



GEANE DE JESUS CONSTANTINO

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA
EM SEMENTES DE PIMENTA HABANERO DURANTE O
ARMAZENAMENTO**

**LAVRAS – MG
2018**

GEANE DE JESUS CONSTANTINO

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE
PIMENTA HABANERO DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora
Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Constantino, Geane de Jesus.

Qualidade fisiológica e atividade enzimática em sementes de
pimenta habanero durante o armazenamento / Geane de Jesus
Constantino. - 2018.

37 p. : il.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Capsicum chinense. 2. dormência. 3. armazenamento. I. Von
Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Santos, Heloisa Oliveira dos. III.
Título.

GEANE DE JESUS CONSTANTINO

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SEMENTES DE
PIMENTA HABANERO DURANTE O ARMAZENAMENTO**

**PHYSIOLOGICAL QUALITY AND ENZYMATIC ACTIVITY IN SEEDS OF
HABANERO PEPPER DURING STORAGE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 18 de outubro de 2018.

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA

Dra. Elise de Matos Pereira - UFLA

Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UNESP

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

Orientadora

Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos

Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Á DEUS por sonhar sonhos maiores do que eu e me levar a conquistar o que nunca imaginei. Por me sustentar nos momentos difíceis e me dar forças para recomeçar.

À Universidade Federal de Lavras, ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e em especial ao Setor de Sementes, pela oportunidade e acolhimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, professora Édila e minha coorientadora Heloisa pelos ensinamentos, ajuda e principalmente pelo apoio e confiança.

Aos membros da banca examinadora: professores Édila Vilela de Resende Von Pinho, Elise de Matos Pereira e Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pelas sugestões e correções enriquecedoras ao meu trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Setor de Sementes, pela ajuda, troca de conhecimento e amizade.

Aos meus amigos Caroline, Elaina, Larissa e Maria Aparecida, pelo apoio constante.

Aos meus familiares Leniza, Jaqueline, Felipe, Euler, Cremilda, Genivaldo, Sueli, Reginaldo e tantos outros, pelas orações e pela confiança que sempre tiveram em mim.

Ao meu esposo Maycon Aparecido Pacheco, por me apoiar em todos momentos e nunca duvidar da minha capacidade. Obrigada Amor, pelo seu cuidado.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira cruzaram o meu caminho e me estimularam a chegar até aqui.

Muito Obrigada!

RESUMO

A expansão do mercado das pimentas tem contribuído para que essa seja uma das olerícolas mais importantes do agronegócio brasileiro. No entanto uma das principais limitações dessa expansão é a oferta no mercado de sementes com alta qualidade. Em sementes de pimenta observa-se geralmente germinação lenta e irregular o que dificulta os tratos culturais, além de aumentar o custo e a produção. Neste trabalho foram avaliadas a qualidade fisiológica e a expressão de enzimas em sementes de pimenta habanero (*Capsicum chinense* Jacquim) durante o armazenamento. Sementes de pimenta habanero armazenadas por diferentes períodos (1 a 21 semanas), armazenadas em câmara fria á 10°C e 40% de umidade relativa, foram submetidas a testes de germinação e vigor para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes. Foi avaliada expressão de enzimas responsáveis pela mobilização de reservas (esterase, isocitrato-liase e endo- β -mananase), a das ligadas à respiração (malato desidrogenase, álcool desidrogenase) e a das enzimas com atividade antioxidante (catalase, peroxidase, superóxido dismutase), por meio da técnica de eletroforese. Os melhores resultados da qualidade fisiológica, avaliada por meio dos testes de germinação e primeira contagem de germinação foram em sementes armazenadas por 20 semanas. Diante desses resultados infere-se que as sementes encontravam-se dormentes até a 20^a semana de armazenamento. As atividades das enzimas endo- β -mananase, isocitrato liase, esterase, peroxidase, catalase, malato desidrogenase e álcool desidrogenasse variam em sementes de pimenta armazenadas por diferentes períodos. Não houve variação significativa da expressão da enzima endo- β -mananase em sementes armazenadas por diferentes períodos.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*. Endo- β -mananase. Dormência. Armazenamento.

ABSTRACT

The expansion of the pepper market has contributed to this being one of the most important olerícolas of Brazilian agribusiness. However one of the main limitations of this expansion is the supply in the seed market with high quality. In pepper seeds, slow and irregular germination is generally observed, which hampers cultural practices, as well as increasing costs and production. In this work the physiological quality and expression of enzymes in habanero pepper seeds (*Capsicum chinense* Jacquin) were evaluated during storage. Habanero pepper seeds stored for different periods (1 to 21 weeks), stored in a cold room at 10 ° C and 40% relative humidity, were submitted to germination and vigor tests to evaluate the physiological quality of the seeds. Expression of enzymes responsible for the mobilization of reserves (esterase, isocitrate lyase and endo- β -mannanase), those linked to respiration (malate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase) and enzymes with antioxidant activity (catalase, peroxidase, superoxide dismutase), using the technique of electrophoresis. The best results of the physiological quality, evaluated through the tests of germination and first count of germination were in seeds stored for 20 weeks. In view of these results, it was inferred that the seeds were dormant until the 20th week of storage. The activities of enzymes endo- β -mannanase, isocitrate lyase, esterase, peroxidase, catalase, malate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase vary in pepper seeds stored for different periods. There was no significant variation of endo- β -mannanase enzyme expression in seeds stored for different periods.

Keywords: *Capsicum chinense*. Endo- β -mannanase. Dormancy. Storage.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	Caraterização e importância das pimentas	9
2.2	Sementes de pimenta: qualidade, dormência e armazenamento	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Local de realização dos experimentos e material vegetal	16
3.2	Teor de água	17
3.3	Determinação da qualidade fisiológica das sementes	18
3.3.1	Teste de germinação	18
3.3.2	Teste de primeira contagem	18
3.3.3	Teste de tetrazólio	18
3.3.4	Análise dos resultados dos testes de germinação, primeira contagem e viabilidade	19
3.4	Análise enzimática	19
3.4.1	Análise da expressão de enzimas	19
3.4.2	Extração endo-β-mananase	20
3.4.3	Extração isocitrato-liase	20
3.4.4	Análise dos resultados	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Teor de água	21
4.2	Qualidade de sementes de pimenta durante o armazenamento	21
4.3	Avaliação da expressão enzimática em sementes de pimenta	23
4.3.1	Endo-β-mananase	23
4.3.2	Isocitrato Liase	24
4.3.3	Esterase	25
4.3.4	Superóxido desmutase	27
4.3.5	Catalase	28
4.3.6	Peroxidase	29
4.3.7	Malato Desidrogenase	29
4.3.8	Álcool desidrogenase	30
5	CONCLUSÕES	31
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

As pimenteiras podem ser produzidas sob diversas condições edafoclimáticas, sendo cultivadas no Brasil diversas espécies e variedades as quais apresentam características próprias e atualmente representam um importante segmento do mercado de hortaliças. A expansão do agronegócio das pimentas nos últimos anos é resultado da exploração de novas variedades e de produtos processados com alto valor de mercado. A pimenta possui significativa importância social e econômica por demandar muita mão-de-obra, além de favorecer a integração entre produtores e a indústria em muitas regiões à agricultura familiar é a maior fornecedora do produto. O mercado de sementes de pimenta ainda é considerado em sua essência informal e por muitas vezes não responde a demanda.

Capsicum chinense é uma pimenta bastante difundida desde o Caribe até o Brasil, considerada uma das pimentas mais picantes. Essa espécie é conhecida como pimenta habanero, pimenta- de -bode, cumari, biquinho entre outras, sendo consumida preferencialmente na forma *in natura*.

Uma das limitações para a expansão do cultivo de pimenteiras é a baixa oferta de sementes com alta qualidade. Mesmo em condições favoráveis sementes de pimenta apresentam, com frequência, germinação lenta e irregular o que dificulta os tratamentos culturais e aumenta o custo da produção. Vários autores têm associado a germinação lenta e desuniforme das sementes de pimentas a dormência dessas.

Tendo em vista que o cultivo de pimentas em larga escala é limitado pela baixa oferta de sementes de qualidade verifica-se no mercado uma demanda de sementes de alta qualidade, principalmente de espécies mais picantes, como a habanero. Essa limitação pode ser associada ao pouco conhecimento em técnicas de produção como a determinação do tempo de colheita, método de secagem e armazenamento.

Para obtenção de sementes de pimenta com alto valor de mercado são necessários estudos que esclareçam os aspectos que afetam a qualidade fisiológica das mesmas. O conhecimento acerca do momento ideal de colheita das sementes é muito importante para se garantir o máximo vigor e produtividade no campo. Não menos importante avaliar a qualidade fisiológica das sementes de pimenta habanero, durante o armazenamento, uma vez que é frequente na indústria sementeira a produção de sementes em uma safra e a comercialização dessas na safra subsequente.

Em algumas espécies de pimenta tem sido observada a quebra de dormência das sementes durante o armazenamento, o que torna importante avaliar a qualidade fisiológica das

sementes de pimenta habanero durante o armazenamento assim como a atividade de enzimas importantes no metabolismo dessas sementes.

