**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Maturação e caracterização morfoanatômica, fisiológica e
bioquímica de sementes de pimentão**

Cristiane de Carvalho

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2014**

**Cristiane de Carvalho
Engenheira Agrônoma**

**Maturação e caracterização morfoanatômica, fisiológica e bioquímica de
sementes de pimentão**

Orientador:
Profa. Dra. **ANA DIONISIA DA LUZ COELHO NOVEMBRE**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Carvalho, Cristiane de

Maturação e caracterização morfoanatômica, fisiológica e bioquímica de sementes de pimentão / Cristiane de Carvalho.- - Piracicaba, 2014.
137 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Capsicum annuum* 2. Citometria de fluxo 3. Endo-beta-mananase 4. Testes histoquímicos I. Título

CDD 635.643
C331m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

DEDICO

Aos meus pais, Cristina e Rubens

pela compreensão, incentivo e amor incondicional.

OFEREÇO

À minha avó Yolanda (in memoriam),

*pela ajuda em toda essa jornada,
por todo amor e carinho.*

Saudades.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), pela minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida em todo o período de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa “sanduíche” concedida

À professora Dra. Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre pela orientação de doutorado e de mestrado, por todos os ensinamentos e pela amizade.

A professora Dra. Elwira Śliwińska que orientou e colaborou com a parte do projeto que foi realizada na Polônia e a biotecnologista Agata Stanecka que ajudou com a condução do trabalho no citômetro de fluxo e a todos os alunos e funcionárias do laboratório pela amizade: Monika, Beata, Iwona, Anna, Kamil, Dorota Ula.

Ao professor Dr. Francisco André Ossamu Tanaka, que gentilmente cedeu toda a estrutura do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária para a confecção e avaliação das lâminas de microscopia, pela ajuda na avaliação das imagens, pelas sugestões na redação da tese e pela grande amizade.

Ao professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo que cedeu o laboratório e reagentes para que fossem feitas as análises enzimáticas e à Dra. Salete Aparecida Gaziola que ajudou nas análises enzimáticas.

À professora Dra. Beatriz Apezatto da Glória e Marli Kasue Misaki Soares pelas sugestões dadas aos testes histoquímicos e pela cessão dos corantes para a realização dos testes.

À professora Simone da Costa Mello que cedeu o campo para o plantio dos pimentões e aos funcionários Gaudencio Stênico, Gerson Alexandre de Almeida e José Nilvaldo dos Santos pela ajuda na condução no campo e pela amizade.

À Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes pela ajuda com as análises de sanidade das sementes.

Ao Dr. Marcos José Trevisan e a todos do laboratório de Pós-Colheita de Plantas Hortícolas pela ajuda com as análises no colorímetro.

Aos professores Antonio Ismael Inácio Cardoso, Beatriz Apezatto da Glória e Paulo Cesar Tavares de Melo pela grande contribuição no exame de qualificação.

À Luciane Aparecida Lopes Toledo, secretária do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, que sempre ajuda a todos com o sorriso no rosto.

Aos professores Silvio Moure Cícero e Julio Marcos Filho que sempre estiveram presentes em todos os momentos da pós-graduação, contribuindo com conselhos e ensinamentos durante as disciplinas.

Aos funcionários do laboratório de Tecnologia de Sementes Helena Maria Pescarin Chamma, Adilson de Jesus Teixeira, João Elias Jabour, Francisco Guilhien Junior, Zezé e Ivani, que sempre estavam prontos para ajudar e pela grande amizade.

Ao professor Dr. Augusto Tulmann Neto que me apresentou e introduziu na vida acadêmica e aos funcionários do Laboratório de Melhoramentos de Plantas I Benedita Inês Franco Possignolo Rodrigues, Paulo Cassieri Neto e José Benedito Alves pela grande amizade e carinho.

Ao meu grande amigo Victor Augusto Forti que sempre esteve presente, desde a graduação, sempre ajudando, dando conselhos e companheiro de viagens, de “sanduíche”.

À toda galera do laboratório de Tecnologia de Sementes que estavam sempre prontos para ajudar, colaborar, dar um conselho, uma dica e pela amizade.

Aos amigos da graduação e aos novos amigos que sempre estavam presentes, perto ou longe: Luciane (Atenas), Heloísa, Daninhas, Tati, 51, Habib, Papita.

À todos os amigos da pensão, atuais e antigos.

À todos da orquestra ESALQ e à Maestrina Cintia Maria Annichino Pinotti que me proporcionaram momentos mais alegres durante o final do doutorado.

Ao Cícero Grangeiro de Oliveira, por sempre estar presente, por sempre tentar ajudar, pela compreensão, amor, companheirismo e amizade.

A todos os amigos, familiares e desconhecidos que ajudaram de alguma forma para que essa tese pudesse ser conduzida e publicada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Maturação	15
2.2 Morfologia das sementes	18
2.3 Presença de substâncias de reserva e da atividade da enzima endo- β -mananase	18
2.4 Avaliação do ciclo celular pela citometria de fluxo	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Tamanho, massa e coloração dos frutos.....	30
3.2 Grau de umidade e massa de matéria seca das sementes.....	32
3.3 Germinação.....	32
3.4 Raios X.....	32
3.5 Emergência e índice de velocidade de emergência da plântula.....	35
3.6 Teste de condutividade elétrica	35
3.7 Teste de Envelhecimento acelerado	35
3.8 Atividade da enzima endo- β -mananase	35
3.9 Análises histoquímicas	37
3.9.1 Verificação de metacromasia	38
3.9.2 Verificação de compostos fenólicos	38
3.9.3 Verificação de polissacarídeos	39
3.9.3 Verificação de lipídios.....	39
3.9.5 Verificação de radicais catiônicos proteicos	39
3.10 Determinação da quantidade de DNA	40
3.11 Análise estatística	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Avaliação dos frutos	43
4.2 Avaliação das sementes frescas	46
4.2.1 Avaliação do teor de água, germinação e massa de matéria seca	46
4.2.2 Avaliação de imagens de raios X	48

4.3 Avaliação das sementes secas.....	53
4.3.1 Primeira época.....	53
4.3.1.1 Avaliação da viabilidade e do vigor.....	53
4.3.1.2 Avaliação de imagens de raios X.....	56
4.3.1.3 Avaliação da atividade da enzima endo- β -mananase	64
4.3.1.4 Testes histoquímicos	65
4.3.2 Segunda época.....	74
4.3.2.1 Avaliação da viabilidade e do vigor.....	74
4.3.2.2 Avaliação de imagens de raios X.....	77
4.3.3 Terceira época.....	79
4.3.3.1 Avaliação da viabilidade e do vigor.....	79
4.3.3.2 Avaliação de imagens de raios X.....	80
4.3.4 Quarta época	84
4.3.4.1 Avaliação da viabilidade e do vigor.....	84
4.3.4.2 Avaliação de imagens de raios X.....	86
4.3.4.3 Avaliação da atividade da enzima endo- β -mananase	88
4.3.4.4 Testes histoquímicos	89
4.3.4.5 Avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo	96
5 DISCUSSÃO.....	101
5.1 Avaliação da viabilidade e do vigor.....	101
5.2 Raios X e o parâmetro fisiológico das sementes	103
5.3 Atividade da endo- β -mananase e o parâmetro fisiológico das sementes.....	104
5.4 Testes histoquímicos e o parâmetro fisiológico das sementes	106
5.5 A quantidade de DNA, tolerância à desidratação, maturidade fisiológica eo parâmetro fisiológico das sementes	107
5.6 A influência do repouso do frutono parâmetro fisiológico das sementes	111
5.7 A influencia do armazenamento no parâmetro fisiológico das sementes	119
6 CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS	125

RESUMO

Maturação e caracterização morfoanatômica, fisiológica e bioquímica de sementes de pimentão

