

ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE ALFACE OSMOCONDICIONADAS COM GIBERELINA

CIBELE APARECIDA TEIXEIRA DA SILVA¹, RODRIGO DE GÓES ESPERON REIS²; THAÍS DE ANDRADE³, NAYARA ROBERTO GONÇALVES⁴, RENATO MENDES GUIMARÃES⁵, HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS⁶

RESUMO

Tratamentos pré-germinativos vêm sendo estudados com o intuito de melhorar o desempenho fisiológico das sementes de hortaliças. Objetivou-se avaliar a atividade enzimática de sementes de alface submetidas ao osmocondicionamento com diferentes tipos de soluto e aplicação de giberelina na presença e ausência de luminosidade. Foram utilizadas sementes da alface crespa, cultivar Hortêncina, submetidas ao condicionamento fisiológico em: duas soluções (PEG-6000 e KNO₃), duas concentrações de giberelina (0 e 200 mg L⁻¹) e duas condições de luminosidade (presença e ausência de luz). Após o condicionamento as sementes foram secas em ambiente natural (condições ambientais de Lavras, 25°C) até atingirem o peso inicial. As variáveis analisadas foram: a porcentagem de germinação, índice de velocidade de emergência e eletroforese de isoenzimas. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, de acordo com esquema fatorial 2x2x2, mais uma testemunha adicional (sementes secas – sem condicionamento). Pelos resultados, pode se observar que o condicionamento fisiológico em solução de PEG com -0,8 MPa por 96 horas em temperatura de 20°C, na presença de luz, melhora o desempenho de sementes de alface. A adição de giberelina durante o condicionamento osmótico não melhora o desempenho de sementes de alface germinadas na luz ou no escuro. As análises das atividades enzimáticas auxiliam na avaliação dos efeitos de tratamento para condicionamento de sementes de alface.

Palavras-chaves: *Lactuca sativa* L., *priming*, germinação, eletroforese de isoenzimas .

INTRODUÇÃO

O condicionamento osmótico ou *priming* tem se destacado por ser um tratamento pré-germinativo de fácil execução, além de proporcionar grandes benefícios as sementes de hortaliças, como: uniformizar o desempenho de lotes de sementes, melhorar a germinação e emergência de plântulas sob condições de estresse, superar dormência em algumas espécies, entre outros (NASCIMENTO & COSTA, 2009). Essa técnica consiste na hidratação controlada das sementes, visando a ativação das fases iniciais da germinação sem que a protrusão da radícula ocorra.

Dentre os principais solutos utilizados para obtenção do potencial osmótico, o PEG é o mais empregado. Trata-se de um polímero que não atravessa a membrana celular, garantindo que as sementes absorvam somente água, porém torna-se necessária a aeração artificial da solução. O KNO₃, um sal inorgânico, também utilizado para o condicionamento fisiológico não reduz a disponibilidade de oxigênio, contudo há relatos de prejuízos à qualidade das sementes de algumas espécies.

Reguladores de crescimento, associados à técnica de condicionamento osmótico, tem sido difundido em algumas espécies com intuito de beneficiar a qualidade de sementes. O uso de giberelina associada ao *priming*, na fase germinativa possui efeito estimulante no processo de germinação, podendo melhorar o vigor e germinação. Efeitos positivos do uso de giberelinas foram observados em sementes de alface (MENEZES et al., 2006), mamão (LOPES & SOUZA, 2008), pimentão (ALBUQUERQUE et al., 2009) e tomate (ANDREOLI & KHAN, 1999).

¹ Mestranda em Fitotecnia, DAG/ UFLA, cibelezacaroni@yahoo.com.br

² Doutorando em Fitotecnia, DAG/UFLA, guidegoes@gmail.com

³ Mestranda em Fitotecnia, DAG/UFLA, thaisandrade_2006@hotmail.com

⁴ Mestranda em Fitotecnia, DAG/UFLA, nayararob1@gmail.com

⁵ Professor Associado, DAG/UFLA, renatomg@ufla.br

⁶ Doutoranda em Fitotecnia, DAG/UFLA, heloisa.ufs@gmail.com

Tratamentos pré-germinativos, como o condicionamento osmótico, podem alterar as atividades bioquímicas das sementes. As enzimas são catalisadores biológicos, ótimos indicadores de deterioração de sementes. As alterações enzimáticas mais frequentes durante a deterioração das sementes são: alterações na estrutura, inativação progressiva, redução ou paralisação da síntese de algumas enzimas e redução da atividade de enzimas respiratórias (MARCOS FILHO, 2005).