A qualidade fisiológica de sementes é avaliada frequentemente por meio de testes de germinação e vigor. Tem-se observado que a utilização de técnicas moleculares, podem oferecer dados importantes para a aferição da qualidade fisiológica das sementes, como a expressão enzimática. A atividade enzimática de diversas proteínas normalmente está relacionada ao processo germinativo, incluindo a quebra da dormência, a mobilização de reservas e o processo de deterioração das sementes. Diante disso, neste estudo objetivou-se avaliar a expressão de proteínas em sementes de pimenta habanero, durante o armazenamento e associá-la com a qualidade fisiológica dessas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização e importância das pimentas

O gênero *Capsicum* apresenta espécies de interesse econômico para a alimentação humana, como os pimentões e as pimentas, cujo sabor picante é conferido pelo alcaloide capscicina (JUDD et al., 2009; SOUZA e LORENZI, 2012). O gênero surgiu na América tropical em uma área ao longo dos Andes, de oeste a noroeste da América do Sul (CHIOU et al., 2014; GARCÍA et al., 2016). As pimentas originadas nas Américas estão presentes na culinária em todo o mundo. Essas plantas foram domesticadas e usadas como condimento no período Précerâmico, indicando que a agricultura sofisticada e cozinhas complexas surgiram precocemente nas Américas (PERRY et al., 2007).

A pimenteira pertencente à família das Solanáceas e ao gênero *Capsicum* pode ser largamente produzida nos solos e climas brasileiros, sendo encontrados diversos tipos de variedades que apresentam características próprias como: coloração, sabor, tamanho, dentre outras (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2014). No Brasil são consideradas domesticadas cinco espécies: *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annum*, *C. baccatum* e *C. pubescens* (CARVALHO et al., 2003). O consumo de pimenta no Brasil tem destaque em vários setores da economia tanto na forma “in natura” ou processada, devido à sua utilidade na culinária, na produção de remédios, produtos agroindustriais, ornamentação além de serem muito exigidas por clientes nos restaurantes (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2012; RUFINO e PENTEADO, 2006).

Diversas espécies pertencentes ao gênero *Capsicum* são conhecidas por apresentarem atividade antifúngica, antioxidante e inibidora de proteinases apresentando potencial para indústria farmacêutica e alimentícia (ALVAREZ- PARRILLA et al., 2012; BARD et al.,

2014; BARD et al., 2015; DIAS et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2012). A atividade antioxidante pode estar relacionada aos compostos diferentes como flavonóides, ácidos fenólicos, capsaicinóides e vitaminas C e E, juntamente com outros antioxidantes encontrados em pimentas (MEDINA-JUÁREZ et al., 2012; MECKELMANN et al., 2013). A pungência das pimentas é um parâmetro de qualidade importante. A quantidade de capsaicinóides: capsaicina, dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina são responsáveis pelo sabor picante. O gênero é constituído de espécie não picantes a extremamente pungentes (MECKELMANN et al., 2013). A pungência das pimentas é a qualidade que mais influencia o seu consumo, se destacando as mais picantes.

Capsicum chinense (Jacq.), é uma das representantes da família Solanaceae que possui distribuição cosmopolita com cerca de 450 espécies que ocorrem no Brasil (SOUZA e LORENZI, 2012). As formas domesticadas de *C. chinense* destacam-se pela ampla variabilidade morfológica expressa na diversidade de formas, tamanhos e cores dos frutos que são geralmente muito picantes e aromáticos. As variedades mais conhecidas desta espécie são habanero, pimenta-de-cheiro, murupi, pimenta-de-bico (biquinho), pimenta-de-bode e cumarido-Pará (RIBEIRO e REIFSCHEIDER, 2008).

Os frutos da pimenta habanero, possuem formato alongado com superfície rugosa apresentando coloração amarela ou vermelha, quando maduro; o peso é inferior a 4,5 gramas com aroma característico e pungência elevada (BARBOSA et al., 2010). Canto-Flick et al. (2008), determinando o nível de pungência de diferentes acessos de pimentas habanero por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), observaram que a espécie apresenta as pimentas mais pungentes conhecidas até aquela data. Considerando-se ainda, que desde que a medida da pungência de pimentas foi inventada por Scoville em 1912, as cultivares de pimenta habanero sempre ocuparam os maiores valores da escala. Sabe-se ainda que as características de pungência podem ser variáveis em função das condições de cultivo e diferenças genéticas interespecíficas.

Diante da importância dessa hortaliça, o mercado de pimentas no Brasil vem crescendo nos últimos anos, tendo como maiores regiões produtoras o Sudeste e o Centro-Oeste. Destacam-se na produção os estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Ceará e Goiás (RUFINO e PENTEADO, 2006). Em 2015 a área explorada com pimentas no Brasil foi de aproximadamente 5 mil hectares com produção total de 75 mil toneladas (PEREIRA et al., 2015). O maior produtor nacional é o estado de Minas Gerais com cerca de 70% do total produzido, entretanto, os maiores consumidores de pimenta do Brasil são os

estados do Nordeste (Ceará, Pernambuco e Bahia), principalmente para o consumo in natura (RIBEIRO et al., 2015).

A crescente demanda do mercado por pimentas tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio pimentas e pimentões um dos mais importantes do país (GENUNCIO et al., 2015). Em muitas regiões do país o mercado das pimentas é abastecido principalmente pela agricultura familiar. O que dá a cultura uma importância social e econômica significativa por demandar mão-de-obra, fixar o produtor no campo e possibilitar a integração do pequeno agricultor à indústria, por meio de conservas e molhos (RUFINO e PENTEADO, 2006). Esses agricultores por muitas vezes, produzem suas próprias sementes, sem critérios que garantem a qualidade física, fisiológica e sanitária das mesmas (NASCIMENTO et al., 2006; NASCIMENTO, 2011; RUFINO e PENTEADO, 2006). Em decorrência da baixa qualidade fisiológica das sementes tem sido observadas mudas de baixo vigor, baixos índices de germinação e menor uniformidade, fatores que dificultam os tratos culturais e aumento o custo de produção.

2.2 Sementes de pimenta: qualidade, dormência e armazenamento

Em espécies que possuem frutos carnosos a maturidade fisiológica das sementes coincide com os valores máximos de germinação, acúmulo de matéria seca e vigor (NASCIMENTO e FREITAS, 2006). Em algumas dessas espécies já foi observado por alguns autores, que sementes mantidas por determinado tempo no fruto após a colheita, dão continuidade ao processo de maturação, atingindo níveis máximos de germinação e vigor (DIAS et al., 2006; VIDIGAL et al., 2006).

Em geral o máximo de qualidade fisiológica das sementes coincide com o maior acúmulo de matéria seca, mas em alguns estudos já foi constatado que algumas espécies não seguem essa regra. Em pimentão foi observado, por Oliveira et al. (1999) que o máximo acúmulo de massa seca foi alcançado antes da máxima qualidade fisiológica. Já em um estudo de Dias et al. (2006) com sementes de tomate, foi observado que o máximo acúmulo de matéria seca ocorre após o máximo de qualidade fisiológica das sementes. Para algumas espécies de *Capsicum*, foi observado que a maturidade fisiológica das sementes ocorre por volta dos 70 dias após a antese, coincidindo com os maiores valores de vigor, germinação e massa seca (JUSTINO et al., 2015; SANTOS et al., 2015).

Queiroz et al. (2011) constataram que sementes de pimentas habanero apresentam dormência, condição atribuída à presença de sementes viáveis, pelo teste de tetrazólio, sem

sintomas de deterioração e que não germinaram. Santos et al. (2015) e Caixeta (2009) também observaram resultados semelhantes em sementes da mesma espécie. Ambas observaram que a dormência foi superada ao longo do armazenamento das sementes. De acordo com Nascimento et al. (2006) uma vez constatada a dormência, as sementes devem ser armazenadas por períodos, de três a quatro meses, para a superação da dormência. Para compreensão da dormência e superação da mesma em sementes de pimenta é necessário o conhecimento dos mecanismos que regulam esse fenômeno. Diante disso e tendo em vista que a semeadura de sementes extraídas de frutos imaturos e recém armazenados apresentam dormência, a semeadura sem se atentar a esses fatos causa risco à produção (CAIXETA, 2009; QUEIROZ et al., 2011; SANTOS et al. 2015).

Sabe-se que a dormência de sementes é definida como um estado em que uma semente viável não germina, mesmo sob condições favoráveis ou adequadas à germinação (FINKELTEIN et al., 2008). A dormência tem o papel de distribuir a germinação ao longo do tempo, em ambientes naturais, tornando possível a sobrevivência das espécies. As sementes podem apresentar diferentes intensidades de dormência que são controladas em nível genético (VIDAVER, 1997).

A dormência pode ser dividida em dois tipos: primária e secundária, a primária se instala durante o processo de maturação da semente já a secundária é induzida como resposta a uma condição ambiental (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Além dessa classificação de dormência, existe outro sistema proposto por Baskin e Baskin (2004) com cinco tipos de dormência: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e a combinação de física com fisiológica. A dormência fisiológica é resultado da presença de inibidores químicos no embrião e do desbalanço hormonal, a física deve-se a impermeabilidade do tegumento, enquanto a física e fisiológica refere-se à combinação entre os dois tipos, a morfológica é relacionada a sementes que apresentam o embrião não-diferenciado ou não completamente desenvolvido (BASKIN e BASKIN, 2004; BASKIN e BASKIN, 1998). Tendo em vista esta classificação, constata-se uma grande diversidade de fatores envolvidos na obtenção e na quebra da dormência das sementes.

Em sementes com dormência fisiológica, o tegumento pode constituir uma restrição mecânica à germinação, a qual deve ser superada para o crescimento do embrião. (BEWLEY, 1997). O enfraquecimento do tecido pode ser associado a liberação de enzimas pelo endosperma ou radícula (KUCERA et al., 2005). O endosperma age como uma barreira mecânica à germinação de várias angiospermas, sendo necessário o seu enfraquecimento para a protusão radicular (BEWLEY, 1997). O enfraquecimento do endosperma em sementes de

solanáceas, como o tomate e as pimentas, vem sendo associado ao processo de germinação dessas sementes e não necessariamente ao processo de quebra de dormência (BASKIN e BASKIN, 2004).

