



PEDRO YURI CAVASIN

**ENDO- β -MANANASE E α -GALACTOSIDASE E SUAS
RELAÇÕES COM A TOLERÂNCIA À TERMOINIBIÇÃO EM
SEMENTES DE ALFACE**

**LAVRAS-MG
2022**

PEDRO YURI CAVASIN

**ENDO- β -MANANASE E α -GALACTOSIDASE E SUAS RELAÇÕES COM A
TOLERÂNCIA À TERMOINIBIÇÃO EM 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 Sementes, para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos
Orientadora

Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

**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.

Endo- β -Mananase E α -galactosidase e suas relações com a
tolerância à termoinibição em sementes de alface / Pedro Yuri
Cavasin. - 2022.

49 p. : il.

Orientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Coorientador(a): Luiz Antônio Augusto Gomes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Altas temperaturas. 2. Galactomanano. 3. Enzima. I. Santos,
Heloisa Oliveira dos. II. Gomes, Luiz Antônio Augusto. III. Título.

PEDRO YURI CAVASIN

ENDO- β -MANANASE E α -GALACTOSIDASE E SUAS RELAÇÕES COM A TOLERÂNCIA À TERMOINHIBIÇÃO EM SEMENTES DE ALFACE

ENDO- β -MANANASE AND α -GALACTOSIDASE AND THEIR RELATIONSHIPS TO THE TOLERANCE TO THERMOINHIBITION IN LETTUCE SEEDS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Sementes, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 04 de julho de 2022.

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos	UFLA
Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes	UFLA
Dr. Cleiton Lourenço de Oliveira	UFLA
Dra. Renata Silva Mann	UFS
Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias	UFV
Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes	UFU

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos
Orientadora

Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

À minha família.

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Pedro e Rita, por dedicarem suas vidas e acreditarem em mim sempre.

À Juliete, por estar me apoiando diariamente na minha trajetória.

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

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, à 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.

À minha orientadora, professora Heloisa Oliveira dos Santos, e ao professor Luiz Antônio Augusto Gomes, pelos conhecimentos transmitidos e por serem exemplo de dedicação, de humildade e de profissionalismo.

Ao Pós-graduado Wilson, por toda ajuda.

À secretária de Pós-Graduação, Marli, pela amizade e atenção durante o curso de doutorado.

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

Aos amigos André Boscolo, Leonardo Hecke, Diogo Mendes e Breno Terra, pelos momentos de descontração e por tornarem essa jornada mais fácil e mais leve.

Aos funcionários do laboratório de análise de sementes.

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

Muito obrigado!

“A única habilidade competitiva de longo prazo é a capacidade de aprender.”

(Seymour Papert)

RESUMO

A temperatura influencia fortemente na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) devido ao efeito de termoinibição. O objetivo deste estudo foi determinar a atividade enzimática e a expressão gênica de diferentes enzimas associadas ao efeito de termoinibição de sementes de alface. Foram utilizadas sementes das cultivares Everglades (tolerante à termoinibição) e Verônica (sensível à termoinibição), os híbridos recíprocos, oriundos do cruzamento entre as duas cultivares e a geração F₂. As sementes foram submetidas aos testes de germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e testes enzimáticos (Catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e endo- β -mananase). Posteriormente, avaliou-se a expressão de genes relacionados a enzimas endo- β -mananase e α -galactosidase por RTq-PCR. Em relação aos testes fisiológicos, a cultivar Everglades, bem como os híbridos F₁(ExV) e F₂(ExV), foram menos termoinibidas que os demais tratamentos. As atividades das enzimas superóxido dismutase e a endo- β -mananase apresentaram relação direta e mais expressiva com as alterações nos parâmetros fisiológicos de termotolerância. Sobre a expressão gênica, houve variação dos transcritos que expressam a endo- β -mananase e a α -galactosidase entre os tratamentos avaliados. A expressão da endo- β -mananase apresentou efeito materno, observando maior expressão nos tratamentos termotolerantes e estar associada a esta característica em sementes de *Lactuca sativa*. Portanto, conclui-se que a endo- β -mananase é um promissor marcador enzimático e genético associado a termotolerância e é uma ferramenta importante na seleção de cultivares em programas de melhoramento de alface.

Palavras-chave: Alface. Enzima. Termoinibição. Altas temperaturas.

ABSTRACT

Temperature strongly influences the germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) due to the thermoinhibition effect. The aim of this study was to determine the enzymatic activity and gene expression of different enzymes associated with the thermoinhibition effect of lettuce seeds. Seeds of the cultivars Everglades (tolerant to thermoinhibition) and Verônica (sensitive to thermoinhibition), the reciprocal hybrids, originated from the cross between the two cultivars and the F2 generation were used. The seeds were submitted to germination tests, first germination count, germination speed index (VIG) and enzymatic tests (Catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and endo- β -mannanase). Subsequently, the expression of genes related to endo- β -mannanase and α -galactosidase enzymes was evaluated by RTq-PCR. Regarding the physiological tests, the Everglades cultivar, as well as its hybrids, were less thermoinhibited than the other treatments. The activities of the enzymes superoxide dismutase and endo- β -mannanase showed a direct and more expressive relationship with the alterations in the physiological parameters of thermotolerance. Regarding gene expression, there was variation in transcripts that express endo- β -mannanase and α -galactosidase between the treatments evaluated. However, endo- β -mannanase followed the trend of the thermoinhibition trait and may be associated with this trait in *Lactuca sativa* seeds. Therefore, it is concluded that endo- β -mannanase is a promising enzymatic and genetic marker associated with thermotolerance and is an important tool in the selection of cultivars in lettuce breeding programs.

Keywords: Lettuce. Enzyme. Thermoinhibition. High temperatures.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1	INTRODUÇÃO	10
	REFERÊNCIAS.....	12
	CAPÍTULO 2 ENDO-β-MANANASE E SUA RELAÇÃO COM TERMOTOLERÂNCIA EM SEMENTES ALFACE	14
1	INTRODUÇÃO	16
2	MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1	Produção das sementes.....	18
2.2	Desenho dos <i>primers</i>.....	19
2.3	Purificação do RNA e síntese do Cdna.....	20
2.4	PCR em tempo real.....	21
2.5	Análise dos resultados.....	22
3	RESULTADOS	23
4	DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS.....	29
	CAPÍTULO 3 ENDO-β-MANANASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE COMO MARCADORES ENZIMÁTICOS DA TERMOTOLERÂNCIA DE SEMENTES DE <i>LACTUCA SATIVA</i> L.....	33
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
3	RESULTADOS	40
4	DISCUSSÃO	44
4	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS.....	47

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a principal hortaliça folhosa produzida e consumida no Brasil, e seu cultivo se dá em todas as regiões brasileiras. Apesar dos avanços alcançados pelos programas de melhoramento ao longo dos anos, as sementes de alface são sensíveis às variações de umidade e temperatura do ambiente em que germinam (SALA; COSTA, 2012). Problemas de germinação resultam em baixa qualidade e atraso na produção de mudas, causando queda na produtividade e perdas diretas para o produtor (NASCIMENTO *et al.*, 2012; BUFALO *et al.*, 2012).

A temperatura ambiente é o principal fator que regula as atividades metabólicas e a protrusão da radícula, influenciando diretamente na germinação das sementes, ou indiretamente, pela dormência e redução da viabilidade, mesmo quando a disponibilidade hídrica é suficiente para permitir a embebição das sementes (DENG; SONG, 2012). Em geral, as sementes de alface apresentam germinação máxima em temperaturas em torno de 20° C, enquanto a maioria das cultivares não germina quando expostas a temperaturas superiores a 30 °C (VILLELA *et al.*, 2010).

Temperaturas elevadas, superiores a 28 °C, são constantes em países tropicais como o Brasil, e por causa disso, podem levar à ocorrência do fenômeno conhecido como termoinibição (CATÃO *et al.*, 2014). Este fenômeno é naturalmente reversível a partir do momento em que todos os fatores que promovem a inibição, como temperatura, luz e umidade, retornam a valores adequados para a germinação (YOONG *et al.*, 2016).

Os genótipos de alface diferem muito em sua capacidade de germinar em altas temperaturas. Acessos resistentes ao calor foram identificados em diferentes programas de melhoramento, como o acesso termotolerante 'Florida Buttercrisp' (s15k0106/ PI 667844), com maior porcentagem de germinação a 35 °C (WEI *et al.*, 2020), o acesso primitivo *Lactuca sativa* L. PI251246, capaz de germinar a 33 °C (YOONG *et al.*, 2016), a cultivar Everglades, cuja germinação é superior a 70% a 35 °C (CATÃO *et al.*, 2016; CATÃO *et al.*, 2014) e o acesso *Lactuca serriola* UC96US23, capaz de germinar em torno de 37 °C (ARGYRIS *et al.*, 2011).

A germinação de sementes é um processo fisiológico e metabólico complexo. Em sementes de alface, os mecanismos de ação que afetam a germinação em altas temperaturas parecem estar relacionados ao enfraquecimento do endosperma, este que por sua vez, permite a protrusão da radícula e o crescimento do embrião (WANG *et al.* 2019).

Para que esse enfraquecimento do endosperma ocorra, um aparato enzimático é colocado em ação, como as enzimas antioxidantes (Catalase, Esterase e Superóxido Dismutase) e outras enzimas como Álcool Desidrogenase, Malato Desidrogenase, Piruvato Descarboxilase e Glutamato Oxaloacetato Transferase (ALMEIDA *et al.*, 2019). Contudo, destaca-se a endo- β -mananase como uma das principais enzimas responsáveis pela hidrólise de mananas no endosperma durante a germinação de sementes de alface (ALMEIDA *et al.*, 2019; CATÃO *et al.*, 2016).