Durante a maturação da semente, a partir da fertilização do óvulo, há alterações inerentes à formação da semente, com destaque para as variações do tamanho, do teor de água, das massas da matéria fresca e seca e da germinação das sementes. Paralelamente, para os frutos carnosos há alterações visíveis nos frutos relacionados à forma, à cor e à senescência. Não há, todavia, relatos de quais mudanças (morfológica, anatômica, fisiológica e bioquímica) ocorrem nas sementes que se desenvolvem no interior de frutos carnosos mantidos em repouso por diferentes períodos de tempo. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a fase final da formação das sementes de pimentão, considerando as variações da morfologia externa dos frutos e do parâmetro fisiológico, da morfologia interna, da enzima endo- β -mananase, da anatomia e do acúmulo de substâncias de reservas e do ciclo celular das sementes, visando verificar se essas mudanças explicam as alterações fisiológicas das sementes de pimentão após o repouso pós-colheita do fruto e durante o armazenamento das sementes. As sementes foram extraídas de frutos em diferentes estádios de maturação, (cores verde, verde-avermelhada e vermelha), mantidos em repouso por 3, 7 ou 14 dias ou sem repouso, e avaliadas logo após a colheita e durante o armazenamento. Os frutos foram avaliados quanto à coloração, dimensões e massa. As sementes foram avaliadas quanto ao teor de água, massa de matéria seca, massa de 1000 sementes, germinação e vigor, além da avaliação de imagens de raios X para o estudo da morfologia interna das sementes, da atividade da enzima endo- β -mananase pelo método da difusão em gel, análises histoquímicas para o estudo da anatomia e de substâncias de reserva e a avaliação do ciclo celular. A colheita das sementes de pimentão pode ser caracterizada pela coloração dos frutos. Em função do repouso há alteração da cor do fruto, do ciclo celular das sementes hidratadas, da atividade da enzima endo- β -mananase e de algumas substâncias de reserva, interferindo positivamente na qualidade das sementes de pimentão. Entretanto, o repouso de frutos, que estão em estágio avançado de desenvolvimento, causa redução da qualidade das sementes. O teor de água, a massa de matéria seca e a morfologia interna da semente, a anatomia das células do endosperma e a presença de substâncias de reservas das sementes não são alterados durante o repouso do fruto, mas estão relacionados ao estágio de formação das sementes. Na medida em que há a deterioração natural das sementes durante o armazenamento, há redução da germinação e do vigor, da atividade da endo- β -mananase, da quantidade de lipídios, proteínas e polissacarídeos das células do embrião e do endosperma. Durante o repouso do fruto por 14 dias, as sementes extraídas de frutos verdes têm tolerância à desidratação, caracterizada principalmente pelo aumento da germinação após a secagem das sementes. A maturidade fisiológica das sementes é caracterizada pela coloração verde-avermelhada dos frutos e também pela estabilização do teor de água das sementes (30%), pela quantidade de matéria seca e pelo conteúdo de DNA 4C; não há coincidência entre maturidade fisiológica e máxima germinação.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*; Citometria de fluxo; Endo-beta-mananase; Testes histoquímicos

ABSTRACT

Bell pepper fruit maturation and morpho-anatomical, physiological and biochemical characterization of the seeds

During seed maturation there are some significant alterations in seed size, moisture content, fresh and dry matter and germination. Furthermore, for fleshy fruits, visible alterations occur as the fruit shape, color and senescence. There are not reports about which morphological, anatomical, physiological and biochemical alterations occur in seeds that develop inside fleshy fruits during the rest of them, for different periods of time. The objective of this research was to evaluate the final stage of the bell pepper seed formation and it was considered the variations of the external morphology of the fruit, and the physiological parameter, internal morphology, activity of endo- β -mannanase, anatomy and the reserve substances accumulation, and cell cycle of the seeds to verify if these changes explain the physiological changes of the bell pepper seeds after the fruit resting and during the seed storage. The seeds were extracted from fruits at different maturation stages (colors green, reddish-green and red), with (3, 7 or 14 days) or without fruit resting, and during the seed storage. The fruits were evaluated by color, and the measurements and weight. The seeds were evaluated for moisture content, dry mass, mass of 1000 seeds, germination and vigor and X-ray imaging to study the internal morphology of the seeds, endo- β -mannanase activity by gel diffusion assay, histochemical analyzes to study seed anatomy and reserve substances, and flow cytometry to assess the cell cycle. The harvest of bell peppers seeds can be made by the color of the fruits. The fruit resting alters the fruit color, germination, vigor, endo- β -mannanase activity, some storage substances and cell cycle improving bell pepper seed quality. However it has a negative role when the fruits are in advanced stage of development (red fruits and resting time more than 7 days). The moisture content, dry matter and the internal morphology of the seeds do not change by the fruit resting, but because of the seed maturation stage. It was observed reduction of all the physiological parameters, including the amount of lipids in the cells and endo- β -mannanase activity. During fruit resting, the endo- β -mannanase activity and the 4C DNA content of the cells decrease and there is an increased rate of germination and vigor. The water content, dry matter, internal morphology and anatomy of the cells of the endosperm and the presence of reserves substances in the seeds are not changed due to the rest of the fruit, but are related to the seed formation stage. There is natural seed deterioration during storage and a reduction of germination and vigor, endo- β -mannanase activity, amount of lipids, proteins and polysaccharides in the embryo and endosperm cells. During the fruit resting (14 days), the seeds extracted from green fruits have desiccation tolerance, characterized by increased of the seed germination after drying. The physiological maturity is reached when the fruits are reddish-green, characterized by stabilizing the water content of the seeds (30 %), amount of dry matter and the 4C DNA content. There is not a coincidence between physiological maturity and maximum germination.

Keywords: *Capsicum annuum*; Flow citometry; Endo-beta-mannanase; Histochemical tests

1 INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma solanácea perene, porém cultivada como planta anual. É planta autógama, embora haja cruzamento em função da ação de insetos polinizadores. O fruto é uma baga oca, de formato alongado ou cúbico. Os frutos maduros têm coloração vermelha, amarela, ou de outras cores, quando maduro (FILGUEIRA, 2008).

A propagação da planta é exclusivamente sexuada e, conseqüentemente, a qualidade das sementes utilizadas é fundamental.

No Brasil, em 2009, foram produzidas pouco mais de 4 toneladas de sementes de pimentão, entre híbridos e variedades, totalizando uma área de mais de 10 mil hectares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS - ABCSEM, 2009). Em 2010 o gasto com sementes para a produção do fruto foi de R\$18,1 milhões, o que representa menos de 2% do custo de produção do pimentão (ABCSEM, 2010).

O rendimento de sementes de *Capsicum* spp. é variável em função do clima, do solo, do manejo da cultura, do cultivar e da espécie, se é do tipo pungente ou doce. Os tipos pungentes geralmente são mais produtivos do que os doces (GEORGE, 1985).

Para a obtenção das sementes é fundamental estabelecer o momento adequado de colheita dos frutos. A colheita precoce reduzirá o tempo de permanência dos frutos em campo, diminuindo a exposição às intempéries como também, às associações com microrganismos e insetos (BARBEDO et al., 1994). Por outro lado, a antecipação da colheita poderá causar a redução da germinação das sementes e o aumento da quantidade de sementes imaturas (SEDIYAMA et al., 1991). No entanto, para muitas espécies de frutos carnosos, a colheita prematura seguida do repouso do fruto por um período de tempo interfere positivamente na qualidade das sementes (ARAÚJO et al., 1982; BARBEDO et al., 1994; DIAS; NASCIMENTO, 2009).

Para avaliar o parâmetro fisiológico das sementes são utilizados testes de germinação e de vigor. A germinação é conduzida sob condições ótimas, ou seja, condições que foram planejadas para determinar o potencial máximo de germinação das sementes. O teste de germinação pode estimar o potencial de emergência da plântula em campo, se as condições de ambiente forem adequadas para tal

(SPEARS, 1995). Os testes de vigor são aplicados com o objetivo de detectar diferenças significativas no parâmetro fisiológico de sementes com germinação semelhante complementando as informações do teste de germinação. Paralelamente, o ideal é que os resultados relacionem-se à qualidade das sementes durante o armazenamento e após a semeadura (SPEARS, 1995), especialmente se as sementes foram colhidas momento correto.

Além da diferença de germinação e vigor, durante o desenvolvimento das sementes ocorrem outras alterações como no tamanho, no teor de água, no conteúdo de matéria seca acumulada, que têm início a partir da fertilização culminando com a maturidade fisiológica, ocasião em que cessa a translocação de assimilados da planta para a semente (BLACK; BEWLEY; HALMER, 2008).

Não há, todavia, relatos de quais mudanças (morfológicas, anatômicas, fisiológicas e bioquímicas) ocorrem nas sementes, durante o repouso dos frutos, por diferentes períodos de tempo, que culminam ou não com a alteração positiva do parâmetro fisiológico das sementes.