Os fito-hormônios, atuam nos mecanismos de germinação e dormência de sementes, há evidências que o ácido abscísico (ABA) é um importante regulador, tanto da indução quanto da manutenção do estado de dormência (TAIZ e ZEIGER, 2013). Já as giberilinas (GA), por sua vez podem levar a quebra da dormência e promover a germinação de sementes. Durante a germinação as GAs induzem a síntese de enzimas hidrolíticas como as amilases, essas enzimas degradam as reservas nutritivas liberando a energia necessária para o desenvolvimento da plântula (TAIZ e ZEIGER, 2013). Enquanto a manutenção da dormência depende da alta relação ABA/GA, a superação da dormência é relacionada a maior degradação de ABA e aumento na biossíntese de GA (CADMAN et al., 2006). É a relação ABA/GA, e não as quantidades absolutas desses hormônios, que controla a germinação. Um exemplo são as sementes de tomate, que germinam facilmente pela ação de GA₃, endógeno através do enfraquecimento do endosperma (GROOT e KARSSSEN, 1987). A ação das giberilinas no enfraquecimento do endosperma, tem sido associado a sementes que diferem quanto a substância de reserva mais abundante, demonstrando ser um fenômeno geral entre as sementes (FINCH-SAVAGE e LEUBNER- METZGER, 2006).

Em muitas pesquisas, como já descrito, observou-se que a dormência pode ser reduzida ou mesmo superada durante o armazenamento, o que pode propiciar o aumento dos valores de germinação e vigor. No entanto, sabe-se que durante o armazenamento o envelhecimento natural das sementes causa a redução progressiva da sua viabilidade e vigor (BEWLEY et al., 2013). A deterioração de sementes é processo irreversível e inevitável, mas é possível retardar a perda da qualidade fisiológica das sementes por meio de técnicas de colheita, secagem e armazenamento apropriadas (MCDONALD, 1999). A temperatura e a umidade do ar desfavoráveis, constituem os principais fatores que promovem a deterioração das sementes, tendo em vista que o aumento e a ação sinérgica de ambos promovem aceleração do metabolismo das sementes, reações não enzimáticas e o crescimento microbiano (BEWLEY et al., 2013). Outros fatores que interferem na qualidade de sementes armazenadas são o ambiente de armazenamento, o tipo de embalagem utilizada, a disponibilidade de oxigênio e as características próprias das espécies (TONIN e PEREZ, 2006). A atenção aos fatores que interferem na qualidade das sementes durante o armazenamento e o monitoramento da qualidade das sementes durante o armazenamento, são essenciais, para a escolha do armazenamento apropriado.

A perda da viabilidade e vigor das sementes durante o armazenamento são resultados de danos em níveis celular e molecular, como a perda da integridade de enzimas, membranas e do DNA (BAILLY, 2004; MCDONALD, 1999). As proporções de danos causados pelos processos de deterioração dependem da capacidade das sementes de reagir aos processos de deterioração, por meio de mecanismos de proteção (BAILLY, 2004; MCDONALD, 1999).

Também para que ocorra a germinação é necessária a atividade de proteínas específicas. Liu et al. (2015) identificaram as proteínas-chave para germinação de sementes de arroz. Nesse estudo, foi observado alterações no proteoma durante a embebição de sementes em diferentes condições. Foi observado alteração significativa na abundância de 121 padrões proteicos em diferentes condições; entre estas proteínas, sete proteínas especificamente associadas com a germinação de sementes e vinte proteínas de resposta a embebição, envolvidas no metabolismo energético, crescimento celular, defesa celular e proteínas de armazenamento. Isso foi possível por meio da comparação de valores de germinação com análise proteômica. Segundo Galland et al. (2014) a seletividade da tradução de RNA mensageiro e a renovação de proteínas agem como sistemas regulatórios dos eventos moleculares que levam à germinação em *Arabidopsis*, considerados fundamentais para a germinação.

Em sementes em que a germinação é limitada pela presença do endosperma, há necessidade do enfraquecimento desse tecido para que ocorra a protrusão radicular. Silva et al. (2004), observaram correlação entre aumento da atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma com o decréscimo da força requerida para o embrião romper o endosperma durante a germinação de sementes de café. Ao estudar o melhor momento para colheita de sementes Santos et al. (2015), associaram a maior expressão da enzima endo- β -mananase à maior qualidade fisiológica das sementes de pimenta habanero.

Nas sementes podem ser encontradas diferentes substâncias de reserva (carboidratos, lipídios e proteínas), a utilização dessas substâncias promove o crescimento das células do eixo embrionário por meio da ação de enzimas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

A enzima isocitrato-liase (ICL) é considerada uma enzima chave na regulação do ciclo do glioxilato e está envolvida no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes. Sua atividade aumenta durante a germinação e apresenta valores máximos quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados (BEWLEY e BLACK, 1994; NELSON e COX, 2011). Durante a germinação de sementes os triacilgliceróis são convertidos em glicose, sacarose e em uma ampla variedade de metabólitos (NELSON e COX, 2011). Outra enzima relacionada ao metabolismo de lipídios é a esterase (EST) que participa da hidrólise de ésteres

de membrana. Ao relacionar a expressão dessa enzima ao estresse hídrico em teosinto, Pedó et al. (2015) constataram aumento da intensidade e do número de bandas com a redução do potencial osmótico da solução. De acordo com os autores, o aumento na peroxidação de lipídeos provavelmente causou dano às membranas celulares afetando a vigor das sementes. Considerando que o endosperma de pimenta é rico em lipídios (BOSLAND e VOTAVA, 1999; MECKELMANN et al., 2013), a expressão enzimática dessas enzimas, atuantes no metabolismo de lipídios, é interessante pois podem ser relacionadas tanto aos altos níveis de qualidade fisiológica como ao processo de deterioração das sementes.

A proteômica têm sido uma ferramenta útil para determinar os papéis e funções biológicas das proteínas individuais e identificar os mecanismos que regem a germinação, o vigor e a viabilidade das sementes em resposta ao envelhecimento (RAJJOU e DEBEAUJON, 2012). Ao comparar o proteoma de sementes secas de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana*, com diferentes níveis de longevidade Nguyen et al. (2015), obtiveram resultados que confirmam o papel dos sistemas antioxidantes na proteção e manutenção do processo de tradução e das vias de energia, essenciais para a longevidade das sementes. Observaram ainda que a oxidação está envolvida na deterioração das sementes e ainda, que as proteínas de armazenamento amortecem a semente do estresse oxidativo protegendo as proteínas importantes e necessárias para a germinação. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) que ocorre durante a dessecação de sementes, germinação e envelhecimento, pode levar ao estresse oxidativo resultando na deterioração das sementes.

Diante disso, os mecanismos de desintoxicação são de grande importância tanto na aquisição de tolerância à dessecação como no processo germinativo e de armazenamento das sementes. Isso é possível graças à presença de enzimas desintoxicantes e compostos antioxidantes nas células, capazes de eliminar os EROS (BAILLY, 2004), levando em consideração que os EROS danificam enzimas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos quando reagem com os mesmos (NELSON e COX, 2011).

A desintoxicação de espécies reativas de oxigênio é crucial para o vigor das sementes (NGUYEN et al. 2015; RAJJOU e DEBEAUJON, 2008), atentando-se ainda se os mecanismos de desintoxicação forem comprometidos, o resultado é a morte das sementes (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008). Existem várias enzimas envolvidas no sistema antioxidante de defesa, a exemplos da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), aglutamato peroxidase (GP) e glutamato redutase (GR) (FERREIRA e BORGHETTI, 2004; NELSON e COX, 2011).

Taveira et al. (2012) observaram alteração no perfil proteico de sementes café submetido a diferentes métodos de secagem e de processamento. Consideram que a expressão de proteínas resistentes ao calor e das enzimas antioxidantes como promissoras para diferenciar a qualidade das sementes submetidas a diferentes manejos na pós-colheita. Nesse trabalho os autores, associaram a maior atividade da enzima catalase em sementes de café (processadas por via seca e secadas a 60 e a 60/40°C), com piores desempenhos fisiológicos. Já a maior expressão da peroxidase foi relacionada a melhor qualidade fisiológica, observada no café despulpado. A peroxidase contribui para o aumento dos mecanismos de defesa e prevenção de perda da qualidade, visto que a redução da sua atividade proporciona maior exposição dos sistemas de membranas aos efeitos do O₂ potencializando a oxidação (BEWLEY e BLACK, 1994).

As enzimas malato desidrogenase (MDH) e álcool desidrogenase (ADH) estão envolvidas com o processo de respiração (BEWLEY e BLACK, 1994; NELSON e COX, 2011). A MDH catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, no ciclo de Krebs, produzindo NADH, produto fundamental para a produção de ATP e de compostos intermediários, essenciais ao funcionamento das células na presença de oxigênio (NELSON e COX, 2011; TAIZ e ZEIGER, 2013). Já a ADH está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol. Com essa ação as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletéria do acetaldeído (NELSON e COX, 2011; TAIZ e ZEIGER, 2013). Tendo em vista que órgãos de reserva em desenvolvimento, como as sementes, necessitam de maior suprimento energético e conseqüentemente apresentam maior atividade respiratória, essas enzimas representam bons marcadores para verificar problemas no metabolismo respiratório das sementes com problemas de germinação (TAIZ e ZEIGER, 2013).

