

QUALIDADE FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE ALFACE REVESTIDAS COM MICRONUTRIENTES, AMINOÁCIDOS E REGULADORES DE CRESCIMENTO

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL QUALITY OF LETTUCE SEEDS COATED WITH MICRONUTRIENTS, AMINOACIDS AND GROWTH REGULATORS

**Kênia Almeida Diniz ALBUQUERQUE¹; Patrícia de Oliveira ALVIM²;
Paulo de Albuquerque SILVA³; André Delly VEIGA⁴**

1. Engenheira agrônoma, Professora, Doutora, Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Campus de Arapiraca, AL, Brasil. keniadiniz@hotmail.com. 2. Engenheira agrônoma, Mestre, Doutoranda do Departamento de Agricultura – DAG, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, Brasil. 3. Engenheiro agrônomo, Doutor, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros – CPATC / UEP, Rio Largo, AL, Brasil. 4. Engenheiro agrônomo, Doutor, Professor da Secretaria de Educação Média e Tecnológica – SEMTEC, Escola Agrotécnica Federal de Machado, MG, Brasil.

RESUMO: A aplicação de aditivos via semente é uma técnica preconizada e muito utilizada pela indústria, porém, pouco se conhece do efeito desta sobre a qualidade fisiológica e bioquímica nas sementes. Objetivou-se avaliar o efeito do recobrimento com micronutrientes, aminoácidos, reguladores de crescimento e suas combinações na germinação, vigor e atividade de algumas enzimas em sementes de alface. Para a peliculização das sementes, foi feita uma mistura de 50 mL do polímero L88[®], 40 mL do aditivo e 10mL de água. Os aditivos utilizados foram micronutrientes, aminoácidos, reguladores de crescimento e a mistura destes. Após a peliculização as sementes foram secadas em temperatura ambiente, e em seguida avaliadas quanto a porcentagem de germinação e de emergência e índice de velocidade de emergência das plântulas e a atividade das enzimas esterase e endo- β -mananase. Concluiu-se que a adição de micronutrientes, aminoácidos e reguladores de crescimento às sementes de alface não interferem na sua germinação e nem a atividade da enzima esterase, mas reduzem a atividade da enzima endo- β -mananase. O revestimento das sementes de alface com micronutrientes, com a mistura de micronutrientes + reguladores de crescimento e com a mistura de micronutrientes + reguladores de crescimento + aminoácidos aumentam o índice de velocidade de emergência das plântulas.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactuca sativa*. Peliculização. Germinação. Endo- β -mananase. Esterase.

INTRODUÇÃO

A cultura da alface (*Lactuca sativa*) possui grande importância econômica para Brasil, ocupando o segundo lugar em área de produção dentre as hortaliças folhosas. É cultivada em quase todas as regiões do globo terrestre, justificando pesquisas que possam oferecer aumentos em produtividade e diminuição de riscos (GOMES et al., 2000).

O embrião da semente (aquênio) de alface é totalmente envolvido pelo endosperma, o qual é constituído de uma camada de duas a quatro células (BORTWICK; ROBBINS, 1928). O endosperma pode retardar ou prevenir a germinação das sementes, atuando como uma barreira física à emissão da radícula, especialmente sob condições desfavoráveis como altas temperaturas (SUNG et al., 1998). Assim, o “enfraquecimento” (amolecimento) do endosperma torna-se um pré-requisito, nessas condições, à emissão da radícula. Como a parede celular do endosperma das sementes de alface é constituída, principalmente, de galactomananos (HALMER et al., 1975), supõe-se

que a enzima endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) poderia desempenhar importante papel neste mecanismo (DUTTA et al., 1997 e NASCIMENTO; CANTLIFFE, 1999).

A adição de hormônios, vitaminas, açúcares e outras substâncias no revestimento de sementes têm sido pesquisados com vistas a poder intervir de alguma maneira, e de forma positiva, sobre o seu metabolismo e o desenvolvimento inicial de plântulas (SAMPAIO; SAMPAIO, 1994). Duran (1989) relata a potencialidade do recobrimento de sementes como forma simples de superar a termo e a fotodormência em sementes de alface com o uso de reguladores de germinação e crescimento.