1.1 Objetivos

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a fase final da formação das sementes de pimentão, considerando as variações da morfologia externa dos frutos e do parâmetro fisiológico, da morfologia interna, da enzima endo- β -mananase, da anatomia e do acúmulo de substâncias de reservas e do ciclo celular das sementes, visando verificar se essas mudanças explicam as alterações fisiológicas das sementes de pimentão após o repouso pós-colheita do fruto e durante o armazenamento das sementes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maturação

Para hortaliças de frutos carnosos, como pimentão e tomate, a maturidade fisiológica das sementes geralmente coincide com o início da mudança de coloração dos frutos. Isso significa que nem sempre há necessidade de esperar pela maturação completa dos frutos para retirar as sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Outro aspecto interessante, é que há estudos que afirmam que a maturidade fisiológica das sementes se completa quando os frutos colhidos são mantidos por 7 a 10 dias em repouso, em local fresco e ventilado, antes da extração das sementes. Nesse caso, há indicações de que sementes imaturas que estão no interior do fruto completam o desenvolvimento, favorecendo o parâmetro fisiológico e o rendimento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; DIAS et al., 2006).

Nos estudos de maturação de sementes provenientes de frutos carnosos, os estádios de maturação dos frutos geralmente são indicados pelo número de dias após a antese (DAA), como nas pesquisas de Dias et al. (2006), Sanchez et al. (1993) e Vidigal (2006) entre outros e para tal, as flores são etiquetadas com a indicação do dia em que ocorreu a antese. Entretanto, produtores e empresas produtoras de sementes colhem o fruto em função da alteração da cor do fruto, avaliada de forma visual. Assim, os frutos são colhidos quando há alteração da cor verde ou quando estão totalmente maduros, embora para a produção de sementes híbridas as flores sejam etiquetadas com a data da polinização. Os frutos híbridos de pimentão são colhidos aos 60 dias após a polinização, quando estão mudando de cor. Nos diferentes trabalhos de pesquisa sobre maturação, é comum o uso de diversas denominações, sempre relacionadas com a cor dos frutos (verde, vermelha, laranja, amarela) ou com o estágio de maturação (maduro, imaturo, supermaduro) e algumas vezes à senescência (firme, murcho). Por isso, nessa revisão foram utilizados os termos verde-maduros, maduros e supermaduros (DIAS et al., 2006; SANCHEZ et al., 1993) e vermelho-firme (DIAS et al., 2006) que foram mantidos de acordo com cada autor. Porém, nessa pesquisa os termos utilizados foram relacionados à cor dos frutos no momento da colheita: verde, verde-avermelhada e vermelha.

Alguns pesquisadores afirmaram que a colheita prematura de frutos carnosos, seguida de repouso, possibilita a obtenção de sementes com nível similar de qualidade das que amadurecem na planta, desde que haja um tempo mínimo do repouso dos frutos (ARAÚJO et al., 1982; BARBEDO et al., 1994; TEIXEIRA; NASCIMENTO; FREITAS, 2006). Entretanto, sementes de tomate, provenientes de frutos colhidos no estágio verde-maduro, mantidos em repouso até o estágio vermelho-firme, apresentaram germinação e vigor mais altos ou iguais àsquelas provenientes dos frutos colhidos no estágio vermelho-firme (DIAS et al., 2006).

Sanchez et al. (1993) observaram que sementes extraídas de frutos maduros e supermaduros de pimentão, em geral, têm massa de matéria seca e germinação superiores quando comparadas às sementes de frutos de coloração verde. Além disso, o repouso pós-colheita de frutos verdes por mais de 14 dias aumentou a germinação das sementes, independentemente dos cultivares estudados. Para pimentão cv. Tico, a extração de sementes foi recomendada quando os frutos atingirem coloração verde alaranjado, com o repouso pós-colheita dos frutos por sete dias (TEIXEIRA; NASCIMENTO; FREITAS, 2006).

Da mesma forma, Pereira (2009) observou que o parâmetro fisiológico das sementes de pimentão é superior quando os frutos são colhidos no estágio verde-avermelhados e mantidos em repouso pós-colheita por, no mínimo, cinco dias, e para as sementes colhidas a partir de frutos totalmente vermelhos não é necessário o repouso pós-colheita. Inclusive, Albuquerque (2009) acrescentou que, para os frutos em estádios avançados de maturação, há prejuízo da qualidade das sementes em função do repouso.

Esses resultados indicam que pode ocorrer variação da qualidade das sementes dependendo do genótipo, em relação ao estágio de desenvolvimento e ao tempo de repouso dos frutos.

Durante a maturação da semente, a partir da fertilização do óvulo, há algumas mudanças marcantes, com destaque para as variações do tamanho, do teor de água, das massas das matérias fresca e seca e da germinação das sementes, além de outras alterações, visíveis no aspecto externo de frutos e de sementes, como a forma, a cor e a senescência que são utilizadas para a identificação da maturidade fisiológica das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; DELOUCHE, 1981). Entretanto, além desses parâmetros há, ainda, variações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento do fruto e, ou, da semente (AGUIAR et al.,

1993; BARBEDO et al., 1994). Após a fertilização do óvulo há divisões mitóticas e as células se diferenciam para formar o eixo do embrião e os cotilédones; após esses eventos a maturação ocorre em grande parte na ausência de divisões celulares e é caracterizada pela expansão celular e deposição de reservas nos cotilédones ou no endosperma (KERMODE, 1995).

A maturação termina com certo grau de desidratação das sementes o que resulta em redução gradual no metabolismo, como perda de água dos tecidos das sementes, e o embrião passa para um estado metabolicamente inativo ou quiescente (KERMODE, 1995). O metabolismo durante o desenvolvimento das sementes é anabólico, sendo caracterizado pela síntese e deposição massiva de reservas dentro dos tecidos de reserva (KERMODE, 1995).

Com relação às variações fisiológicas, teoricamente a porcentagem de sementes aptas a germinar é crescente durante a maturação, atingindo nível máximo em época próxima à da paralisação do fluxo de matéria seca da planta para a semente (DIAS; NASCIMENTO, 2009; MARCOS FILHO, 2005). O mesmo ocorre para o vigor, ou seja, a proporção de sementes vigorosas aumenta com o decorrer da maturação, atingindo o máximo em época muito próxima ou coincidente com o máximo acúmulo de reservas (MARCOS FILHO, 2005). Além disso, a maturação, juntamente com a desidratação das sementes favorece a formação de plântulas normais (BEWLEY; BLACK, 1994).

Algumas dessas mudanças também ocorrem durante o armazenamento das sementes (DELOUCHE; BASKIN, 1973) que culminam com a redução da qualidade das sementes.

Entre as diversas variáveis que afetam a conservação das sementes durante o armazenamento, um aspecto importante a ser considerado diz respeito à sua própria qualidade inicial (BARBEDO et al., 1999). Este, entre outros fatores, está diretamente relacionado com a proximidade entre o momento em que as sementes atingem a maturidade fisiológica e o momento em que são efetivamente colhidas. Quanto mais se antecipa a colheita das sementes em relação ao seu ponto de maturidade fisiológica, menor o seu vigor; por outro lado, quanto mais se atrasa a colheita após a maturidade, mais avançado estará o processo de deterioração. Em ambos os casos, o potencial de armazenamento das sementes é proporcionalmente reduzido, e estas ficam mais vulneráveis a condições adversas do ambiente de armazenamento (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983; BEWLEY; BLACK, 1994).

Pereira (2009) afirmou que sementes de pimentão colhidas a partir de frutos verde-avermelhados, totalmente vermelhos e de murchos, quando armazenadas com boa qualidade inicial, por três meses, apresentaram conservação da viabilidade e melhoria do vigor.

2.2 Morfologia das sementes

Nessa pesquisa, a morfologia das sementes foi avaliada por meio de imagens de raios X para analisar as partes e o estágio de desenvolvimento de cada semente ou de sementes. As imagens de raios X possibilitam visualizar as partes internas das sementes e analisar se estão formadas ou não; se têm endosperma, mas não têm o embrião; se têm endosperma, mas o embrião está em estádios diferentes de desenvolvimento; os diferentes tipos de anormalidades como embrião danificado, poliembrionia e outras características (SIMAK; GUSTAFSSON, 1953).