Sementes de algumas cultivares de alface não germinam se não forem expostas à luz. Acredita-se que essa regulação da germinação de sementes de alface por fitocromos é mediada pela giberelina (YOSHIKI et al., 2008). Em geral, as sementes que necessitam de luz para germinar a requerem também durante a embebição. Assim, para estas espécies, luz artificial deve ser fornecida durante o condicionamento osmótico.

Dentre as enzimas que podem ser utilizadas para avaliação da qualidade fisiológica de sementes submetidas ao priming, há a malato desidrogenase (MDH) e a álcool desidrogenase (ADH), que se destacam nos processos respiratórios; a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) que estão envolvidas na remoção de radicais livres (MARCOS FILHO, 2005); e a esterase (EST) que é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios totais de membrana (HENNING et al., 2009).

Ante o exposto, objetivou-se avaliar a atividade enzimática de sementes de alface submetidas ao osmocondicionamento com diferentes tipos de soluto e aplicação de giberelina na presença e ausência de luminosidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras. Utilizaram-se sementes de alface crespa, cultivar Hortência, que foram submetidas ao condicionamento fisiológico avaliando-se os seguintes fatores: duas soluções (PEG-6000 e KNO₃), duas concentrações de giberelina (0 e 200 mg L⁻¹) e duas condições de luminosidade (presença e ausência de luz). O condicionamento osmótico foi realizado em solução aerada com potencial osmótico de -0,8 MPa, para as duas soluções, durante um período de 96 horas sob temperatura de 20°C. A concentração de giberelina (GA₃) na solução osmótica foi de 200 mg L⁻¹ de acordo com Menezes et. al (2006). A concentração da solução de PEG-6000 foi obtida de acordo com a equação proposta por Michel & Kaufmann (1973), enquanto que a concentração da solução de KNO₃ foi determinada de acordo com a equação de Van't Hoff (HILLEL, 1971). As concentrações das soluções osmóticas de PEG e KNO₃ na temperatura de 20°C foram de 250,98 e 22,92 g.L⁻¹. Após o condicionamento as sementes foram secas em ambiente natural até atingirem o peso inicial e as seguintes variáveis foram analisadas: **porcentagem de germinação:** foram utilizadas caixas gerbox com duas folhas de papel mata-borrão umedecidas com água destilada (2,5 vezes o peso do papel). Cada tratamento foi constituído por quatro repetições de 50 sementes, que permaneceram em câmaras tipo BOD com temperatura de 20 °C e luz constante. A contagem final foi realizada no sétimo dia após a instalação do teste, sendo computada a percentagem de plântulas normais; **índice de velocidade de emergência:** realizada com semeadura das sementes em caixas plásticas contendo *Plantmax* como substrato. Foram realizadas irrigações diárias. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições de 50 sementes. Foram realizadas contagens diárias das plântulas normais emergidas até os 10 dias após a instalação do ensaio. O cálculo foi feito conforme fórmula proposta por Maguire (1962).

A atividade enzimática foi avaliada por meio de eletroforese de isoenzimas, realizada após o condicionamento. As sementes foram armazenadas a -86 °C, quando foram maceradas em cadinhos em presença de PVP e nitrogênio líquido. Para extração das isoenzimas foi utilizado tampão Tris HCl 0,2M pH 8,0, na proporção de 250 µL por 100 mg das sementes, homogeneizado e mantido por 12 horas a 4°C, seguido de centrifugação a 14.000 xg por 30 minutos a 4°C. A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50 µL do sobrenadante da amostra e a corrida efetuada a 120 V por 4 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para os sistemas malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e esterase (EST) (Alfenas et al., 1998).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, de acordo com um esquema fatorial 2x2x2, mais uma testemunha adicional (sementes secas – sem condicionamento). A análise de variância foi realizada através do software ASSISTAT e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A comparação com a testemunha foi realizada pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados da análise de variância, observou-se interação tripla significativa entre os fatores para as variáveis: porcentagem de germinação e índice de velocidade de emergência.