O ciclo das plantas hortícolas é geralmente curto, o que é fator relevante, quando se estudam os aspectos referentes à sua nutrição. Alguns trabalhos demonstram que em muitos casos um aporte nutricional externo, mediante a adição localizada de fertilizantes em formulações simples ou combinadas, faz com que as plântulas respondam favoravelmente e cresçam de forma mais rápida e vigorosa. Nos casos específicos de sementes de hortaliças, geralmente de pequeno tamanho, as

limitadas quantidades de substâncias de reserva podem ser equilibradas por meio de seu recobrimento com aqueles nutrientes que são essenciais para o seu desenvolvimento inicial (SAMPAIO; SAMPAIO, 1994).

Pesquisas têm sido desenvolvidas para detectar as diversas reações metabólicas que envolvem síntese e a degradação de moléculas durante o desenvolvimento, a germinação e na deterioração das sementes. A integridade e o metabolismo celular dependem da grande variedade de enzimas e proteínas estruturais de cada espécie. Assim, as isoenzimas podem ser utilizadas como marcadores de dormência, germinação e deterioração de sementes. Algumas isoformas da enzima endo- β -mananase têm se mostrado eficientes marcadores no processo de germinação de sementes de alface. As esterases, que possuem funções específicas no metabolismo de lipídios, podem ser usadas como marcadores do processo de deterioração das sementes (VIEIRA et al., 2006). Contudo, fica evidenciada a importância do uso de marcadores moleculares para avaliação da qualidade das sementes.

Objetivou-se avaliar o efeito do recobrimento com micronutrientes, aminoácidos, reguladores de crescimento e sua combinação na germinação, no vigor e na atividade de algumas enzimas em sementes de alface.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Foi utilizada a técnica de peliculização (film-coating), que consiste no revestimento das sementes com um filme composto de uma mistura de polímeros, sem alterar o tamanho e formato das mesmas. Para isso, fez-se uma mistura de 50 mL do polímero L88[®], 40 mL do aditivo (micronutrientes, aminoácidos e reguladores de crescimento) e 10 mL de água. As sementes foram então revestidas com essa mistura na dose de 50 mL kg⁻¹ de sementes.

Foram utilizados os produtos comerciais Starter[®] (5% de zinco, 3% de manganês, 0,3% de cobre, 0,7% de boro e 4% de enxofre), Stimulate[®] (combinação de giberelinas, citocininas e auxinas) e Novragro[®] (produto a base de aminoácidos com composição não fornecida pelo fabricante), compondo os seguintes tratamentos: sementes de alface sem revestimento, revestidas com reguladores de crescimento, revestidas com aminoácidos, revestidas com micronutrientes, revestidas com

micronutrientes + reguladores de crescimento, revestidas com micronutrientes + aminoácidos, revestidas com aminoácidos + reguladores de crescimento e sementes revestidas com micronutrientes + aminoácidos + reguladores de crescimento.

Por se tratarem de volumes pequenos de sementes, todos os produtos foram aplicados manualmente, em sacos plásticos de composição química neutra (MACHADO, 2000), com agitação até a completa distribuição do produto nas sementes (RUANO et al., 1989). Após o tratamento das sementes com cada produto, foram realizados os testes descritos a seguir.

Teste de germinação

A semeadura foi realizada em caixas acrílicas tipo gerbox sobre papel mata-borrão umedecido com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. A seguir, as caixas foram transferidas para a câmara de germinação (BOD), em regime alternado de luz e escuro (12 horas), regulado à temperatura 20°C. Utilizou-se 4 repetições de 100 sementes por tratamento e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, segundo as Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 1992).

Teste de emergência em condições controladas

A semeadura foi realizada em substrato solo + areia na proporção 1:2 em bandejas plásticas. A umidade do substrato foi ajustada para 60% da capacidade de retenção. Foram utilizadas 4 repetições de 100 sementes por tratamento. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal, previamente regulada à temperatura de 20°C, em regime alternado de luz e escuro (12 horas). A partir do início da emergência foram realizadas avaliações diárias, computando-se o número de plântulas emergidas até a estabilização. Foram avaliadas a porcentagem de emergência e o índice de velocidade de emergência de plântulas, determinado segundo fórmula proposta por Maguire (1962).