Em *Arabidopsis* foi possível avaliar a morfologia do embrião e detectar anormalidades quando as sementes secas foram radiografadas (BINO; AARTSE; VAN DER BURG, 1993). Em sementes de *Tabebuia*, também foi possível visualizar embriões defeituosos que não puderam ser percebidos visualmente pela morfologia das sementes (OLIVEIRA et al., 2004).

Sementes de *Capsicum esculentum* são consideradas formadas quando têm o embrião formado e curvado, que é característico dessa espécie, o endosperma formado e ocupando a cavidade interior do tegumento e pouco espaço livre entre o embrião e o endosperma (MICÓ; LABRADA; CALDERÓN, 1999).

Em radiografias de sementes híbridas de pimentão foram verificadas anormalidades morfológicas, como embriões danificados e mal formados, início de retração ou “descolamento” parcial do endosperma e espaço livres entre o eixo embrionário e o endosperma (GAGLIARDI, 2009).

Como foi observado, não há muitas pesquisas que relacionem a morfologia interna por imagens de raios X com o estágio de maturação das sementes de pimentão.

2.3 Presença de substâncias de reserva e da atividade da enzima endo- β -mananase

As substâncias de reserva das sementes são mobilizadas após a germinação, durante o desenvolvimento da plântula, e seus produtos de degradação são usados

para a geração de energia e a produção de matéria prima (proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos e lipídios) para a síntese de novos tecidos e células (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

Para determinar essas substâncias e também a anatomia das sementes, são utilizados os testes histoquímicos ou também conhecidos como microquímicos ou citoquímicos. Esses testes foram utilizados para determinar substâncias de reservas durante a maturação de sementes de urucum (AMARAL, 1990), para descrever as alterações celulares envolvidas na degradação do galactomanano durante a germinação de *Sesbania* sp. (TONINI et al., 2006), ou para caracterizar as sementes de espécies menos estudadas como o cártamo (ABUD et al., 2010).

Os embriões de sementes maduras de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e de pimentão ou pimenta (*Capsicum annuum*) são caracterizados por serem curvados e achatados e envolvidos por células endospermáticas e pelo tegumento; as sementes são discoides e há o endosperma micropilar e a testa que cobre a extremidade da radícula (LEUBNER-METZGER, 2003).

Para os testes histoquímicos, são preparadas lâminas do material vegetal, que é colorido para a detecção de substâncias de reserva em microscópio de luz. No caso de sementes, a reação de Schiff (PAS – *Periodic Acid Schiff*) pode ser utilizada para a detecção de polissacarídeos neutros, de celulose e de hemicelulose (McMANUS, 1948), o Sudan IV para paredes suberificadas, cutinizadas e outros materiais lipídicos (PEARSE, 1972), o Xylidine Ponceau para identificação de proteínas (VIDAL, 1970) e azul de toluidina para visão geral das células (AMARAL 1990; O'BRIEN et al., 1964), entre outras.

As principais substâncias de reserva das sementes de pimentão são lipídios e proteínas, determinados tanto no embrião como no endosperma e o embrião tem também β -glucano; o amido não foi detectado (CHEN; LOTT, 1992).

Os lipídios podem se acumular no embrião ou endosperma e são a mais eficiente fonte de reserva de energia (MIQUEL; BROWSE, 1995). Os carbonos dos ácidos graxos são mais reduzidos do que os carboidratos e, portanto, a oxidação dos lipídios libera duas vezes mais energia do que a oxidação dos carboidratos ou proteínas (MIQUEL; BROWSE, 1995).

Quanto às reservas proteicas, em sementes são encontradas, principalmente, duas classes de proteínas, as globulinas e as prolaminas, sintetizadas no complexo de Golgi e retículo endoplasmático, sendo estas acumuladas sob a forma de corpos

proteicos (MARTY, 1999). As proteínas têm como função armazenar principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de novas proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários na plântula em crescimento (LIMA et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). Elas são armazenadas em vacúolos durante o desenvolvimento e maturação e são degradadas rapidamente para suprir os nutrientes para o desenvolvimento da plântula durante a germinação (TSE et al., 2007).

Além dos lipídios e proteínas, muitos polímeros de carboidratos foram selecionados durante a evolução das Angiospermas como os polissacarídeos de reserva da parede celular. Esses são associados à dureza, como os mananos em endospermas de sementes de palmeiras, de tomate e de alface, e às relações hídricas, como os xiloglucanos em cotilédones e os galactomananos em endospermas de sementes de leguminosas (BUCKERIDGE et al., 2000).

Os mananos são também polissacarídeos de reserva de parede celular. Esses polissacarídeos como compostos de reserva já foram detectados em sementes de pimenta (WATKINS et al., 1985), tomate (GROOT et al., 1988), alface (HALMER; BEWLEY, 1979) e café (WOLFRON; LAVER; PATIN, 1961), e para todas essas sementes foi observada a presença de atividade da enzima endo- β -mananase. Essas espécies têm endospermas finos e a presença desses polissacarídeos foi relacionada à restrição mecânica para a protrusão da raiz primária (BUCKERIDGE et al., 2000). O acúmulo dessas substâncias confere resistência aos tecidos das sementes (“dureza”) e isso pode ser associado a um sistema de proteção do embrião em relação aos danos mecânicos (BUCKERIDGE et al., 2000; ZAMSKI, 1995).

A endo- β -mananase é uma enzima constitutiva, cuja atividade pode ser determinada após hidratação das sementes por períodos de tempos variáveis. Para sementes de gergelim, a atividade da enzima é detectada após 20 minutos de hidratação (CARVALHO et al., 2001), enquanto que para sementes de tomate foram necessárias 12 a 48 horas de hidratação (STILL; BRADFORD, 1997).

Para as sementes de cenoura foi observado que a atividade da enzima endo- β -mananase no endosperma é superior à do embrião (HOMRICHHAUSEN et al., 2003). Bewley (1997) afirmou que a ausência de germinação de determinadas espécies pode ser devida à inatividade de enzimas como a endo- β -mananase e outras hidrolases, o que dificulta o enfraquecimento das paredes celulares.

Portanto, durante a maturação das sementes ocorrem mudanças celulares e nas substâncias de reserva das sementes. Isso, provavelmente, também ocorre durante o armazenamento das sementes, pois segundo Delouche e Baskin (1973), durante o armazenamento ocorre desorganização das membranas e consequente perda do controle da permeabilidade, seguida da danificação dos mecanismos de produção energética e de biossíntese, da redução do parâmetro de armazenamento, da velocidade de germinação e do aumento na ocorrência de anormalidades, causando a redução da germinação e a morte da semente.

Smith e Berjak (1995) relataram que existem vários fatores que influenciam o vigor e a viabilidade das sementes durante o armazenamento, que são fatores genéticos; efeitos do ambiente de pré-colheita e de maturação (temperatura, chuva, solo, umidade atmosférica); fatores mecânicos (na colheita ou beneficiamento); ambiente de armazenamento (temperatura e umidade relativa); fatores intrínsecos como alterações de macromoléculas e metabólitos essenciais e acúmulo de substâncias tóxicas; e fatores patológicos.

Avaliação dessa natureza foi efetuada por Pedrosa et al. (1999) que afirmaram que os teores de proteína de sementes de urucum, armazenadas por oito meses, decresceram com o período de armazenagem.

A peroxidação de lipídios e radicais livres associados com estresse oxidativo podem ser considerados os principais fatores que atuam na deterioração das sementes (MURTHY; SUN, 2000).

Assim, a partir da avaliação das substâncias de reserva juntamente com a atividade da enzima endo- β -mananase pode ser possível verificar as diferenças que ocorrem ao longo da maturação e dos períodos de repouso pós-colheita dos frutos e, também, se há alterações após o armazenamento das sementes, as quais podem estar relacionadas à viabilidade dessas sementes.

2.4 Avaliação do ciclo celular pela citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi inicialmente desenvolvida para contagem e análises rápidas de células sanguíneas e a partir da década de 80 começou a ser adaptada para células vegetais (DOLEZEL, 1997apud SCHIFINO-WITTMANN, 2001), que determina a atividade do ciclo celular.

