



HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE
GENES DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE
SEMENTES DE PIMENTA HABANERO
(*Capsicum chinense* JACQUIM.).**

LAVRAS – MG

2013

HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE GENES DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE PIMENTA HABANERO
(*Capsicum chinense* JACQUIM).**

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

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos, Heloisa Oliveira dos.

Qualidade fisiológica e expressão de genes durante o desenvolvimento de sementes de pimenta habanero (*Capsicum chinense* JACQUIM.) / Heloisa Oliveira dos Santos. – Lavras: UFLA, 2013.

70 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Qualidade de sementes. 2. qRT-PCR. 3. Germinação. 4. Vigor.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521

HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE GENES DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE PIMENTA HABANERO
(*Capsicum chinense* JACQUIM).**

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

APROVADA em 22 de março de 2013

Dr. João Almir Oliveira	UFLA
Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA
Dr. Antonio Rodrigues Vieira	EPAMIG
Dr. Anderson Cleiton José	UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

LAVRAS - MG

2013

"É uma daquelas coisas que as pessoas dizem. Você não pode seguir em frente, até esquecer o passado. Esquecer é a parte fácil. Seguir em frente é que dói. Então, às vezes, nós lutamos, tentando manter as peças no lugar. As coisas não podem permanecer as mesmas. Em algum momento, você tem que esquecer. E seguir em frente. Porque não importa o quão doloroso seja... É a única forma de crescermos." Shonda Rhimes

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades que surgem em nossas vidas, pela sabedoria e luz que nos guiam para que sejam aproveitadas da melhor maneira possível.

A minha orientadora, Profa. Édila Vilela de Resende Von Pinho, exemplo de ética e profissionalismo, pelos ensinamentos transmitidos, dedicação, incentivo, infinita paciência, por acreditar em mim, mesmo com todos os meus defeitos, e por fazer por mim o que tão pouco mereço.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro, respectivamente.

Aos professores do Setor de Sementes, Prof. Renato Mendes Guimarães, Profa. Maria Laene Moreira de Carvalho e Prof. João Almir Oliveira, exemplos de ética e dedicação.

Aos membros do comitê de orientação, Prof. Luís Antônio Augusto Gomes, Prof. Renato Mendes Guimarães e Profa. Maria Laene Moreira de Carvalho, pela disposição sempre que precisei.

Aos membros da banca examinadora, Prof. João Almir Oliveira, Profa. Luciane Vilela Resende, Prof. Anderson Cleiton José e ao pesquisador Antônio Rodrigues Vieira, pelas valiosas contribuições.

À Renata Silva-Mann, Robério Ferreira e Genésio Ribeiro, amigos, professores e eternos orientadores. Quero que saibam que, a despeito do tempo e da distância, agradeço pelas orientações para vida e pelo apoio em todos os momentos.

Aos estagiários, bolsistas de iniciação científica e BIC-junior's, por todo auxílio e dedicação na condução dos experimentos.

Em especial a equipe “deixa arder”, Rucyan Pereira, Luis Otávio, Tiago Oliveira, Manuela Rocha, Luiza Nascimento, Aline Lima, Verônica Resende, Sophia Mangussi e Elise de Matos, pela grandiosa colaboração durante a execução dos trabalhos e os momentos de descontração.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, Elenir, Elza, Walbert, Viviane, Viviana, Dalva e Laís, pelo auxílio na execução dos experimentos e disponibilidade.

Aos amigos do Setor de Sementes e demais colegas da pós-graduação pelo companheirismo durante esses anos em Lavras.

Aos amigos de todas as horas: Iolanda Vilela, Laís Andrade, Tathiana Timóteo, Vivian Nascimento, Davi Bittar, Ísis Dantas, Ana Paula Corguinha, André Resende, André Carvalho, Alexana Baldoni, Arthur Gomes, Leandra Helena, Nara Edreira, Wilder Sousa e Thiago Matos, pela paciência, amizade, carinho, companheirismo em todos os momentos e por tornarem meus dias mais alegres e ternos. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado vocês em minha vida!

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para que essa fase da minha vida fosse tão maravilhosa, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

A demanda por sementes de pimenta habanero tem aumentado consideravelmente em função da expansão do agronegócio das pimentas. No entanto, sementes dessa espécie apresentam baixa qualidade fisiológica constituindo um dos principais problemas enfrentados pelos agricultores. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar a qualidade fisiológica de sementes de pimenta habanero durante o desenvolvimento assim como a expressão de genes envolvidos na germinação de sementes. O experimento foi conduzido em área experimental e no laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Foram colhidos frutos com 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias após a antese (DAA). Foram utilizadas também sementes provenientes de frutos colhidos aos 70 dias após a antese e submetidos ao repouso por sete dias. Parte das sementes colhidas nos diferentes estádios foi submetida à secagem a 35°C até as sementes atingirem 8% de teor de água. Para a avaliação da qualidade fisiológica utilizou-se os testes de germinação, primeira contagem de germinação, T50 e emergência de plântulas. A expressão das enzimas alfa amilase, isocitrato liase e endo β mananase foram avaliadas pela técnica de eletroforese e a expressão dos genes α amylase (B73), Isocitrato liase (ICL6) e Endo β mananase MAN2, Ácido abscísico (NCED) e Giberelina (GA3ox1) foi avaliada pela técnica de qRT-PCR em sementes não secadas e submetidas à secagem. Maiores valores de germinação e vigor de sementes de pimenta habanero foram observados em sementes extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA e submetidos ao repouso por sete dias independentemente do processo de secagem. Maior expressão da enzima alfa amilase e do gene AmyB73 foi observada em sementes colhidas após 63 DAA e não submetidas à secagem. Maior expressão da enzima endo β mananase foi observada em sementes extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA e submetidas a sete dias de repouso, independentemente de serem ou não submetidas à secagem. A expressão do gene MAN2 foi aumentada com o desenvolvimento até 70 DAA, naquelas sementes não submetidas à secagem. Maior expressão do gene NCED foi observada em sementes em estágio mais tardio de desenvolvimento (70DAA), independentemente da secagem. Para o gene GA3ox1, a partir de 42 DAA, houve redução da expressão e a maior expressão desse gene foi observada em sementes não submetidas à secagem.

Palavras-chave: Qualidade de sementes. qRT-PCR. Germinação. Vigor.

ABSTRACT

The demand for habanero pepper seeds has increased considerably due to the expansion of peppers agribusiness. However, seeds of this species have low physiological quality constituting one of the main problems faced by farmers. The objective of this research was to evaluate the physiological quality of habanero pepper seeds during development as well as the expression of genes involved in seed germination. The trial was conducted in the experimental area and at Central Seed Laboratory of the Agriculture Department - Federal University of Lavras. Fruits were harvested at 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 days after anthesis (DAA). It also was used seeds from fruits harvested at 70 days after anthesis and subjected to rest for seven days. Part of seeds harvested at different stages was subjected to drying at 35 °C until the seeds reach 8% of water content. For the physiological quality evaluation was used the germination test, first germination count, T50 and seedling emergence. The expression of alpha-amylase enzymes, Isocitrate lyase and endo β mannanase were analyzed by electrophoresis technique. The genes expression α amylase (B73), Isocitrate lyase (ICL6) and Endo β mannanase MAN2, Abscisic acid (NCED) and Gibberellin (GA3ox1) was determined using qRT-PCR technique in seeds not dried and subjected to drying. Higher values of germination and seed vigor were observed in habanero pepper seeds extracted from fruits harvested at 70 DAA and submitted to rest for seven days regardless of the drying process. Increased expression of alpha amylase enzyme and gene AmyB73 was observed in seeds harvested at 63 DAA and not subjected to drying. Increased expression of the enzyme endo β mannanase was observed in seeds extracted from fruits harvested at 70 DAA and subjected to seven days of rest, whether or not subject to drying. MAN2 gene expression was increased with the development until 70 DAA, in those seeds not subjected to drying. NCED greater gene expression was observed in seeds at a later stage of development (70DAA), independently of the drying. For gene GA3ox1, from 42 DAA, there was observed a decrease expression and the increased expression of this gene was observed in seeds not subjected to drying.

Keywords: Seed quality. qRT-PCR. Germination. Vigor.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Mercado, importância e características de pimentas	12
2.2	Desenvolvimento de sementes	16
2.3	Dormência em sementes de pimenta	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Local e materiais	28
3.2	Testes para a avaliação da qualidade fisiológica	29
3.3	Determinação do teor de água	30
3.4	Teste de germinação	30
3.5	Tetrazolio	30
3.6	Teste de primeira contagem	31
3.7	Teste de emergência de plântulas	31
3.8	Velocidade de germinação e emergência	31
3.9	Análise estatística	32
3.10	Análise de enzimas	32
3.11	Análise da expressão de enzimas e fito-hormônios por meio da técnica de qRT-PCR	33
3.12	Extração e purificação do RNA	34
3.13	Transcrição reversa para a síntese do cDNA	34
3.14	Desenho dos <i>primers</i>	36
3.15	PCR em tempo real	37
3.16	Análise dos resultados	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Qualidade de sementes de pimenta durante o desenvolvimento	39
4.2	Avaliação da atividade das enzimas isocitrato liase, alfa amilase e endo β mananase durante o desenvolvimento de sementes de pimenta por meio da técnica de eletroforese	42
4.3	Expressão gênica das enzimas isocitrato liase, alfa amilase e endo β mananase durante o desenvolvimento de sementes de pimenta por meio da técnica de qRT-PCR	47
5	CONCLUSÕES	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

As pimentas são estimulantes do apetite e auxiliares da digestão, além de serem fontes de proteínas, glicídios, lipídeos, minerais e vitaminas, sobretudo vitaminas C e E têm sido utilizadas na culinária, sobretudo nos países tropicais, há centenas de anos e a sua exploração industrial cresce a cada ano, com o desenvolvimento de molhos e alguns preparados desidratados. Parte da produção brasileira de pimentas é utilizada em diferentes formas, como páprica, pasta desidratada, conservas e ornamentais.

No Brasil, pimentas são produzidas em todos os Estados, sobretudo em Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias em diferentes regiões do Brasil.

Devido à expansão do agronegócio das pimentas a demanda por sementes de pimenta com alta qualidade, principalmente de espécies picantes como a Habanero, aumentou consideravelmente. No entanto, a produção em grande escala tem sido limitada pela baixa oferta de sementes de qualidade.

Sementes de pimenta apresentam germinação lenta e irregular e geralmente baixo vigor, mesmo sob condições favoráveis, constituindo um dos principais problemas enfrentados pelos produtores. Vários autores têm associado a germinação lenta e desuniforme em sementes de pimenta à presença de dormência.

A dormência parece ser controlada por vários genes, e ecologicamente tem o papel de distribuir a germinação no tempo. No entanto, sob o ponto de vista da tecnologia de sementes, a dormência pode levar a perdas na semeadura e na formação de mudas comprometendo a implantação da cultura.

Os fito-hormônios atuam nos mecanismos de dormência e germinação de sementes. A expressão de genes para a biossíntese de ácido abscísico (ABA)

em sementes de pimenta pode estar associada ao estado de dormência. Há evidências de que o ácido abscísico é um importante regulador, tanto da indução quanto da manutenção, do estado de dormência, ou também de germinação. Por outro lado as giberelinas são hormônios que induzem a germinação de sementes. Em algumas espécies esse fito-hormônio é importante na síntese de enzimas-chave na germinação de sementes a exemplo de endo β mananase e alfa amilase.

Assim, a avaliação da qualidade fisiológica de sementes durante o desenvolvimento de sementes de pimenta torna-se importante para o estabelecimento de plantas no campo e alta produtividade.

Diante do exposto, objetivou-se nesta pesquisa avaliar a qualidade fisiológica de sementes de pimenta habanero durante o desenvolvimento, assim como a expressão de genes envolvidos na germinação de sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mercado, importância e características de pimentas

As pimentas pertencem ao gênero *Capsicum*, possivelmente originárias da América tropical, e vêm sendo cultivadas desde as primeiras civilizações, estando disseminadas atualmente por quase todo o mundo, e a expansão do seu cultivo deu-se, principalmente devido à sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais.

As espécies domesticadas do gênero *Capsicum* são autógamas, com baixa taxa de polinização cruzada dependendo da população entomófila da região de cultivo. Apresentam ciclo de vida perene ou anual, em função da região de cultivo. São plantas arbustivas, com caule semilenhoso, chegando a ultrapassar um metro de altura, com ampla ramificação lateral. Com sistema radicular pivotante, apresenta elevado número de ramificações laterais, podendo atingir de 70 cm a 120 cm de profundidade. As folhas apresentam tamanho, coloração, formato e pilosidade variáveis, entretanto a cor predominante é verde. Quanto ao formato, as folhas podem variar de ovaladas ou lanceoladas a deltoides. As hastes podem apresentar ou não antocianina ao longo de seu comprimento e/ou nos nós, podendo variar de glabras até pilosas (HENZ; RIBEIRO, 2008).