É válido ressaltar ainda, que pouco se conhece sobre os mecanismos e o potencial gênico envolvidos no efeito de termoinibição e como isto impacta no processo de germinação. Diante deste contexto, o objetivo deste estudo foi identificar possíveis marcadores genéticos e enzimáticos relacionados à característica de termoinibição em sementes de alface.

REFERÊNCIAS

- ARGYRIS, J.; TRUCO, M. J.; OCHOA, O.; MCHALE, L.; DAHAL, P.; DEYNZE, A. VAN; MICHELMORE, R. W.; 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.
- BUFALO, J.; AMARO, A.C.E.; DE ARAÚJO, H.S.; CORSATO, J.M., ONO, E.O.; FERREIRA, G.; RODRIGUES, J. D. Stratification periods in seeds germination of lettuce (*Lactuca sativa L.*) under different conditions of light and temperature. **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 isozyme 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.; SANTOS, H. O. DOS; GUIMARÃES, R. M.; FONSECA, P. H. F.; CAIXETA, F. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de alface em diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 49, n. 4, p. 316–322, 2014.
- DE ALMEIDA, F. A.; SILVA-MANN, R.; DOS SANTOS, H. O.; PEREIRA, R. W.; BLANK, A. F. Germination temperatures affect the physiological quality of seeds of lettuce cultivars. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 4, p. 1143-1152, 2019.
- DENG, Z.; SONG, S. Sodium nitroprusside, ferricyanide, nitrite and nitrate decrease the thermo-dormancy of lettuce seed germination in a nitric oxide-dependent manner in light. **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 139-146, 2012.
- 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, p. 510-517, 2012.
- SALA, F.C.; COSTA, C.P.D. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. **Horticultura brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.
- VILLELA, R.P.; SOUZA, R.J.D.; GUIMARÃES, R.M.; NASCIMENTO, W.M.; GOMES, L.A.A.; CARVALHO, B.O.; BUENO, A.C.R. Produção e desempenho de sementes de cultivares de alface em duas épocas de plantio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 158-169, 2010.
- WANG, L.; HAO, J.; QI, Z.; LIU, W.; LIU, C.; HAN, Y.; FAN, S. Cloning and Expression of Mitogen-activated Protein Kinase 4 (MAPK4) in Response to High Temperature in Lettuce (*Lactuca sativa L.*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 21, n. 1, p. 54-60, 2019.

WEI, S.; YANG, X.; HUO, G.; GE, G.; LIU, H.; LUO, L.; ...; LONG, P. Distinct metabolome changes during seed germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in response to thermal stress as revealed by untargeted metabolomics analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1481, 2020.

YOONG, F. Y.; OBRIEN, 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 factor1 (ERF1). **Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p. 472–488, 2016.

CAPÍTULO 2 ENDO- β -MANANASE E SUA RELAÇÃO COM TERMOTOLERÂNCIA EM SEMENTES ALFACE

RESUMO

Para algumas cultivares de alface sob temperaturas elevadas, a germinação das sementes tende a não acontecer e a identificação da expressão de genes relacionados à termotolerância pode ser uma importante ferramenta para a seleção de cultivares promissoras de alface que germinem em temperaturas elevadas. O objetivo desta pesquisa foi analisar a expressão de genes relacionados à termotolerância em duas cultivares de alface (*Lactuca sativa*). Foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* das cultivares Everglades (tolerante à termoinibição) e Verônica (sensível à termoinibição), os híbridos recíprocos, oriundos do cruzamento entre as duas cultivares e a geração F2. Avaliou-se a expressão de genes relacionados a enzimas endo- β -mananase e α -galactosidase por RTq-PCR. Houve variação dos transcritos que expressam para as duas enzimas entre os tratamentos avaliados. A expressão da endo- β -mananase apresentou efeito materno, observando maior expressão nos tratamentos termotolerantes e estar associada à esta característica em sementes de *Lactuca sativa*.

Palavras-chave: Termoinibição. Altas temperaturas. *Lactuca Sativa*. Termotolerância. Sementes.

ENDO- β -MANANASE AND ITS RELATIONSHIP WITH THERMOTOLERANCE IN LETTUCE SEEDS

ABSTRACT

For some lettuce cultivars, seed germination tends to not happen under higher temperatures, while for others the germination proceeds. The identification of which genes may be correlated to the thermotolerance may become a tool for accelerate the cultivar selection. This study was carried aiming to evaluate the thermotolerance-related gene expression on two lettuce seeds (*Lactuca sativa*). Lettuce seeds from the cultivars Everglades (thermotolerant) and Veronica (thermosensitive), and reciprocal hybrids from both cultivars crossing and F2 generation were used. Endo- β -mannanase and α -galactosidase gene expression was measured through RT-qPCR. Transcripts vary for both enzymes between analyzed treatments. Endo- β -mannanase gene expression follow the same pattern observed for thermoinhibition on the tested treatments, possibly being correlated to this characteristic in lettuce seeds.

Palavras-chave: Thermoinhibition. High temperatures. *Lactuca Sativa*. Thermotolerance. Seeds.

1 INTRODUÇÃO

A germinação de sementes é controlada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, como luz, oxigênio e temperatura (TAN *et al.*, 2013). Dentre esses fatores, a temperatura influencia diretamente na capacidade e velocidade de germinação (BASKIN; BASKIN, 2014). A germinação da maioria das cultivares de alface é inibida em temperaturas acima de 25 °C (HUO *et al.*, 2013), e acima de 28°, a germinação tende a não acontecer (YOONG *et al.*, 2016). Este fenômeno é definido como termoinibição.

Em programas de melhoramento de alface, a variabilidade genética é essencial para a obtenção de genótipos superiores (JEBERSON *et al.*, 2016). Apesar da maioria das cultivares de alface utilizadas serem sensíveis à termoinibição, vários genótipos são relatados como capazes de germinar em temperaturas mais elevadas. Como exemplo, sementes dos acessos *Lactuca serriola* UC96US23, capazes de germinar sob temperaturas em torno de 37 °C (ARGYRIS *et al.*, 2011), o acesso primitivo *Lactuca sativa* L. PI251246, capaz de germinar acima de 33 °C (YOONG *et al.*, 2016), e da alface tipo lisa, cultivar Everglades, cuja germinação é superior a 70% a 35 °C (CATÃO *et al.*, 2014; CATÃO *et al.*, 2016).

Os mecanismos pelos quais as sementes herdaram a capacidade para germinarem em altas temperaturas não são totalmente elucidados (NASCIMENTO; CANTLIFFE 2002). Contudo, a termotolerância relacionada à semente pode apresentar efeito materno, característica observada nas gerações seguintes e herdada do genitor feminino (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

A semente de alface madura, que é um aquênio, possui três camadas que circundam o embrião: uma camada mais externa ou pericarpo, uma camada ou tegumento mediano e uma camada interna, o endosperma. O endosperma consiste em duas camadas de células que envolvem firmemente o embrião (NIJSSE *et al.*, 1998). Este que é constituído quimicamente de polissacarídeo de reserva, o galactomanano (OUELLETTE; BEWLEY, 1986), consiste em um esqueleto de manose com grupos laterais de galactose.

A integridade estrutural da camada de endosperma é enzimaticamente enfraquecida para que a germinação aconteça (NIJSSE *et al.*, 1998), contudo, altas temperaturas influenciam negativamente na atividade das enzimas durante a quebra do galactomanano. Além disso, apesar do pouco número de células, o endosperma atua como uma barreira física à emissão da radícula podendo atrasar ou impedir a germinação da semente. Assim, a mobilização da reserva de galactomananos do endosperma torna-se um pré-requisito à emissão da radícula, sob condições de altas temperaturas (SUNG, 1996).

Sabe-se que existe um aparato enzimático responsável pela regulação e a quebra das reservas em sementes de alface, com destaque para a enzima endo- β -mananase (NASCIMENTO *et al.*, 2016; CATÃO *et al.*, 2014; CATÃO *et al.*, 2016).

Assim, a identificação de genes funcionais relacionados, ou proteínas que são responsáveis pela resposta à altas temperaturas, e a mobilização de reservas, é fundamental para desenvolver estratégias eficazes para obtenção de sementes de alface termotolerantes. Com isso, torna-se mais fácil a compreensão do mecanismo molecular nas respostas ao estresse térmico (KANEKO *et al.*, 2016).

A técnica quantitativa de PCR em tempo real (qPCR) incorpora a eficiência tradicional da reação em cadeia da polimerase (PCR) com a produção de um sinal fluorescente específico, medindo a cinética da reação nas fases iniciais de PCR (MIRMAJLESSI *et al.*, 2015). Esta técnica é amplamente utilizada como no diagnóstico de diferentes fitopatógenos (SCHUMPP *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2014), triagem genotípica rápida de sementes (LAN *et al.*, 2015) e rastreabilidade e quantificação de sementes geneticamente modificadas (LEAO-BUCHIR *et al.*, 2018). Neste sentido, a técnica de RT-qPCR é uma ferramenta útil e poderosa para descobrir genes diferencialmente expressos e analisar alterações do transcriptoma em diferentes cultivares de sementes de alface (FOWLER.; THOMASHOW, 2002; KREPS *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2017).

Estudos relacionados à expressão de genes ligados à termotolerância têm como vantagem, não só possibilitar a compreensão do processo, mas podem ser ainda marcadores úteis para programas de melhoramento em sementes de alface. Assim, o presente estudo realizou análise da expressão de genes relacionados a enzimas de degradação do galactomanano em sementes de alface com o objetivo de avaliar a relação com a característica de termotolerância.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção das sementes

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de alface: Everglades, que apresenta folhas lisas e é considerada tolerante à termoinibição, e Verônica, que possui folhas crespas e é sensível à termoinibição, além de sementes dos híbridos e seus recíprocos e geração F₂.