O estudo de proteínas tem se mostrado útil para determinar as funções biológicas das proteínas individuais e elucidar os mecanismos moleculares que regem a germinação, o vigor e a viabilidade das sementes em resposta ao envelhecimento. Diante do exposto, o estudo da expressão de enzimas em sementes de pimenta habanero, mostra-se como uma alternativa para o entendimento das mudanças na qualidade fisiológica e no estado de dormência dessas sementes durante o armazenamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos e material vegetal

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de Análise de Sementes, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Em um experimento anterior, foram formadas mudas de pimenta para produção de sementes de acordo com metodologia de Santos (2013). O plantio foi realizado na área experimental do Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Localizada na região sul de Minas Gerais, apresentando as coordenadas: latitude 21° 14' S, longitude 45° 00' W Gr. e 918 m de altitude. O clima de Lavras, pela classificação climática de Köppen, é Cwa, temperado chuvoso (mesotérmico), com inverno seco e verão chuvoso, subtropical. A precipitação anual normal é de 1.529,7 mm, sendo os maiores valores nos meses de dezembro a fevereiro (BRASIL, 1992; DANTAS, et al., 2007).

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, as mudas foram transplantadas na área experimental do setor de sementes, do Departamento de Agricultura, em área com latossolo vermelho-escuro (LE) e textura argilosa.

O solo foi preparado convencionalmente e as correções realizadas de acordo com a análise química do mesmo. A adubação de cobertura, assim como, os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com os recomendados para a cultura.

O ensaio foi instalado em delineamento de blocos casualizados (DBC) com quatro repetições, sendo que cada parcela foi constituída de duas linhas de 15 metros de comprimento com 15 plantas com espaçamento de 1,5 metros entre linhas.

Durante a fase de florescimento, as flores foram etiquetadas diariamente, no dia da antese. Os frutos foram colhidos a 70 dias após a antese e as sementes 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 foram secadas em estufa de circulação de ar a 35% até atingirem 8% de teor de água, para posterior armazenamento em câmara fria à 10°C e 40% de umidade relativa por períodos de 1 a 21 semanas em embalagens hermeticamente fechadas.

3.2 Teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa, a 105°C durante 24 horas, utilizando-se duas sub amostras de 1 grama de sementes por tratamento, conforme

as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de umidade.

3.3 Determinação da qualidade fisiológica das sementes

Sementes acondicionadas em embalagens impermeáveis, armazenadas em câmara fria à 10°C e 40% de umidade relativa por períodos de 1 a 21 semanas, foram submetidas aos testes de germinação e primeira contagem, semanalmente.

3.3.1 Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada bloco. Foram semeadas sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecido com água destilada em quantidade equivalente a três vezes o peso do papel seco e acondicionadas em caixas plásticas do tipo *gerbox* e mantidas em germinador tipo BOD com regime alternado, 16 horas a 20° C no escuro e 8 horas a 35°C em luz. As avaliações foram efetuadas aos 7 e 14 dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

3.3.2 Teste de primeira contagem

Foi realizado simultaneamente ao teste de germinação, com a contagem de plântulas normais ao sétimo dia após a semeadura. O resultado foi expresso em porcentagem (BRASIL, 2009).

3.3.3 Teste de tetrazólio

As sementes remanescentes do teste de germinação, sementes que não germinaram e não estavam mortas, foram submetidas ao teste de tetrazólio. Para isso, as sementes foram cortadas longitudinalmente e imersas em sal de tetrazólio a 0,075% durante 3,5 horas a 37°C no escuro. (LIMA et al., 2012; SANTOS et al.,2015). Após esse período, foi feita avaliação com o auxílio de microscópio estereoscópico para identificação de sementes viáveis, segundo Lima et al. (2012).

3.3.4 Análise dos resultados dos testes de germinação, primeira contagem e viabilidade

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC), com quatro repetições, sendo que cada parcela foi constituída de duas linhas de 15 metros de comprimento com 15 plantas com espaçamento de 1,5 metros entre linhas. Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico *Sisvar* (FERREIRA, 2011). As médias foram comparadas por meio do teste *Scott-Knott* (1974), a 5% de probabilidade.

3.4 Análise enzimática

Sementes armazenadas nos diferentes períodos (1 a 21 semanas), foram utilizadas para o estudo da expressão de enzimas por meio da técnica de eletroforese. Foi avaliada a expressão das enzimas catalase, esterase, isocitrato-liase, malato desidrogenase, álcool desidrogenase, peroxidase, endo- β -mananase e superóxido dismutase.

3.4.1 Análise da expressão de enzimas

Para a análise enzimática foram utilizadas duas amostras de 20 gramas de sementes para cada tratamento. As sementes foram maceradas em mortor contendo nitrogênio líquido e antioxidante PVP (Polivinil Pirrolidone) e armazenadas em *deep freezer* a -86°C até o momento da extração. Para a extração das enzimas foram aplicados aplicado 250 μl do tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8 + 0,1% de beta-mercaptoetanol). Em seguida as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas por um período de 12 horas em geladeira. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 4°C a 14000 rpm por 30 minutos. Foram aplicados 50 μL do sobrenadante no gel de corrida (gel separador – poliacrilamida 7,5% e gel concentrador – poliacrilamida 4,5%). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi de Tris glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 120 V por 5 horas. Após a eletroforese foi realizada a revelação das enzimas peroxidase (EC 1.11.1.7.), esterase (EC 3.1.1.1.), álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1.), malato desidrogenase (EC 1.1.1.37.), superóxido dismutase (EC 1.15.1.1.) e catalase (EC 1.11.1.6.) (ALFENAS et al., 2006).

3.4.2 Extração endo- β -mananase

Para a extração da enzima endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) as sementes foram trituradas em mortor contendo nitrogênio líquido e PVP (Polivinil Pirrolidone). As amostras foram divididas resultando em 100g de pó da amostra em cada microtubo, onde foram adicionados 300 μ l do tampão (0,1M HEPES e 0,5 M de NaCl, com pH 8) mais ácido ascórbico na proporção de 5mg de ácido para cada ml de tampão. A solução foi agitada em vortex por 1 minuto e centrifugada a 4° C a 10000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado ao gel confeccionado com 6ml de LBG (*locust bean gum*), 0,24g de agarose (Qbiogene) e 24 ml de tampão pH 5 (11ml de ácido cítrico 1M, 50 ml de Na₂ HPO₄ e 149 ml de água destilada). Após a solidificação do gel, o mesmo armazenado em geladeira durante 24 horas antes da aplicação da amostra. Em cada furo do gel (feitos com furador de 2mm) foram aplicados 2 μ l da amostra. Posteriormente o gel foi transferido para um germinador, a 25°C durante 21 horas, no escuro em câmara úmida. Após 21 horas em germinador, o gel foi lavado em água e em seguida em tampão (tampão do gel) por 30 minutos e depois novamente lavado em água destilada coberto com corante vermelho congo 0,5% por 30 minutos e posteriormente em etanol por 10 minutos para retirada do corante. O álcool foi removido com água e o gel foi adicionado a uma solução de 1M de Na Cl até a observação visual de halos brancos nos furos que continham a amostra. Foi feita a medida do diâmetro das amostras em duas direções, com o auxílio de um paquímetro, resultando em um valor médio.

3.4.3 Extração isocitrato-liase

Para extração da enzima isocitrato-liase (EC 4.1.3.1.) foi utilizado o tampão Tris HCl 0,2 M pH 8 + 0,1% de beta-mercaptoetanol + 0,1% de Fenilhidrazina, na proporção de 250 μ l a cada 100 gramas de sementes. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas por 2 horas na geladeira, seguido de centrifugação a 4° C a 14000 rpm por 60 minutos. Foram aplicados 50 μ L do sobrenadante, no gel de corrida constituído de gel separador (poliacrilamida 7,5%) e gel concentrador (poliacrilamida 4,5%). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi de Tris glicina pH 8,9. As corridas foram efetuadas a 120 V por 5 horas. Os géis foram revelados seguindo a metodologia de Pereira et al. (2012).

3.4.4 Análise dos resultados

Após a obtenção dos géis, a expressão enzimática, com exceção da endo- β -mananase, foi quantificada com o auxílio do programa ImageJ® (Alves et al. 2017). Para calcular a atividade da enzima endo- β -mananase foi feita uma comparação com a curva padrão gerada pela endo- β -mananase comercial de *Aspergillus niger* (Megazyme). O cálculo da atividade da enzima endo- β -mananase foi realizado segundo Downie et al. (1994). Os dados da expressão da enzima endo- β -mananase foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico *Sisvar* e as médias foram comparadas por meio do teste *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teor de água

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de teor de água entre as sementes de pimenta armazenadas nos diferentes períodos. Estas apresentaram teor de água médio de 7,9%, com variação máxima de 0,5%.

4.2 Qualidade de sementes de pimenta durante o armazenamento

Em relação as variáveis germinação, viabilidade e primeira contagem da germinação das sementes de pimenta habanero armazenadas por 21 semanas, foram observadas diferenças significativas pela análise de variância. Maiores valores de germinação e de vigor em sementes armazenadas até a 20ª semana (TABELA 1).

Houve variações significativas dos valores de germinação nos diferentes períodos de armazenamento. Embora os valores mais altos de germinação e vigor tenham sido observados em sementes armazenadas por 20ª semana, não é possível concluir que a dormência das sementes foi superada nesse período. Importante ressaltar que os testes são realizados em uma amostra de sementes que varia em relação ao estágio de maturação, mesmo considerando as sementes de um mesmo fruto.

Por meio do teste de tetrazólio foi verificado que a maioria das sementes remanescentes do teste de germinação se encontravam viáveis, o que comprova a dormência dessas sementes, fato que explica a não diferença estatística entre os percentuais de sementes remanescentes e viáveis pelo teste de tetrazólio, nos diferentes tratamentos.