Os frutos, seu principal produto, são bagas, glabros, decíduos ou persistentes; são alongados, arredondados, triangulares ou cônicos, campanulados, quadrados ou retangulares; e apresentam-se vermelhos ou amarelos quando maduros, podendo ser alaranjados, roxos e até pretos. Sua principal característica é o sabor pungente, devido à presença do alcaloide capsaicina, presente no tecido da superfície da placenta, que é liberado ao se cortar o fruto (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008).

As fases de desenvolvimento dos frutos são caracterizadas por alterações que culminam com a maturação, o amadurecimento e finalmente a senescência. O amadurecimento constitui a fase final da maturação que é caracterizada pelo amolecimento da polpa, desenvolvimento do aroma e do sabor dos frutos. Em frutos de pimenta habanero (*C. chinense* Jacquin), foram identificados 102 diferentes compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos frutos verde-maduros e maduros, com predominância de diferentes tipos de alcoóis, aldeídos e cetonas que conferem aroma distinto em cada estágio de amadurecimento (PINO; SAURI-DUCH; MARBOT, 2006).

As sementes são reniformes, aplanadas, claras, pequenas e em grande número; o embrião é curvo. O número cromossômico pode ser igual a 24 ou 26 (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008).

Dentre os 5 táxons do gênero *Capsicum* que são domesticados, dois deles têm sido mais explorados comercialmente no Brasil, *C. annum* e *C. chinense*.

O centro primário de diversidade da espécie *Capsicum chinense* é o México e o Brasil é o centro secundário de diversidade que tem a Bacia Amazônica como área de maior diversidade (REIFSCHNEIDER, 2000). Esta é representada pelas pimentas conhecidas como habanero, pimenta-de-bode, cumari, murupi, pimenta-de-cheiro, biquinho, entre outras (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008).

A pimenta habanero, é bastante difundida desde o Caribe até o Brasil, sendo consumida preferencialmente *in natura*, e é considerada uma das pimentas mais picantes.

Botanicamente, se caracteriza pela corola da flor branca com duas a cinco flores por nó, raramente solitárias. O pedicelo dessa espécie é normalmente pendente, podendo estar ereto ou inclinado, possuindo uma constrição junto ao cálice com a presença de antocianina nas anteras. Apresenta

frutos pendentes com formas retangulares, sendo outros afilados na ponta, tendo de 2 a 4 cm de comprimento e 2 a 6 cm de largura. Quando imaturos apresentam coloração verde, tornando-se vermelhos, laranjas, amarelos, brancos ou até mesmo de cor púrpura e marrom quando maduros (CARVALHO et al., 2003).

Vale ressaltar que as pimentas da espécie *C. chinense* são facilmente confundidas com as da espécie *C. frutescens* e isso se deve à proximidade genética entre as duas espécies. A principal distinção morfológica entre elas é a presença de uma constrição anelar, localizada entre o cálice e o pedúnculo, encontrada nos frutos de *C. chinense* (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008).

O cultivo de pimentas ocorre praticamente em todas as regiões do país e é um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração do pequeno agricultor e a agroindústria (REIFSCHNEIDER, 2000). As principais regiões brasileiras produtoras de pimenta são Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, com destaque para os estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul.

O mercado de pimentas no Brasil é muito segmentado e diverso, em razão da grande variedade de produtos e subprodutos, usos e formas de consumo. Nesse mercado tem destaque o de pimentas comercializadas *in natura*, em pequenas quantidades, no atacado e no varejo, em todos os Estados brasileiros (HENZ; RIBEIRO, 2008). Esse mercado vem sofrendo grandes modificações pela exploração de novas variedades e pelo desenvolvimento de produtos com grande valor agregado, impulsionando o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas um dos mais importantes do país (RUFINO; PENTEADO, 2006).

Em 2012, a exportação brasileira de pimenta girou em torno de 52.923 ton. o equivalente a 268.582 mil US\$. Já as importações foram de apenas 986 ton. ao custo de 7.835 mil US\$ (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013).

Com o aumento do mercado e da área plantada há maior demanda por sementes de alta qualidade. No Brasil é cultivado anualmente cerca de 13 mil ha de pimentas e pimentões, gerando uma produção estimada em 280 mil toneladas, sendo 2.000 ha, ocupados com pimentas doces e picantes (HENZ, 2004; REIFSCHNEIDER; RIBEIRO; LOPES, 1998). O tamanho real e a relevância dessas informações são difíceis de estimar, principalmente por falta de estatísticas confiáveis e de informações sistematizadas (HENZ; RIBEIRO, 2008).

Embora haja uma tradição de cultivo e consumo de pimentas no Brasil, independentemente de sua importância como centro de dispersão de espécies como *C. baccatum* e *C. chinense*, a produção do país apresenta ainda pouca relevância no cenário mundial das pimentas.

Esse quadro possivelmente está sendo revertido pela importância recente que as pimentas alcançam como umas das poucas hortaliças nacionais exportadas e pela sua associação com pequenas agroindústrias de conserva. Além disso, a exploração de novos tipos de pimentas e o desenvolvimento de produtos com alto valor agregado tem gerado novas oportunidades de negócios, aumentando assim a prospecção de mercado e a exploração de nichos especializados (HENZ, 2004).

Em função do aumento do cultivo de pimentas no Brasil há demanda por sementes de alta qualidade. Nesse sentido é importante a implantação de um programa de controle de qualidade desde a produção até a comercialização das mesmas. Uma das demandas neste programa de controle de qualidade é o conhecimento dos processos de formação de sementes visando à determinação do estágio de colheita.

2.2 Desenvolvimento de sementes

O desenvolvimento das sementes pode ser dividido em três fases: a primeira fase, caracterizada por inúmeras divisões celulares após a fertilização do óvulo; a segunda fase, em que há o aumento no acúmulo de matéria seca no endosperma e/ou embrião; e a terceira fase, quando ocorre a dessecação ou secagem, caracterizada pela redução no teor de água da semente (MARCOS FILHO, 2005).

Em geral, o desenvolvimento do fruto e da semente ocorre simultaneamente e de forma sincronizada (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). O acompanhamento do desenvolvimento das sementes é feito com base nas modificações que ocorrem em algumas características físicas e fisiológicas, como tamanho, teor de água, conteúdo de matéria seca acumulada, germinação e vigor (DIAS, 2001).

Em hortaliças de frutos carnosos, como o pimentão e o tomate, a maturidade das sementes geralmente coincide com o início da mudança de coloração dos frutos. Vale salientar ainda que as sementes podem atingir a maturidade após a colheita dos frutos quando eles passam por um período de descanso ou repouso, que varia de 7 a 10 dias, em local fresco e ventilado, antes da extração das sementes. Nesse caso, sementes imaturas ainda presentes no fruto completam o seu desenvolvimento, resultando em melhor qualidade fisiológica e maior rendimento (DIAS, 2001).

Segundo Nascimento e Freitas (2006), em espécies cujas sementes estão contidas em frutos carnosos, como em pimentas, os valores máximos de germinação, vigor e acúmulo de matéria seca ocorrem quando as sementes atingem a maturidade fisiológica. A partir desse ponto, a germinação e o vigor geralmente declinam. No entanto, nem sempre o máximo acúmulo de matéria seca coincide com a máxima qualidade fisiológica da semente, o que foi

constatado em experimentos com pimentão (OLIVEIRA et al., 1999) e tomate (BERRY; BEWLEY, 1991; DIAS et al., 2006; KNOW; BRADFORD, 1987). A falta de conhecimento do melhor estágio de colheita de sementes de pimentas pode ser uma das causas da baixa germinação e vigor de sementes.

Para as espécies de *Capsicum*, sabe-se que o ponto de maturidade fisiológica ocorre por volta de 55 a 65 dias após a antese. Gonçalves (1997) verificou que o ponto de maturidade fisiológica de sementes de pimentão (*C. annuum* L.) ocorreu a partir dos 55 dias após a antese, ou seja, quando as plantas estavam com 100 dias de idade. Nesse estágio de maturação, foram observados valores máximos de vigor, peso seco e germinação das sementes

Sanchez et al. (1993), estudando a influência da maturidade do fruto, armazenamento e tratamento de maturação pós-colheita na qualidade de sementes de pimentão, concluíram que as sementes extraídas de frutos maduros e excessivamente maduros apresentaram maior peso seco e maior porcentagem de germinação, sendo que esses frutos foram colhidos aos 50 e 60 dias após a antese, respectivamente.

Apesar das variações, é consenso que a maturidade fisiológica de sementes de *Capsicum annuum* L. ocorre a partir dos 55 dias após a antese, apesar das condições de temperatura e umidade relativa do local de produção influenciar nesse período de maturidade fisiológica das sementes.

Portis et al. (1999), estudando a relação entre marcadores fisiológicos e o início das atividades de replicação do DNA e a síntese de β -tubulina em sementes de pimentão em diferentes estágios de desenvolvimento, observaram a aquisição de tolerância à dessecação dessas dos 42-49 dias após a antese e aos 56 dias, a aquisição completa dessa tolerância.

Durante o desenvolvimento das sementes há a expressão de proteínas específicas que podem estar associadas à tolerância à dessecação, germinação e dormência de sementes. Em algumas espécies essas proteínas já foram descritas.

No entanto, em sementes de pimenta há necessidade de estudar as principais enzimas e hormônios relacionados à germinação e dormência destas.

Queiroz et al. (2011) trabalhando com sementes de pimenta habanero, não submetidas e submetidas à secagem, relataram porcentagens reduzidas de germinação e emergência de plântulas, atrelando tal resultado à dormência das sementes, pois, durante a avaliação do teste de germinação, foi observada a presença de sementes embebidas sem protrusão radicular. No entanto, essas sementes não estavam mortas, o que foi constatado por meio do teste de tetrazólio, onde as sementes embebidas estavam viáveis, sem quaisquer sintomas de deterioração.

Resultados semelhantes aos encontrados por Queiroz et al. (2011) já haviam sido relatados por Caixeta (2009) que trabalhando com sementes da mesma espécie, colhidas em três estádios de desenvolvimento, observaram dormência nas sementes a qual foi superada ao longo do armazenamento. Diante disso, ressalta-se a importância de estudos relacionados aos eventos alistados à dormência em sementes de pimenta habanero.

2.3 Dormência em sementes de pimenta

A dormência parece ser controlada por vários genes, e ecologicamente tem o papel de distribuir a germinação no tempo. No entanto, sob o ponto de vista da tecnologia de sementes, a dormência pode levar a perdas na semeadura e na formação de mudas comprometendo a implantação da cultura.

Vale ressaltar que a dormência não deve ser somente associada com a ausência de germinação. Preferivelmente, tem sido associada a uma característica da semente que determina as condições requeridas para a germinação (FENNER; THOMPSON, 2005).

Existem dois tipos de dormência, a primária e a secundária. As sementes apresentam dormência primária quando são dispersas da planta-mãe em estado de dormência (SIMPSON, 1990). Logo, a dormência primária é induzida durante o desenvolvimento e deve-se a presença do ácido abscísico (ABA) durante a maturação das sementes na planta-mãe (HILHORST, 1995). A dormência adquirida após a dispersão é caracterizada como dormência secundária (SIMPSON, 1990) e pode estar relacionada a fatores que são, geralmente, usados em laboratório para a quebra da dormência como a secagem ou a embebição. Vários são os tratamentos aplicáveis para a quebra desse tipo de dormência a exemplo do resfriamento estratificado, aquecimento estratificado, luz, giberelinas e outros hormônios (KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005), vapores de substâncias como as butenolidas (KROCK et al., 2002) e componentes como o óxido nítrico (BAILLY, 2004). Krock et al. (2002) demonstraram que a indução de dormência secundária em sementes de *Nicotiana attenuata* ocorre naturalmente por um sinal químico dado pelo ABA e outros terpenos presentes no material que recobrem as sementes em seu habitat. A dormência secundária é, muitas vezes, fisiológica e está associada com os ciclos de dormência anuais em bancos de sementes (FENNER; THOMPSON, 2005; HILHORST, 1998).

A dormência primária é perdida em resposta às condições ambientais, já a dormência secundária ocorre se as condições requeridas para a germinação estiverem ausentes. A dormência secundária pode ser perdida e adquirida de acordo com as condições prevalecentes. Essas mudanças nos níveis de dormência são graduais (BASKIN; BASKIN, 1998, 2004; FENNER; THOMPSON, 2005; HILHORST, 1998).