Para a obtenção das sementes, inicialmente fez-se a semeadura das cultivares Everglades e Verônica, em bandejas de poliestireno com 128 células, semeando três sementes por célula. 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 no Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Lavras (CDTT), município de Ijaci, MG, Brasil. A estação experimental está localizada nas coordenadas 21°09'24'S e 44°55'34'W, a 831 metros de altitude. As bandejas 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 emergência, as plântulas 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 das 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 atingirem o ponto de colheita as sementes foram colhidas nos dois genitores e identificados como $F_1(\text{Everglades} \text{♀} \times \text{Verônica} \text{♂})$ ($F_1(\text{ExV})$), correspondendo às sementes colhidas em flores emasculadas de plantas da cultivar Everglades e polinizadas com flores da cultivar Verônica; $F_1(\text{Verônica} \text{♀} \times \text{Everglades} \text{♂})$ ($F_1(\text{VxE})$), correspondendo às sementes colhidas em flores emasculadas de plantas da cultivar Verônica e polinizadas com flores da cultivar Everglades; Verônica, correspondendo às sementes oriundas de autofecundação da cultivar Verônica e Everglades, correspondendo às sementes oriundas de autofecundação da cultivar Everglades. Estas sementes foram limpas, secadas naturalmente, embaladas em saco de papel e armazenadas em câmara fria a 15 °C e 50% UR.

Para a obtenção da geração F_2 nas mesmas condições dos demais tratamentos, o processo se repetiu, semeando sementes da cultivar Everglades, Verônica, $F_1(\text{ExV})$ e $F_1(\text{VxE})$. Foram colhidas sementes dos seis tratamentos (Everglades, Verônica, $F_1(\text{ExV})$, $F_1(\text{VxE})$, $F_2(\text{ExV})$ e $F_2(\text{VxE})$).

2.2 Desenho dos *primers*

As sequências dos genes-alvo escolhidos, Bgal e Man, que expressam as enzimas α -galactosidase e endo- β -mananase, respectivamente, foram encontradas por meio de busca no banco de dados do *Fitozome*. Com base nessas sequências foram desenhados os *primers* utilizando-se o *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)*. As sequências dos *primers* estão representadas na Tabela 1. Foram utilizados como controle endógeno os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) e o gene codificante da subunidade 18S do ribossomo.

Tabela 1 - Primers utilizados na análise de qRT-PCR.

Enzimas	Gene		Sequência 5'-----3'	
α -galactosidase	(BGAL1)	F	AAACAGCGGATGCAATGGTG	
		R	TTGAGTTCAGCCCAACAGTC	
	(BGAL2)	F	AAGGACAAGGGCGCATTAC	
		R	TGTTGCAGCCGAAGTGATTC	
	(BGAL4)	F	AAGCCGTGAATGCAAACACC	
		R	TTGCATGCCAAACCTTTCCG	
	(BGAL5)	F	TGATGATGCAGCAACTGGG	
		R	TCCTTCCAGTTGAGTTCAGAGC	
	Endo- β -mananase	(MAN3)	F	ATTTTGTGGTGGCTGAAGCG
			R	ACTGCTTTTTGCCACCAAGG
(MAN10)		F	ATGGGCACACTAACGGTTTG	
		R	ACGTCACCCTTGCAATCAAC	
(MAN11)		F	AACACGGCCTATGAAAGTGC	
		R	ATTCCTTCGCCATGACTTG	
(MAN14)		F	ATCATAGCCGCGCAAGAATC	
		R	AGCCCAAGTTCGACAAACAG	
Genes endógenos		GADPH	F	ATGATGATGTGAAAGCAGCG
			R	TTTCAACTGGTGGCTGCTAC
	18S	F	TGTCCATCTGCTCTCTGTTG	
		R	CACCCCAAGCACAATAAGAC	

(F) sequência do primer *forward* e (R) sequência do primer *reverse*.

Fonte: Do autor (2022).

Foi realizada uma reação de PCR convencional usando como molde um *mix* do cDNA das amostras estudadas e os *primers* citados na Tabela 1. Com base na observação de uma única banda por meio da eletroforese em gel de agarose, foi confirmada a especificidade dos *primers*.

2.3 Purificação do RNA e síntese do cDNA

Para a extração do RNA, as sementes de todos os tratamentos foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com a adição do reagente Pure Link RNA Plant[®] (Invitrogen), seguindo as especificações do manual do fabricante.

A integridade, concentração e pureza do RNA extraído foram avaliadas em todas as etapas com a utilização da eletroforese em gel de agarose a 1% (corado com brometo de etídeo) por meio de espectrofotometria em aparelho *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA - Biotek®). Após purificados, os extratos foram separados em alíquotas para evitar descongelamento de todo o material durante o manuseio, conservando assim, maior integridade do material usado. Após as extrações dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com DNase *Free* para evitar qualquer contaminação com DNA. Para isso, foi utilizado o *Kit DNase Turbo Free*® AMBIOM de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante, sendo os materiais novamente analisados quanto à pureza, integridade e concentração.

Após o processo de extração e purificação, os RNAm foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Foi utilizado *kit High Capacity cDNA Reverse transcription cDNA*® da *Applied Biosystems*, segundo protocolo recomendado pelo fabricante. Após a síntese, o material foi diluído na proporção de 1:5 para ser usado nas etapas de PCR.

2.4 PCR em tempo real

Para essa análise foi utilizado o aparelho de *real-time PCR Sistem 7500* (*Applied Biosystems*). A *qRT-PCR* foi realizada utilizando o *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, finalizando com 15 segundos a 95 °C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação, foram utilizados 1,0 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* e 3,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG com ROX* (*Invitrogen*) sendo adicionada água ultrapura completando o volume final de 7,0 µL/amostra. Controles negativos, compostos por água, e controles endógenos foram incluídos em todas as análises. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A coleta de dados foi realizada por meio do *software v. 2.0.1*, do sistema 7500 de *PCR em tempo real* (*Applied Biosystems*).

Para todos os *primers* usados (genes-alvo e controle endógeno), foi feito o teste de eficiência. Para tal, uma reação de RT-qPCR foi feita, sendo usado como amostra um *mix* feito com os cDNA de todos os tratamentos usados. A eficiência foi calculada com base nos dados de amplificação pelo *software LinRegPCR* (DEKKERS *et al.*, 2012; RAMAKERS *et al.*, 2003; RUIJTER *et al.*, 2009). A análise da expressão gênica foi realizada usando os valores de Ct (cycle threshold), pelo método $\Delta\Delta Ct$, sendo usado como controle as amostras da cultivar Everglades e como controle endógeno (genes de referência) os genes GADPH e 18S.

2.5 Análise dos resultados

As amostras correspondentes ao tratamento da cultivar Everglades foram consideradas como sendo amostras controle. Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de mRNA's das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de mRNA's dos controles. Após a obtenção dos dados brutos, os mesmos foram analisados por meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene-alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct$ (amostra) – Ct (controle endógeno) e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (calibrador). Em seguida, o nível de expressão foi calculado pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados de expressão relativa foram apresentados de forma de gráficos de barra.

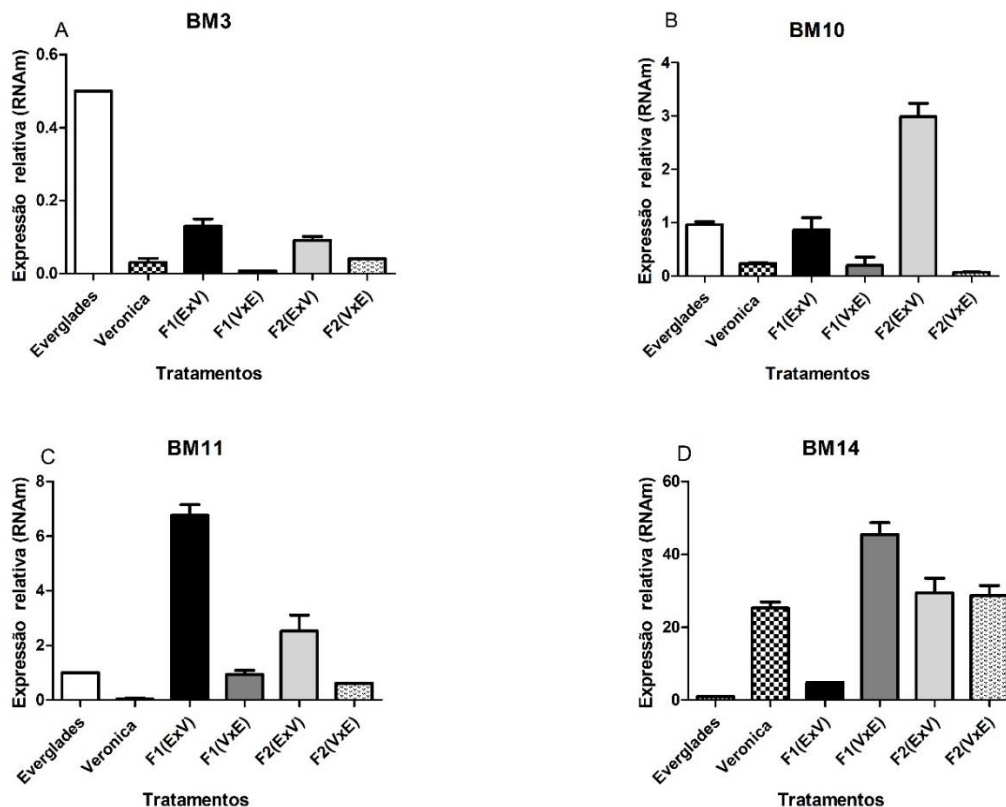
3 RESULTADOS

A extração com o reagente *PureLink Plant* RNA gerou RNA's totais com alta qualidade, íntegros e livres de impurezas. Após a amplificação utilizando os *primers* do gene constitutivo foi observada alta viabilidade dos cDNA's construídos. Ressalta-se ainda que não foram observadas bandas inespecíficas ou dímeros nos testes realizados.