Analisando os resultados considerando o somatório das sementes germinadas e daquelas remanescentes e viáveis, não foi verificada diferença estatística entre a maioria dos tratamentos, com exceção daquelas cujas sementes foram armazenadas por 11 e 17 semanas. Mesmo assim, os valores foram altos e muito próximos dos demais. A diferença observada pode ser atribuída ao baixo coeficiente de variação.

Diante dos resultados infere-se que nas sementes de pimenta habanero, quando colhidas aos 70 dias após a antese, estas apresentam dormência, o que restringe sobremaneira a germinação das sementes.

Esses dados condizem com vários trabalhos nos quais foi observada a dormência em sementes de pimenta (BOSLAND, 1999; CAIXETA, 2009; NASCIMENTO, et al., 2006; QUEIROZ et al., 2011). De acordo com Nascimento et al. (2006) o período de duração dessa dormência é relativamente curto no máximo três meses, considerando o intervalo de tempo entre a colheita das sementes e a semeadura suficiente para a quebra da dormência. Mas no presente estudo foi visto que no lote de sementes armazenadas por aproximadamente 6 meses ainda havia sementes dormentes. Isso pode ser relacionado a variação na intensidade de dormência que ocorre entre as diferentes espécies e até mesmo em sementes de uma mesma planta (VIDAVER, 1997). Vale ressaltar, que mesmo com baixas porcentagens de germinação das sementes na maioria dos tratamentos, as condições de armazenamento se mostraram adequadas levando em conta a alta porcentagem de viabilidade, independente dos períodos de armazenamento.

Diante dos resultados observados infere-se que o repouso dos frutos de pimenta habanero, colhidas após 70 dias da antese por sete dias, seguido da extração das sementes seja importante para a quebra da dormência das sementes. Santos et al. (2015) observaram maiores valores, de germinação e vigor em sementes extraídas de frutos que foram colhidos 70 dias após a antese e permaneceram em repouso por 7 dias.

Tabela 1- Primeira contagem da germinação (PCG%), germinação (G%) e viabilidade de sementes de pimenta Habanero, durante 21 semanas de armazenamento.

Semana	PCG (%)	G (%)	Sementes remanescentes e não mortas (%)	Viabilidade sementes remanescentes - TZ (%)	Total de viabilidade (G + TZ) (%)
1	30 b	51 d	49	96 a	98 a
2	21 c	33 f	67	97 a	98 a
3	20 c	34 f	66	95 a	97 a
4	22 c	45 e	55	94 a	97 a
5	18 c	37 f	63	97 a	98 a
6	16 c	37 f	63	96 a	97 a
7	21 c	39 e	61	93 a	96 a
8	19 c	36 f	64	97 a	98 a
9	28 b	50 d	50	92 a	96 a
10	30 b	53 d	47	89 a	95 a
11	16 c	27 f	73	92 a	94 b
12	36 b	58 c	42	96 a	98 a
13	32 b	60 b	40	95 a	98 a
14	28 b	48 d	52	94 a	97 a
15	20 c	36 f	64	97 a	98 a
16	30 b	57 c	43	92 a	97 a
17	21 c	42 e	58	90 a	94 b
18	20 c	44 e	56	98 a	99 a
19	28 b	47 d	53	93 a	96 a
20	54 a	80 a	20	98 a	100 a
21	34 b	55 c	45	99 a	100 a
CV(%)	8,67	12,2	-	6,8	3,04

*Medias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2018).

4.3 Avaliação da expressão enzimática em sementes de pimenta

4.3.1 Endo- β -mananase

Para a enzima endo- β -mananase, foram observados altos valores de expressão em todas as semanas de armazenamento, podemos observar que houve pouca variação na expressão em função do período de armazenamento das sementes (2,96 c.v.%) (TABELA 2). SANTOS, et al., (2015) observaram que em pimenta habanero, sementes com maiores níveis de vigor e germinação apresentavam maior expressão da enzima endo- β -mananase. Catão et al. (2014), também associaram a maior atividade da enzima com maior ocorrência de germinação, ao avaliarem a atividade da enzima durante a germinação de sementes de alface, em alta temperatura. Alves et al. (2017), associaram o aumento das expressões enzimáticas da endo-

β -mananase de acordo com o avanço dos estádios de maturação em sementes de jiló, com o aumento progressivo da qualidade fisiológica em função do processo de maturação. Caixeta (2014) e Queiroz et al., (2011), trabalhando com sementes de pimenta habanero e malagueta, colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento, observaram o aumento da expressão da enzima endo- β mananase em sementes colhidas nos estádios de desenvolvimento mais avançados que apresentavam o maior desempenho fisiológico. Na presente pesquisa, as sementes foram colhidas no seu período de maturidade fisiológica, este pode ser um dos fatores que expliquem tanto a alta expressão da enzima como a proximidade dos valores dos resultados encontrados.

Tabela 2- Dados da expressão da enzima endo- β -mananase em sementes de pimenta habanero, durante 21 semanas de armazenamento (picomol. min⁻¹. g⁻¹)

Semana	Endobeta ^{NS}
1	76,05a
2	76,25a
3	77,09a
4	74,98a
5	78,05a
6	77,59a
7	77,26a
8	77,18a
9	76,29a
10	76,98a
11	76,59a
12	77,06a
13	78,05a
14	76,68a
15	76,98a
16	77,28a
17	77,58a
18	77,89a
19	78,25a
20	78,95a
21	78,92a
CV (%)	2,96

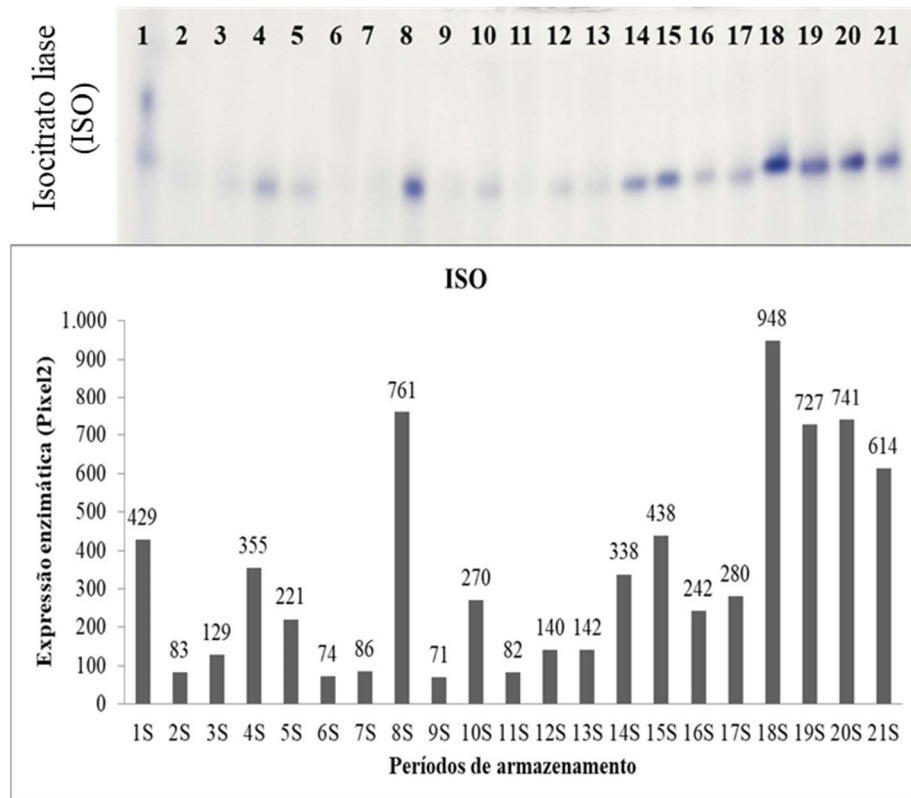
*Médias seguidas de mesma letra (na coluna) não diferem entre si, pelo teste de Scoot Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2018).

4.3.2 Isocitrato Liase

De uma maneira geral maiores níveis de atividade da enzima isocitrato liase foram observados em sementes de pimenta após a 18 semanas de armazenamento (FIGURA 1). Com exceção da atividade observada em sementes armazenadas por 8 semanas, nas quais também se observa alta atividade. Essa expressão pode ser relacionada a uma maior qualidade

das sementes, considerando os valores de germinação, tendo em vista que a isocitrato-liase é uma enzima chave na regulação do ciclo do glicoxilato, envolvida no metabolismo de lipídios e no desenvolvimento das atividades no glioxissomos (BEWLEY e BLACK, 1994). Em um estudo com pimenta habanero Santos et al. (2015), também observaram maiores valores da atividade da enzima isocitrato liase, em sementes colhidas em estádios mais tardios de maturidade quais também se observam os maiores valores de germinação.

Figura 1 - Expressões da enzima isocitrato liase (ISO) de sementes de pimenta habanero, armazenadas de 1 a 21 semanas.