Extração e quantificação da enzima esterase

Sementes de alface embebidas em água por 24 horas foram moídas em recipiente de porcelana contendo nitrogênio líquido e PVP (polivinilpirrolidona). Em uma amostra de 100 mg desse material adicionou-se o tampão de extração (Tris HCl 0,2M, pH8) na quantidade de 2,5 vezes o

peso de cada amostra e 0,1% de β -mercaptoetanol. O material foi colocado em geladeira over night e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. Do sobrenadante, 40-60 μ L foram aplicados no gel de poli(acrilamida). Para a revelação da enzima foram preparadas duas soluções. A solução 1 foi composta de 50 mg de α -naftil acetato e 50 mg de β -naftil acetato, dissolvidos em 10 mL de acetona 50%. A solução 2 foi composta de 100 mL de Tris HCl 0,05 M, pH 7,1 e 100 mg de Fast Blue RR. A solução foi filtrada e o seu volume completado para 100 mL com 3 L da solução 1. O gel foi então mergulhado na solução reveladora e mantido a 37°C até o aparecimento das bandas.

Atividade da enzima de endo- β -mananase

Para a extração da enzima endo- β -mananase foram moídas 10 sementes intactas de cada tratamento em moinho refrigerado. De cada tratamento foram pesados 200mg de cada material para adição de 600 μ l de tampão de extração (0,1 M HEPES/ 0,5M NaCl e ácido ascórbico (5mg de ácido ascórbico por ml de tampão), pH 8,0). Na etapa seguinte as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 10000g e 20 μ l do sobrenadante aplicados em gel contendo 6ml de locust bean gum, 24ml de tampão pH 5,0 (1M Ácido Cítrico/ 0,4M de Na₂HPO₄ 2 H₂O). As alíquotas foram aplicados em furos de 2mm feitos no gel com auxílio de um

furador O gel ficou incubado por 21h e revelado segundo metodologia proposta de Silva et al. (2002). A atividade da enzima endo- β -mananase foi calculada de acordo com Downie et al. (1994).

O experimento foi conduzido seguindo o delineamento inteiramente casualizado, sendo oito tratamentos e quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2000) e os dados foram submetidos à análise de variância. Os produtos foram avaliados pelo critério de Scott Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa pelo critério de Scott-Knott ($p \leq 0.05$) apenas para o índice de velocidade de emergência (Tabela 1). Para esta característica, os melhores resultados foram observados para as sementes revestidas apenas com micronutrientes, para a mistura de micronutrientes + reguladores de crescimento e para a mistura de micronutrientes + reguladores de crescimento + aminoácidos.

As sementes do tratamento testemunha apresentaram alta porcentagem de germinação (Tabela 1). Isso pode explicar o não incremento dessa variável com a utilização dos produtos no revestimento das sementes.

Tabela 1. Porcentagem de germinação, emergência e índice de velocidade de emergência de sementes de alface revestidas com diferentes materiais. UFLA, Lavras, MG, 2009.

Produtos	Germinação	Emergência	IVE
Testemunha	99.00 a	98.50 a	25.50 b
Micronutrientes	98.00 a	99.50 a	28.00 a
Reguladores de crescimento	97.50 a	95.50 a	24.50 b
Aminoácidos	99.00 a	99.00 a	24.75 b
Micronutrientes + Reguladores de crescimento	98.00 a	99.00 a	26.50 a
Micronutrientes + Aminoácidos	97.00 a	96.50 a	24.00 b
Reguladores de crescimento + Aminoácidos	98.00 a	98.50 a	23.50 b
Micronutrientes + Reguladores de crescimento + Aminoácidos	98.50 a	99.00 a	29.50 a
CV (%)	1.47	2.23	8.95

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

A atividade da enzima esterase no gel de acrilamida apresentou um padrão de bandas semelhante para todos os tratamentos (Figura 1). A esterase é uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo de lipídios de membrana durante a germinação da semente. A atividade da esterase associada aos resultados de germinação e emergência confirmam que não houve efeito negativo dos produtos aplicados sobre a qualidade das sementes. Caso houvesse alterações nos padrões desta enzima seria evidenciada a ocorrência de

eventos deteriorativos, pois a esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo de lipídios e aos processos degenerativos de membrana (SANTOS et al., 2004).