Os estudos de expressão gênica dos transcritos pela técnica de RTq-PCR revelaram a expressão em sementes de alface. Observa-se grande variação da expressão dos genes analisados nos diferentes tratamentos. Os resultados obtidos confirmam a presença destes genes que codificam as enzimas endo- β -mananase e α -galactosidase em sementes de *Lactuca sativa*.

Na Figura 1 são representados os resultados das análises de quantificação relativa para os genes BM3, BM10, BM11 e BM14 (Endo- β -mananase) em sementes de *Lactuca sativa*.

Figura 1 - Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes BM3, BM10, BM11 e BM14 (Endo- β -mananase) em sementes de alface em diferentes tratamentos



Fonte: Do autor (2022).

Na Figura 1A, está representada a expressão do gene BM3. Para este gene, houve aumento significativo dos níveis de expressão para Everglades. Contudo, a expressão deste gene

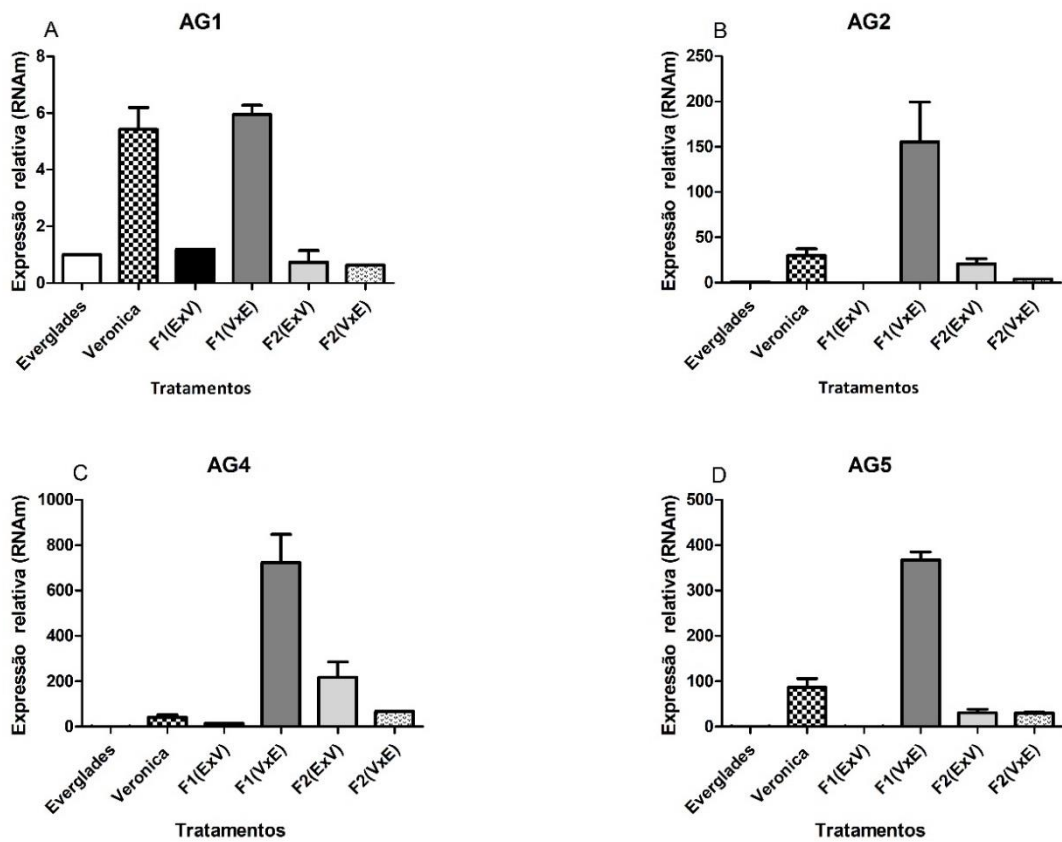
nos demais tratamentos foi menor. A expressão relativa do gene BM10 (FIGURA 1B), foi maior no tratamento F₂(ExV), seguido dos tratamentos Everglades, F₁(ExV), Verônica, e F₁(VxE), F₂(VxE), respectivamente. O gene BM11 (FIGURA 1C) foi mais expresso no tratamento F₁(ExV). Já o gene BM14 (FIGURA 1D), foi mais expresso no tratamento F₁(VxE) e apresentou menores valores de expressão relativa nos tratamentos F₂(ExV), F₂(VxE), Verônica, F₁(ExV) e Everglades, respectivamente.

Em resumo, os genes BM3, BM10, BM11 e BM14 foram mais expressos nos tratamentos Everglades, F₂(ExV), F₁(ExV) e F₁(VxE), respectivamente.

A análise dos transcritos realizada por meio da técnica de RT-qPCR, referente aos genes AG1, AG2, AG4 e AG5 (α -galactosidase) é apresentada na Figura 2.

Na Figura 2A, está representada a expressão do gene AG1. Para este gene, houve aumento significativo dos níveis de expressão relativa para Verônica, bem como, para F₁(VxE). Contudo, a expressão deste gene nos demais tratamentos foi menor. O gene AG2 (FIGURA 2B), foi mais expresso no tratamento F₁(VxE) e apresentou menores valores de expressão nos tratamentos Verônica, F₂(EXV) e F₂(VxE) respectivamente. Não foi observada expressão deste gene nos tratamentos Everglades e F₁(EXV). A expressão relativa do gene AG4 (FIGURA 2C), foi maior em F₁(VxE) e apresentou menores valores de expressão nos tratamentos F₂(ExV), F₂(VxE), Verônica e F₁(ExV) respectivamente. Contudo, não apresentou expressão no tratamento Everglades. Já o gene AG5 (FIGURA 2D), foi mais expresso em F₁(VxE) e apresentou menores valores de expressão nos tratamentos Verônica, F₂(ExV), F₂(VxE) respectivamente. E este gene, não apresentou expressão no tratamento Everglades e F₁(ExV).

Figura 2 - Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes AG1, AG2, AG4 e AG5 (α -galactosidase) em sementes de alfafa em diferentes tratamentos.



Fonte: Do autor (2022).

De forma geral, observou-se maior expressão de todos os genes da α -galactosidase no tratamento F₁(VxE). Em relação ao gene AG1, além do F₁(VxE) no tratamento Verônica, o gene também foi consideravelmente expresso.

4 DISCUSSÃO

Durante a germinação de sementes de alface, o polissacarídeo galactomanano do endosperma é hidrolisado. Desta hidrólise, resultam os monossacarídeos (manose livre e galactose) além dos oligomanoses residuais (manbiose e manotriose) que são produtos da ação enzimática da α -galactosidase e da endo- β -mananase respectivamente, e estas se difundem do endosperma para os cotilédones (OUELLETTE; BEWLEY, 1986). Contudo, em sementes de *Lactuca sativa* (alface) a α -galactosidase só pode retirar galactose do produto de ação da endo- β -mananase (LEUNG; BEWLEY, 1983).

Nos resultados do perfil de expressão gênica, BM3, BM10 e BM11, que codificam a enzima endo- β -mananase, observa-se o efeito materno nos híbridos F₁ e na geração F₂ em sementes de alface. A característica de termoinibição é observada na cultivar Everglades (termotolerante), no F₁(ExV), porém, seu recíproco F₁(VxE) não apresenta tolerância à altas temperaturas, indicando a presença de efeito materno na geração F₁.

O efeito materno é a influência casual do genótipo e fenótipo materno no fenótipo da prole (WOLF; WADE, 2009). No caso da semente, o endosperma triplóide herdado é constituído de duas partes materna (ORSI; TANKSLEY, 2009). Este efeito pode ser testado por meio de cruzamentos recíprocos. Em caso positivo, o resultado dos cruzamentos é diferente entre si, com os genes maternos envolvidos (NASCIMENTO *et al.*, 2016), como foi observado no presente estudo.

A maior atividade enzimática da endo- β -mananase foi observada em sementes de alface termotolerante (Everglades) quando comparada com sementes termossensíveis (Verônica). Além disto, sementes de alface termotolerante apresentaram melhores parâmetros fisiológicos, que impactaram diretamente na germinação (CAVASIN *et al.*, 2021).

A atividade da endo- β -mananase foi relatada em sementes de várias espécies. No entanto, embora a degradação de mananas seja iniciada por esta enzima, o papel dela no enfraquecimento do endosperma ainda é controverso, a ponto de alguns autores afirmarem que a endo- β -mananase que não é a única responsável pela quebra do galactomanano (NONOGAKI *et al.*, 2000), enquanto outros concluem que a endo- β -mananase é o principal componente enzimático do processo de desmontagem dos galactomananos (NASCIMENTO *et al.*, 2016, CATÃO *et al.*, 2014; CATÃO *et al.*, 2016).