Essa atividade é expressa pela replicação de DNA nas sementes, que é utilizada como marcador molecular. Esse método é rápido e preciso para estimar o conteúdo

de DNA nos núcleos das células vegetais e permite a detecção da replicação em diferentes estágios e em diferentes tecidos das sementes e com isso é possível acompanhar as mudanças no estado fisiológico de uma semente (ŚLIWIŃSKA, 2009). A replicação do DNA como um evento tardio na germinação pode ser utilizada para avaliar o estado fisiológico das sementes, para monitorar o condicionamento, para estimar a pureza genética e também para avaliar os estádios de maturação (ŚLIWIŃSKA, 2009).

O método consiste basicamente no isolamento dos núcleos, coloração com um fluorocromo e leitura da fluorescência emitida por estes núcleos em um citômetro de fluxo. A fluorescência é proporcional ao conteúdo de DNA. Normalmente são verificados dois picos de fluorescência, aquele dos núcleos 2C (células em G_0 e G_1) e aquele dos núcleos 4C (células em G_2 e mitose) (BENNET; LEITCH, 1995). No caso do endosperma das sementes, que é formado pela fusão de dois núcleos do gametófito feminino e um do masculino, na fase G_1 do ciclo celular, apresenta conteúdo 3C de DNA e 6C, em G_2 (ŚLIWIŃSKA, 2009).

Swift (1950) introduziu o termo *valor 'C'* (onde C é uma constante) que se refere ao conteúdo de DNA de um genoma haplóide não-duplicado de um indivíduo. Convencionalmente o valor C independe da ploidia das espécies (BENNET; LEITCH, 1995).

Durante o período de crescimento celular (fase G_1) uma célula diplóide apresenta conteúdo 2C de DNA nuclear. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e na fase seguinte (fase G_2) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo de DNA nuclear é mantido no nível 4C. Em seguida ocorre a mitose (fase M) durante a qual a célula se divide, formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA (BEWLEY; BLACK, 1994).

Durante o desenvolvimento do embrião e do endosperma a atividade celular é alta e há a redução gradual da atividade celular na medida em que a semente se forma. A atividade do ciclo celular pode ser identificada pela proporção de núcleos com conteúdo de DNA 4C, ou seja, quanto menos núcleos 4C na célula, a semente está mais próxima de atingir o ponto de maturidade fisiológica (ŚLIWIŃSKA, 2009).

Durante a formação das sementes de beterraba, nos embriões morfológicamente desenvolvidos, as análises de citometria de fluxo confirmaram que a razão $G_2:G_1$ (4C:2C) é constante e sem alteração durante a maturação. Porém, isso ocorre somente para sementes frescas. Após a secagem, aparecem diferenças

significantes entre sementes de diferentes estágios de maturação. A desidratação causou a redução da proporção de núcleos em G_2 isolados do embrião (ŚLIWIŃSKA, 2003).

O conteúdo de DNA nuclear das pontas da radícula de semente de tomate alterou entre 30 e 45 dias após a polinização (DAP). Sementes colhidas aos 45 DAP tinham predominantemente, as células da ponta da radícula com conteúdo 2C de DNA, indicando que a maioria das células estava em G_1 . Aparentemente quando a maioria das células para na fase G_1 significa que é o fim do crescimento ativo das sementes de tomate e o início da tolerância a desidratação (LIU et al., 1997).

Em função das informações há a possibilidade da utilização da técnica da citometria de fluxo para a detecção de DNA celular e a da atividade da enzima endo- β -mananase, juntamente com imagens de raios X e de microscopia de luz, as quais podem ser úteis para detectar diferenças morfológicas, anatômicas, bioquímicas e fisiológicas em sementes de pimentão, colhidas em diferentes estádios de maturação e mantidas em repouso por períodos variáveis, e, assim, estabelecer relações com o parâmetro fisiológico das sementes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de pimentão, da variedade de polinização aberta “Casca Dura Ikeda”, produzidas na cidade de Piracicaba (22,7253° S, 47,6492° W), SP no ano de 2011.

Essa pesquisa foi composta por doze tratamentos, de acordo com o estágio de desenvolvimento e do período de repouso pós-colheita dos frutos (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização dos tratamentos de acordo com o estágio de desenvolvimento e do período de repouso dos frutos considerados para a avaliação da maturação de sementes de pimentão, variedade “Casca Dura Ikeda”

Tratamentos	
1	Frutos colhidos verdes sem repouso
2	Frutos colhidos verdes e mantidos em repouso por 3 dias
3	Frutos colhidos verdes e mantidos em repouso por 7 dias
4	Frutos colhidos verdes e mantidos em repouso por 14 dias
5	Frutos colhidos verde-avermelhados sem repouso
6	Frutos colhidos verde-avermelhados e mantidos em repouso por 3 dias
7	Frutos colhidos verde-avermelhados e mantidos em repouso por 7 dias
8	Frutos colhidos verde-avermelhados e mantidos em repouso por 14 dias
9	Frutos colhidos vermelhos sem repouso
10	Frutos colhidos vermelhos e mantidos em repouso por 3 dias
11	Frutos colhidos vermelhos e mantidos em repouso por 7 dias
12	Frutos colhidos vermelhos e mantidos em repouso por 14 dias

A semeadura foi em bandejas de poliestireno expandido, com 128 células contendo o substrato comercial Basaplant® para hortaliças. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação, durante os meses de janeiro e fevereiro de 2011. A partir de 20 dias da semeadura (mudas com um par de folhas), foi aplicada adubação foliar com macro e micronutrientes (Yogen2®) na concentração de 5g.L⁻¹ a cada 15 dias. Sete dias antes do transplante (mudas com quatro pares de folhas), foi feita a aplicação manual de deltametrina (piretróide) na concentração de 0,3 mL.L⁻¹ para o controle de lagartas. A irrigação foi realizada manualmente, duas vezes ao dia, até que o substrato atingisse a capacidade de campo, ou seja, até que a água escorresse pelos orifícios das bandejas.

Aos 40 dias após a semeadura, as mudas que tinham quatro pares de folhas, foram transplantadas para o campo, colocadas em canteiros de 1,20 m de largura por 36 m de comprimento, e distribuídas em duas fileiras espaçadas de 0,80 x 0,5 m, totalizando 25.000 plantas m². Cada canteiro foi considerado um bloco, totalizando quatro blocos de campo, os quais foram considerados como quatro repetições nos testes que foram realizados em laboratório.

Tabela 2 – Análise do solo do campo de cultivo do pimentão, variedade “Casca Dura Ikeda”, em Piracicaba, SP

pH	P	S	K	Ca	Mg
	mg.dm ⁻³			mmolc.dm ⁻³	
6,3	437	5	9,5	150	34
MO	B	Cu	Fe	Mn	Zn
g.dm ⁻³			mg.dm ⁻³		
20	0,6	13,9	42	16,7	26,4
Al	H+Al	SB	CTC	V	m
	mmolc.dm ⁻³			%	
1,369	22	193,5	215	90	0,7

P: fósforo; S: enxofre; K: potássio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; MO: matéria orgânica; B: boro; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: Manganês; Zn: zinco; Al: alumínio; H+Al: hidrogênio mais alumínio; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; V: porcentagem de saturação por bases; m: porcentagem de saturação por alumínio

O solo foi adubado antes do transplântio, considerando os resultados da análise do solo (Tabela 2), com 50 g por planta de 04-14-08 suplementado com 12% Ca, 9,7% S, 10% B, 9,2% Zn e 80g de Yorin Master[®] por metro quadrado, aplicados manualmente antes do transplante das mudas. A adubação de cobertura foi realizada 40 dias após o transplântio com 20 kg.ha⁻¹ de 20-00-20 e a cada mês, intercalando, a cada 15 dias com adubo foliar composto por macro e micronutrientes (Yogen2[®]), na concentração de 2 g.L⁻¹.

Para a suplementação de água, as plantas no campo foram irrigadas por aspersão uma vez ao dia.

Um dia após o transplântio das mudas, foi aplicado, de forma preventiva, o inseticida com imidacloprido (piretróide) para o controle da mosca-branca e de tripes e o fungicida com oxicleto de cobre para *Phytophthora capsici*, nas doses recomendadas para a cultura do pimentão. Durante o desenvolvimento vegetativo das plantas foi necessária uma aplicação de acaricida com abamectina para controle

de ácaro-branco e uma de piretróide para prevenção de insetos desfolhadores e uma de oxicloreto de cobre para prevenção de *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum* spp., 30 dias após o transplante. As aplicações foram feitas com pulverizador costal.

