

Ação de diferentes enzimas na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) - Asteraceae

Action of different enzymes on germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) - Asteraceae

Marcos Antonio Pimentel¹, Maria Cristina Vasconcellos¹, Rafaela de Oliveira Penha¹, Edson Perez Guerra¹ e André Luís Lopes da Silva^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia, Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 80215-901, Curitiba – PR - Brasil.

ABSTRACT

Seed germination involves the use of different enzymes for metabolism. The aim of this study was to evaluate the effect of different commercial enzymes on germination of lettuce seeds. Lettuce seeds were immersed in a solution of 300 mL distilled water and 5.0 mL enzyme solution during one hour. The treatments consisted of the commercial enzyme solutions: (1) Alcalase[®] and Celluclean[®] (purpose catalyze hydrolysis of peptide bonds and bonds of beta 1,3 and 1,4 glucan present in the cellulose, respectively), (2) Pectinex[®] (purpose dilutes pectin, releasing sugars), (3) Alcalase[®] (purpose to catalyze peptide bonds), (4) Pectinex[®] and Alcalase[®] (purpose to catalyze peptide bonds and to release sugars), (5) Alcalase[®] and Ban[®] (purpose to catalyze peptide bonds and hydrolysis of bonds alpha 1,4 - glucosidic forming dextrin preferably as product), (6) Spirizyme[®] (glucoamylase enzyme: glucan 1,4 alpha-glucosidase) and (7) control (distilled water free of enzymes). After treatment with the enzyme solutions seeds were sown in Petri dishes containing filter paper or soil as a substrate, both saturated with distilled water. The seeds of all treatments germinated in four days after seeding. The percentage of seed germination on filter paper showed no significant differences between the treatments, but the germination percentage showed statistical differences when germinated in the soil. The highest percentages of germination in the soil were in the control treatment (96.6%) and in the treatment with Pectinex[®] and Alcalase[®] (81.6%). Industrial enzymes application in lettuce seeds does not increase the speed and percentage of seed germination.

Key-words: Hydrolysis, enzymatic solution, alcalase, protease, pectinase

INTRODUÇÃO

Os reguladores de crescimento influenciam no metabolismo protéico, podendo aumentar a taxa de síntese de enzimas envolvidas no processo de germinação das sementes (McDonald & Khan, 1983). As Giberelinas atuam na superação da dormência de sementes, na hidrólise das reservas nutritivas, pela indução da síntese de alfa amilase, enzima responsável pela hidrólise do amido (Levitt, 1974). As enzimas tem papel fundamental nas diversas reações metabólicas tanto de síntese, como na biodegradação de moléculas durante o desenvolvimento e deterioração da semente. Contudo vários fatores podem influenciar a germinação de sementes (Silva et al., 2005;

Bisognin et al., 2008; Costa et al., 2010; Rego et al., 2011; Alcântara et al., 2011).

O embrião da semente (aquênio) de alface (*Lactuca sativa* L.) 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). Dessa forma, foi preconizado que enzimas industriais poderiam promover a degradação do endosperma, aumentando a velocidade e a percentagem de germinação das sementes de alface.

Author for correspondence: clonageinvitro@yahoo.com.br

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes enzimas comerciais na germinação de sementes de alface.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Black seeded Simpson foram adquiridas da Top Seed[®]. As sementes foram imersas em uma solução de 300 mL de água destilada e 5,0 mL de solução enzimática por uma hora. Os tratamentos consistiram das soluções enzimáticas comerciais: (1) Alcalase[®] e Celluclean[®], (2) Pectinex[®], (3) Alcalase[®], (4) Pectinex[®] e Alcalase[®], (5) Alcalase[®] e Ban[®], (6) Spirizyme[®] e (7) controle (apenas água destilada). Após o tratamento com as soluções enzimáticas as sementes foram semeadas em placas de petri contendo papel filtro ou terra preparada da marca Riga (mistura de húmus, esterco de aves e adubos minerais) como substrato; ambos saturados com água destilada. As placas de Petri permaneceram fechadas durante a condução do experimento. Os substratos foram autoclavados por 15 minutos a 121° C e 103 KPa. As placas foram mantidas em sala de crescimento com a temperatura de 25°C ± 2 e fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 20 µM m⁻² s⁻¹, obtida de lâmpadas fluorescentes brancas. O experimento foi observado diariamente e a percentagem de germinação das sementes foi avaliada aos quatro dias após a semeadura.