Sendo assim, a endo- β -mananase parece ser necessária para o enfraquecimento do endosperma, contudo, pode não ser suficiente para permitir a conclusão da germinação, exigindo outros fatores, como o ácido abscísico (ABA), as giberelinas (GA), etileno (ET), óxido

nítrico (NO), auxinas (IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011) e proteínas da parede celular como expansinas (NONOGAKI *et al.*, 2000). Estudos com sementes de um acesso primitivo de alface PI251246 (termotolerante) e a cultivar Salinas revelaram a expressão gênica denominada fator de resposta ao etileno 1- LsERF1, responsável pela promoção da biossíntese de giberelina para combater os efeitos inibitórios do ácido abscísico e, portanto, promover a germinação em altas temperaturas (YOONG *et al.*, 2016).

Adicionalmente, acredita-se que a mobilização do galactomanano em sementes pode estar relacionada à ação de outras enzimas como a α -galactosidase (REID; EDWARDS, 1985). Neste trabalho, ao avaliar a expressão relativa dos quatro genes (AG1, AG2, AG4 e AG5) correspondente à enzima α -galactosidase, foi observada grande variação entre os tratamentos. Neste caso, a característica de termoinibição não seguiu a tendência esperada, possivelmente porque algumas α -galactosidasas podem estar associadas a outras funções (MCCLEARY; MATHESON, 1976). A α -galactosidase parece ser uma enzima constitutiva cuja atividade não é específica para a germinação ou mobilização pós-germinativa das reservas de galactomananas do endosperma durante o crescimento das plântulas (FEURTADO *et al.*, 2001).

Sementes de tomate (*Solanum Lycopersicon*) apresentaram três isoformas da enzima α -galactosidase (FUERTADO *et al.*, 2001), já em sementes de *Cyamopsis tetragonoloba* foram descobertas múltiplas formas de α -galactosidase e somente uma delas associada com a degradação do galactomanano presente no endosperma (MCCLEARY; MATHESON, 1976).

Ademais, a presença de mRNA, ou seja, do transcrito, não significa necessariamente a presença do produto proteico, pois existem diferentes mecanismos de expressão gênica e regulação gênica, que podem ser utilizados de acordo com a necessidade da célula. Ainda se deve considerar que o sistema de controle genético da qualidade fisiológica em sementes é complexo, devido ao envolvimento de mais de um gene (CARRINGTON; AMBRON, 2003). No caso de alface, o controle genético da tolerância à termoinibição em sementes de alface é atribuído a um ou poucos genes (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

5 CONCLUSÃO

A expressão dos genes estudados que codificam a enzima endo- β -mananase segue a característica de termoinibição, diferentemente da α -galactosidase, podendo ser usada como marcador.

Desta forma, a expressão dos genes codificadores de endo- β -mananase podem estar associados à mobilização de reservas do endosperma, e, conseqüentemente, na germinação em semente de *Lactuca sativa*.

REFERÊNCIAS

- ARGYRIS, J.; TRUCO, M. J.; OCHOA, O.; MCHALE, L.; DAHAL, P.; DEYNZE, A. VAN; MICHELMORE, R. W.; 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.
- DEKKERS, B. J.; WILLEMS, L.; BASSEL, G. W.; VAN BOLDEREN-VELDKAMP, R. P.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W.; BENTSINK, L. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 1, p. 28-37, 2012.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination**. London: Elsevier/Academic Press, 2014.
- CARRINGTON, J. C.; AMBROS, V. Role of microRNAs in plant and animal development. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 336-338, 2003.
- CATÃO, H. C. R. M.; GOMES, L. A. A.; GUIMARÃES, R. M.; FONSECA, P. H. F.; CAIXETA, F.; MARODIN, J. C. Physiological and isozyme 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.; SANTOS, H. O. DOS; 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.
- FEURTADO, J.A.; BANIK, M.; BEWLEY, J. D. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 359, p. 1239-1249, 2001.
- FOWLER S.; THOMASHOW M.F *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **The Plant Cell**, v. 14, n. 8, p. 1675-1690, 2002.
- HE G.H.; XU J.Y.; WANG Y.X.; LIU J.M.; LI P.S.; MING C., MA Y.Z.; XU Z.S. Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2016.
- HUO, H.; DAHAL, P.; KUNUSOTH, K.; MCCALLUM, C. M.; BRADFORD, K. J. Expression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase4 is essential for thermoinhibition of lettuce seed germination but not for seed development or stress tolerance. **Plant Cell**, v. 25, n. 3, p. 884–900, 2013.
- IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R.; DEL CARMEN RODRÍGUEZ-GACIO, M.; BARRERO-SICILIA, C.; CARBONERO, P.; MATILLA, A. J. Molecular analysis of endo- β -mannanase genes upon seed imbibition suggest a cross-talk between radicle and micropylar endosperm during germination of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 1, p. 80-82, 2011.

JEBERSON, M. S.; SHASHIDHAR, K. S.; IYANAR, K. Estimation of genetic variability, expected genetic advance, correlation and path analysis in field pea (*Pisum sativum* L.). **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 7, n. 4, p. 1074–1078, 2016.

KANEKO K.; SASAKI M.; KURIBAYASHI N.; SUZUKI H.; SASUGA Y.; SHIRAYA T.; INOMATA T.; ITOH K.; BASLAM M.; MITSUI T. Proteomic and glycomic characterization of rice chalky grains produced under moderate and high-temperature conditions in field system. **Rice**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2016.

KREPS J.; WU Y.; CHANG, H.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant physiology**, v. 130, n. 4, p. 2129-2141, 2002.

LAN, Y.; WANG, C. E.; WU, C. F.; LIU, Z. Y.; GAO, C. F. Crop Plant Genotyping by Real-Time PCR Analysis of Crude Extracts of Seeds. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 1, p. 1-4, 2015.

LEAO-BUCHIR, J.; PEREIRA, G. V. M.; DA SILVA, A. L. L.; ALBAN, S.; ROCHA, M. C.; POLETTINI, J.; SOCCOL, C. R. Real-time PCR for traceability and quantification of genetically modified seeds in lots of non-transgenic soybean. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 1, p. 34-41, 2018.

LEE, S.; SHIN, Y. Development and practical use of RT-PCR for seed-transmitted Prune dwarf virus in quarantine. **The Plant Pathology Journal**, v. 30, n. 2, p. 178, 2014.

LEUNG, D.W.M.; BEWLEY, J.D. A role for α -galactosidase in the degradation of the endosperm cell walls of lettuce seeds, cv. Grand Rapids. **Planta**, v. 157, n. 3, p. 274-277, 1983.

LISBOA, C.G.S; TONINI, P.P.; TINÉ, M.A.S.; BUCKERIDGE, M.S. Endo-B-mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18 n. 2, p. 269-280, 2006.

MCCLEARY, B. V.; MATHESON, N. K.; SMALL, Darryl M. Galactomannans and a galactoglucomannan in legume seed endosperms: Structural requirements for β -mannanase hydrolysis. **Phytochemistry**, v. 15, n. 7, p. 1111-1117, 1976.

MIRMAJLESSI S.M.; LOIT E.; MÄND M.; MANSOURIPOUR S.M. Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis-a review. **Plant Protection Science**, v. 51, n. 4, p. 177-190, 2015.

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, n. 2, p. 216–222, 2016.

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.

- NIJSSE, J. *et al.* Low-temperature scanning electron microscopic observations on endosperm in imbibed and germinated lettuce seeds. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 509-516, 1998.
- NONOGAKI, H.; GEE, O.H.; BRADFORD, K.J. A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. **Plant Physiology**, v. 123, n. 4, p. 1235-1246, 2000.
- OLIVEIRA, D. F. D.; CAVASIN, P. Y.; SILVA, S.; OLIVEIRA, N. S.; OLIVEIRA, C. L. D.; GOMES, L. A. A. Genetic control of thermo-inhibition tolerance in lettuce seeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 56, 2021.
- OUELLETTE, B. F. F.; BEWLEY, J. D. β -Mannoside mannohydrolase and the mobilization of the endosperm cell wall of lettuce seeds, cv. Grand Rapids. **Planta**, v. 169, n. 3, p. 333-338, 1986.
- CAVASIN, P.Y.; H.O. SANTOS, H.O.; GOMES, L.A.A.; FANTAZZINI, T.B.; VON-PINHO, E.V.R.; PIRES, R.M.O.; CARVALHO, E.R. Endo- β -Mannanase Enzyme Activity is Related to Thermo Inhibition in *Lactuca sativa* Seeds. **Research Journal of Seed Science**, v.14 p. 11-18, 2021.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.
- REID, J.G.; EDWARDS, M. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seed. *In*: STEPHEN A. (Ed.). **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 155-186.
- RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. e45-e45, 2009.
- SCHUMPP, O.; BRÉCHON, A.; BRODARD, J.; DUPUIS, B.; FARINELLI, L.; FREI, P.; PELLET, D. Large-Scale RT-qPCR Diagnostics for Seed Potato Certification. **Potato Research**, v. 64, n. 4, p. 553-569, 2021.
- SHI, J.; YAN, B.; LOU, X.; MA, H.; RUAN, S. Comparative transcriptome analysis reveals the transcriptional alterations in heat-resistant and heat-sensitive sweet maize (*Zea mays* L.) varieties under heat stress. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2017.
- TAN, L.; CHEN, S.; WANG, T.; DAI, S. Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. **Proteomics**, v. 13, n. 12-13, p. 1850-1870, 2013.
- TIAN, Q.; FENG, J. J.; HU, J.; ZHAO, W. J. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 123-132, 2005.

WOLF, J. B.; WADE, M. J. What are maternal effects (and what are they not)? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1520, p. 1107-1115, 2009.

YOONG, F. Y.; OBRIEN, 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 factor1 (ERF1). **Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p. 472–488, 2016.

CAPÍTULO 3 ENDO- β -MANANASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE COMO MARCADORES ENZIMÁTICOS DA TERMOTOLERÂNCIA DE SEMENTES DE *LACTUCA SATIVA* L.