Além da dormência primária e secundária têm-se ainda diferentes tipos de dormência. Nikolaeva (1967, 2004) propôs um sistema de classificação da dormência considerando o fato de que a mesma é determinada tanto por

propriedades morfológicas quanto fisiológicas das sementes. Baseados nesse sistema, Baskin e Baskin (1998, 2004) propuseram um sistema de classificação que compreende cinco tipos de dormência de sementes: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e a combinação da física e fisiológica.

A dormência fisiológica é o tipo de dormência que prevalece, principalmente em sementes que compõem os bancos de sementes em regiões temperadas. É também característica das espécies-modelo utilizadas em estudos de dormência, tais como *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana* spp., *Avena fatua*, e outros cereais. Os níveis de dormência fisiológica podem variar de acordo com a intensidade da dormência (BASKIN; BASKIN, 2004). Sementes que apresentam uma profunda dormência fisiológica não germinam ou produzem plântulas normais.

Nesse tipo de dormência, tratamentos com giberelinas não são eficientes para a quebra da dormência e são necessários vários meses de frio ou calor para que as sementes germinem (BASKIN; BASKIN, 2004; FINCH-SAVAGE; CLAY, 1994). Vale ressaltar que quando sementes apresentam dormência fisiológica em níveis menos profundos, os tratamentos com giberelinas, armazenamento e frio ou calor são capazes de quebrar essa dormência e quando as sementes germinam produzem plântulas normais (BRASKIN; BASKIN, 2004).

A dormência morfológica é evidente em sementes com embriões subdesenvolvidos, em termos de tamanho. Os embriões não são dormentes fisiologicamente, mas precisam de tempo para crescer e germinar (BASKIN; BASKIN, 1998; 2004).

Já a dormência morfofisiológica é típica de sementes com embriões subdesenvolvidos e que ainda têm um fator fisiológico de dormência (BASKIN; BASKIN, 2004). As sementes de espécies que apresentam esse tipo de dormência, tais como *Fraxinus excelsior* (FINCH-SAVAGE; CLAY, 1994),

devem ser tratadas com giberelinas ou com frio e calor para a superação do estado de dormência (BASKIN; BASKIN, 1998, 2004).

A dormência física deve-se à impermeabilidade do tegumento. Escarificação mecânica ou química pode quebrar essa dormência (BASKIN; BASKIN, 1998).

Quando se tem a combinação da dormência física e fisiológica, esta é caracterizada pela impermeabilidade do tegumento combinada com a dormência fisiológica do embrião (BASKIN; BASKIN, 2004).

Esse sistema de classificação mostra a diversidade de fatores morfológicos e fisiológicos envolvidos no controle da dormência em resposta às diferentes condições ambientais. Para a compreensão dos diferentes tipos de dormência de sementes, é necessário o conhecimento dos mecanismos que regulam esse fenômeno.

Segundo Bosland e Votava (1999), Lakshmanan e Berke (1998) e Nascimento (1998), sementes não submetidas à secagem de espécies do gênero *Capsicum* podem apresentar dormência. Nascimento et al. (2006) afirmam que, uma vez constatada a ocorrência de dormência em sementes de pimenta, estas, deverão ser armazenadas por determinado período, geralmente de três a quatro meses, para que o fenômeno seja superado. Assim a semeadura de sementes de pimenta recém-extraídas do fruto pode representar um risco para a obtenção de estandes uniformes, contribuindo para a elevação do gasto de sementes. Tais informações corroboram com os resultados encontrados por Caixeta (2009), que trabalhando com sementes de pimenta habanero colhidas em três estádios de desenvolvimento, observou a presença de dormência superada ao longo do armazenamento.

Em sementes onde a germinação é limitada pela presença do endosperma há necessidade do enfraquecimento desse tecido para que haja a protrusão da radícula. Esse papel é desempenhado por várias enzimas a exemplo

da endo- β -mananase, que está presente no endosperma em diferentes isoformas, sendo duas dessas inibidas pelo ácido abscísico na fase de enfraquecimento do endosperma na região próxima à radícula, inibindo o potencial de pressão da radícula (SILVA et al., 2004).

Groot e Karssen (1987), Nonogakii (1992) e Toorop, Van e Hilhorst (2000) avaliando a atividade da endo- β -mananase em sementes de tomate verificam que o enfraquecimento do endosperma está diretamente ligado ao aumento da atividade dessa enzima. Resultados semelhantes foram relatados por Pinto et al. (2007) e Silva et al. (2004) onde observaram uma correlação entre aumento da atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma micropilar com o decréscimo da força requerida para o embrião romper o endosperma durante a germinação de sementes de café e lobeira, respectivamente.

Caixeta (2009), trabalhando com sementes de pimenta habanero e malagueta, colhidas em três estádios de desenvolvimento, observou aumento da atividade da enzima endo- β -mananase em sementes processadas nos estádios de desenvolvimento mais avançados. Foi observada ainda menor atividade da enzima nas sementes recém armazenadas independente do estádio de desenvolvimento das sementes.

Dentro de um grupo de enzimas, a α e β - amilases estão envolvidas no principal sistema de degradação do amido. O desenvolvimento da atividade da amilase constitui um importante evento, podendo ser detectado durante o início da germinação das sementes, sendo seu principal papel, disponibilizar substratos para utilização da plântula até que ela se torne fotossinteticamente autossuficiente (NEDEL; ASSIS; CARMONA, 1996).

Caixeta (2009), trabalhando com sementes das pimentas malagueta e habanero, observou a presença de sementes dormentes, principalmente quando foram processadas a partir de frutos imaturos e recém armazenadas. Nessas sementes foi observada também, baixa atividade da alfa-amilase, o que ressalta a

importância dessa enzima no processo de germinação de sementes de pimenta, confirmando os relatos de Livesley e Bray (1991) e Petruzzelli e Taranto (1990), os quais enfatizam que, em sementes com alto índice de dormência, a atividade da amilase é pequena.

Vários tipos de dormência em sementes decorrem do bloqueio da ação da alfa-amilase. A ocorrência dessa enzima é largamente distribuída nas plantas, principalmente associada com a β amilase. A alfa-amilase presente nas sementes dormentes é encontrada em pequenas quantidades, entretanto durante a germinação a expressão dessa enzima é aumentada (MEYER, 1976).

Estudos relacionados aos mecanismos de dormência de sementes, em nível molecular, são escassos, entretanto, em algumas pesquisas têm sido fornecidos subsídios para o entendimento da dormência fisiológica (BETHKE; LIBOUREL; JONES, 2007; BOVE et al., 2005; CADMAN et al., 2006; LEFEBVRE et al., 2006). Nesses trabalhos são mostrados que os mecanismos que determinam a dormência podem atuar nos componentes do embrião e/ou do tegumento (BEWLEY, 1997b; HILHORST, 1995). Segundo Cadman et al. (2006), há evidências de que os sucessivos bloqueios à germinação estão associados às mudanças quantitativas e qualitativas do transcriptoma nos tecidos da semente.

Enzimas envolvidas na degradação de lipídios parecem influenciar no nível de dormência e conseqüentemente na germinação e no estabelecimento de plântulas. Durante cada estágio da germinação o ciclo do glioxalato inicia uma função de mobilização dos triglicerídeos, onde enzimas como a isocitrato liase, têm sua expressão aumentada devido ao metabolismo de lipídeos (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005). Essa enzima tem papel importante na transformação de lipídios em sacarose que vai ser usada durante o processo germinativo.

A maior atividade da enzima isocitrato liase pode estar relacionada a sementes mais vigorosas Martins et al. (2000). Essa qualidade, por vezes é influenciada pela dormência (BEWLEY, 1997a).

Os fito-hormônios atuam nos mecanismos de dormência e germinação de sementes. A expressão de genes para a biossíntese de ácido abscísico (ABA) pode aumentar a dormência em sementes. Há evidências de que o ácido abscísico é um importante regulador, tanto da indução quanto da manutenção, do estado de dormência e também de germinação (BEWLEY, 1997a; KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005). Nas sementes, o ABA promove o desenvolvimento e a maturação do embrião, a síntese das reservas das sementes (proteínas e lipídios), a tolerância à seca, a inibição da germinação (dormência) e a apoptose (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002). Os genes mais estudados com relação ao desenvolvimento de sementes é o ABI3 (Acido Abscísico Insensível), o qual é expresso especificamente nas sementes (PERCY; ZEIGER, 1994) e suas proteínas são membros de um grupo de fatores da transcrição que atuam como intermediários na regulação de genes ABA-responsivos durante o desenvolvimento de sementes.

Sementes em desenvolvimento raramente germinam, e quando ocorre germinação precoce, a mesma está associada à deficiência e síntese de ABA (HILHORST, 1995; KARSSSEN, 1976). Sendo assim, a deficiência de ABA durante o desenvolvimento da semente está associada com a ausência de dormência primária.

Lefebvre et al. (2006), estudando a expressão gênica do ABA em *A. thaliana*, sugeriram que a síntese do hormônio, tanto no endosperma quanto no embrião, induz a dormência das sementes. Em sementes profundamente dormentes do ecotipo Cvi de *A. thaliana*, foi verificado que a dormência provavelmente dependa do balanço entre a biossíntese e o catabolismo de giberelinas GA e ABA (ALI-RACHEDI et al., 2004; CADMAN et al., 2006). O

tratamento de sementes dormentes com giberelina causou um aumento transitório na concentração de ABA, sugerindo que em sementes dormentes, existe um mecanismo de reação que mantém uma alta relação ABA/GA (ALIRACHEDI et al., 2004).

A dormência é determinada geneticamente e a regulação desse fenômeno também é definida pela expressão de genes específicos em cada espécie. Cadman et al. (2006) estudando o envolvimento do ABA e GA na expressão dos genes relacionados à dormência observaram que a expressão dos genes ABI1 a ABI5, de mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensíveis ao ABA, é regulada de forma complexa durante a indução e superação da dormência, pelo ácido abscísico. Assim foi possível aos autores sugerir que há um grande número de transcritos para a biossíntese de giberelinas em sementes com diferentes profundidades de dormência. Além disso, Kucera, Cohn e Leubner-Metzger (2005) afirmaram que outros fito-hormônios estão envolvidos na regulação da expressão gênica durante a indução, manutenção e superação da dormência fisiológica.

Essas informações referentes ao controle da germinação podem partir das variações alélicas existentes entre locos ligados à dormência, bem como ao processo de germinação (CADMAN et al., 2006).

É consenso no meio científico, que os fito-hormônios atuam nos mecanismos de dormência e germinação de sementes. Há evidências de que o ácido abscísico (ABA) é um importante regulador, tanto da indução quanto da manutenção, do estado de dormência (BEWLEY, 1997a; KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005).

Diferentes intensidades de dormência em sementes de *A. thaliana* dependem do balanço entre a biossíntese e o catabolismo de GA e ABA, que determina a dominância de um dos dois hormônios. O tratamento de sementes dormentes com giberelina causa um aumento transitório na concentração de

ABA, sugerindo que em sementes dormentes, existe um mecanismo de reação que mantém uma alta relação ABA/GA (ALI-RACHEDI et al., 2004).

Desse modo, o estado de dormência é caracterizado pelo aumento da biossíntese de ABA e degradação de GA. De acordo com uma hipótese sobre o balanço hormonal em sementes dormentes, proposto por Karssen e Laçka (1986), ABA e GA agem em diferentes locais e em momentos diferentes durante a “vida da semente”. O ABA induz a dormência durante a maturação, e a GA apresenta a função de promover a germinação.

Experimentos com sorgo (STEINBACH et al., 1997) e com mutantes de milho deficientes e insensíveis ao ABA (WHITE et al., 2000) demonstraram que GA e ABA podem agir ao mesmo tempo sobre a dormência e germinação. A inibição da biossíntese de GA durante o desenvolvimento da semente tem efeito similar ao da aplicação exógena de ABA, por exemplo, suprimindo a viviparidade. É a relação ABA/GA, e não os teores absolutos dos hormônios, que controla a germinação. Então, é fato que a GA opõe-se diretamente ao sinal do ABA durante a indução da dormência em cereais. É necessária a realização de novas pesquisas que determinem a generalidade desse fenômeno.

Enquanto a manutenção do estado de dormência depende de uma alta relação ABA/GA, a superação da dormência envolve uma maior degradação de ABA e aumento da biossíntese de GA, de forma que essa relação seja menor.

Essas conclusões relativas à síntese e concentração de ABA e GA são válidas para a regulação da dormência embrionária. Em adição à concentração e síntese hormonais, a transição do estado de dormente para não dormente, em muitas sementes, é caracterizada pela redução da sensibilidade ao ABA e aumento da sensibilidade à GA (ALI-RACHEDI et al., 2004).

