L.A.A.; GUIMARÃES, R.M.; FONSECA, P.H.F.; CAIXETA, F.; MARODIN, J.C. Physiological and isoenzyme alterations in lettuce seeds under different conditions and storage periods. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 305313, 2016.
- CATÃO, H.C.R.M.; GOMES, L.A.A.; DOS SANTOS, H.O.; GUIMARÃES, R.M.; FONSECA, P.H.F.; CAIXETA, F. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de alface em diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 316-322, 2014.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2008.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.
- HILLS, P.N.; VAN STADEN, J.; THOMAS, T.H. Thermoinhibition of seed germination. **South African Journal of Botany**, v. 69, n. 4, p. 455-461, 2003.
- LEHNINGER, A.L. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
- MALUF, W.R. Melhoramento genético da alface (*Lactuca sativa* L.). **Melhoramento genético de hortaliças**. Lavras: UFLA, 1994.
- MENEZES, N.L.; SANTOS, O.S.; SCHMIDT, D. Produção de sementes de alface em cultivo hidropônico. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 705-706, 2001.
- MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Revista Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 13-18, 2009.

- MOTA, J.H.; YURI, J.E.; FREITAS, S.D.; RODRIGUES JUNIOR, J.C.; RESENDE, G.D.; SOUZA, R.D. Avaliação de cultivares de alface americana durante o verão em Santana da Vargem, MG. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 234-237, 2003.
- NAKADA, P.G.; OLIVEIRA, J.A.; MELO, L.C.; SILVA, A.A.; SILVA, P.A.; PERINA, F.P. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 42-51, 2010.
- NASCIMENTO, W.M., ANDRADE, K.P., FREITAS, R.A., SILVA, G.O., BOITEUX, L.S. Effects of temperature on tomato seed germination: Phenotypic variability and heterosis. **Horticultura Brasileira**, v. 1, n. 34, p. 216-222, 2016.
- NASCIMENTO, W.M.; CRODA, M.D.; LOPES, A.C.A. Produção de sementes, qualidade fisiológica e identificação de genótipos de alface termotolerantes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 510-517, 2012.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER, D.J. Ethylene evolution and endo- $\beta$ -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 156-163, 2004.
- NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 103-106, 2002.
- ORSI, C.H.; TANKSLEY, S.D. Natural variation in an abc transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. **Plosgenet**, v. 5, n. 1, p. E1000347, 2009.
- RASBAND, W.S.; IMAGEJ, U.S. National Institutes of Health. Maryland, USA: Bethesda, 1997-2016. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/docs/faqs.html>>. Acesso em: 01 jan. 2019.
- ROVERI, J.S.C.B.; VON PINHO, E.V D.R.; VON PINHO, R.G.; SILVEIRA, C.M.D. Electrophoretic patterns of the alpha-amilase enzyme in corn seeds submitted to high drying temperature. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 77-83, 2004.
- SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.
- SOUZA, M.C.M; RESENDE, L.V.; MENEZES, D.; LOGES, V.; SOUTE, T.A; SANTOS, V. F. Variabilidade genética para características agrônômicas em progênies de alface tolerantes ao calor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 354-358, 2008.
- SUNG, Y. et al. Structural changes in lettuce seed during germination at high temperature altered by genotype, seed maturation temperature, and seed priming. **Journal American Society Horticulture Sciences**, v. 133, n. 2, p. 300-311, 2008.
- TAN, D.X.; HARDELAND, R.; MANCHESTER, L.C.; KORKMAZ, A.; MA, S.; ROSALES-CORRAL, S.; REITER, R.J. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 2, p. 577-597, 2002.

YOONG, F.Y.; O'BRIEN, L.K.; TRUCO, M.J.; HUO, H.; SIDEMAN, R.; HAYES, R.; MICHELMORE, R.W.; BRADFORD, K.J. Genetic variation for thermotolerance in lettuce seed germination is associated with temperature-sensitive regulation of Ethylene Response Factor 1 (ERF1). **Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p. 472-488, 2016.

ZHANG, N.; ZHAO, B.; ZHANG, H. J.; WEEDA, S.; YANG, C.; YANG, Z. C.; REN, S.; GUO, Y. D. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of pineal research**. v. 54, n.1, p.15–23, 2013.