RESUMO

Em temperaturas elevadas, a germinação em sementes de alface tende a não acontecer, criando problemas para o estabelecimento do estande de mudas. Objetivou-se avaliar a termotolerância em sementes de alface e encontrar marcadores enzimáticos para esta característica. Foram utilizadas sementes das cultivares Everglades (tolerante à termoinibição) e Verônica (sensível à termoinibição), os híbridos recíprocos, oriundos do cruzamento entre as duas cultivares e a geração F₂. As sementes foram submetidas aos testes de germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e testes enzimáticos (Catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e endo- β -mananase). Os dados obtidos nos testes de germinação e IVG foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5%. A cultivar Everglades, o híbrido F₁(ExV) e F₂(ExV) apresentaram menos influência na germinação em altas temperaturas do que os demais tratamentos. Além disso, o efeito materno foi observado na geração F₁. Temperaturas elevadas interferiram na atividade de todas as enzimas avaliadas, conseqüentemente, nos parâmetros fisiológicos. Contudo, a superóxido dismutase e a endo- β -mananase apresentaram relação direta e mais expressiva com as alterações nos parâmetros fisiológicos do que o restante das enzimas avaliadas, podendo ser utilizada como marcadores para a seleção de genótipos termotolerantes em sementes de alface.

Palavras-chave: Alface. Isoenzimas. Termoinibição. Altas temperaturas.

ENDO- β -MANANASE E SUPEROXIDE DISMUTASE AS ENZYMATIC MARKERS OF THERMOTOLERANCE OF SEEDS OF *LACTUCA SATIVA* L.

ABSTRACT

At higher temperatures, lettuce seeds tend to not germinate, which result in problems for crop establishment on field. Thus, this study aimed to evaluate the thermotolerance in lettuce seeds and find enzymatic markers. Were used the thermoinhibition tolerant cultivar Everglades, the sensitive Verônica, reciprocal hybrids, from the crossing between the cultivars, and F₂ - generation were used. Seeds were submitted to germination and enzymatic tests (catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and endo- β -mananase). Germination percentage (first and final counting) and speed index (GSI) were analyzed through Tukey's test. Everglades cultivar, as its reciprocal hybrids, have not been influenced by temperature regarding germination if compared to the other treatments. Also, the maternal effect was observed for F₁ generation. Higher temperatures interferes at activity for all enzymes here tested, consequently in the physiological parameters. However, superoxide dismutase and endo- β -mannanase have shown direct and more expressive correlation with changes on the physiological parameters when compared to the other enzymes. Thus, is possible to conclude that those enzymes can be used as markers for thermotolerant genotypes selection.

Keywords: Lettuce. Isoenzymes. Thermoinhibition. Higher Temperatures.

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa verde mais consumida no mundo. Principalmente as folhas de alface são consumidas *in natura*, sendo um alimento com altas quantidades de vitaminas (A, B1, B2 e B5), cálcio, potássio, sódio, fósforo, ferro, silício, flúor, magnésio e antioxidantes. Além disso, também pode ser fonte de fibras insolúveis (SILVA *et al.*, 2016).

Com o melhoramento genético e as cultivares mais adaptadas, a produção de alface ficou mais fácil em várias regiões, porém, existem limitações. A maioria das cultivares produz sementes sensíveis ao calor, suscetíveis à termoinibição. Assim, em temperaturas superiores a 28 °C, a germinação das sementes tende a não acontecer (YOONG *et al.*, 2016), criando problemas para a o estabelecimento do estande de mudas.

Apesar da maioria das cultivares de alface serem termosensíveis, há muitos relatos na literatura de genótipos cujas sementes são capazes de germinar em temperaturas mais elevadas. Como exemplo, o acesso *Lactuca serriola* UC96US23, capaz de germinar em torno de 37 °C (ARGYRIS *et al.*, 2011), o acesso primitivo *Lactuca sativa* L. PI251246, capaz de germinar a 33 °C (YOONG *et al.*, 2016), e cultivar Everglades, cuja germinação é superior a 70% a 35 °C (CATÃO *et al.*, 2016; CATÃO *et al.*, 2014).

Além das análises fisiológicas, as análises enzimáticas podem ser um mecanismo de se verificar a termoinibição. Como exemplo, a determinação da atividade da enzima endo- β -mananase, que enfraquece as paredes celulares dos tecidos circundantes do embrião, permitindo seu desenvolvimento (CATÃO *et al.*, 2014), sendo este processo influenciado pela temperatura.

O amolecimento do endosperma está diretamente relacionado a germinação e a termotolerância (WANG *et al.*, 2019). Para esse amolecimento há participação de enzimas como álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), catalase (CAT), esterase (EST), piruvato descarboxilase (PDC), glutamato oxaloacetato transferase (GOT) e endo- β -mananase é essencial. Esta última enzima é responsável pela hidrólise de mananas do endosperma durante a germinação (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Cultivares termosensíveis possuem mais manose na parede celular do que genótipos termotolerantes, conseqüentemente, é necessário mais tempo para a endo- β -mananase completar a hidrólise e, conseqüentemente, o tempo de germinação é prolongado (ALBUQUERQUE *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2018).

A análise da expressão enzimática e proteica permite a diferenciação das cultivares, o que pode ser uma ferramenta para identificar variações relacionadas à resposta a fatores

abióticos, como temperaturas mais altas para germinação. Assim, é possível identificar marcadores que podem ser ferramentas para a seleção de cultivares de alface tolerantes a temperaturas mais elevadas de germinação de sementes (CATÃO *et al.*, 2014). Diante do exposto, objetivou-se avaliar a termotolerância em sementes de alface das cultivares Everglades e Verônica, bem como seus híbridos, e encontrar possíveis marcadores enzimáticos para termotolerância.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de alface: Everglades, que apresenta folhas lisas e é considerada tolerante à termoinibição, e Verônica, que possui folhas crespas e é sensível à termoinibição, além de sementes dos híbridos recíprocos e geração F₂.

Para a obtenção das sementes, inicialmente fez-se a semeadura das cultivares Everglades e Verônica, em bandejas de poliestireno com 128 células, semeando 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 no Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Lavras, Fazenda Palmital, município de Ijaci, MG, Brasil. A estação experimental está localizada nas coordenadas 21°09'24'S e 44°55'34'W, a 831 metros de altitude. 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 bífidados, 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 F₁(Everglades ♀ x Verônica ♂) ((F₁(ExV)), correspondendo às sementes colhidas em flores emasculadas de plantas da cultivar Everglades e polinizadas com

flores da cultivar Verônica; $F_1(\text{Verônica}^{\ominus} \times \text{Everglades}^{\ominus})$ ($F_1(\text{VxE})$), correspondendo às sementes colhidas em flores emasculadas de plantas da cultivar Verônica e polinizadas com flores da cultivar Everglades; Verônica, correspondendo às sementes oriundas de autofecundação da cultivar Verônica e Everglades, correspondendo às sementes oriundas de autofecundação da cultivar Everglades. Estas sementes foram limpas, secadas, embaladas e armazenadas em câmara fria a 15 °C e 50% UR.

Para a obtenção da geração F2 nas mesmas condições dos demais tratamentos, o processo se repetiu, semeando sementes da cultivar Everglades, Verônica, $F_1(\text{ExV})$ e $F_1(\text{VxE})$. Foram colhidas sementes dos seis tratamentos (Everglades, Verônica, $F_1(\text{ExV})$, $F_1(\text{VxE})$, $F_2(\text{ExV})$ e $F_2(\text{VxE})$).

Para os testes de primeira contagem de germinação, germinação e vigor (IVG) foram utilizadas sementes de cada tratamento, dispostas no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições (caixa *gerbox*) de 50 sementes cada, perfazendo um total de 24 parcelas. As sementes foram distribuídas sobre 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 (BRASIL, 2009). 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.

Para tanto, os mesmos tratamentos foram também dispostos, da mesma forma, em B.O.D. em temperatura de 20 °C, para verificar porcentagem de germinação e IVG das sementes em temperatura ideal.

Para as análises enzimáticas foram utilizadas três amostras de 350 sementes de cada um dos tratamentos, que foram armazenadas à temperatura de -86 °C. As sementes foram trituradas na presença de polivinilpolipirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido em cadinho de porcelana sobre gelo e, posteriormente, armazenado à temperatura de -86 °C. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Para a extração das enzimas antioxidativas em sementes de alface (catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD)) utilizou-se 100 mg de cada tratamento, homogeneizados em tampão fosfato de potássio 400 mM pH 7,8 (375 µL), EDTA 10 mM (15µL), ácido ascórbico 200 mM (15 µL) e água (1035 µL). Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 14000 rotações por minuto (RPM) a 4 °C.

A atividade das enzimas SOD, CAT e APX foi determinada pela técnica de espectrofotometria, com microplaca de 96 poços de poliestireno. Para a avaliação da SOD, utilizou-se 10 μL do extrato enzimático bruto e de 190 μL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,8 (100 μL), metionina 70 mM (40 μL), EDTA 10 mM (3 μL), água (30 μL), azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM (15 μL) e riboflavina 2 μM (2 μL). A reação foi conduzida a 25 °C, em uma câmara de reação iluminada com uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 7 min de exposição à luz, absorvância foi lida a 560 nm. O resultado da atividade da SOD foi expresso em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

Para a CAT, utilizou-se 10 μL do extrato enzimático bruto e 190 μL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 (100 μL), água (80 μL) e peróxido de hidrogênio 250mM (10 μL). O decréscimo na absorvância a 240 nm a 28 °C foi medido durante três minutos de reação. O resultado da CAT foi expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

Para a APX, utilizou-se 10 μL do extrato enzimático bruto e 190 μL do meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7,8 (100 μL), ácido ascórbico 10 mM (10 μL), água (70 μL), peróxido de hidrogênio 2 mM (10 μL). Observou-se o decréscimo da absorvância a 290 nm durante três minutos, a 28 °C. O resultado da APX foi expresso em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

Para a extração das enzimas endo- β -mananase, 100 mg de cada tratamento foram acrescidos de 300 μL de tampão de extração (HEPES 0,1 M / NaCl 0,5 M e ácido ascórbico (5 mg de ácido ascórbico por mL de tampão), pH 8,0).