Um processo muito utilizado para o estudo e superação da dormência é o *afterripening*, que consiste na secagem e armazenamento da semente seca, que apresenta baixas taxas metabólicas, por um período determinado e sob condições

controladas. Durante o *afterripening*, algumas sementes perdem a dormência (BEWLEY, 1997a).

O *afterripening* promove a ampliação da faixa de temperatura para germinação; a redução na concentração de ABA e aumento da resposta à GA; a perda da necessidade de luz para germinar; o aumento da resposta à luz; a perda da necessidade de nitrato para germinar e o aumento da velocidade de germinação.

Os parâmetros que determinam as condições do *afterripening* são a umidade e teor de óleo, estrutura do tegumento da semente e a temperatura (MANZ et al., 2005).

Os mecanismos moleculares do processo não são conhecidos. Têm sido propostas reações não enzimáticas que removem inibidores da germinação, reações antioxidantes (BAILLY, 2004), alterações de membranas e degradação de proteínas específicas, via proteassoma (BORGHETTI; NODA; SÁ, 2002). Usando cDNA-AFLP na análise da expressão gênica em *Nicotiana*, Bove et al. (2005), encontraram evidências de que o *afterripening* alterou a taxa de transcrição. Cadman et al. (2006) ratificaram essas evidências em trabalhos com *A. thaliana*.

Atualmente existem várias técnicas por meio das quais é possível avaliar a expressão de genes associados à qualidade de sementes.

A maximização da sensibilidade dos métodos de quantificação tem levado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas, dentre elas o PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), que já é usado há bastante tempo na área médica. No entanto, mais recentemente tem sido utilizada em estudos de expressão gênica e quantificação de sequências específicas em plantas (GACHON; SAINDRENAN, 2004). De modo geral, a investigação da expressão gênica em plantas, tem facilitado o conhecimento e o entendimento de genes e vias metabólicas.

Na ciência básica, o qPCR tem sido amplamente empregado na quantificação de transcritos específicos (RT-q PCR). Assim, a técnica de PCR em tempo real pode ser utilizada para se estudar a expressão de genes associados à qualidade das sementes, a exemplo dos envolvidos nos processos de germinação e dormência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e materiais

A pesquisa foi conduzida na área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Essa região apresenta clima tipo Cwb da classificação de Koppen. A temperatura média anual é de 19,4°C e a pluviosidade se distribui, principalmente de outubro a abril, com valores anuais de 1529,7 mm.

Em uma primeira etapa da pesquisa foram formadas mudas de pimenta para a instalação do experimento para a produção de sementes. Para isso as sementes de pimenta habanero (*Capsicum chinense*), foram semeadas em bandejas de “isopor” com 72 células, contendo substrato comercial Plantimax-hortaliças e 5 mL de solução de 2000 ppm de sulfato de amônio por célula. Após 45 dias da semeadura, foi realizado o transplante das mudas na área experimental do setor de sementes, do Departamento de Agricultura em área com Latossolo Vermelho-escuro (LE), textura argilosa.

O solo foi preparado convencionalmente e as correções feitas de acordo com a análise química do mesmo. O ensaio foi instalado em delineamento de blocos casualizados (DBC) com quatro repetições, sendo que cada parcela

constituiu de duas linhas de 15 metros de comprimento com 15 plantas, espaçadas 1,5 metros entre linhas.

A adubação de cobertura, assim como, os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura.

Durante a fase de florescimento, as flores foram etiquetadas diariamente, no dia da antese, até obtenção do número de frutos que garantissem a quantidade de sementes suficiente para todas as análises. Foram colhidos frutos com 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias após a antese (DAA). Após a colheita, as sementes foram extraídas manualmente e lavadas em água corrente. Separou-se também frutos colhidos aos 70 dias após a antese os quais foram submetidos ao repouso por sete dias seguido de extração das sementes, totalizando 10 tratamentos.

As sementes foram extraídas manualmente com o auxílio de um estilete. Após a extração, as sementes foram desinfestadas com solução 1% de hipoclorito de sódio, por um minuto. Em seguida procedeu-se instalação dos testes para avaliação da qualidade das sementes.

Parte das sementes extraídas foi submetida à secagem lenta em estufa de circulação de ar, a 35 °C, até aproximadamente 8% de teor de água (QUEIROZ et al., 2011).

3.2 Testes para a avaliação da qualidade fisiológica

Sementes nos diferentes estádios de desenvolvimento, com e sem secagem, foram submetidas aos testes de germinação (TPG), primeira contagem (TPC), emergência de plântulas (EMP), velocidade de germinação e de emergência (VG/VE), tempo médio para a ocorrência 50% de germinação e emergência (T_{50}).

3.3 Determinação do teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras de 1 grama para cada tratamento, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.4 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes semeadas sobre duas folhas de papel mata-borrão, umedecidas com água na proporção de três vezes o peso do substrato seco, em caixas plásticas tipo *gerbox*, que foram mantidos em câmaras germinadoras tipo BOD sob regime alternado de temperatura e luz, sendo 20°C/16 h no escuro e 30°C/8 h na presença de luz. As avaliações foram efetuadas aos sete e 14 dias após a semeadura (BRASIL, 2009) e os resultados, expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.5 Tetrazolio

As sementes remanescentes de cada tratamento do teste de germinação foram cortadas longitudinalmente, com uso de um bisturi. A metade de cada semente foi colocada em recipiente de plástico escuro, imersa em solução de sal de tetrazólio a 0,075%, durante 3,5 horas, em temperatura constante de 37°C. Após a coloração, a avaliação foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico para a determinação da viabilidade (GAGLIARDI; MARCOS FILHO, 2011).

Vale ressaltar que o teste de tetrazólio foi realizado somente, nas sementes colhidas a partir de 49 DAA. As sementes colhidas nos estádios anteriores a 49 DAA não foram submetidas ao teste de tetrazólio devido ao seu pequeno tamanho o que dificultou o corte para visualização das estruturas internas.

3.6 Teste de primeira contagem

Efetuada em conjunto com o teste de germinação, foi realizado o teste de primeira contagem de germinação, no sétimo dia após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

3.7 Teste de emergência de plântulas

Para o teste de emergência foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes distribuídas em bandejas multicelulares de poliestireno com células separadas, contendo substrato comercial tipo *Plantimax*-hortaliça. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação dotada de sistema de nebulização intermitente, à temperatura de 25 a 30 °C. Foram realizadas avaliações diárias a partir do início da emergência de plântulas, computando-se o número de plântulas emersas até a estabilização do estande. Foi computada a porcentagem de plântulas normais aos 30 dias.

3.8 Velocidade de germinação e emergência

A velocidade de germinação e emergência foi realizada simultaneamente aos testes de germinação e emergência, anotando-se, diariamente e no mesmo

horário, o número de plântulas que apresentavam dois folíolos completamente abertos (EDMOND; DRAPALA, 1958).

3.9 Análise estatística

Foi realizada análise de variância para todos os testes utilizando o programa estatístico *Sisvar* (FERREIRA, 2000). Para a comparação entre as médias, empregou-se o teste de *Scott-Knott* (1974), a 5% de probabilidade.

3.10 Análise de enzimas

Duas amostras de 20 gramas de cada tratamento e armazenadas à temperatura de - 86°C em *deep freezer*, para análise de enzimas por meio da técnica de eletroforese.

Para a análise eletroforética de enzimas as sementes foram trituradas na presença de PVP e nitrogênio líquido em cadinho, e posteriormente armazenadas à temperatura de -86°C.

Para a extração da enzima alfa amilase, foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 250µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 8h, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4°C, e reveladas de acordo com Alfenas (2006). Ressalta-se ainda que as sementes de todos os tratamentos foram embebidas por 5 horas antes do processo de extração.

Para a extração da enzima isocitrato liase, foi utilizado o tampão Tris-Hcl 0,2M pH8,0 + 0,1% β-Mercaptoetanol + 0,1% Fenilhidrazina, na proporção de 300µL por 100mg de sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 2hrs, em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 60

minutos, a 4°C, e os géis foram revelados segundo metodologia proposta por Pereira et al. (2012).

A corrida eletroforética ocorreu 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 das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 120 V por 5 horas.

Para a extração da enzima endo-β-mananase, em cada microtubo com 100mg de pó de cada amostra foi adicionado 300µL 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 14000rpm e 2µL do sobrenadante aplicados em gel contendo 6mL de LBG (*Locust Bean Gum*), 0,24 g de agarose e 24mL de tampão pH 5,0 (1M Ácido Cítrico/ 0,4M de Na₂HPO₄ 2 H₂O). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2mm feitos no gel com auxílio de um furador. O gel foi incubado por 21h e revelado segundo metodologia proposta de Silva et al. (2004). A atividade da enzima endo-β-mananase foi calculada de acordo com Downie, Hilhorst e Bewley (1994).

3.11 Análise da expressão de enzimas e fito-hormônios por meio da técnica de qRT-PCR

A expressão de genes por meio da técnica de qRT-PCR foi dividida em quatro etapas: Extração e Purificação do RNA, Transcrição reversa para síntese do cDNA, PCR em tempo real, e Análise dos resultados.

3.12 Extração e purificação do RNA

Para a extração do RNA as sementes colhidas nos diferentes estádios de desenvolvimento 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 e pureza do RNA foram avaliadas em todas as etapas com a utilização da eletroforese em gel de agarose desnaturante (corados com SYBR[®] *Green II*, *Applied Biosystems*) e em espectrofotômetro (*NanoVue*). Foram separadas alíquotas para evitar o descongelamento diário do RNA estoque, evitando a sua degradação e contaminação.

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.

Para comprovar a eficiência do tratamento com DNase foi realizada uma reação de *PCR* convencional. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA genômico de pimenta. O *primer* utilizado foi o correspondente ao gene constitutivo Ubiquitina. Foi preparado um gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídeo para a visualização das possíveis amplificações.

3.13 Transcrição reversa para a síntese do cDNA

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. A eficiência da síntese de cDNA foi comprovada por meio de *PCR* convencional. Nessa análise foi utilizado como controle

positivo a amostra de DNA genômico de pimenta, e o *primer* correspondente ao gene constitutivo Ubiquitina. Foi preparado um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para visualização das ampliações.

3.14 Desenho dos *primers*

Os genes-alvo foram baseados em diferentes enzimas e hito-hormônios, escolhidos por sua importância conhecida no processo de germinação e dormência em sementes, após revisão bibliográfica.

As sequências dos genes-alvo escolhidos foram encontradas por meio de busca no banco de dados do genoma *Capsicum* sp. sequenciado no *GenBank*. 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 da Ubiquitina 3 e GAPDH (HONGJIAN, 2011).

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

Gene		Sequência 5'-----3'
Endo B mananase (MAN 2)	F	AATGCCTGAAAAGAAGCAAAACA
	R	TTGGTCGGGATACAGATGGATT
Ácido abscísico (NCED)	F	TGCAGCCTCCTAGTGCTTGTAC
	R	TGGAAGAGGACCTGGGATTG
Alfa amilase (B73)	F	CCGGCTCCACGCAGAAC
	R	TATAGGCGTAGCCCTGCATGA
Isocitrato liase (ICL6)	F	CATGAAGGACGAAACCAAAGG
	R	TCTGGAAGCCCAACAACCA
Giberelina (GA ₃ ox)	F	GGTGACCTCCTCCACATATATTATCC
	R	TGTTGGGTTTCGGTTCACCAT
Ubiquitina (UBI 3)	F	TGTCCATCTGCTCTCTGTTG
	R	CACCCAAGCACAATAAGAC
GAPDH	F	ATGATGATGTGAAAGCAGCG
	R	TTTCAACTGGTGGCTGCTAC

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

3.15 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)* e as amostras de cDNA sintetizadas a partir do RNA extraído. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e 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 5,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen)* para um volume final de 10,0 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)*. Foi utilizado o método *Ct* comparativo para quantificação relativa, onde os *Ct's (Ciclo threshold)* das amostras foram normalizados usando os *Ct's* dos controles endógenos. Para isso, previamente foi realizado um experimento de validação, a fim de verificar que as eficiências de amplificação dos genes-alvo e endógenos são similares e próximas de 100%. As curvas-padrão, para o teste de eficiência, para os genes em estudo foram geradas a partir das seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da melhor diluição do cDNA para ser utilizada em cada reação, que foi de 1:5.

3.16 Análise dos resultados

As amostras correspondentes às sementes colhidas aos 14 dias após a antese foram consideradas como sendo amostras calibradoras. 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: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade de sementes de pimenta durante o desenvolvimento

Pelos resultados da análise de variância, verificou-se efeito significativo para todos os parâmetros avaliados nos quais a análise estatística foi aplicada.

Observa-se pelos resultados do Gráfico 1 que as sementes sem secagem apresentaram altos teores de água, variando de 90,13 a 53,54%.