Na presença de luz não houve diferenças significativas para a porcentagem de germinação devido aos solutos ou pela presença ou ausência de giberelina na solução de condicionamento (Tabela 1). Na ausência de luz e com a utilização de KNO₃ e giberelina houve decréscimo no percentual de germinação, nos demais tratamentos não foi observada diferença significativa. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao teste de germinação proporcionar condições ideais para a semente germinar. Assim, um lote com baixo vigor e alta viabilidade não seria diferenciado dos demais. Carvalho et al. (2000) comentam que quando as sementes apresentam elevado potencial fisiológico, não é verificada resposta significativa na germinação das sementes submetidas ao condicionamento.

Na Tabela 1, observando-se os dados referentes ao índice de velocidade de emergência, verificou-se que os tratamentos com condicionamento osmótico não diferiram da testemunha, com exceção das sementes osmocondicionadas com ambas as soluções com giberelina e ausência de luz, que apresentaram índice inferior.

Ainda avaliando-se o índice de velocidade de emergência (Tabela 1), observou-se que, na presença de luz e giberelina, o tratamento com KNO₃ foi superior ao PEG. Já no tratamento sem giberelina e na presença de luz, a embebição em PEG propiciou maiores índices. Entretanto, quando a embebição foi em soluto PEG nas duas condições de luminosidade, a adição de giberelina reduziu as médias observadas. Quando o soluto foi KNO₃ na presença de luz, a adição de giberelina aumentou o índice observado. Já na ausência de luz, verificou-se que independente do soluto utilizado a adição de giberelina reduziu a velocidade de emergência. Todos os tratamentos apresentaram índices de velocidade de emergência superiores à testemunha, exceto aqueles que foram submetidos ao condicionamento fisiológico com giberelina e ausência de luz.

Tabela 1- Médias da porcentagem de germinação (PG) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de alface submetidas ao condicionamento fisiológico.

Solução	Com luz		Sem Luz	
	Com GA ₃	Sem GA ₃	Com GA ₃	Sem GA ₃
Germinação (%)				
PEG	88 Aa [†]	95 Aa [†]	77 Aa [†]	85 Aa [†]
KNO ₃	79 Aa [†]	87 Aa [†]	58 Bb	88 Aa [†]
Testemunha	91			
Índice de velocidade de emergência				
PEG	7,02 Bb [†]	10,99 Aa	5,91 Ba [†]	8,95 Aa
KNO ₃	9,45 Aa	7,47 Bb	4,78 Ba [†]	9,23 Aa
Testemunha	4,83			

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

[†]Não difere da testemunha pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

No padrão enzimático da catalase (Figura 1), se observa maior atividade para o grupo das sementes osmocondicionadas com PEG em relação ao grupo submetido ao KNO₃. Em situações de estresse, uma maior atividade da enzima ocorre com o intuito de proteger a semente de danos causados por intoxicações, o que pode ter ocorrido nos tratamentos que tiveram o PEG como soluto. Esse fato pode ter ocorrido porque o PEG não penetra no interior das sementes, não alterando, portanto, a atividade de proteção exercida por essa enzima. Ao contrário, o efeito tóxico do KNO₃ pode ter alterado negativamente o funcionamento da enzima, e por isso prejudicado o desempenho das

sementes. Já a intensidade da atividade da catalase na testemunha tende a ser intermediária diferenciando dos outros tratamentos.

Também foi observada, para os dois solutos, menor atividade da enzima nas sementes que permaneceram no escuro durante o condicionamento com adição de giberelina. Estes mesmos tratamentos apresentaram menor germinação e vigor. A catalase é uma enzima antioxidante do sistema de defesa, envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio. A redução da atividade dessa enzima faz com que as sementes fiquem mais suscetíveis aos efeitos deletérios de radicais livres sobre os ácidos graxos insaturados das membranas, comprometendo o seu vigor (BAILLY et al., 2001).

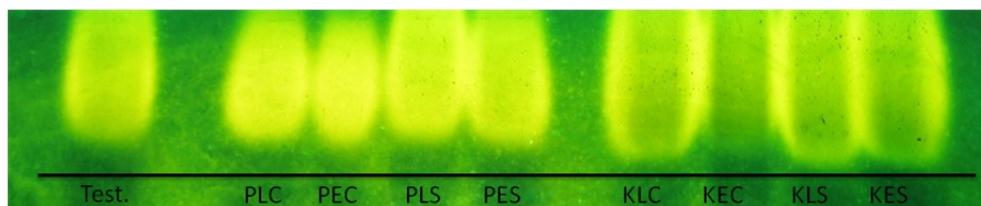


Figura 1- Padrão enzimático catalase em sementes de alface cv. Hortências osmocondicionadas. (P – com PEG, K – com KNO₃; L – com luz, E – escuro; C – com GA₃, S – sem GA₃)