Em seguida, as amostras foram centrifugadas (30 min / 14.000 rpm) e 20 μL foram pipetados em gel de agarose contendo 6 mL de goma de alfarroba (LBG; 0,24 g de agarose e 24 mL de ácido cítrico 1 M / NaHPO₄ 0,4 M • 2H₂O, pH 5,0). O gel foi incubado por 21 horas e desenvolvido de acordo com o método proposto por Silva *et al.* (2004). A atividade da endo- β -mananase foi calculada de acordo com Downie *et al.* (1994).

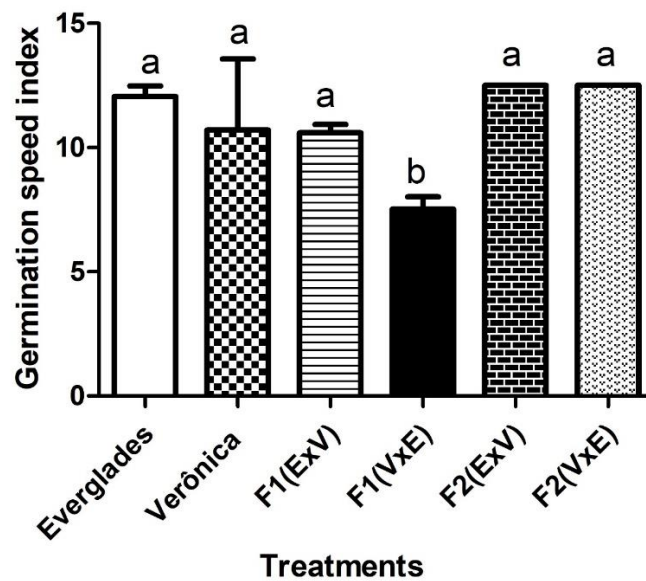
Todos os dados foram computados e as análises de variância e teste de média (Tukey 5%) foram realizados utilizando o programa R para Windows.

3 RESULTADOS

Por meio da análise de variância, foram encontradas diferenças significativas para todas as características avaliadas.

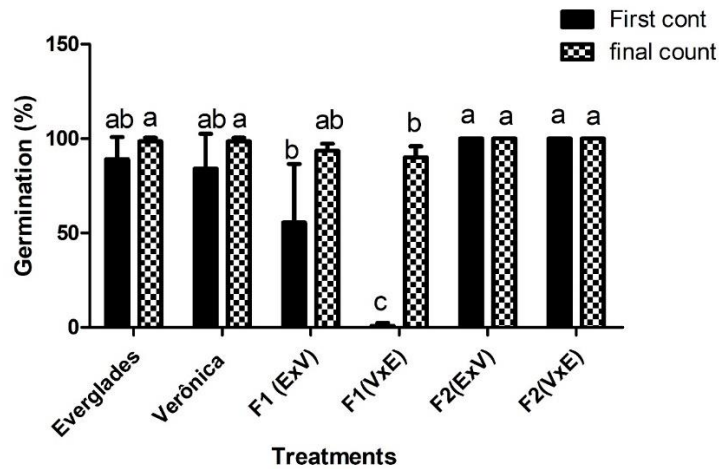
Os resultados de índice de velocidade de germinação e % germinação para todos os tratamentos na temperatura ideal (20°C) podem ser observados nas Figuras 1 e 2. Todos os tratamentos, exceto F1(VxE) apresentam os mesmos valores semelhantes para IVG. Além disso, a porcentagem de germinação observada também estava de acordo com o padrão comercial (acima de 80%).

Figura 1- Índice de Velocidade de Germinação para sementes de alface de diferentes cultivares e híbridos a 20 °C. As mesmas letras indicam que não há diferenças pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2022).

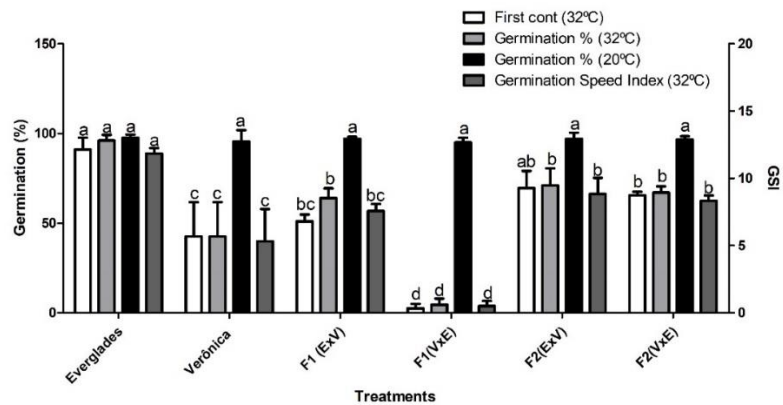
Figura 2 - Primeira contagem de germinação e % germinação para sementes de alface de diferentes cultivares e híbridos a 20 °C. As mesmas letras indicam que não há diferenças pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2022).

Valores mais elevados para todos os parâmetros relacionados à germinação foram observados para a cultivar Everglades a 32°C (FIGURA 3). No entanto, as sementes de todos os tratamentos apresentaram germinação estatisticamente semelhante após a diminuição da temperatura para 20 °C. Para a geração F₁, a 32 °C, F₁ (ExV) apresentou valores maiores quando comparados ao F₁ (VxE recíproco). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas para a geração F₂.

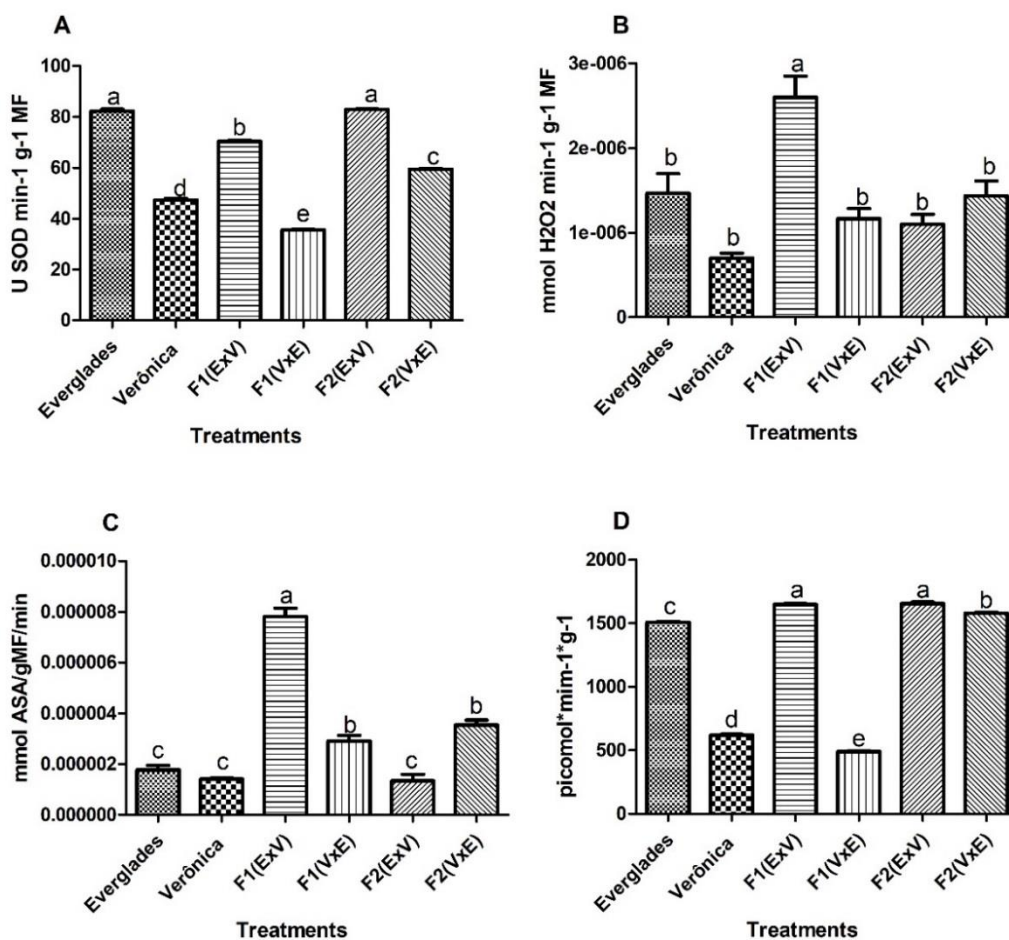
Figura 3 - Índice de Velocidade de Germinação (7 dias a 32 °C), primeira contagem (4 dias a 32°C), porcentagem de germinação (7 dias a 32 °C) e porcentagem de germinação (mais 7 dias a 20 °C) contagem de germinação para sementes de alface de diferentes cultivares e híbridos a 20 °C. As mesmas letras para cada parâmetro indicam que não há diferenças através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2022).