Independentemente do estágio de desenvolvimento observou-se valores superiores a 50% de umidade, valores considerados elevados, havendo a necessidade de passar pelo processo de secagem para evitar deterioração, e formação de produtos que acarretem danos imediatos conforme descrito por Marcos Filho et al. (2005).

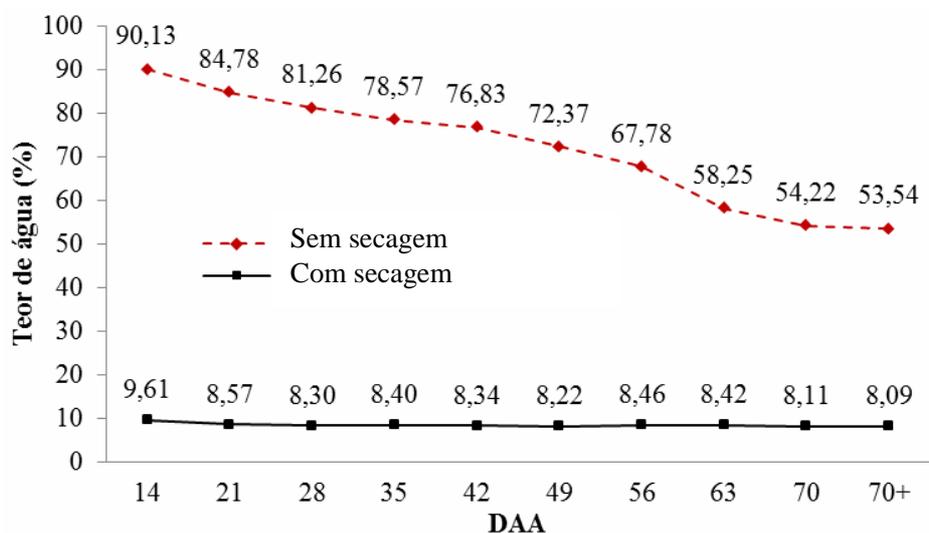


Gráfico 1 Teor de água em sementes de pimenta habanero quando colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento e após a secagem

Com relação aos resultados dos testes de primeira contagem de germinação, germinação, índice velocidade de germinação, emergência e índice de velocidade de emergência em sementes úmidas (Tabela 2), colhidas em cada estágio de maturação foi observado de uma maneira geral menores valores quando as sementes se encontravam em estádios menos avançados de desenvolvimento.

Tabela 2 Dados da primeira contagem da germinação (PCG), germinação (G), índice velocidade de germinação (IVG), estande inicial (EI), emergência (E) e índice de velocidade emergência (IVE) e viabilidade pelo teste de tetrazólio, de sementes de pimentas Habanero não submetidas secagem, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento em função dos dias após antese (DAA)

DAA	PCG (%)	G (%)	IVG	EI (%)	E (%)	IVE	TZ (%)
14	0 d	0 f	0 f	0 d	0 e	0 d	-
21	0 d	07 f	7 c	0 d	0 e	0 d	-
28	3 d	14 e	5 a	02 d	04 e	9 b	-
35	0 d	03 f	6 b	01 d	01 e	9 b	-
42	0 d	03 f	6 b	01 d	02 e	11 c	-
49	0 d	03 f	7 c	12 c	17 d	10 c	54
56	01 d	28 d	6 b	13 c	23 c	9 b	64
63	17 c	39 c	6 b	14 c	23 c	8 a	68
70	24 b	44 b	6 b	29 b	55 b	8 a	72
70+	54 a	73 a	5 a	56 a	75 a	8 a	89
CV(%)	16,05	14,05	4,3	9,28	8,87	4,6	-

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade

Os maiores valores de germinação e emergência foram observados em sementes extraídas de frutos aos 70 dias após a antese e que foram submetidos a um período de descanso de 7 dias. Com exceção dos resultados observados no teste de IVE, no qual não houve diferença significativa do vigor de sementes extraídas de frutos colhidos a partir de 63 DAA, menores valores de germinação e vigor observados em sementes extraídas de frutos nos primeiros estádios de desenvolvimento e isso se deve provavelmente a imaturidade fisiológica das sementes associadas à dormência. Segundo Bosland e Votava (1999),

Lahshmanan e Berke (1998) e Nascimento (1998), sementes não submetidas à secagem de espécies do gênero *Capsicum* podem apresentar dormência.

Para o índice de velocidade de germinação o melhor valor foi observado no estágio 70DAA com repouso e não houve diferença estatística em sementes extraídas de frutos colhidos nos estádios 56DAA, 63DAA e 70DAA.

Os dados representados na Tabela 3 são referentes à primeira contagem de germinação, germinação, índice de velocidade de germinação, emergência e índice de velocidade de emergência de sementes de pimenta Habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas à secagem.

Tabela 3 Dados da primeira contagem da germinação (PCG), germinação (G), índice velocidade de germinação (IVG), estande inicial (EI), emergência (E) e índice de velocidade emergência (IVE) e viabilidade pelo teste de tetrazólio de sementes secadas de pimentas Habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento em função dos dias após antese (DAA)

DAA	PCG (%)	G (%)	IVG (Dias)	EI (%)	E (%)	IVE (Dias)	TZ (%)
14	0 d	0 f	0 c	0 f	0 g	0 b	-
21	0 d	04 e	8 b	0 f	05 f	12 a	-
28	0 d	07 e	8 b	0 f	08 f	11 a	-
35	0 d	02 f	7 b	05 e	14 e	13 a	-
42	0 d	01 f	5 a	01 f	07 f	12 a	-
49	0 d	02 f	7 b	01 f	07 f	13 a	64
56	05 c	33 d	7 b	13 d	39 d	11 a	70
63	28 b	44 c	5 a	16 c	44 c	10 a	74
70	26 b	51 b	5 a	33 d	61 b	9 a	72
70+	73 a	94 a	4 a	58 a	81 a	9 a	90
CV (%)	18,49	9,43	37,7	12,74	6,89	37,5	-

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade

Os maiores valores de germinação e vigor foram observados em sementes colhidas nos estádios de desenvolvimento 70DAA dias com repouso. Com exceção dos resultados observados no teste de IVE.

A partir dos resultados infere-se que durante o período de repouso dos frutos ocorre a quebra de dormência das sementes favorecendo a qualidade fisiológica das sementes. Randle e Honma (1981) afirmaram que o genótipo e a idade do fruto influenciam a intensidade de dormência das sementes e que sementes extraídas de frutos supermaduros germinam mais rapidamente, havendo aumento da intensidade de dormência com o decréscimo da idade do fruto.

Segundo Nascimento e Freitas (2006), em espécies cujas sementes estão contidas em frutos carnosos, como nas pimentas, os valores máximos de germinação, vigor e acúmulo de matéria seca ocorrem quando as sementes atingem a maturidade fisiológica.

Em sementes colhidas nos estádios de desenvolvimento 14DAA, 21DAA, 28DAA, 35DAA, 42DAA e 49 DAA, os valores de germinação e de emergência foram muito baixos. Provavelmente, as porcentagens reduzidas de germinação e emergência se devem à dormência das sementes.

Para o índice tempo médio para ocorrência de 50% de emergência de plântulas os valores não diferem estatisticamente entre si nos estádios de desenvolvimento 63 DAA, 70DAA e 70 DAA com repouso.

4.2 Avaliação da atividade das enzimas isocitrato liase, alfa amilase e endo β mananase durante o desenvolvimento de sementes de pimenta por meio da técnica de eletroforese

Com relação à atividade da enzima isocitrato liase por meio da técnica de eletroforese em sementes colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento e não submetidas à secagem (Figura 1), verificou-se aparecimento de isoformas a partir do estágio de 56 dias após a antese. Também pode ser observada maior atividade dessa enzima em sementes em estádios mais avançados de maturação,

ocorrendo maior atividade em sementes colhidas nos estádios de 63 DAA e 70 DAA com repouso dos frutos.

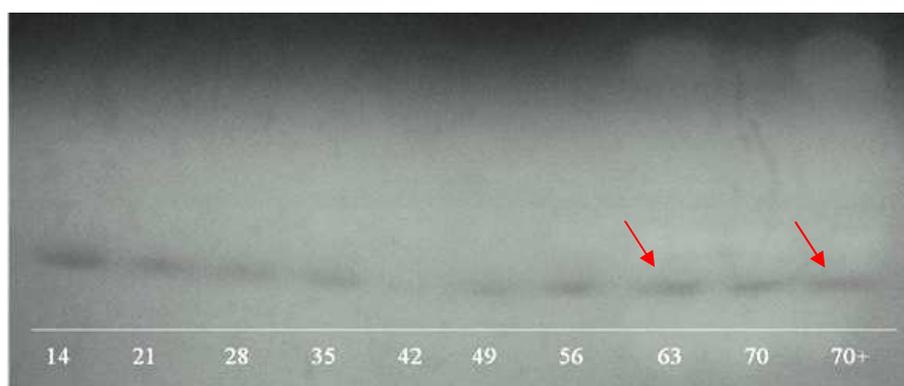


Figura 1 Atividade da enzima isocitrato liase em sementes não submetidas à secagem de pimentas Habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

A maior atividade da isocitrato liase em sementes nos estádios finais de desenvolvimento pode estar relacionada com vigor dessas sementes, fato confirmado por Martins et al. (2000). Esses autores verificaram maior atividade, em sementes de soja, na cultivar Doko, a qual normalmente apresenta maior qualidade fisiológica, quando comparada com sementes de outras cultivares da mesma espécie, como as cultivares Uberaba e Rio Doce (COSTA, 1986). Tais resultados condizem com os observados para pimenta quando se observa que maiores atividades da isocitrato liase foi encontrada em sementes colhidas em estádios mais avançados e com maiores valores de germinação e vigor (Tabelas 3 e 4).

Em relação à atividade da isocitrato liase em sementes de pimenta, em diferentes estádios de desenvolvimento, submetidas à secagem (Figura 2) foi possível observar que iniciou-se aos 35 DAA. Essa atividade foi aumentada gradativamente durante os estádios de desenvolvimento subsequentes. Esses resultados podem estar associados aos maiores valores de germinação e de vigor

em sementes colhidas em estádios mais avançados de desenvolvimento (Tabela 3).

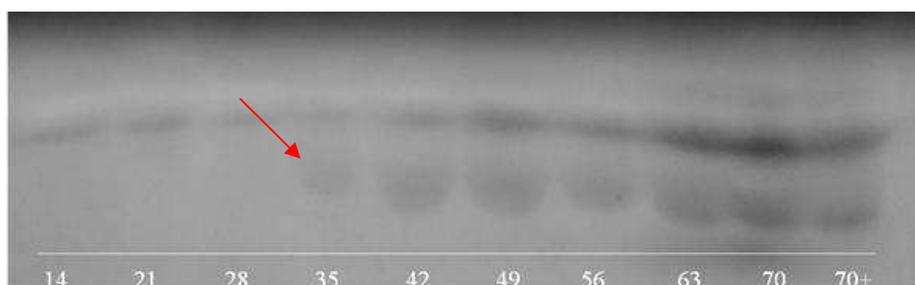


Figura 2 Atividade da enzima isocitrato liase em sementes secadas de pimentas Habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

Ainda em relação à atividade da enzima isocitrato liase observa-se que o processo de secagem até as sementes atingirem 8% de teor de água propicia à atividade dessa enzima em sementes colhidas em estádios menos avançados de desenvolvimento. Em sementes submetidas à secagem a atividade dessa enzima ocorreu aos 35 DAA e em sementes não submetidas à secagem aos 56 DAA.

Nas Figuras 3 e 4 estão apresentados os padrões da enzima α -amilase em sementes de pimenta, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, submetidas ou não a secagem. Foi observada atividade dessa enzima em sementes a partir de 63 DAA, independentemente da secagem.

Houve atividade da enzima α -amilase em sementes não submetidas à secagem e colhidas a partir de 63 DAA. No entanto, em sementes submetidas à secagem a atividade dessa enzima foi maior.