A maior atividade da enzima endo- β -mananase foi observada quando as sementes não foram tratadas. Os demais resultados evidenciaram redução na atividade da enzima, porém essa diferença não significou prejuízos na germinação e emergência (Figura 2). Esses resultados diferem dos

encontrados para o índice de velocidade de emergência (Tabela 1), em que as plântulas provenientes de sementes sem tratamento emergiram mais lentamente quando comparadas às

revestidas com micronutrientes, com micronutrientes + reguladores de crescimento e com a mistura de micronutrientes + reguladores de crescimento + aminoácidos.

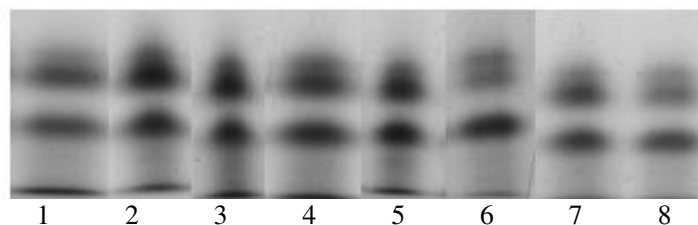


Figura 1. Atividade da enzima esterase em sementes de alface sem revestimento (1), revestidas com reguladores de crescimento (2), aminoácidos + reguladores de crescimento (3), micronutrientes (4), aminoácidos (5), micronutrientes + aminoácidos + reguladores de crescimento (6), micronutrientes + aminoácidos (7), micronutrientes + reguladores de crescimento (8). UFLA, Lavras, MG, 2009.

Em outros estudos foi observado que apenas a presença dessa enzima não é suficiente para promover a emergência da radícula (TOOROP et al., 1996; DAHAL et al., 1997). Toorop et al. (2000) obtiveram evidências de que a atividade da endo- β -mananase é necessária no momento inicial da germinação, mas requer a presença de outros fatores controlados pelo ácido abscísico, que finalmente

conduzem à protrusão da radícula. Silva (2002) trabalhou com sementes de *Coffea arabica* observou que o aumento na atividade desta enzima não está diretamente ligado ao aumento na velocidade de emergência das plântulas, podendo em alguns casos ter efeito alostérico, ou seja, algumas rotas podem ser inibidas pelo excesso de metabólitos produzidos pela ação da enzima.

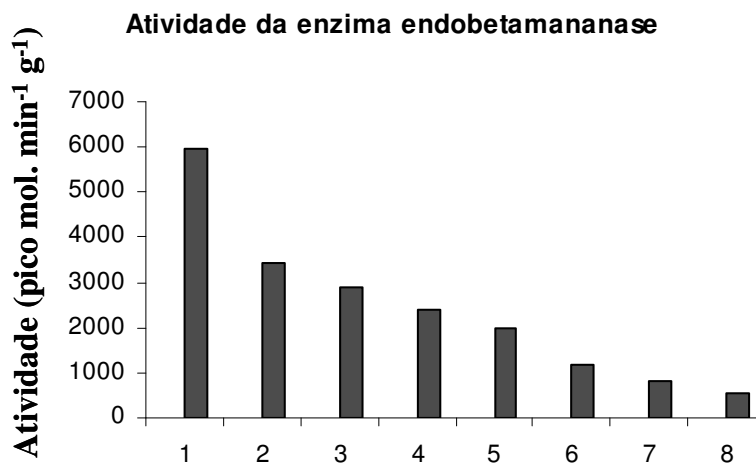


Figura 2. Atividade da enzima endo- β -mananase em sementes de alface sem revestimento (1), revestidas com reguladores de crescimento (2), aminoácidos + reguladores de crescimento (3), micronutrientes (4), aminoácidos (5), micronutrientes + aminoácidos + reguladores de crescimento (6), micronutrientes + aminoácidos (7), micronutrientes + reguladores de crescimento (8). UFLA, Lavras, MG, 2009.

CONCLUSÕES

A adição de micronutrientes, aminoácidos e reguladores de crescimento às sementes de alface não afetam negativamente sua germinação e nem a

atividade da enzima esterase, mas reduzem a atividade da enzima endo- β -mananase.

O revestimento das sementes de alface com micronutrientes, com a mistura de micronutrientes + reguladores de crescimento e com a mistura de micronutrientes + reguladores de crescimento +

aminoácidos aumentam o índice de velocidade de emergência das plântulas.