Fonte: Do autor (2018)

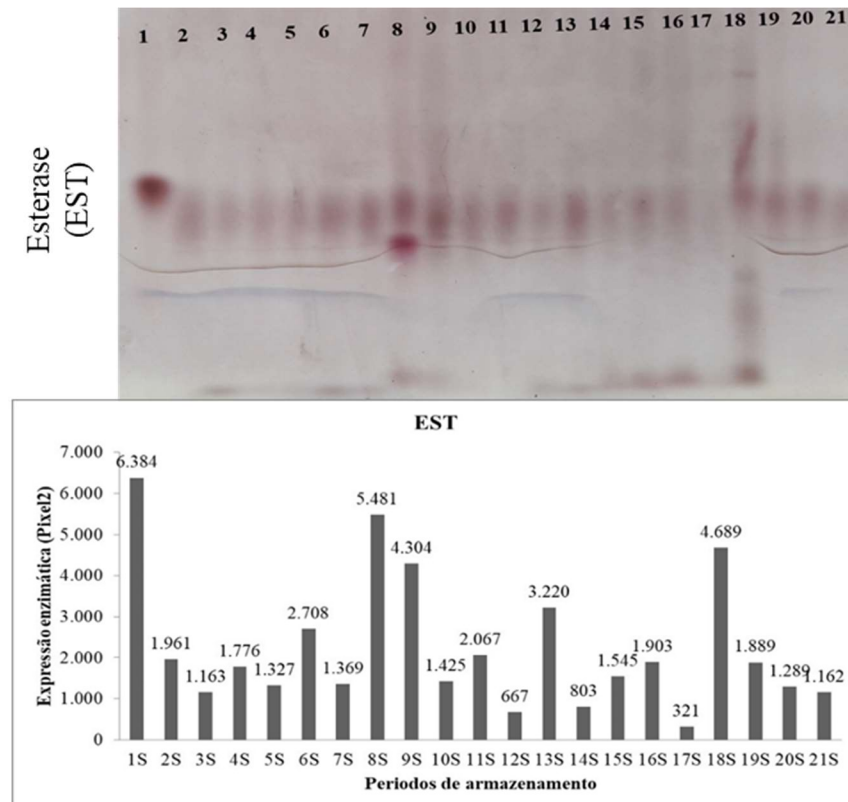
4.3.3 Esterase

Foram observados diferentes valores de atividade da enzima esterase em sementes armazenadas por diferentes períodos de armazenamento, tendo como maiores valores as sementes armazenadas por menor período, seguido daquelas armazenadas por oito semanas (FIGURA 2). Nas sementes mais imaturas tem sido observada maior atividade da enzima, o que pode explicar o resultado observado em sementes e armazenadas por uma semana. Durante a germinação de sementes, os triacilgliceróis são convertidos em glicose, sacarose e em uma ampla variedade de metabólitos essenciais e energia. A primeira etapa para a respiração dos lipídios é a hidrólise pelas lipases (RAVEN et al., 2014; TAIZ e ZEIGER,

2013). Contudo, as sementes que apresentaram maiores porcentagens de germinação e primeira contagem não apresentaram valores elevados de atividade da lipase estudada. Santos et al. (2015) observaram maior atividade da enzima em sementes de pimenta habanero, em estádios mais avançados de maturação quando apresentavam maiores valores de germinação e vigor. Já Caixeta (2009) relacionou a maior atividade da enzima, em sementes de pimenta habanero com maior período de armazenamento e com a deterioração das sementes ao longo do armazenamento.

Alves et al. (2017) constatou que sementes de jiló mais imaturas continham maiores teores de lipídeos que foram reduzidos com o avanço do processo de maturação. Comparando estes resultados com a expressão da enzima esterase, concluíram que quanto maior o teor de lipídios, maior será a expressão da enzima esterase. As maiores expressões dessa enzima ocorreram em sementes com menores percentuais de germinação e emergência. Em acordo com a baixa expressão observada na semana 20 de armazenamento, onde foi obtido maiores valores germinação e primeira contagem, nesta pesquisa (TABELA 1).

Figura 2 - Expressões da enzima esterase (EST) em sementes de pimenta habanero, armazenadas de 1 a 21 semanas.

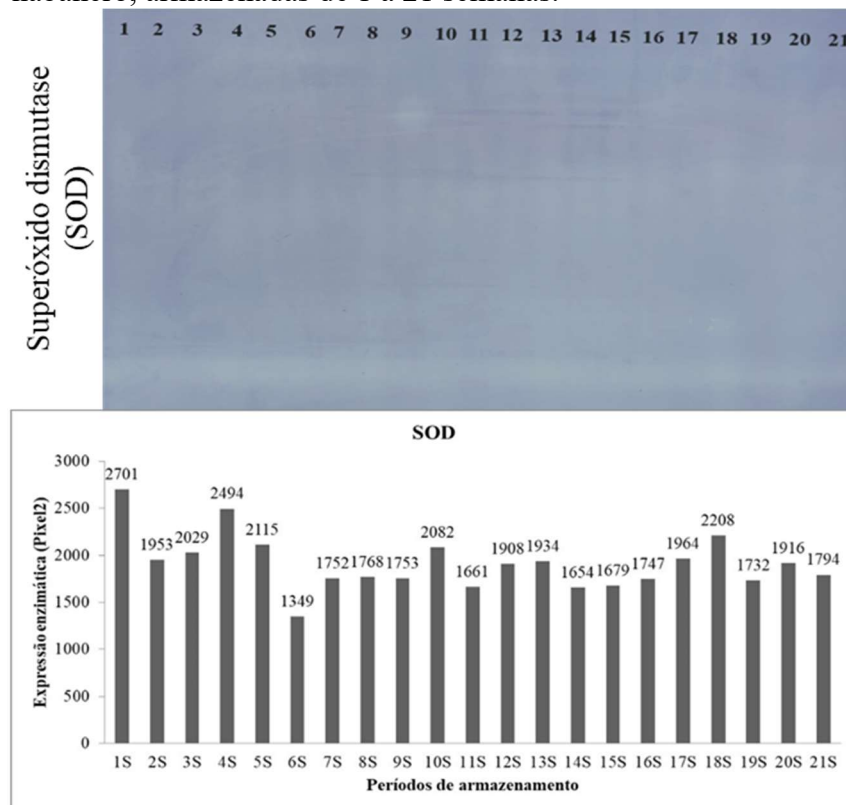


Fonte: Do autor (2018)

4.3.4 Superóxido desmutase

Foram observadas variações da atividade da enzima superóxido dismutase em sementes de pimenta habanero armazenadas em diferentes períodos de armazenamento (FIGURA 3). O maior valor da atividade dessa enzima foi observado em sementes armazenadas por 1 semana, o que também foi observado para a enzima esterase. Para os demais tratamentos não foi possível associar a atividade dessa enzima com as outras variáveis. O principal papel da SOD é transformar o superóxido em peróxido de hidrogênio na célula, enquanto a catalase (CAT) decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água, sem a produção de radicais livres (MARCOS FILHO, 2015). São importantes as manutenções da atividade das isoenzimas dos sistemas antioxidantes, como a SOD, pois atuam na remoção de espécies reativas de oxigênio que podem causar danos celulares e afetar a qualidade das sementes (BAILLY, 2004).

Figura 3 - Expressões da enzima superóxido dismutase (SOD) de sementes de pimenta habanero, armazenadas de 1 a 21 semanas.



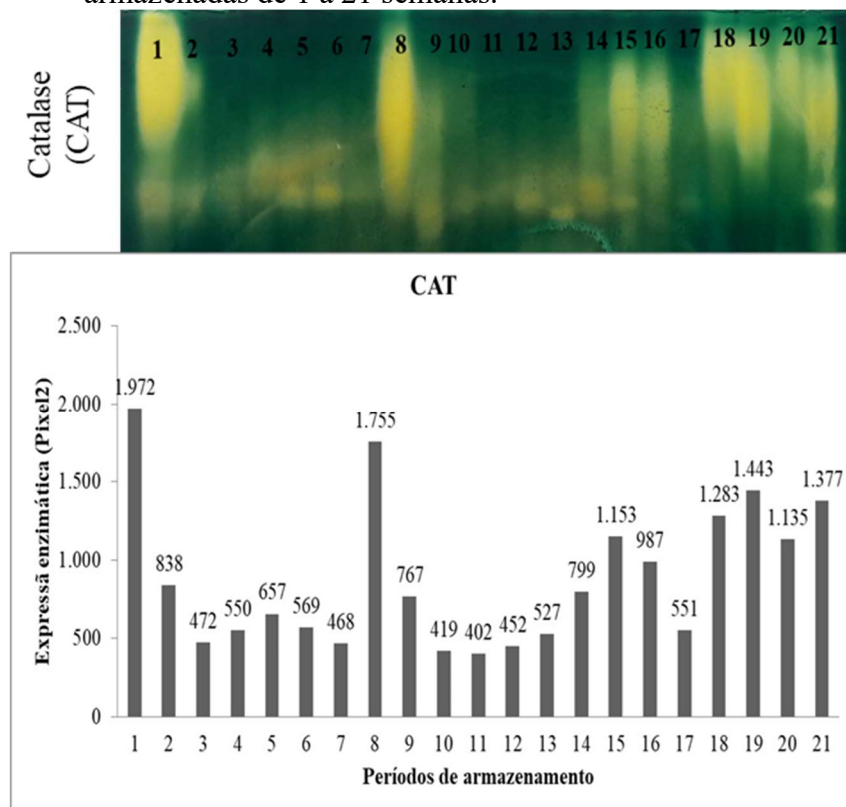
Fonte: Do autor (2018)

4.3.5 Catalase

A enzima catalase (CAT), está envolvida nos processos de remoção de radicais livres, sua função é catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O), protegendo as células de danos oxidativos (NELSON e COX, 2014). Na presente pesquisa houve variação da atividade da enzima catalase nas sementes armazenadas.

Como observado para as atividades da EST e SOD também foi verificado maior valor bruto de atividade da enzima catalase em sementes recém armazenadas. Com exceção da atividade, observada em sementes armazenadas por oito semanas, após uma semana de armazenamento houve reduções da atividade da enzima em sementes armazenadas até a 21ª semana (FIGURA 4). Após este período houve aumento da atividade da enzima. Vidigal et al., (2009), observaram maior expressão em sementes de pimenta extraídas em estádios mais avançados de maturação e com qualidade fisiológica superior. Em algumas pesquisas tem sido observada maior expressão dessa enzima em sementes imaturas, às quais estão sujeitas à maior oxidação (ALVES et al., 2007) e em sementes armazenadas por mais tempo o aumenta a probabilidade de ocorrência de mais oxidação.