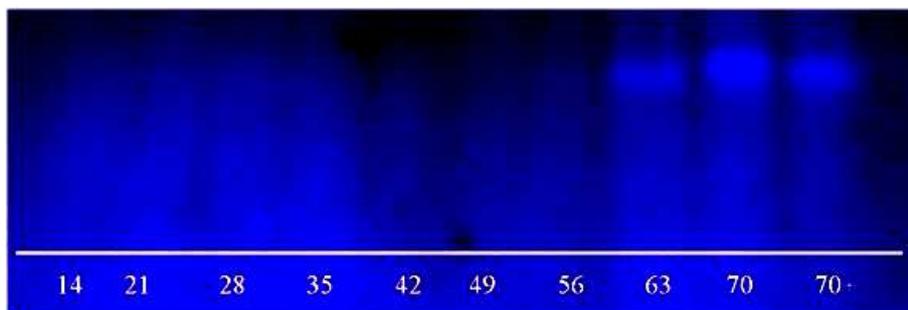


Figura 3 Atividade da enzima alfa amilase em sementes não submetidas à secagem de pimentas Habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

A degradação do amido, principal fonte de reserva na maioria das sementes de plantas cultivadas, é essencial na germinação dessas sementes (YAMASAKI, 2003). Pelos resultados, observa-se que a atividade dessa enzima aumenta consideravelmente a partir de 56 DAA, coincidindo com os maiores valores de germinação e vigor (Tabelas 3 e 4).

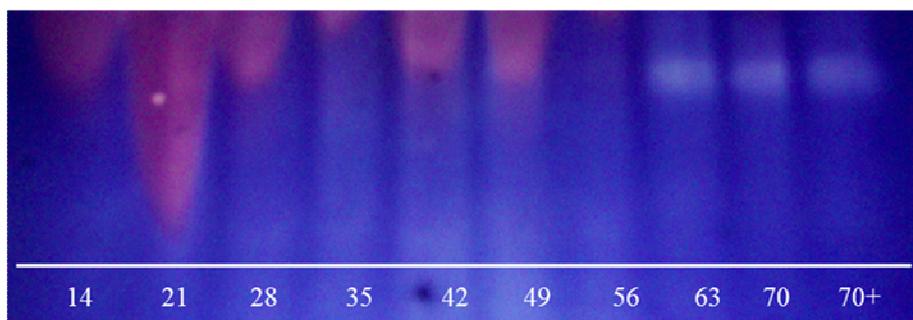


Figura 4 Atividade da enzima alfa amilase em sementes secadas de pimentas Habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

A maior atividade da enzima endo β mananase foi observada em sementes colhidas no estágio de desenvolvimento 70 DAA com repouso, independentemente da secagem (Tabela 4).

Tabela 4 Atividade da enzima endo β mananase em sementes de pimenta Habanero colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento (picomol. min⁻¹. g⁻¹)

DAA	Sementes sem secagem	Sementes secadas
14	21,80 f	9,42e
21	21,67 f	9,35e
28	50,36 d	12,60d
35	21,50f	9,63e
42	19,67f	9,74e
49	42,30e	9,79e
56	51,37d	12,29d
63	57,55c	13,21c
70	67,55b	14,35b
70+	76,05a	16,61a
CV(%)	3,30	2,73

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade

Pode-se verificar que as sementes colhidas nesse estágio já haviam atingido a maturidade fisiológica, apresentando o completo desenvolvimento dos mecanismos enzimáticos envolvidos na germinação. A atividade dessa enzima, que é chave na germinação de sementes de pimenta, foi maior nos estádios mais avançados de desenvolvimento (Tabela 04). Tais resultados corroboram aos apresentados por Caixeta (2009) que, trabalhando com sementes de pimenta habanero colhidas em três estádios de desenvolvimento, observou maior atividade na enzima endo- β -mananase nas sementes colhidas no estágio de desenvolvimento mais avançado.

Em sementes submetidas à secagem e colhidas no estágio 70 DAA com repouso foi observada menor atividade dessa enzima em relação às sementes não secadas. Ressalta-se que o teor de água nessas sementes era bem discrepante, 53,54% e 8,09% em sementes não submetidas e submetidas à secagem. Essa diferença pode explicar esse resultado, uma vez que a endo- β -mananase se expressa mais em sementes mais úmidas, como relatado por Pereira et al. (2011) que, trabalhando com sementes de *Coffea arabica* L, observaram

maior atividade da enzima endo- β -mananase em sementes úmidas quando comparadas às sementes que foram submetidas à secagem.

Sementes que são tolerantes à dessecação e sobrevivem no estado desidratado por períodos maiores, dependendo das condições de armazenamento, são designadas de ortodoxas. Essas sementes, após a histodiferenciação e antes da secagem na maturação, adquirem a habilidade para germinar e tolerar a dessecação (BEWLEY; BLACK, 1994). Contudo, essa tolerância à secagem não é uniforme durante todo o processo de desenvolvimento das sementes. Logo, não se pode afirmar se a tolerância à dessecação é desenvolvida antes ou em resposta à perda de água durante a maturação (BEWLEY; BLACK, 1994).

4.3 Expressão gênica das enzimas isocitrato liase, alfa amilase e endo β mananase durante o desenvolvimento de sementes de pimenta por meio da técnica de qRT-PCR

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 de *primers* por meio da curva de dissociação realizada para cada tratamento.

Pelos resultados da análise da expressão gênica, de uma maneira geral, observa-se grande variação da expressão dos genes analisados em sementes nos diferentes estádios de desenvolvimento.

No Gráfico 2 são representados os resultados das análises de quantificação relativa para o gene ICL6 (Isocitrato liase) em sementes de pimenta habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento.

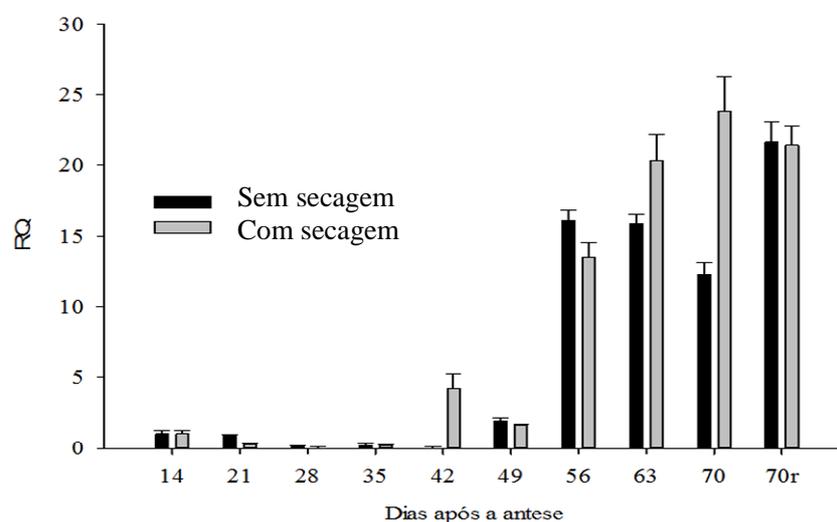


Gráfico 2 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene ICL6 em sementes de pimenta habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

Observa-se um aumento gradual na expressão desse gene no decorrer do desenvolvimento, tendo uma relação direta com o aumento da germinação e vigor.

Em sementes colhidas a partir de 42DAA e submetidas à secagem foi observada maior expressão da enzima isocitrato liase, ICL6, em relação às sementes não secadas, com exceção daquelas colhidas aos 49DAA e extraídas de frutos colhidos aos 70DAA e submetidas ao repouso. Ao comparar esses resultados com os observados na análise proteômica, por meio da técnica eletroforética, também se observa maior expressão da enzima em sementes colhidas a partir de 35DAA e submetidas à secagem (Figura 2). Nesses tratamentos aparece uma isoforma da enzima que se encontra ausente em sementes não submetidas à secagem.

Em espécies ortodoxas, as quais toleram a dessecação, a exemplo de sementes de pimenta, a secagem é importante uma vez que a taxa de secagem

influencia resposta à desidratação das sementes em desenvolvimento e a tolerância à dessecação dos tecidos vegetais.

Vale ressaltar que a enzima isocitrato liase é considerada uma enzima-chave na regulação do ciclo do glioxilato e envolvidas no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes, e no desenvolvimento das atividades no glioxissomos. A atividade dessa enzima aumenta durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados e na síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994).

No ciclo do glioxilato, os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose), os quais são facilmente deslocados para os meristemas radiculares e apicais (CIONI; PINZAUTI; VANNI, 1981).

Oliveira (2011) relatou que as pimentas do gênero *Capsicum* apresentam em sua composição química cerca de 11,0% de lipídios, no entanto, segundo Topuz e Ozdemir (2007) as pimentas apresentam uma diversidade na sua composição química, e os níveis desses compostos podem variar de acordo com o genótipo, grau de maturação, tipo de solo, estação do ano, insolação, dentre outros fatores (KOKOPELLI, 2013).

No Gráfico 3 são representados os resultados da expressão do gene *Alpha amylase B73* (AmyB73) avaliada por meio da técnica qRT-PCR.

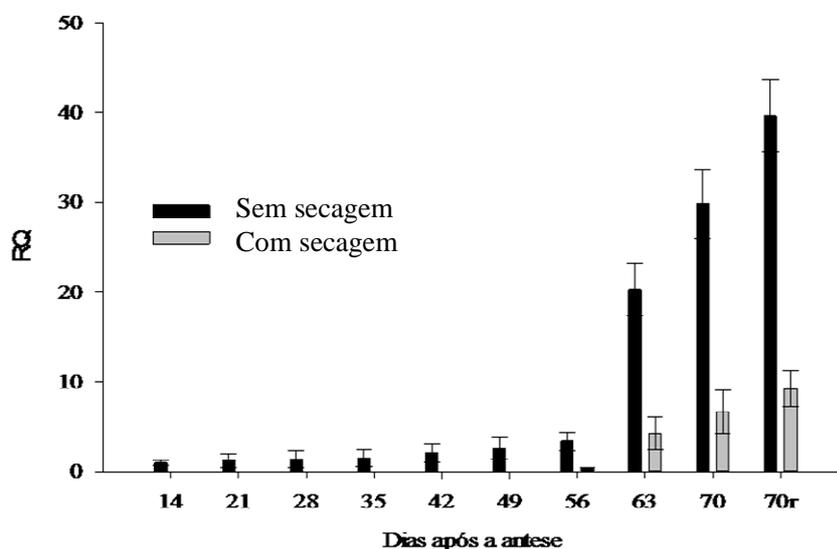


Gráfico 3 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene AmyB73 em sementes de pimenta habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

Ao considerar a expressão desse gene durante o desenvolvimento das sementes observa-se o aumento da mesma com o desenvolvimento, principalmente a partir de 63DAA em sementes submetidas ou não à secagem. Caixeta (2009), por meio da técnica de eletroforese, verificou maior atividade da enzima alfa amilase em sementes de pimenta habanero com alta qualidade fisiológica. Essa autora relatou ainda que apesar do baixo teor de amido nessas sementes, a enzima alfa amilase parece ser importante no processo de germinação dessa espécie.

Ainda pelo Gráfico 3, observa-se menor expressão do gene em sementes secadas. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de as enzimas amilases estarem envolvidas na germinação de sementes, que é sintetizada “de novo”, havendo a necessidade de embebição das mesmas. Segundo Lovegrove e Hooley (2000), Nakajima et al. (2006) e Xie et al. (2007) após a embebição, no embrião, ocorre a síntese de giberelina que ativa a síntese de α -amilase. No entanto, não

se pode esquecer que a secagem funciona também como um indutor da expressão da α amilase.

Oliveira et al. (2013) observaram maior expressão do gene AmyB73 em sementes de milho de menor tamanho embebidas em relação às sementes de maior tamanho e submetidas à secagem.

Em sementes não submetidas à secagem, maior expressão do gene AmyB73 foi observada em sementes extraídas de frutos colhidos aos 70DAA e submetidos ao repouso por sete dias. Ressalta-se que nessas sementes também foram observados os maiores valores de germinação e vigor (Tabelas 2 e 3).

Comparando os resultados da expressão observados pelas técnicas de qRT-PCR e eletroforese, verifica-se no zimograma da α -amilase em sementes não submetidas à secagem, aumento da expressão da enzima com o desenvolvimento das sementes, assim como observado pela técnica de *qRT-PCR*.

Já em sementes submetidas à secagem e colhidas após 63DAA houve a expressão de isoforma específicas, conforme indicação na Figura 4. Essa isoforma específica pode estar associada ao gene estudado, uma vez que a expressão do gene AmyB73, em sementes secadas, ocorreu a partir de 63 DAA, seguindo o padrão observado na expressão dessa enzima pela técnica de eletroforese.

Em relação à expressão do gene *MAN2* (Gráfico 4) durante o desenvolvimento, em sementes não submetidas à secagem, e colhidas até 70DAA, observa-se um padrão comparado de germinação de sementes em várias espécies durante o desenvolvimento.