A partir do início da formação de frutos a cada 15 dias, aproximadamente, foram aplicados os fungicidas clorotalonil e oxicloreto de cobre para o controle de doenças, principalmente podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* e antracnose, por *Colletotrichum* spp.

Os dados climáticos do período em que as plantas ficaram no campo estão na Figura 1.

A flor da primeira bifurcação de cada planta foi descartada, tendo em vista que um fruto fixado nessa posição poderia prejudicar o desenvolvimento da planta e consequentemente o pegamento do novo fruto (REIFSCHNEIDER, 2000; GODOY; GODOY; CARDOSO, 2006).

Os primeiros frutos formados de cada planta foram colhidos com base na morfologia externa e nas cores verde, verde-avermelhada e totalmente vermelha, para compor os tratamentos descritos na Tabela 1.

Figura 1- Precipitação pluviométrica (chuva em mm), temperatura máxima (T max), média (T med) e mínima (T min) em °C, do período de janeiro a agosto de 2011, de Piracicaba, SP. Dados do posto meteorológico USP-ESALQ

Após a colheita, os frutos foram mantidos em repouso em ambiente com condições de temperatura e umidade relativa do ar não controladas (Figura 2). Assim

como no campo, a temperatura alta no repouso pós-colheita dos frutos pode levar ao murchamento, aumentando a taxa de transpiração e favorece o aparecimento de doenças pós-colheita e aumenta a taxa respiratória (ANTONIALI et al., 2006; BARROS; GOES; MINAMI, 1994).

Foram colhidos 12 frutos de cada repetição, por tratamento, descrito na Tabela 1, de acordo com a Figura 3 e desses foram separados ao acaso cinco frutos que foram pesados, medidos e avaliados quanto à coloração, utilizando o colorímetro ou por notas visuais (item 3.1).

Figura 2 – Umidade relativa do ar (UR) em %, temperatura máxima (T max), média (T med) e mínima (T min) em °C, do período de maio a agosto de 2011, da sala onde os frutos ficaram em repouso por 3, 7 ou 14 dias, em Piracicaba, SP

Após essas avaliações dos frutos, as sementes dos 12 frutos foram extraídas e foi separada uma amostra contendo as sementes frescas, que foram avaliadas quanto ao teor de água, à massa de matéria, à germinação e às imagens de raios X. A seguir todas as sementes foram lavadas em água corrente.

Após a lavagem em água corrente, as sementes foram colocadas em peneiras comuns, para permitir a passagem de ar, e mantidas por 24h à sombra, para secarem, até atingirem 10% de água, aproximadamente. Para uniformizar a secagem, uma lâmpada incandescente de 150 W foi colocada próximo as peneiras durante um período de seis horas, para manter 30 °C de temperatura. Essas

sementes foram denominadas de “sementes secas” e constituíram as amostras de sementes para serem avaliadas durante o armazenamento das sementes. As sementes não foram beneficiadas.

Figura 3 - Desenho esquemático da distribuição das plantas no canteiro para a produção de sementes de pimentão. **A:** esquema de um canteiro que foi considerado uma repetição e como as plantas estavam dispostas (círculos). **B:** Detalhe de uma parte do canteiro. As cores representam os frutos de pimentão que estavam prontos para serem colhidos em cada planta. **C:** Total de frutos colhidos por canteiro e por cor para compor os diferentes tratamentos. O exemplo utilizado foi para frutos verdes, sendo que o mesmo foi feito para as outras cores de frutos (verde-avermelhada e vermelha)

As sementes secas de todos os tratamentos foram armazenadas em sacos de papel por um ano em câmara com 50% de umidade relativa do ar e 20 °C, e foram avaliadas a cada três meses durante esse período, com exceção da penúltima

avaliação, após nove meses de armazenamento (maio/2012), pois neste momento as sementes foram avaliadas apenas em relação à quantidade de DNA pela técnica de citometria de fluxo, em Bydgoszcz, Polônia.

3.1 Tamanho, massa e coloração dos frutos

Para a determinação do tamanho do fruto (comprimento e largura) e da massa foram avaliadas quatro repetições de cinco frutos, relacionados à cada tratamento (Tabela 1). As dimensões dos frutos foram determinadas com um paquímetro nos sentidos longitudinal e transversal da região basal (inserção do pedúnculo do fruto na planta); a massa foi determinada em balança analítica. A avaliação da coloração dos frutos foi efetuada utilizando o critério visual, que é o utilizado rotineiramente para a produção de sementes de pimentão, e pelo equipamento denominado colorímetro, marca Minolta, modelo CR-300.

O colorímetro determina os resultados no espaço livre de cor definido pela CIE (Comissão Internacional de Iluminação ou Commission Internationale de l'Eclairage) que é a autoridade internacional em luz, iluminação, cor e espaço livres de cor. Esse sistema torna a interpretação visual similar ao sistema visual de ordenação de cores chamado Munsell e é conhecido como sistema CIE de Colorimetria ou CIELAB. No espaço CIELAB as cores são descritas pela luminosidade (L^*), pelos conteúdos de vermelho a verde (a^*) e de amarelo a azul (b^*), como descrito por Régula (2004) e indicado na Figura 4.

Segundo revisão feita por Pinheiro (2009), o estudo da cor utilizando os valores isolados das coordenadas é incorreto, porque as duas coordenadas (a^* e b^*) não são independentes. No entanto, o ângulo de tonalidade, h° (*hue*) e o índice de saturação, croma (C^*), são medidas derivadas de a^* e b^* . O ângulo de cor h° assume valor 0° para a cor vermelha, 90° para amarela, 180° para verde e 270° para azul. A cromaticidade ou croma (C^*) expressa a intensidade da cor, ou seja, a saturação em termos de pigmentos desta cor. Valores de croma próximos de zero representam cores neutras (cinzas), enquanto valores próximos de 60 expressam cores vívidas (MENDONÇA et al., 2003) (Figura 4).

Figura 4 – Modelo CIELAB utilizado pelo colorímetro, onde L^* representa a luminosidade, a coordenada $+a^*$ representa o conteúdo de vermelha, a $-a^*$, o de verde, a $+b^*$, o de amarela e a $-b^*$, o de azul; o ângulo de cor h° que representa a mistura das cores e o croma C^* , a intensidade da cor (Adaptado de PINHEIRO, 2009)

Tabela 3 – Notas atribuídas, de forma visual, para a coloração dos frutos de pimentão, da variedade “Casca Dura Ikeda”, colhidos em diferentes estádios de maturação

Nota	Descrição	Representação dos quadrantes	Imagens dos frutos
1	100% da área do fruto com a cor verde.		
2	Início de listras vermelhas na base do fruto.		
3	1/4 da área do fruto com a cor vermelha.		
4	2/4 da área do fruto com a cor vermelha		
5	3/4 da área do fruto com a cor vermelha		
6	100% da área do fruto com a cor vermelha		

Para a avaliação com o colorímetro foram feitas duas leituras em lados opostos da superfície externa do fruto, tendo como referência a inserção do pedúnculo do fruto na planta, considerada como a base. Esses pontos foram marcados previamente no fruto antes da leitura para que esses mesmos pontos fossem lidos antes e após o repouso do fruto.

Com relação às notas visuais, essas foram dadas dividindo os frutos em quatro quadrantes de acordo com a quantidade de verde e de vermelho de cada um desses quadrantes (Tabela3).

Para estudar a formação das sementes de pimentão as flores não foram marcadas, mas as colheitas corresponderam aos períodos de antese de, aproximadamente 40 dias para os frutos verdes, 50 dias para os frutos verde-avermelhados e 70 dias para os frutos vermelhos.

3.2 Grau de umidade e massa de matéria seca das sementes

Para a determinação do grau de umidade e da massa de matéria seca, foram utilizadas duas repetições de 2,0 g de sementes, mantidas em estufa a $105\pm3^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas (BRASIL, 2009). Os resultados foram indicados em base úmida e expressos em porcentagem de água e em miligramas de matéria seca por 100 sementes.

O teor de água foi determinado nas sementes recém-extraídas dos frutos (frescas), após a secagem e antes da instalação dos demais testes em todos os momentos de avaliação.

3.3 Germinação

Para o teste de germinação foram semeadas quatro repetições de 50 sementes em papel, marca Germitest, umedecido com água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. As sementes foram mantidas em temperatura de 25°C . A avaliação foi realizada aos 14 dias após a germinação e o resultado foi expresso em porcentagem de plântulas normais.