O delineamento do experimento usado foi inteiramente casualizado com quatro repetições de vinte sementes em esquema bifatorial, considerando como fatores o tipo de substrato e o tipo de solução enzimática (2x7). Os dados foram transformados para arco-seno $\sqrt{x/100}$. Após a transformação dos dados, estes foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa estatístico GENES (Cruz, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes começou e terminou aos quatro dias após a semeadura. Não houve diferenças para nenhum tratamento testado com relação à velocidade de germinação das sementes. A germinação de alface normalmente ocorre do quinto ao décimo dia da semeadura (Ripado, 1993). A velocidade de germinação ocorreu devido às condições controladas de laboratório, que diferem das condições de estresse que podem

ocorrer no campo devido a instabilidade climática. A maioria das reações enzimáticas são de alta especificidade em relação ao substrato e ao tipo da reação catalisada. O tipo de substrato apresentou diferenças significativas (P<0,05), sendo o papel filtro, o substrato mais indicado para a germinação de sementes de alface do que o substrato solo. O papel filtro apresentou uma média geral de 73,5% de germinação das sementes com relação a 61,6% de germinação de sementes obtida no solo. As diferentes soluções enzimáticas apresentaram diferenças estatísticas (P<0,05). Os melhores resultados de germinação das sementes no solo; foram obtidas no tratamento controle e na solução misturada com Pectinex[®] e Alcalase[®], alcançando 96,6 e 81,6% de germinação, respectivamente. Não houve diferenças significativas da percentagem de germinação de sementes no substrato papel filtro, apesar de ter variado de 60 a 88,3% (Tabela 1).

As enzimas são controladas em sua atividade catalítica por vários mecanismos celulares, como ativação e inibição por pequenas moléculas genericamente chamadas de cofatores. A natureza química dos cofatores é muito variável, podendo ser, por exemplo, um ou mais íons metálicos (como o ferro), ou uma molécula orgânica (como a vitamina B₁₂). As enzimas agem nas células em concentrações extremamente baixas. Alguns estudos atestam que é possível atenuar o estresse hídrico através da indução das proteínas de choque térmico ou através de utilização de substâncias osmoprotetoras, como indução de dissacarídeos osmoprotetores, poliaminas ou indução de enzimas extratoras de radicais livres (Maity et al., 2000; McCue et al., 2000; Matovina & Blake, 2001; Sung Shim et al., 2003; Wahid & Shabbir, 2005; Kumari et al., 2006). Contudo, esse estudo foi conduzido em condições de ausência de estresse, o que provavelmente não permitiu observar um provável efeito benéfico dessas diferentes enzimas na germinação das sementes. Esse provável efeito benéfico poderia gerar uma aplicação dessas enzimas em sementes de alface plantadas em regiões de alto risco promovido por condições ambientais instáveis. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem novos testes envolvendo a germinação de sementes em condições de estresse para comprovação dessa preconização. Além disso, essas enzimas poderiam ter algum efeito benéfico em sementes de espécies que apresentam dormência, provavelmente no enfraquecimento do endosperma ou tegumento.

Tabela 1. Efeitos de diferentes soluções enzimáticas na percentagem de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Black seeded Simpson aos quatro dias de semeadura.

Solução enzimática comercial (5 mL)	Substratos	
	Solo	Papel filtro
Controle	96,6 aA ¹	88,3 aA
Alcalase [®] e Celluclean [®]	38,3 bA	60,0 aA
Pectinex [®]	45,0 bA	66,6 aA
Alcalase [®]	58,3 bA	78,3 aA
Alcalase [®] e Pectinex [®]	81,6 aA	76,6 aA
Alcalase [®] e Ban [®]	63,3 bA	83,3 aA
Spirizyme [®]	48,3 bA	61,6 aA
CV(%)	39,1	

¹ Tratamentos seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

CONCLUSÃO

A aplicação das enzimas industriais (Alcalase[®] e Celluclean[®], Pectinex[®], Alcalase[®], Alcalase[®] e Ban[®], Spirizyme[®], Alcalase[®] e pectinex[®]) em sementes de alface não aumentam a velocidade e a percentagem de germinação das sementes em condições controladas.