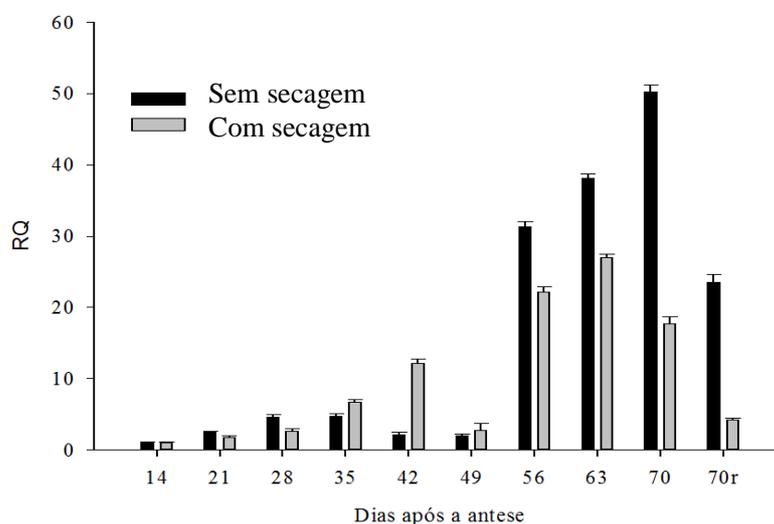


Gráfico 4 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene MAN2 em sementes de pimenta habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

No início do desenvolvimento de sementes a germinação é aumentada, seguida de redução aos 42 e 49 DAA e posterior aumento após 56 DAA. Resultados semelhantes foram encontrados por Teófilo et al. (1996) que, trabalhando com dessecação química pré-colheita na cultura do feijoeiro e seus efeitos no rendimento e qualidade de sementes, observaram que nos estádios iniciais de formação de sementes de feijão a germinação é aumentada e sobre decréscimo nos estádios intermediários com posterior aumento nos estádios mais tardios de desenvolvimento.

Em sementes extraídas de frutos colhidos aos 70DAA e mantidas em repouso por mais sete dias houve a redução da expressão dessa enzima em sementes submetidas à secagem ou não (Gráfico 4). Nessas sementes foram observados maiores valores de germinação e vigor (Tabelas 2 e 3).

Deve ser ressaltado que em sementes não submetidas à secagem, extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA e mantidas em repouso por mais sete

dias onde foi observado teor de água de 53,54%, valor este menor que os demais. No entanto, a diferença de teor de água entre as sementes colhidas aos 70 DAA e as colhidas aos 70 DAA e submetidas ao repouso parece não explicar esse resultado.

A endo β mananase é uma enzima considerada essencial no processo de germinação de sementes, estando relacionada diretamente ao processo de amolecimento do endosperma (SILVA et al., 2004). Dessa forma, o amolecimento é considerado uma consequência da atividade dessa enzima, a qual hidrolisa a parede celular, processo este muito investigado em sementes de tomate, café e alface (GROOT; KARSSSEN, 1988; NONOGAKI; MATSUSHIMA; MOROHASHI, 1992).

No entanto, Peetambar et al. (1997) não verificaram relação entre a atividade da β -mananase e a germinação em sementes de *Lycopersicon esculentum* pois, não foram observadas correlações entre a atividade da enzima, com a taxa de germinação. Segundo os autores, muito embora houvesse aumento na atividade da β -mananase nas sementes, antes da protrusão da radícula a redução do potencial hídrico atrasou ou evitou a emergência da radícula.

Dutta, Bradford e Nevins (1997), relataram que a atividade da enzima é expressa antes da germinação e é regulada pelas mesmas condições que governam a germinação. Logo, observa-se redução da atividade da enzima quando há maiores valores de germinação das sementes.

Os resultados da análise quantitativa da expressão do gene *NCED* (Gráfico 5), ligado a biossíntese do ABA, nos diferentes estágios de desenvolvimento estão representados no Gráfico 5. Foi possível observar uma expressão crescente do gene ao longo do desenvolvimento das sementes, independentemente da secagem. Os maiores valores de expressão gênica do *NCED* foram encontrados nos últimos estágios, que corresponde ao ponto de

maturidade fisiológica e maturação tardia. Os menores valores de expressão foram observados no estágio inicial de desenvolvimento (14 D8AA).

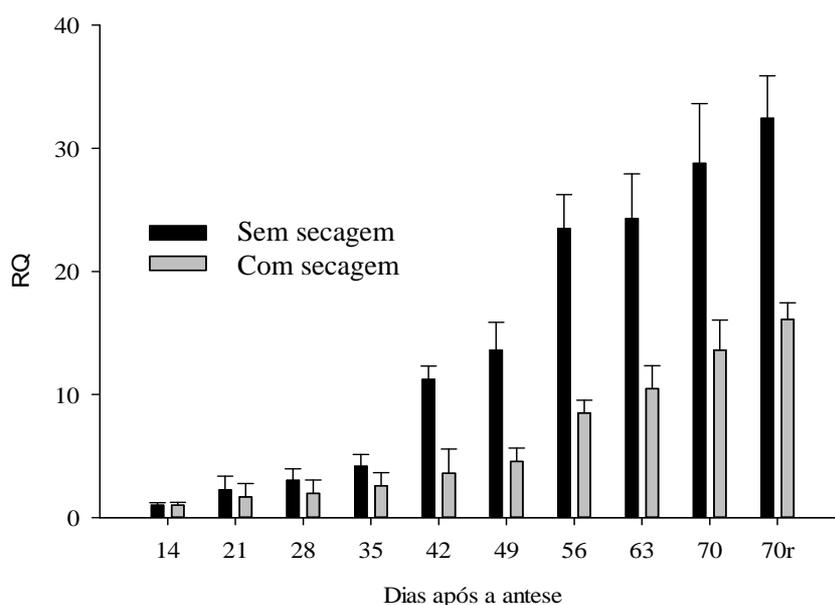


Gráfico 5 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene NCED em sementes de pimenta habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

Nesta pesquisa os maiores valores de germinação e vigor foram observados em sementes colhidas em estádios mais avançados de desenvolvimento. No entanto, sabe-se que ABA é um inibidor da germinação de sementes. Assim infere-se que o gene estudado tem um efeito menor sobre a produção de ABA e conseqüentemente sobre a germinação de sementes. Na literatura são relatados diferentes genes associados a produção de ABA, como rd29B, rab18, ABI1 e ABI2 (KANG et al., 2002).

Estudos com mutantes têm sido extremamente úteis na demonstração do papel de hormônios na dormência de sementes. Sementes de *Arabidopsis*, por exemplo, exibem um variado grau de sensibilidade ao ABA, dependendo do ecotipo. Mutantes de *Arabidopsis* deficientes em ABA (que não produzem o ácido abscísico) mostram-se não dormentes na maturidade (ZEEVART et al., 1988). Quando cruzamentos recíprocos entre o mutante ABA (deficiente em ABA) e o tipo selvagem (não mutante) foram feitos, a semente exibiu dormência somente quando o embrião produziu ABA.

Por outro lado, a dormência é grandemente reduzida em sementes de mutantes de *Arabidopsis* insensíveis ao ABA (mutantes *abi1* e *abi3* que não são afetados pelo ABA), embora estas sementes contenham maior concentração de ABA do que as do tipo selvagem durante o desenvolvimento. Similares conclusões a cerca do papel do ABA na regulação da dormência têm sido obtidos em trabalhos com mutantes de tomate, indicando que o fenômeno é, provavelmente, de caráter geral. Embora o papel do ABA na iniciação e na manutenção da dormência de sementes pareça estar bem esclarecido, outros hormônios contribuem para o efeito geral. Por exemplo, em muitas plantas, o pico de produção de ABA na semente coincide com o declínio nos níveis de auxinas (AIA) e de giberelinas (GA) (LACAMPAGNE; GAGNÉ; GÉNY, 2010).

Contreras et al. (2009) para sementes de alface (*Lactuca sativa* cv. “Tango”), observaram altos níveis de ABA endógeno nos estágios intermediários e finais do desenvolvimento, momento em que as sementes adquiriram tolerância à dessecação.

O mesmo foi observado por Clemente (2012), também em sementes de alface, em que a expressão do gene *LsNCED* foi maior nos estádios finais de desenvolvimento das sementes.

Nesta pesquisa foi observado ainda que, nas sementes secadas, o mesmo padrão de elevação da expressão do gene em sementes colhidas em estádios mais avançados de desenvolvimento, no entanto, com menores valores relativos. Resultados estes que confirmam o relatado por Finch-Savage e Leubner-Metzger (2006), que a síntese de ABA está diretamente relacionada com o teor de água das sementes, sendo os menores valores observados em sementes com baixos valores de teor de água.

Os níveis de expressão do GA3ox1 foram analisados em sementes nos diferentes estágios de desenvolvimento de sementes de pimenta (Gráfico 6).

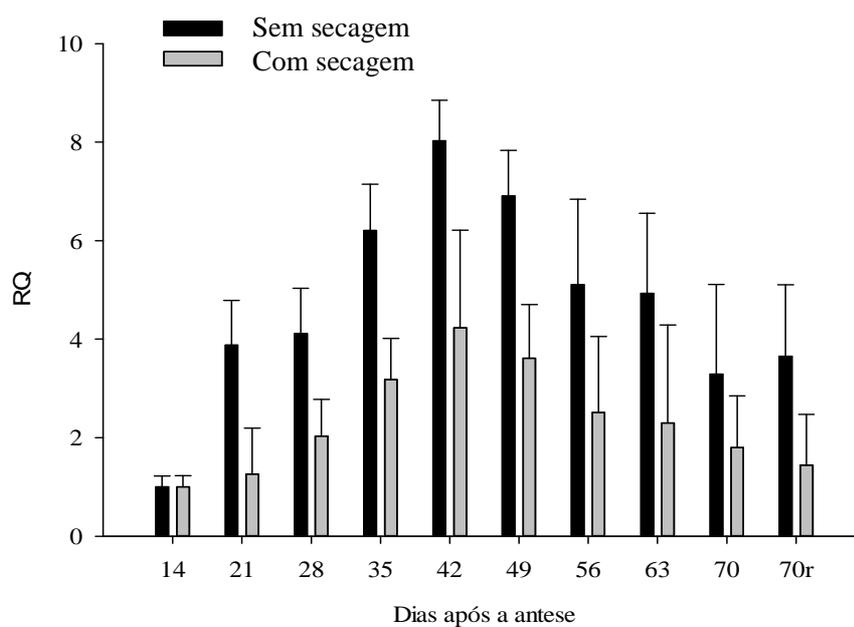


Gráfico 6 Perfil da expressão quantitativa relativa do gene GA3ox1 em sementes de pimenta habanero, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento

A expressão gênica do GA3ox1 foi crescente em sementes colhidas nos cinco primeiros estádios de desenvolvimento, com maiores valores em sementes colhidas aos 42 DAA.

Em sementes colhidas após este estágio foram observados menores valores absolutos de expressão do gene GA3ox1 tanto em sementes secadas quanto nas não submetidas a secagem. No entanto, nas sementes não secadas não houve diferença significativa da expressão do gene em sementes colhidas aos 56 e 63 DAA, das colhidas aos 63 e 70 DAA e das colhidas aos 70 DAA com e sem repouso. Nas sementes submetidas à secagem não houve diferença da expressão deste gene em sementes colhidas aos 42 e 49 DAA, das colhidas aos 49, 56, 63, 70 e 70r DAA. Assim observa-se, de uma maneira geral, menores valores de expressão do gene em sementes no final do processo de desenvolvimento quando comparados aos valores máximos de expressão observados em sementes colhidas aos 42 DAA.

Ao comparar estes resultados com os observados nos testes de germinação e vigor esperava-se maior expressão deste gene em sementes extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA e naquelas colhidas neste mesmo estágio e submetidas ao repouso, da mesma forma que esperava-se menor expressão do gene NCED em sementes nestes estádios de desenvolvimento.

No entanto, há coerência dos resultados de expressão destes genes em sementes colhidas nos estádios mais avançados de desenvolvimento, com o aumento da expressão do NCED e redução do GA3ox1.

Segundo Toh et al. (2008) a GA 3-oxidase (GA3 ox) participa da última etapa da biossíntese do GA, sendo a produção do GA necessária para a sobrevivência das sementes durante a embriogênese (SAWADA et al., 2008; SINGH et al., 2002). Além disso, o estabelecimento de dormência durante a maturação das sementes é regulada por interações entre o GA e ABA, quando o

ABA induz a dormência e o GA promove a germinação (HOLDSWORTH; BENTSINK; SOPPE, 2008).

Singh et al. (2002) afirmam que o GA tem papel essencial no início do desenvolvimento de sementes, enquanto que o ABA é requerido durante a maturação. Já os níveis de GA aumentam ao longo do desenvolvimento das sementes, ao mesmo tempo em que é imposta a dormência primária, pela ação do fito-hormônio ABA.

5 CONCLUSÕES

Maiores valores de germinação e vigor de sementes de pimenta habanero são observados em sementes extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA e submetidos ao repouso por sete dias.