Para SOD (FIGURA 4A), maiores valores foram observados para a cultivar Everglades e F₂(ExV) em relação aos demais tratamentos. Além disso, maior atividade de SOD foi observada em Everglades quando comparado à Verônica. O mesmo pode ser observado comparando-se os híbridos recíprocos e a geração F₂, quando a cultivar Everglades é a genitora feminina. Neste caso, observa-se maiores valores quando comparados ao recíproco.

Figura 4 - Atividade de superóxido dismutase (A), catalase (B), ascorbato peroxidase (C) e endo-β-mananase (D) em sementes de alface segundo cultivares e híbridos recíprocos. As mesmas letras indicam que não há diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: Do autor (2022).

Para a enzima CAT (FIGURA 4B), maior atividade pode ser observada apenas em F₁ (ExV), sem diferença estatística entre os demais tratamentos.

Em relação à enzima APX (FIGURA 4C), maiores valores foram observados para o tratamento F₁ (ExV), seguido da recíproca F₁ (VxE) e F₂ (VxE), com valores estatisticamente iguais.

Para endo- β -mananase (FIGURA 4D), maior expressão pode ser observada para F₁(ExV) e F₂(ExV), seguido por F₂(VxE) e cultivar Everglades. Valores estatisticamente diferentes foram observados entre as cultivares Everglades e Verônica, bem como nas gerações F₁ e F₂, quando Everglades é o genitor feminino, com valores superiores aos recíprocos.

A enzima endo- β -mananase e a superóxido dismutase apresentam comportamento semelhante quanto a sua expressão, sendo a diminuição da atividade mais expressiva para cultivares termosensíveis quando comparadas às termotolerantes.

4 DISCUSSÃO

Altas temperaturas interferem negativamente na atividade de todas as enzimas avaliadas, conseqüentemente nos parâmetros fisiológicos de sementes de alface. A cultivares Everglades, bem como os híbridos utilizando-a como genitor feminino, tem menos influência da temperatura na germinação do que os demais tratamentos.

Sob altas temperaturas, sementes termosensíveis, os genes relacionados ao ABA são mais expressos e a germinação é inibida, entretanto, em sementes termotolerantes, os genes relacionados ao etileno e GA são mais expressos e a germinação tende a acontecer (NASCIMENTO *et al.*, 2018). No presente trabalho, observa-se maiores valores de germinação a 32 °C (FIGURAS 3 e 4) em sementes da cultivar Everglades e da gerações F₁ e F₂ em que a cultivar Everglades (termotolerante) é o genitor feminino.

A germinação das sementes para todos os tratamentos após a diminuição da temperatura para 20 °C (FIGURA 4) confirma o efeito de termoinibição nas sementes de alface (CATÃO *et al.*, 2016). Este resultado confirma ainda, que a cultivar Everglades é termotolerante e está de acordo com vários relatos que encontram maior germinação das sementes da cultivar Everglades se comparada a cultivares termosensíveis (NASCIMENTO *et al.*, 2012; CATÃO *et al.*, 2014; CATÃO *et al.*, 2016; CATÃO *et al.*, 2018).

As diferenças encontradas entre os híbridos F₁ mostram a influência materna sobre a expressão da tolerância à termoinibição. Da mesma forma, o efeito materno foi observado para a germinação de sementes de tomate em temperaturas mais altas, diferenças encontradas para a germinação de híbridos recíprocos para as cultivares San Vito e Fontana (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

A termoinibição para sementes de alface está ligada ao endosperma, que é triplóide (ORSI; TANKSLEY, 2009) e de origem materna. O endosperma pode retardar ou impedir a germinação, atuando como uma barreira física para a emissão da radícula, principalmente em condições desfavoráveis. O enfraquecimento (amolecimento) do endosperma é um pré-requisito para a emissão da radícula em condições de altas temperaturas (NASCIMENTO *et al.*, 2001). Esta informação é de extrema importância para a seleção de genótipos em programas de melhoramento de plantas, uma vez que dois terços do endosperma são do genitor feminino.

A manose é um componente de reserva do endosperma das sementes de alface, e a produção de endo- β -mananase é essencial para o enfraquecimento da parede celular das células do endosperma, conseqüentemente, permitir a protrusão da radícula e a emergência da plântula. A atividade da endo- β -mananase inclui também a extensão da parede celular, defesa e

mobilização limitada da hemicelulose com outras enzimas, para fornecer carboidratos durante algumas fases do desenvolvimento da semente e da planta (BEWLEY, 1997).

Temperaturas mais altas causam estresse oxidativo, a partir do qual são formadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (JALEEL *et al.*, 2007). As sementes possuem sistemas antioxidantes enzimáticos, que são a principal defesa contra EROs gerados em condições de estresse. Dentre essas enzimas, superóxido dismutase (converte o radical superóxido em H_2O_2 e O_2), catalase e ascorbato peroxidase (transforma H_2O_2 em H_2O e O_2) (CATÃO *et al.*, 2016).

Assim, a redução na expressão dessas enzimas pode resultar na diminuição da prevenção do dano oxidativo. Temperaturas mais altas durante a germinação reduzem a atividade dessas enzimas, principalmente durante a fotorrespiração, resultando no acúmulo de radicais livres (FOYER; NOCTOR, 2003).

O conhecimento da atividade das isoenzimas permite a identificação de variações relacionadas a fatores abióticos, como a resposta da espécie à temperatura. Assim, os marcadores bioquímicos podem ser utilizados como ferramenta para selecionar cultivares tolerantes a altas temperaturas, contribuindo para programas de melhoramento genético em regiões tropicais e subtropicais (CATÃO *et al.*, 2014). Para o armazenamento de sementes de alface em diferentes temperaturas, Catão *et al.* (2016) observaram que temperaturas mais altas interferem na qualidade bioquímica e fisiológica das sementes e isoenzimas podem ser utilizadas como marcadores durante esse processo.

Como foi observado neste estudo, fica evidente que a temperatura influencia diretamente nos parâmetros fisiológicos das sementes. A atividade das enzimas SOD e endo- β -mananase têm correlação direta e mais expressiva com as alterações nos parâmetros fisiológicos quando comparadas às demais enzimas avaliadas. Além disso, a cultivar Everglades (termotolerante) e os híbridos F_1 e F_2 tendo essas cultivares como genitor feminino apresentam maior atividade em ambas as enzimas, mostrando que SOD e endo- β -mananase juntas podem ser indicadores promissores da termotolerância de sementes de alface.

4 CONCLUSÕES

Há efeito materno para a terminibição da tolerância em sementes de alface.

A quantificação de endo- β -mananase e superóxido dismutase pode ser usada como marcadores para seleção de progênies de alface quanto à tolerância à terminibição.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K.A.D.; ALVIM P.O.; SILVA P.A.; VEIGA, A.D. Qualidade fisiológica e bioquímica de sementes de alface revestidas com micronutrientes, aminoácidos e reguladores de crescimento. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 843-848, 2010.
- ALMEIDA, F.A.; SILVA-MANN, R.; SANTOS, H.O.; PEREIRA, R.W.; BLANK, A.F. **Germination temperatures affect the physiological quality of seeds of lettuce cultivars.** **Bioscience Journal**, v. 35, p.1143-1152, 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) collocates with the high temperature germination locus Htg6. 1 in lettuce (*Lactuca* sp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, p. 95-108, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes (RAS)**. Brasília: Mapa/Assessoria de Comunicação Social, 2009.
- BEWLEY, J.D. Breaking down the walls—a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy? **Trends in Plant Science**, v. 2, 464-469, 1997.
- CATÃO, H.C.R.M.; GOMES, L A.A.; 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, p. 316-322, 2014.
- 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, p. 305-313, 2016.
- DOWNIE, B.; HILHORST, H.W.M.; BEWLEY, J.D. A new assay for quantifying endo- β -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, v. 36, p. 829-835, 1994.
- FERREIRA, V.F.; RICARDONI, M.A.; ROSA, S.D.V.F.D.; FIGUEIREDO, M.A.D.; COELHO, S.V.B.; FANTAZZINI, T. B. Endo- β -mannanase enzyme activity in the structures of *Coffea arabica* L. seeds under different types of processing and drying. **Ciência Rural**, v. 48, p. 1-7, 2018.
- FOYER, C. H.; NOCTOR G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplast, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355–364, 2003.
- JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSEL, V. R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 110-116, 2007.
- 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, p. 216-222, 2016.

NASCIMENTO, W.M.; HUBER, D. J.; CANTLIFFE, D.J. Carrot seed germination and ethylene production at high temperature in response to seed priming. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 554-558, 2018.

NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER D.J. Endo- β -mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermotolerant lettuce genotypes in response to seed priming. **Seed Sci. Res.**, v. 11, p. 255-264, 2001.

ORSI, C.H.; TANKSLEY, S.D. Natural variation in an abc transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. **Plosgenet**, v. 5, 2009.

SILVA, A.A.V.; COSTA, A.F.M.; FREITAS, R.M.S.; SANTOS, M.B.S.V.; LOURENÇO, A.L.N.; MALTA, A.S.; NOÉ, P.V.R. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de sururu (*Mytella charruana*) e alface (*Lactuca sativa*) comercializados em um mercado público de Maceió-AL. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 525-529, 2016.

SILVA, E.A.; TOOROP, P.E.; VAN-AELST, A.C.; HILHORST, H.W. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, v. 220, p. 251-261, 2004.

WANG, L.; HAO, J.; QI, Z.; LIU, W.; LIU, C.; HAN, Y.; FAN, S. Cloning and expression of mitogen-activated protein kinase 4 (MAPK4) in response to high temperature in lettuce (*Lactuca sativa*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 21, p. 54-60, 2019.

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, p. 472-488, 2016.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento à pesquisa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG – Brasil) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).