Nos tratamentos utilizando PEG, verificou-se uma baixa atividade da MDH que pode estar relacionado a restrição de oxigênio nessa solução (Figura 2A), caracterizando redução na respiração aeróbica, uma vez que essa enzima tem uma função importante no ciclo de Krebs para a produção de NADH. Por outro lado a maior atividade dessa enzima foi observada em sementes condicionadas em soluções de KNO₃ e testemunha. Embora os resultados com MDH evidenciem prejuízos na oxigenação das sementes durante o *priming*, quando o soluto foi PEG, pode-se presumir que esse prejuízo não foi de intensidade suficiente para reduzir o desempenho das sementes em relação aos tratamentos com boa oxigenação. A MDH catalisa a conversão de malato a oxalacetato, e, além da importante função dentro do ciclo de Krebs, participa do movimento de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas (TAIZ & ZEIGER, 2009).

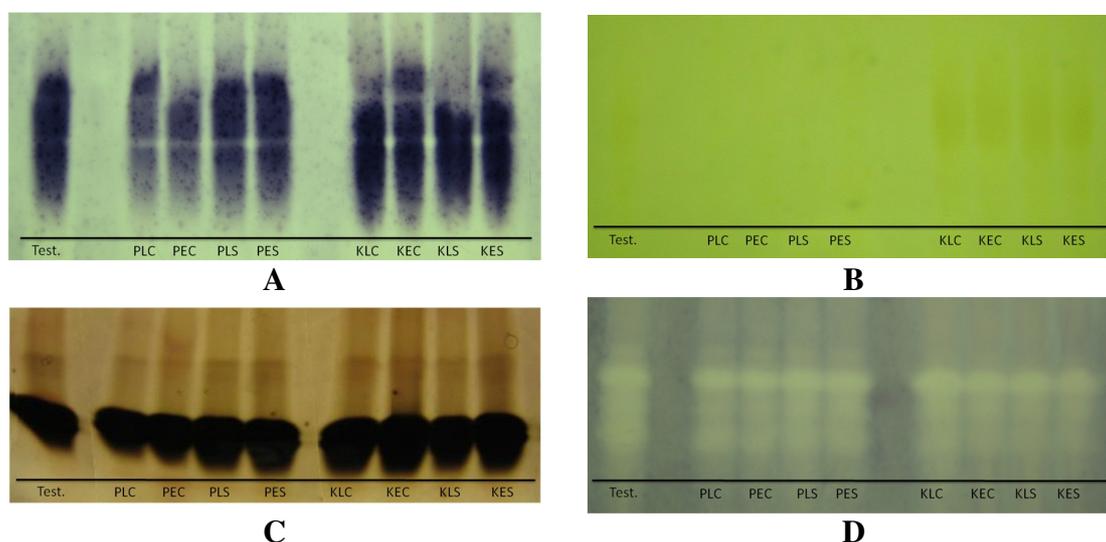


Figura 2- Padrão enzimático de sementes de alface cv. Hortências osmocondicionadas: (A) Malato desidrogenase; (B) Álcool desidrogenase; (C) Esterase; (D) Superóxido dismutase.

Quanto ao sistema enzimático da álcool desidrogenase (ADH) (Figuras 2B), foi observada maior atividade em sementes condicionada em solução de KNO₃. Estes resultados divergem daqueles encontrados por Vidigal (2008) e Brandão Junior et al. (2002), que correlacionaram a alta atividade dessa enzima a maior viabilidade de sementes. Esta enzima está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN et al., 2005). O acetaldeído acelera a deterioração das sementes. Com o aumento da atividade da ADH, as sementes ficam mais protegidas

contra a ação deletéria deste composto, a qual é maior quanto comparada a do etanol. Entretanto, a maior atividade dessa enzima pode indicar maior intensidade do funcionamento da rota anaeróbica de produção de energia no nível celular, devido a estresse provocado por toxidez do KNO_3 .

Em sementes de alface a atividade da esterase foi mais intensa em sementes submetidas ao condicionamento em solução de KNO_3 (Figura 2C). Essa enzima está envolvida em reações de hidrólise de ésteres e está diretamente ligada ao metabolismo de lipídios e ao processo degenerativo de membranas. Com isso observa-se que alterações nos padrões dessa enzima são evidências da ocorrência de eventos deteriorativos (HENNING et al., 2009). Observa-se também, que houve uma maior intensidade das bandas nos tratamentos com solução de KNO_3 no escuro, o qual se assemelha com a testemunha.