Maior expressão da enzima alfa amilase e do gene *AmyB73* é observada em sementes colhidas após 63 DAA e não submetidas a secagem.

Maior atividade da enzima endo β mananase é observada em sementes extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA e submetidas a sete dias de repouso.

A expressão do gene *MAN2* em sementes sem secagem aumenta com o desenvolvimento de sementes até 70 DAA.

Maior atividade da enzima isocitrato liase e do gene *ICL6* é observada em sementes extraídas de frutos colhidos aos 42 DAA.

A sensibilidade aos fitormônios parece ser mais importante que o nível de expressão dos genes *NCED* e *GA3ox1* durante os estádios de desenvolvimento das sementes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações nas expressões gênicas e atividades das enzimas α amilase, isocitrato liase e endo β mananase durante o desenvolvimento de sementes de pimenta habanero foram coerentes com o padrão indicativo, onde se observou aumento do potencial germinativo, durante as fases iniciais do processo de germinação, seguindo de redução desse potencial e finalmente acentuado aumento até o final da maturação.

Entretanto, quando se observou a expressão dos genes potencialmente indutores (GA) e inibidores (ABA) da germinação não seguiram o mesmo padrão. Parece que o mecanismo de sensibilidade a esses hormônios ou especificidades dos hormônios induzidos por esses genes, apresentam respostas diferentes às suas funções esperadas em relação à germinação.

Por essas considerações pode-se sugerir que pesquisas focadas especificamente na atuação dos sistemas enzimáticos e genes envolvidos nesses processos podem trazer respostas importantes para o entendimento das alterações na germinação durante o desenvolvimento de sementes de pimenta habanero.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ALI-RACHEDI, S. et al. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 219, p. 479-488, 2004.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, p. 93-107, 2004.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic, 1998.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, n. 14, p. 1-16, 2004.
- BERRY, T.; BEWLEY, J. D. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a germinative mode without a requirement for desiccation. **Planta**, Berlin, v. 186, n. 1, p. 27-34, 1991.
- BETHKE, P. C.; LIBOUREL, I. G.; JONES, R. L. Nitric oxide in seed dormancy and germination. In: BRADFORD, K.; NONOGAKI, H. (Ed.). **Seed development, dormancy and germination**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 153-171. v. 6.
- BEWLEY, J. D. Breaking down the walls: a role for endo- β -mannase in release from seed dormancy? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, p. 464-469, 1997b.
- BEWLEY, J. D. Seed Germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1055-1066, 1997a.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BORGHETTI, F.; NODA, F. N.; SÁ, C. M. Possible involvement of proteasome activity in ethylene-induced germination of dormant sunflower embryos. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, n. 14, p. 125-131, 2002.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice *Capssicums***. Wallingford: CAB International, 1999. 204 p. (Crop Production Science in Horticulture, 12).

BOVE, J. et al. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, p. 593-612, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009.

CADMAN, C. S. C. et al. Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seed during cycling through dormant and non-dormant states indicate a common underlying dormancy control mechanism. **Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 805-822, 2006.

CAIXETA, F. **Modificações fisiológicas e proteínas durante o desenvolvimento, germinação e armazenamento de sementes de pimenta malagueta (*Capssicum frutescens* L.) e habanero yellow (*Capssicum chinense*)**. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C. et al. (Ed.). **Pimentas *Capssicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-54.

CARVALHO, S. I. C. et al. **Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capssicum spp.*) da Embrapa Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 49 p. (Documentos, 49).

CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1-26, 1981.

CLEMENTE, A. C. S. **Expressão de genes associados à rota biossintética do ácido abscísico, giberelina e etileno durante o desenvolvimento e germinação de sementes de alface**. 2012. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. 2013. Brasília, 2013.

CONTRERAS, S. et al. Red to far-red ratio during seed development affects lettuce seed germinability and longevity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 1, p. 130-134, Feb. 2009.

COSTA, A. F. S. **Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de genótipos de soja (Glycine max (L.) Merrill), produzidas em cinco localidades de Estado de Minas Gerais**. 1986. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1986.

DIAS, D. C. F. S. et al. Tomato seed quality in relation to fruit maturation and post-harvest storage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 34, n. 3, p. 691-699, 2006.

DIAS, D. C. F. Maturação de sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 5, n. 6, p. 22-24, 2001.

DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- α -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, New York, v. 36, p. 829-835, 1994.

DUTTA, S.; BRADFORD, K. J.; NEVINS, D. J. Endo β mananase activity present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. **Plant Physiology**, Washington, v. 155-161, 1997.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**, Alexandria, n. 71, p. 428-434, 1958.

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds**. Cambridge: Cambridge University, 2005.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: Ufla, 2000. Software.

FINCH-SAVAGE, W. E.; CLAY, H. A. Evidence that ethylene, light and abscisic acid interact to inhibit germination in the recalcitrant seeds of *Quercus robur* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 1295-1299, 1994.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, p. 501-523, 2006.

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S.; ROCK, C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p. 15-45, 2002.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 367-371, May 2004.

GAGLIARDI, B ; MARCOS FILHO, J . Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 4, p. 411-416, 2011.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

GONÇALVES, C. P. **Desenvolvimento e maturação fisiológica da semente de pimentão cv. all Big**. 1997. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1997.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberelin-deficient mutants. **Planta**, Berlin, v. 171, p. 525-531, 1987.

HENZ, G. P. Perspectivas e potencialidades do mercado de pimentas. In: ENCONTRO NACIONAL DO AGRONEGÓCIO PIMENTAS (*CAPSSICUM* SPP.), 1.; MOSTRA NACIONAL DE PIMENTAS E PRODUTOS DERIVADOS, 1., Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. 1 CD ROM.

HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C. Mercado de comercialização. In: RIBEIRO, C. S. C. (Ed.). **Pimentas *Capssicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 15-24.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy: primary dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, p. 61-73, 1995.

HILHORST, H. W. M. The regulation of secondary dormancy: the membrane hypothesis revisited. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 77-90, 1998.

HOLDSWORTH, M. J.; BENTSINK, L.; SOPPE, W. J. J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytologist**, Cambridge, v. 179, p. 33-54, 2008.

HONGJIAN, W. et al. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capssicum annuum* L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 416, n. 1/2, p. 24-30, 2011.

KANG, J. Y. et al. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 343-357, 2002.

KARSSSEN, C. M.; LAÇKA, E. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberelin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. In: BOOP, M. (Ed.). **Plant growth substances**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p. 315-323.

KARSSSEN, C. M. Uptake and effect of abscisic acid during induction and progress of radicle growth in seeds of *Chenopodium album*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 259-263, 1976.

KNOW, O. S.; BRADFORD, K. J. Tomato seed development and quality as influenced by preharvest treatment with ethephon. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 3, p. 588-591, 1987.

KOKOPELLI. **Pimentas**: história e nutrição. Disponível em: <<http://www.kokopelli-seedfoundation.com>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

KROCK, B. et al. Vegetation-derived abscisic acid and four terpenes enforce dormancy in seeds of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 12, p. 239-252, 2002.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 15, p. 281-307, 2005.

LACAMPAGNE, S.; GAGNÉ, S.; GÉNY, L. Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (lar) and anthocyanidin reductase (anr) activities and expression. **Journal Plant Growth Regulation**, New York, v. 28, p. 81-90, 2010.

LAKSHMANAN, V.; BERKE, T. G. Lack of primary seed dormancy in pepper (*Capssicum* spp.). **Capssicum and Eggplant Newsletter**, Turin, v. 17, p. 72-75, 1998.

LEFEBVRE, V. et al. Funtional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 309-319, 2006.

LIVESLEY, M. A.; BRAY, C. M. The effect of ageing upon a-amylase production and protein synthesis by wheat aleurone layers. **Annals of Botany**, London, v. 68, n. 1, p. 69-73, 1991.

LOVEGROVE, A.; HOOLEY, R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 102-110, 2000.

MANZ, B. et al. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. **Plant Physiology**, Washington, n. 138, p. 1538-1551, 2005.

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

MARTINS, C. A. O. et al. Atividade da isocitrato-liase durante a germinação de sementes de soja, **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 42-46, 2000.

MEYER, L. H. Food chemistry. In: _____. **Carbohydrates**. Connecticut: The Avi, 1976. Cap. 3, p. 65-113.

NAKAJIMA, M. et al. Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. **Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 880-889, 2006.

NASCIMENTO, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças: potencialidades e implicações. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.16, n. 2, p. 106-109, nov. 1998.

NASCIMENTO, W. M.; FREITAS, R. A. Produção de sementes de pimentas. In: RIBEIRO, C. S. C. et al. (Ed.). **Cultivo de pimentas (*Capssicum spp.*) no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. v. 27, p. 30-39.

NEDEL, J. L.; ASSIS, F. N.; CARMONA, P. S. **A planta de arroz-morfologia e fisiologia**. Pelotas: UFPEL, 1996. 56 p.

NIKOLAEVA, M. G. On criteria to use in studies of seed evolution. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, p. 315-320, 2004.

NIKOLAEVA, M. G. **Physiology of deep dormancy in seeds**. Leningrad: Iztatel'stvo "NAUKA", 1967. 219 p.

NONOGAKI, H.; MATSUSHIMA, H.; MOROHASHI, Y. Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 167-172, June 1992.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capssicum spp.*** 2011. 81 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Terezina, 2011.

OLIVEIRA, A. P. et al. Maturação fisiológica de sementes de pimentão, em função de idade de frutos após a antese. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 21, n. 2, p. 88-94, 1999.

OLIVEIRA, G. E. et al. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 40-48, 2013.

PEETAMBAR, D. et al. Relationship of Endo-P-D-Mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. **Plant Physiology**, Washington, v. 11, n. 3, p. 1243-1252, 1997.

PERCY, R. G.; ZEIGER, E. Genetic variability for stomatal conductance in Pima cotton and its relation to improvements of heat adaptation. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 7217-7221, 1994.

PEREIRA, D. M. et al. Atividade da enzima endo- β -mananase em diferentes partes de sementes de café, antes e após a germinação.. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...** Araxá: [s. n.], 2011. 1 CD ROM.

PEREIRA, R. W. et al. Expressão da enzima isocitrato liase em sementes de pimenta habanero (*Capssicum chinense* Jacquin) colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 25., 2012, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2012. 1 CD ROM.

PETRUZZELLI, L.; TARANTO, G. Amylase activity and loss of viability in wheat. **Annals of Botany**, London, v. 66, n. 4, p. 375-380, 1990.

PINO, J.; SAURI-DUCH, E.; MARBOT, R. Changes in volatile compounds of Habanero chile papper (*Capssicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening states. **Food Chemistry**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 394-398, Feb. 2006.

PINTO, L. V. A. et al. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* St. Hill seed germination. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 6, p. 1185-1187, 2007.

PORTIS, E. et al. Molecular and physiological markers during seed development of peppers (*Capssicum annuum* L.): DNA replication and tubulin synthesis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 85-90, Mar. 1999.

QUEIROZ, L. A. F. et al. Época de colheita e secagem na qualidade de sementes de pimenta Habanero Yellow. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, p. 472-481, 2011.

RANDLE, W. M.; HONMA, S. Dormancy in peppers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 19-25, 1981.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. et al. **Capssicum- pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 113 p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. Pepper production and breeding in Brazil, and a word on eggplants. **Capssicum and Eggplant Newsletter**, Turin, v. 17, p. 13-18, 1998.

RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, p. 7-15, 2006.

SANCHEZ, V. M. et al. Fruit maturity, storage and posharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capssicum annuum* L.) seed quality. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 191-201, June 1993.

SAWADA, Y. et al. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, p. 1386–1396, 2008.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SILVA, E. A. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potencial and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 251-261, 2004.

SIMPSON, G. M. **Seed dormancy in grasses**. New York: Cambridge University, 1990. 297 p.

SINGH, D. P. et al. Gibberellins are required for seed development and Pollen Tube Growth in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 12, p. 3133-3147, Dec. 2002.

STEINBACH, H. S. et al. Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 113, p. 149-154, 1997.

TEÓFILO, E. M. et al. Dessecação química pré-colheita na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) efeitos sobre a produção de grãos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 425-436, 1996.

TOH, S. et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, n. 3, p. 1368–1385, Mar. 2008.

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

TOPUZ, A.; OZDEMIR, F. Assessment of carotenoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capssicum annuum* L.) grown in Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, n. 20, p. 596-602, 2007.

WHITE, C. N. et al. Gibberellins and seed development in maize: evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 1081-1088, 2000.

XIE, Z. et al. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 64, p. 293-303, 2007.

YAMASAKI, Y. Amylase in germinating millet seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 64, p. 935-939, 2003.

ZEEVART, J. A. D.; CREELMAN, R. A. Metabolism and physiology of abscisic acid. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 39, p. 439-473, 1988.