RESUMO

A germinação de sementes envolve a utilização de diversas enzimas durante o seu metabolismo. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes enzimas comerciais na germinação de sementes de alface. Sementes de alface foram imersas em uma solução de 300 mL de água destilada e 5,0 mL de solução enzimática por 1 hora. Os tratamentos consistiram das soluções enzimáticas comerciais: (1) Alcalase[®] e Celluclean[®] (finalidade catalisar hidrólise de ligações peptídicas e ligações do tipo beta 1,3-1,4 glucana presente na celulose, respectivamente), (2) Pectinex[®] (finalidade diluir a pectina, deixando açúcares livres), (3) Alcalase[®] (finalidade catalisar ligações peptídicas) (4) Alcalase[®] e pectinex[®] (finalidade catalisar ligações peptídicas e deixar açúcares livres), (5) Alcalase[®] e Ban[®] (finalidade catalisar ligações peptídicas e hidrólise de ligações alfa 1,4-glucosídicas formando dextrina preferencialmente como produto final), (6) Spirizyme[®] (enzima glucoamilase-glucana 1,4 alfa glicosidase) e (7) controle (apenas água destilada). Após o tratamento com as soluções enzimáticas as sementes foram postas em placas de Petri contendo papel filtro ou solo como substrato; ambos saturados com água destilada. As sementes de todos os tratamentos germinaram aos quatro dias após a semeadura. A percentagem de germinação das sementes em papel filtro não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos, porém a percentagem de germinação apresentou diferenças estatísticas quando germinadas no solo. As maiores

percentagens de germinação no solo foram no tratamento controle (96,6%) e com a mistura de Alcalase[®] e pectinex[®] (81,6%). A utilização dessas enzimas industriais, em sementes de alface, não aumentam a velocidade e a percentagem de germinação das sementes.

Palavras-chave: hidrólise, solução enzimática, alcalase, protease, pectinase

REFERÊNCIAS

- Alcântara, B. K.; Brondani, G. E.; Gonçalves, A. N.; Almeida, M.; Azevedo, R. A. (2011), Methods of asepsis for *in vitro* establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, **2**, 7-13.
- Bisognin, D. A.; Silva, A. L. L.; Horback, M. A.; Giroto, J.; Barriquello, C. J. (2008), Germinação e propagação *in vitro* de porongo. *Ciência Rural*, **38**, 332-339.
- Borthwick, H. A.; Robins, W. W. (1928), Lettuce seed and its germination. *Hilgardia*, **3**, 275-304.
- COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N.; LEMUS, E. A. E.; SOCCOL, C. R. (2010), Estabelecimento *in vitro* de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) - Euphorbiaceae. *Caderno de Pesquisa Série Biologia*, **22**, 5-12.
- Cruz, C. D. (2001), **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 648p.

- Levitt, J. (1974), **Introduction to plant physiology**. 2.Ed. Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 447p.
- Kumari, G. J.; Reddy, A. M.; Naik, S. T.; Kumar, S. G.; Prasanthi, J.; Sriranganayakulu, G.; Reddy, P. C.; Sudhakar, C. (2006), Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. *Biologia Plantarum*, **50**, 219-226.
- Maity, S.; Banerjee, G.; Roy, M.; Pal, C.; Pal, B.; Chakrabarti, D.; Bhattacharjee, A. (2000), Chemical induced prolongation of seed viability and stress tolerance capacity of mung bean seedlings. *Seed Science and Technology*, **28**, 155-162.
- Matovina, V. B. and Blake, T. J. (2001), Seed treatment with the antioxidant Ambiol enhances membrane protection in seedlings exposed to drought and low temperatures. *Trees*, **15**, 163-167.
- McCue, P.; Zheng, Z.; Pinkham, J. L.; Shetty, K. (2000), A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. *Process Biochemistry*, **35**, 603-613.
- McDonald, M. D. and Khan, A. A. (1983), Acid scarification and protein synthesis during seed germination. *Agronomy Journal, Madison*, **2**, 111-114.
- Rego, S. S.; Ferreira, M. M.; Nogueira, A. C.; Grossi, F.; Sousa, R. K.; Brondani, G. E.; Araujo, M. A.; Silva, A. L. L. (2011), Estresse Hídrico e Salino na Germinação de Sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, **2**, 37-42.
- Ripado, M. F. B. (1993), **A cultura da alfaca**. Lisboa: Livraria Popular Francisco Franco, p.14, 21-23.
- Silva, A. L. L.; Bisognin, D. A.; Barriquello, C. J.; Ritter, C. E. L. (2005), Germinação *in vitro* de sementes de mogango (*Cucurbita pepo* L.) - Cucurbitaceae. *Ciência e Natura*, **27**, 19-28.
- Sung, Y.; Cantliffe, D. J.; Nagata, R. T. (1998), Seed developmental temperature regulation of thermotolerance in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **123**, 700-705.
- Sung Shim, I; Momose, Y.; Yamamoto, A.; Kim, D.; Usui, K. (2003), Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, **39**, 285-292.
- Wahid, A. and Shabbir, A. (2005), Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regulation*, **46**, 133-141.