Em relação a superóxido dismutase (SOD), maior atividade foi observada na testemunha e nas sementes osmocondicionadas com PEG (Figura 2D). A SOD está normalmente relacionada a sementes de alta qualidade fisiológica, sendo uma enzima que catalisa os radicais superóxidos livres (O_2^-), produzidos em diferentes locais da célula, para oxigênio molecular e H_2O_2 (MCDONALD, 1999). A menor intensidade da atividade enzimática nos tratamentos com KNO_3 pode estar relacionado com a absorção do sal pelas sementes influenciando, assim, os sistemas de membranas, e podendo também afetar algum mecanismo que iniba a atividade dessa enzima.

CONCLUSÃO

O condicionamento fisiológico em solução de PEG com -0,8 MPa por 96 horas em temperatura de 20°C, na presença de luz, melhora o desempenho de sementes de alface.

A adição de giberelina durante o condicionamento osmótico não melhora o desempenho de sementes de alface germinadas na luz ou no escuro.

Análises de atividades enzimáticas auxiliam na avaliação dos efeitos de tratamento para condicionamento de sementes de alface.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALBUQUERQUE, K. S.; GUIMARÃES, R.M.; GOMES, L. A. A; VIEIRA, A. R.; JÁCOME, M. F. Condicionamento osmótico e giberelina na qualidade fisiológica de sementes de pimentão colhidas em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.4, p.100-109, 2009.

ALFENAS, A. C.; DUSI, A.; ZERBINI JÚNIOR, F. M.; ROBINSON, I. P.; MICALES, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; DIAS, L. A. S.; SCORTICHINI, M.; BONDE, M. R.; ALONSO, S. K.; JUNGHANS, T. G.; BRUNE, W. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.

ANDREOLI, C.; KHAN, A. Matricconditioning integrated with gibberellic acid to hasten seed germination and improve stand establishment of pepper and tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1953-1958, 1999.

BAILLY C, AUDIGIER C, LADONNE F, WAGNER MH, COSTE F, CORBINEAU F, CÔME D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, p.701–708. 2001.

BRANDÃO JUNIOR, D.E.; VIEIRA, M.das G.G.C; HILHORST, H.W.M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.4, p.673-681, jul./ago., 2002.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry emolecular biology of plants. **Rockville: American Society of PlantPhysiologists**, 2005. 1367 p.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

CARVALHO, L. F.; MEDEIROS FILHO, S.; ROSSETTI, A. G.; TEÓFILO, E. M. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p.185-192, 2000.

HENNING, F. A.; MERTZ, L. M.; ZIMMER, P. D.; TEPLIZKY, M. D. F. Qualidade fisiológica, sanitária e análise de isoenzimas de sementes de aveia-preta tratadas com diferentes fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.3, 2009.

HILLEL, D. **Soil and water: physical principles and processes**. New York: Academic Press, p.288, 1971.

LOPES, H. M.; SOUZA, C. M. Efeitos da giberelina e da secagem no condicionamento osmótico sobre a viabilidade e o vigor de sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.1, p.181-189, 2008.

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

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

McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, Zürich, v.27, n.1, p.177-237, 1999.

MENEZES, N. L. de; ESPINDOLA, M. C. G.; PASQUALLI, L. L.; SANTOS, C. M. R.; FRAZIN, S. M. Associação de tratamentos pré-germinativos em sementes de alface. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.13, n.1, p.1-11, 2006.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, v.51, p.914-916, 1973.

NASCIMENTO, W. M.; COSTA, C. J. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças. In: NASCIMENTO, W. M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.345-396, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução: SANTARÉM, E. R. Ed.4, Porto Alegre: Artmed, 2009.

VIDIGAL, D.S. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de pimenta em função do estágio de maturação dos frutos. 2008, 77p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

YOSHIKI, S.; KATSUMATA, T.; KITAMURA, J.; KAWAIDE, H.; NAKAJIMA, M.; ASAMI T.; NAKAMINAMI, K.; KURAHASHI, T.; MITSUHASHI, W.; INOUE, Y.; TOYOMASU, T. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellins content, rather than of gibberellin responsiveness. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.12, p.3383-3393, 2008.