Às instituições de fomento à pesquisa CAPES e Fapemig, pela concessão de bolsas de estudos. Às empresas Incotec e Stoller® pelo fornecimento dos materiais utilizados neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

ABSTRACT: The application of additives via seeds is a technique preconized and greatly utilized by the industry, but, little is known about of the effect upon the physiological and biochemical quality in seeds. This work was accomplished with the purpose of evaluating the effect of the covering with micronutrients, aminoacids, growth regulators and their combinations in the germination, vigor and activity for some enzymes in lettuce seeds. For the film-coating of the seed, a mixture of 50 mL of L88® polymer, 40 mL of the additive and 10 mL of water was done. The additives used were micronutrients, aminoacids, growth regulators and the mixture of these. After film-coating, the seeds were dried in room temperature and next they were evaluated as to the percentage of germination, percentage of emergence and index of emergence velocity of the seedlings and activity of the enzymes esterase and endo- β -mannase. It follows that the addition of micronutrients, aminoacids and growth regulators to the lettuce seeds do not negatively affect their germination and the esterase enzyme activity, but reduce the activity of the endo- β -mannase enzyme. The coating of lettuce seeds with micronutrients, with a mixture of micronutrients + growth regulators, and a mixture of micronutrients + growth regulators + aminoacids increase the index of emergence velocity of the seedlings.

KEYWORDS: *Lactuca sativa*. Film-coating. Germination. Endo- β -mannase. Esterase.

REFERÊNCIAS

BORTHWICK, H. A.; ROBBINS, W. W. Lettuce seed and its germination. *Hilgardia, Berkley*, v. 3, n. 11, p. 275-304, 1928.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.

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.

DURAN, J. M. Pré-acondicionamiento y recubrimiento de semillas hortícolas. **Agricultura**, v. 679, p. 128-131, 1989.

DUTTA, S.; BRADFORD, K. J.; NEVINS, D. J. Endo- β -mannanase present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 113, n. 1, p. 155-161, 1997.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para o Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GOMES, T. M.; OLIVEIRA, R. F., BOTREL, T. A.. Determinação da fotossíntese em função do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e da concentração de CO₂ para a cultura da alface, utilizando o medidor portátil (LI-6400)1. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 315-316, Julho 2000.

HALMER, P.; BEWLEY, J. D.; THORPE, T. A. Enzyme to break down lettuce endosperm cell wall during gibberellin-and-light-induced germination. **Nature**, London, v. 258, n. 5537, p. 716-718, 1975.

MACHADO, José da Cruz. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Lettuce seed germination at high temperature: endo-beta-mannanase activity and ethylene production in response to seed vigor. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SEED BIOLOGY, 6, Merida Yucatan, 1999. **Program and abstracts presentations**. Merida Yucatan, 1999. p. 103.

RUANO, O.; PIRES, J. R.; ALMEIDA, W. P. de; YAMAOKA, R. S.; COSTA, A.; MARUR, C. J.; TURKIEWICZ; SANTOS, W.J. **Prevenção do tombamento do algodoeiro através do tratamento de sementes com fungicidas**. Londrina: IAPAR, 1989. 6p. (IAPAR. Informe de Pesquisa, v. 13, n. 88).

SAMPAIO, T. G.; SAMPAIO, N. V. Recobrimento de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 3, p. 20-52, dez. 1994.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. V. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 26, nº1, p.110-119, 2004.

SILVA, E. A. A. **Coffee (Coffee arabica L., cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. 2002. 105 p. Thesis (Ph. D.) - Wageningen University, Wageningen, 2000.

SUNG, Y.; CANTLIFFE, D. J.; NAGATA, R. T. Using a puncture test to identify the role of seed coverings on thermotolerant lettuce seed germination. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 6, p. 1102-1106, 1998.

TOOROP, P. E.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. Endo- β -mananase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. **Planta**, v. 200, p. 153-158, 1996.

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

VIEIRA, M. G. G. C.; VON PINHO, E. V. R.; SALGADO, K. C. P. C. Técnicas moleculares em sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 88-96, maio/jun. 2006.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. Sistema de análise estatística para microcomputadores – Sanest. Pelotas: UFPel, 1984. 109p.