Figura 4 - Expressões da enzima catalase (CAT) de sementes de pimenta habanero, armazenadas de 1 a 21 semanas.



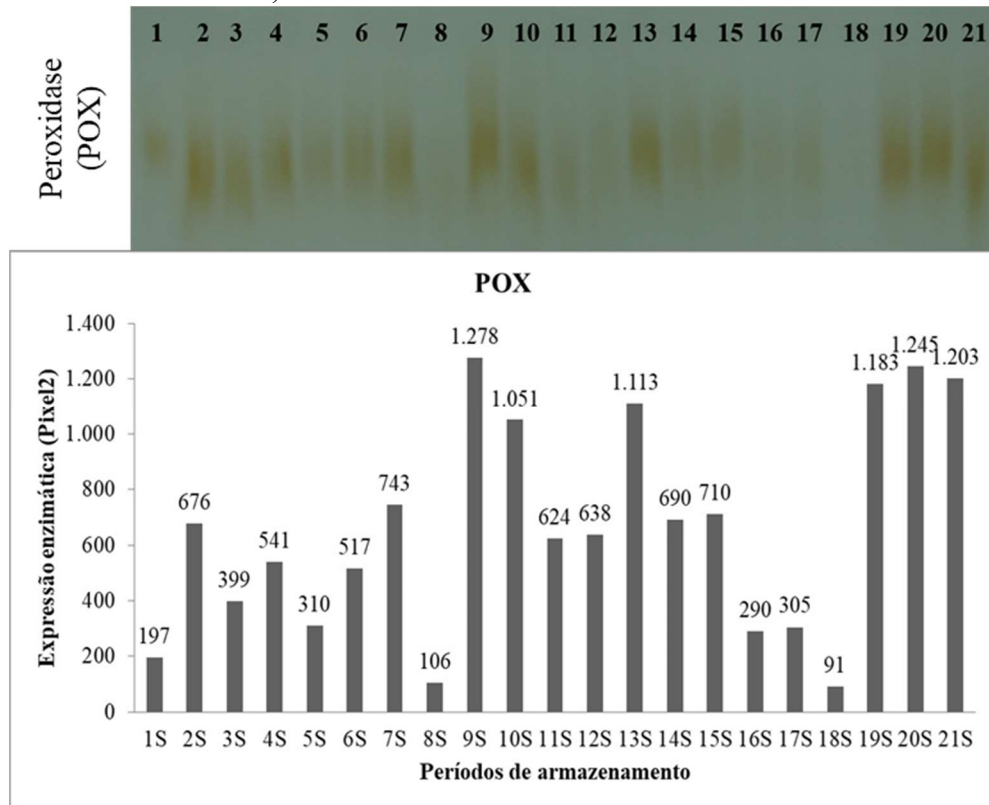
Fonte: Do autor (2018)

4.3.6 Peroxidase

Para a enzima peroxidase houve variação da expressão em sementes armazenadas por diferentes períodos. Não sendo possível associá-la a qualidade fisiológica.

Carvalho et al. (2014) também relacionou a melhor qualidade fisiológica de sementes de soja durante o armazenamento a altos níveis de atividade da enzima. Já Alves et al. (2017) observou maior atividade da POX em sementes com pior desempenho fisiológico em jiló. Na presente pesquisa a menor atividade dessa enzima foi observada em sementes armazenadas uma, oito e dezoito semanas.

Figura 5 - Expressões da enzima peroxidase (POX) de sementes de pimenta habanero, armazenadas de 1 a 21 semanas.



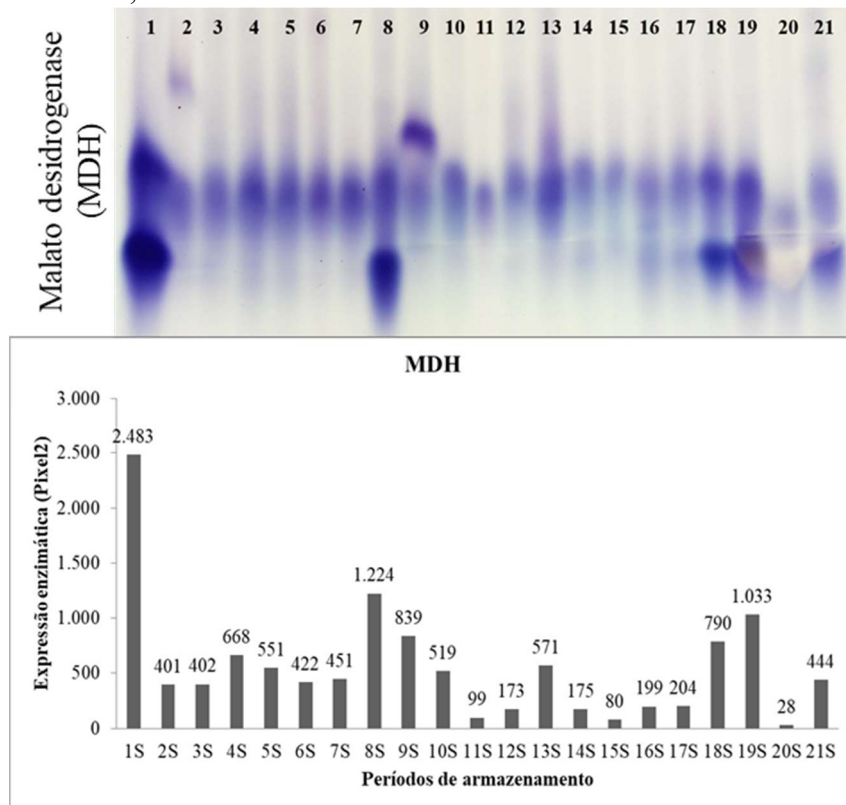
Fonte: Do autor (2018)

4.3.7 Malato Desidrogenase

Para a enzima malato desidrogenase (MDH), houve maiores valores da atividade em sementes armazenadas por 1, 8 e 19 semanas (FIGURA 6). Em um estudo com soja, Carvalho et al. (2014) observaram que a atividade da enzima se manteve elevada durante o armazenamento, sendo relacionada com a manutenção da qualidade durante o armazenamento. Em contrapartida, Alves et al. (2017), observou alta expressão da MDH em

sementes com pior qualidade fisiológica (sementes imaturas). Os autores salientaram que no início do desenvolvimento das sementes, há maior teor de água, aumento de massa seca e alta atividade respiratória. Já em sementes mais maduras há menor teor de água, estabilização do acúmulo de matéria seca e a semente apresenta menor atividade respiratória e metabólica. Segundo Santos et al. (2005), há aumento da respiração nas sementes que se encontram em processo de deterioração e as enzimas envolvidas na respiração, como a ADH e a MDH, podem estar associadas à menor qualidade fisiológica. Na presente pesquisa maior atividade dessa enzima foi observada principalmente em sementes armazenadas por menor período de armazenamento (1 semana).

Figura 6 - Expressões da enzima malato desidrogenase (MDH) de sementes de pimenta habanero, armazenadas de 1 a 21 semanas.



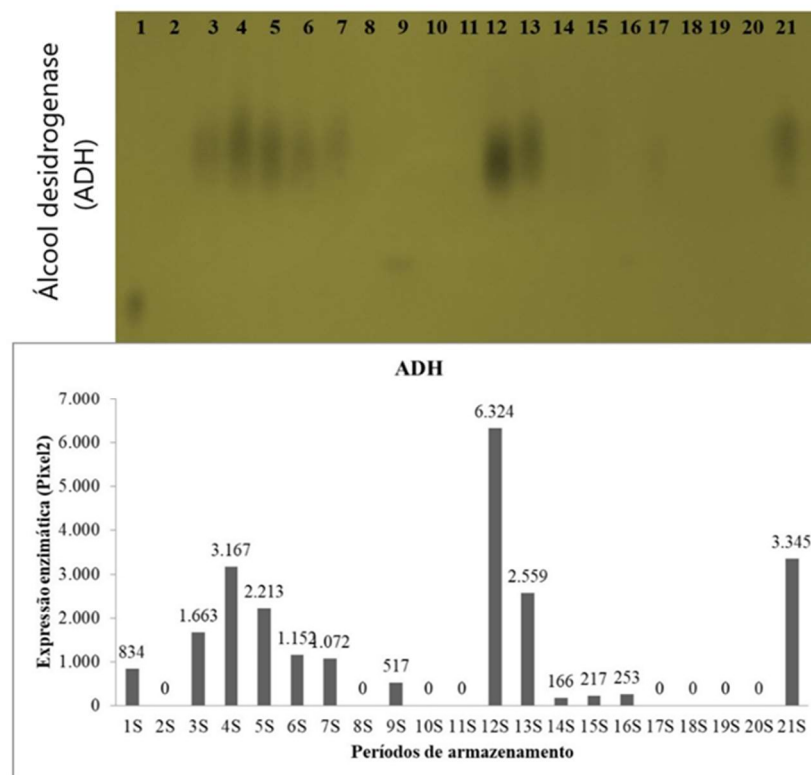
Fonte: Do autor (2018)

4.3.8 Álcool desidrogenase

Os maiores valores da expressão da enzima ADH foram observados em sementes armazenada 12, 21, 4 semanas (FIGURA 7). Para as sementes de pimenta, não foi identificada a expressão dessa enzima em sementes armazenadas por 2, 8, 10, 11, 18, 19 e 20 semanas. A ADH está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol (NELSON e COX, 2014; TAIZ e ZEIGER, 2013). O acetaldeído acelera a deterioração das

sementes. Com a atividade da ADH, as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletéria deste composto, que é maior quando comparada a do etanol (NELSON e COX, 2014; VEIGA et al., 2010). Carvalho et al. (2014) relacionaram a atividade dessa enzima em sementes de soja à manutenção da qualidade fisiológica, durante o armazenamento, em contrapartida, Alves et al. (2017) relacionaram a maior expressão da enzima ADH à sementes imaturas e com pior desempenho fisiológico em sementes de jiló. Já Santos et al. (2015), associaram aumento da expressão da enzima à sementes de pimenta habanero com maiores valores de germinação e vigor.