3.4 Raios X

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes que foram coladas sobre fita dupla face em papel transparência e numeradas de acordo com a posição ocupada

na transparência de maneira que pudessem ser identificadas nas determinações posteriores.

As sementes foram radiografadas imediatamente após serem extraídas dos frutos e após a secagem, nas quatro épocas de avaliação, utilizando equipamento digital Faxitron X-Ray utilizando a voltagem de 26kV por 1,3s ou 4,3s (determinado automaticamente pelo equipamento) a uma distância de 11,6 cm da fonte de raios X.

As sementes radiografadas foram colocadas para germinar como descrito para o teste de germinação e a identificação de cada semente foi mantida por meio de números sequenciais. A avaliação foi realizada aos 14 dias após a semeadura e as plântulas normais e anormais e as sementes não germinadas foram fotografadas para serem examinadas juntamente com as imagens de raios X.

As imagens de raios X foram avaliadas utilizando o programa Image-Pro® Plus. Este programa permite medir o espaço livre, entre o endosperma+embrião e o tegumento e entre o endosperma e o embrião, por meio de diferenças de tonalidades de cinza do espaço livre e das partes constituintes da semente. Assim, por meio do programa, são marcadas as diferenças de cores, gerando, automaticamente, valores percentuais (ou absolutos) correspondentes à área do espaço livre e às partes da semente (embrião + endosperma + tegumento), como mostra a Figura 5.

A partir dos resultados obtidos com as avaliações do espaço livre pelo programa e pelo teste de germinação, as sementes foram classificadas em quatro classes quanto à porcentagem de espaço livre entre o endosperma+embrião e o tegumento (Figura 5):

- i. Espaço livre menor ou igual a 10% ($\leq 10\%$) que inclui as sementes completamente formadas, sem espaço livre;
- ii. Espaço livre entre 10% e 19,99% (10%-19%);
- iii. Espaço livre entre 20% e 30% (20%-30%), e;
- iv. Espaço livre maior ou igual a 30% ($\geq 30\%$) que inclui as sementes não formadas e vazias.

Figura 5 – Imagens de raios X de sementes de pimentão (A, B, C, D) e as respectivas imagens dos espaço livres entre o tegumento e endosperma-embrião (A', B', C', D') feitas pelo programa Image-Pro® Plus. A: semente completamente formada e com o tamanho máximo; B e C: sementes formadas, mas em crescimento (não atingiram o tamanho máximo); D: semente mal formada ou vazia. As porcentagens referem-se ao espaço livre, que é representado pela cor vermelha

3.5 Emergência e índice de velocidade de emergência da plântula

Foram semeadas quatro repetições de 50 sementes em caixas de poliestireno expandido, contendo 200 células preenchidas com substrato comercial e foram mantidas em ambiente de casa de vegetação, não climatizada. O substrato foi umedecido com água até que a água escorresse pelas perfurações da bandeja. As avaliações foram realizadas diariamente, durante 20 dias, e com os dados foram calculadas a quantidade de plântulas normais que emergiram, em porcentagem, e a velocidade de emergência da plântula, índice proposto por Maguire (1962).

3.6 Teste de condutividade elétrica

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes pesadas com precisão de 0,0001 g. Em seguida, as sementes foram colocadas em copos de plástico, com 50 mL de capacidade, e adicionados 25 mL de água destilada e durante a hidratação as sementes foram mantidas a 25 °C por 4h (OLIVEIRA; NOVENBRE, 2005). A condutividade elétrica da solução foi determinada utilizando um condutivímetro Digimed DM-31 e os resultados foram expressos em $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.7 Teste de Envelhecimento acelerado

Amostras, com aproximadamente 300 sementes por repetição, foram distribuídas uniformemente e em camada única, sobre tela metálica, em caixas de plástico transparente de dimensões 11x11x3,5 cm contendo 40 mL de água. As caixas foram mantidas em câmara modelo 45 VWR Scientific, a 41 °C por 72 horas (KIKUTI; KIKUTI; MINAMI, 2005). Após esse período, as sementes foram avaliadas pelo teste de germinação, conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais obtidas aos 10 dias após a semeadura.

3.8 Atividade da enzima endo- β -mananase

A atividade da endo- β -mananase foi avaliada pelo método utilizado da difusão em gel, adaptado de Downie et al. (1994) e Still, Dahal e Bradford (1997) por Veiga et al. (2007) e modificado para esta pesquisa.

As sementes inteiras, de cada tratamento, foram utilizadas secas ou hidratadas por 24 horas, trituradas, utilizando almofariz e nitrogênio líquido, e, a seguir, foram colocados 100 mg de cada amostra, em microtubos tipo Eppendorf e adicionados 300 μL do tampão de extração (0,1 M Hepes; 0,5 M de NaCl; ácido ascórbico na

proporção de 5 mg do ácido para cada mL de tampão e o pH foi ajustado para 8,0). Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram agitados (agitador Vortex) por 1 minuto e centrifugados, a 10.000 g por 30 minutos, a 4 °C.

Para o preparo do gel, foram dissolvidos 6 mL de “locust bean gum” ou LBG (Sigma) 0,5% em 24 mL de tampão pH 5,0 (11 mL de ácido cítrico 1M, 50 mL de Na₂HPO₄ e 149 mL de água destilada totalizando 210mL), com aquecimento por 30 minutos, a 70 °C com agitação seguida de resfriamento em temperatura ambiente. O LBG e o tampão foram centrifugados a 11.000g por 15 min, a 4 °C, e em seguida foi adicionado 0,24 g de agarose ao sobrenadante, que foi dissolvida por aquecimento por um minuto em forno micro-ondas. Em cada placa (140 mmx12,4 mm) foram adicionados 30 mL do gel, que foi armazenado por 2h em geladeira a 4 °C.

No gel foram feitos 26 poços com ajuda de uma pipeta de 2 mm e todo o gel foi retirado por sucção. Foram colocados 2µL do sobrenadante das amostras de sementes por poço em três repetições de cada amostra. Como controle positivo de cada placa, foram utilizadas as concentrações de 0,23 pmol.s⁻¹ e 0,023 pmol.s⁻¹ deendo-β-mananase comercial de *Arpergillus niger* (Megazyme). As placas permaneceram em germinador a 25 °C por 24h no escuro.

Para a revelação, o gel foi inicialmente lavado em água destilada e, em seguida, lavado em tampão (tampão do gel) por 30 minutos e novamente lavado com água destilada. Logo após, o gel foi coberto com 10 mL do corante vermelho do Congo 0,5% por 30 minutos e colocado em etanol por 10 minutos para a fixação do corante. O etanol foi removido com água destilada, foi adicionada uma solução 1M de NaCl até que fossem visualizados halos de coloração mais clara que o gel, nos poços que continham as amostras.

O vermelho do Congo é sensível ao pH, tornando-se azul escuro ou preto em pH baixo (<3,0) e vermelho em pH superior a 5,2 sendo o intervalo, a faixa de viragem de cor (SEELY, 2013). Ao adicionar o vermelho do Congo, o gel fica vermelho. Após 20 minutos a solução de vermelho do Congo foi decantada e o gel foi lavado brevemente com água. As áreas hidrolisadas pela enzima ficam visíveis pela adição da solução de NaCl que tem pH 7. Após a decantação do NaCl, em 1min ou 2 min, a coloração vermelha começa a escurecer e ficar azul ou preta, com essas mudanças ocorrendo mais rapidamente nas áreas fora das zonas hidrolisadas (STILL; DAHAL; BRADFORD, 1997). Quando o contraste entre a zona hidrolisada (halos) e o fundo escuro (gel) estava visível, as placas foram digitalizadas, utilizando

scanner e foi determinado o diâmetro das amostras, em duas direções, utilizando o programa Image-Pro[®] Plus, resultando em um valor médio, em milímetros.

A curva padrão, juntamente com a equação logarítmica foi obtida utilizando a enzima endo- β -mananase comercial de *Aspergillus niger* em várias concentrações ($1,18 \text{ pmol.s}^{-1}$ a $0,00007 \text{ pmol.s}^{-1}$) utilizando o mesmo gel das amostras de sementes e o mesmo modo de revelação. Para o cálculo da atividade da enzima, o diâmetro das amostras foi comparado com a curva padrão, estabelecida com a enzima comercial, por análise de regressão. Os resultados foram expressos em pmol.s^{-1} , ou seja, é a quantidade de enzima que quebra um picomol de ligação por segundo em condições específicas.