Figura 7- Expressões da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de pimenta habanero, armazenadas de 1 a 21 semanas.



Fonte: Do autor (2018)

5 CONCLUSÕES

Há dormência em sementes de pimenta habanero colhidas aos 70 dias após a antese, durante o armazenamento.

As melhores porcentagens de germinação e de primeira contagem de germinação foram observadas em sementes armazenadas por 20 semanas.

As atividades das enzimas isocitrato liase, esterase, peroxidase, catalase, malato desidrogenase e álcool desidrogenase variam em sementes de pimenta armazenadas por diferentes períodos.

Não houve variação significativa da expressão da enzima endo- β -mananase em sementes armazenadas por diferentes períodos.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 627p. 2006.
- ALVAREZ-PARRILLA, E. et al. Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. **Food Chemistry**. v. 133, n. 3, 827-834p. 2012.
- ALVES, M. V. P., et al. Physiological and Biochemical Characterization of Jiló Seeds (*Solanum gilo*) in Different Harvest Times. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 10, 2569-2595p. 2017.
- BAILLY, C. Research Review, Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Science Research**. v. 14, 93–107p. 2004.
- BARBOSA, R.I. et al. Morphometric patterns and preferential uses of Capsicum peppers in the State of Roraima, Brazilian Amazonia. **Horticultura Brasileira**, 28(4): 477-482 p. 2010.
- BARD, G. C. V., et al. Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. **Peptide Science**. v. 102, n. 4, 335-343 p. 2014.
- BARD, G. C. V., et al. Characterization of peptides from *Capsicum annuum* hybrid seeds with inhibitory activity against α -Amylase, serine proteinases and fungi. **The Protein Journal**. New York, v. 34, n. 2, 122-129p. 2015.
- 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, 1-16 p. 2004.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 9, p. 1055-1066, 1997.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: **Plenum**, 445p. 1994.
- BEWLEY, J. D., et al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. **Springer**. 3 ed. 392p. 2013.
- BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice Capsicums**. **Science in Horticulture**. Wallingford, 204p. 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Meteorologia. Normais climatológicas: 1961-1990. Brasília, 84 p. 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ ACS, 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. **Alterações fisiológicas e bioquímicas durante desenvolvimento, germinação e armazenamento em sementes de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) e habanero yellow (*Capsicum chinenses*)**. Trabalho de Conclusão de curso (Tese) Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 98p. 2009.

CANTO-FINCK, A. et al. Capsaicinoids Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest Known Cultivars. **HortScience**. v. 43, n. 5, 1344-1349p. 2008.

CARVALHO, E. R.; et al. Enzyme activity in soybean seeds produced under foliar application of manganese. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, 317-327p. 2014.

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

CATÃO, H.C.R.M. et al. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de alface em diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 49, n. 4, 316-322p. 2014.

CHIOU, K. L.; HASTORF, C. A. A systematic approach to species-level identification of chile pepper (*Capsicum* spp.) seeds: establishing the groundwork for tracking the domestication and movement of chile peppers through the Americas and beyond. **Economic Botany**. New York, v. 68, n. 3, 316-336p. 2014.

DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, 1862-1866p. 2007.

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

DIAS, G. B. et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. **The protein journal**. New York, v. 32, n.1, 15-26p. 2012.

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

FERREIRA A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, BR: Artmed, 323p. 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, 1039-1042p. 2011.

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

FINKELSTEIN, R., et al. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual review of plant biology**, 59p. 2008.

GALLAND, M. et al. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during Arabidopsis seed germination. **Molecular & Cellular Proteomics**. 13(1): 252-268p. 2014.

GARCÍA, C. C. et al. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Annals of botany**. v. 118, n. 1, 35-51p. 2016.

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

JUDD, W.S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 632p. 2009.

JUSTINO, E. V. et al. Determinação da maturidade fisiológica de sementes de pimenta dedo-de-moça. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 3, 2015.

KUCERA, B. et al. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 15, p. 281-307, 2005.

LIMA, A. C. et al. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade de sementes de pimenta Habanero (*Capsicum chinenses* Jacqum). In: **XXV Congresso de Iniciação Científica da UFLA**. Lavras, 2012.

LIU, Shu-Jun, et al. A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. **Physiologia plantarum**. v. 154, n. 1, 142-161p. 2015.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 659 p. 2015.

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

MECKELMANN, S. W. et al. Compositional characterization of native Peruvian chili peppers (*Capsicum* spp.). **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 61, n. 10, 2530-2537p. 2013.

MEDINA- JUÁREZ, L. A. et al. Antioxdant activity of peppers (*Capsicum annuum* L.) extracts and characterization of their phenolic. **Interciencia**. Caracas, v. 37, n. 8, 588-593p. 2012.

NASCIMENTO, W. M. et al. Produção de sementes de pimentas. **Informe Agropecuário, Epamig**. Belo Horizonte, v. 27, n. 235, 30-39p. 2006. In: PINTO, C.M.F.; SILVA, D.J.H. (ed.) Cultivo da pimenta. **Informe Agropecuário, Epamig**. Belo Horizonte, v. 27, n. 235, 108p. 2006.

- NASCIMENTO, W.M. Mercado de sementes de pimentas no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DO AGRONEGÓCIO PIMENTAS (*Capsicum* spp.), Anais. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 9p. 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico]. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 1250p. 2011.
- NGUYEN, Thu-Phuong et al. A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. **Journal of experimental botany**. v. 66, n. 20, 6399-6413p. 2015.
- OLIVEIRA, G. E. et al. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 37, n. 1, 40-48p. 2013.
- PEDÓ, T. et al. Desempenho de sementes, vigor e expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob efeito da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 13, n. 1, 5-9p. 2015.
- PEREIRA, R.W. Expressão da enzima isocitrato liase em sementes de pimenta habanero (*Capsicum chinense* Jacquin) colhidas em diferentes estádios de desenvolvimento. In: **Congresso de Iniciação Científica, UFLA**. Lavras, 2012.
- PINTO, C.M.F.; SILVA, D.J.H. (ed.) Cultivo da pimenta. **Informe Agropecuário, Epamig**. Belo Horizonte, v. 27, n. 235, 108p. 2006.
- PEREIRA, I.S., et al. Validação de marcadores moleculares associados à pungência em pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 33, 189-195p. 2015.
- PERRY, L. et al. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Science**, v. 315, n. 5814, 986-988p. 2007.
- QUEIROZ, L. A. F. **Estádio de maturação e secagem na qualidade fisiológica de sementes de pimentas Habanero Yellow (*Capsicum chinense* Jacquin) e malagueta (*Capsicum frutescens* L.)**. Trabalho de Conclusão de curso (Tese) Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 86p. 2009.
- QUEIROZ, L. A. F. et al. Época de colheita e secagem na qualidade de sementes de pimenta Habanero Yellow. **Rev. Bras. Sementes**. Londrina, v. 33, n. 3, 472-481p. 2011.
- RAJJOU, L.; DEBEAUJON I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **C. R. Biologies**. v. 331, 796-806p. 2008.
- RIBEIRO, C.S.C. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Genética e melhoramento. In: RIBEIRO, C.S.C., LOPES, C.A., CARVALHO, S.I.C., HENZ, G.P. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Ed.). **Pimentas Capsicum**. Brasília: **Embrapa Hortaliças**. 55-69p. 2008.
- RIBEIRO, F. et al. New small proteinase inhibitors from *Capsicum annuum* seeds: characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. **Peptide Science**. v. 100, n. 2, 132-140p. 2013.

- RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D.C.S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado de pimenta. **Informe Agropecuário, Epamig**. Belo Horizonte, v. 27, n. 235, 7-15p. 2006. In: PINTO, C.M.F.; SILVA, D.J.H. (ed.) & Cultivo da pimenta. **Informe Agropecuário, Epamig**. Belo Horizonte, v. 27, n. 235, 108p. 2006.
- SANTOS, H. O. **Qualidade fisiológica e expressão de genes durante o desenvolvimento de sementes de pimenta habanero (*Capsicum chinense* Jacquin)**. Trabalho de Conclusão de curso (Tese) Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 70p. 2013.
- SANTOS, H. O., et al. Physiological quality and gene expression during the development of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacquin) seeds. **Genetics and Molecular Research**. v. 14, n. 2, 5085-5098p. 2015.
- SILVA, E. A. A. et al. abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, 251-261p. 2004.
- SILVA, L. R. et al. Chemical assessment and antioxidant capacity of pepper (*Capsicum annum* L.) seeds. **Food and Chemical Toxicology**. n. 53, 240-248p. 2012.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG III**. 3° ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da flora, 768p. 2012.
- TAVEIRA, J. H.S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 47, n. 10, 1511-1517p. 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, BR: Artmed, 954 p. 2013.
- TONIN, G. A.; PEREZ, S. C. J. G. A. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocotea porosa* (Nees et Martius ex. Nees) após diferentes condições de armazenamento e semeadura. **Revista Brasileira de sementes**. 2006.
- VEIGA, A. D. et al. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, 953-960P. 2010.
- VIDAVER, W. Light and seed germination. In: KLAN, A.A. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam, **North Holland Publishing Co.**, 181-98p. 1997.
- VIDIGAL, D.S., et al. Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, 87-93p. 2006.