3.9 Análises histoquímicas

Para as análises histoquímicas das sementes, o tegumento foi retirado com pinça e bisturi e um pedaço do endosperma na parte oposta ao hilo foi cortado para que as sementes pudessem ser fixadas em solução de Karnowsky (KARNOWSKY, 1965) modificada, por aproximadamente quatro semanas.

Completado o tempo de fixação, as sementes foram desidratadas em série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), pela imersão das sementes por 30 min em cada diluição do álcool, com exceção do álcool 70%, cujo período de imersão foi de aproximadamente cinco dias. Posteriormente, as sementes foram infiltradas em resina acrílica (LEICA-HISTORESIN), conforme as recomendações do fabricante, exceto a recomendada para o tempo de permanência das sementes para a infiltração. Em resina+etanol (1:1) as sementes permaneceram por no mínimo 48 horas e na resina pura por mais 4 dias para posterior polimerização.

O material polimerizado foi cortado com $5\mu\text{m}$ de espessura utilizando um micrótomo rotatório manual Leica com navalha de aço tipo "C".

Conforme os testes realizados, foram utilizados corantes específicos, que serão descritos a seguir.

Após a reação com os corantes, os cortes foram fotografados com câmera digital MRc acoplada em microscópio Carl Zeiss Axioskop 2, a qual é conectada a um microcomputador com o programa Axiovision. As partes da semente fotografadas foram o endosperma micropilar, ponta da radícula, hipocótilo, cotilédone, da parte externa do endosperma (próximo ao tegumento) e a parte interna do endosperma e estão esquematizadas na Figura 6.

Figura 6 - Semente de pimentão sem tegumento e as partes que foram fotografadas nos testes histoquímicos. Em: embrião; En: endosperma; Hi: hilo; Mi: micrópila

3.9.1 Verificação de metacromasia

Para detecção de metacromasia foi utilizado azul de toluidina pH 2,6(O'BRIEN; McCULLY, 1981), modificado)(pH original é 6,8). Com esse corante é possível visualizar células e tecidos das sementes em função da coloração diferenciada dos compostos desses tecidos.

As lâminas contendo os cortes foram imersas no corante por 3min. Após esse tempo o corante foi retirado e as lâminas foram lavadas em água corrente de torneira por mais 1 min. Após a secagem, as lâminas foram montadas em resina sintética Entellan®.

3.9.2 Verificação de compostos fenólicos

Para detectar compostos fenólicos foi utilizado o cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) que produz coloração negro-azulada ou verde-escura com esses compostos.

Os cortes foram cobertos com o corante e as lâminas foram acondicionadas em placas de Petri fechadas em estufa a 80 °C por 6 horas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada, três vezes por 2 minutos. Após secas, foram montadas em Entellan®.

3.9.3 Verificação de polissacarídeos

Para a detecção de polissacarídeos neutros, celulose e hemicelulose foi utilizada a reação do PAS (Periodic Acid Schiff) (McMANUS, 1948) que cora esses compostos de magenta.

Para essa reação, inicialmente colocou-se tetraidreto boreto de sódio a 1% sobre os cortes das lâminas por 1h. Decorrido este tempo, o tetraidreto foi retirado e os cortes foram oxidados com ácido periódico a 1% por 20 min. Em seguida, foi lavado com água destilada e o reagente de Schiff foi colocado sobre os cortes por 20min. Após esse tempo as lâminas foram lavadas três vezes com metabissulfito de sódio durante 2min e posteriormente com água destilada. Quando as lâminas estavam secas foram montadas em Entellan®.

3.9.4 Verificação de lipídios

Para a detecção de lipídios (paredes suberificadas, cutinizadas e outros materiais lipídicos) foi utilizado o Sudan IV (PEARSE, 1972) que cora esses compostos de vermelho.

Os cortes das lâminas foram cobertos com solução de Sudan IV. As lâminas foram acondicionadas em placas de Petri fechadas, as quais ficaram em estufa a 80 °C por aproximadamente 1h. Após esse tempo, as lâminas com o corante foram cobertas com lamínulas e observadas e fotografadas imediatamente.

3.9.5 Verificação de radicais catiônicos proteicos

Para a detecção de radicais catiônicos proteicos, os quais são corados de vermelho, foi utilizado o Xylidine ponceau (VIDAL, 1970).

A solução de Xylidine Ponceau foi colocada sobre os cortes que foram corados por 30 min; logo após foram lavados por 40 min em ácido acético 3% e em água destilada. Após a secagem foram montados em Entellan®.

As análises histoquímicas e a determinação da atividade da enzima endo- β -mananase foram avaliadas em dois momentos: com as sementes secas da primeira época de análise e após o período de um ano de armazenamento das sementes (quarta época).

3.10 Determinação da quantidade de DNA

A avaliação da quantidade de DNA das células foi determinada pela técnica de citometria de fluxo, essa análise foi realizada na “Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy” (Universidade de Tecnologia e Ciências da Vida), na cidade de Bydgoszcz, Polônia.

A análise foi realizada com sementes secassem o tegumento e com as extremidades da radícula de sementes secas, hidratadas por 72h ou com a ponta raiz primária (após a protrusão).

Para compor as análises das sementes inteiras, foram utilizadas 12 sementes por tratamento, as quais foram avaliadas individualmente pelo citômetro de fluxo. Quando a análise foi feita utilizando a ponta da radícula, foram feitas 5 repetições de 4 a 6 extremidades das radículas por tratamento. As amostras de núcleos foram preparadas de acordo com Lanteri et al. (1993).

O tegumento das sementes foi retirado utilizando uma lâmina e descartado; para retirar somente as extremidades das radículas, as sementes foram seccionadas longitudinalmente para expor o embrião e, um segmento de aproximadamente 3 mm da extremidade da radícula foi cortado.

As sementes inteiras ou as extremidades da radícula foram colocadas em uma placa de petri de plástico de 5,5 cm de diâmetro. Com uma pipeta foram adicionados 300 μL de tampão de isolamento de núcleos (0,1 M Tris-Cl; 0,25 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 85 mM NaCl; 0,1% VIV TritonX-100; pH 7,0) suplementado com 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As sementes ou as extremidades da radícula foram cortadas com a ajuda de uma lâmina e foram adicionados mais 1000 μL do tampão suplementado com DAPI. A suspensão nuclear foi filtrada em filtro de nylon de 50 μm , para remover os pedaços maiores das sementes. As amostras ficaram em repouso por cerca de 10 minutos antes da leitura.

Para a calibração do citômetro de fluxo Partec CCA (Münster, Germany), foi utilizada uma folha nova e expandida de ervilha, preparada da mesma maneira que as sementes (LANTERI et al., 1993).

Após a preparação dos tecidos, os núcleos foram contados em citômetro, no modo linear para as sementes inteiras e no modo logaritmo para as extremidades das radículas até a contagem de 5.000 a 7.000 núcleos, aproximadamente (LANTERI et al., 1993).

Os resultados de citometria são expressos em histogramas (Figura 7), cuja área de cada pico foi avaliada utilizando o programa DPAC v.2.2. A proporção de núcleos com diferentes conteúdos de DNA, e a razão 4C/2C e 6C/3C foram estabelecidas.

Figura 7 – Histograma representativo da citometria de fluxo (FORTI, 2013). O primeiro pico representa as células menores com conteúdo 2C de DNA que se encontram na fase G_0 e G_1 da mitose e o segundo representa as células maiores, com conteúdo 4C de DNA e que estão na fase G_2 da mitose

O conteúdo de DNA é proporcional ao sinal de fluorescência emitida pelo fluorocromos ligados aos núcleos e captado no citômetro e são expressos em valor de C, sendo 2C igual ao número de núcleos na fase G_1 (primeiro período de crescimento celular) do processo de divisão celular e 4C igual ao número de núcleos na fase de divisão celular G_2 (segundo período de crescimento celular) (Figura 7).

3.11 Análise estatística

Para a análise da variância dos resultados relacionados ao parâmetro fisiológico das sementes foram considerados os estádios de maturação dos frutos de acordo com a coloração (três cores) e os períodos de repouso do fruto (quatro períodos) e a comparação das médias pelo teste de Tukey (5%). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 3x4.

Os demais resultados não foram analisados estatisticamente; as alterações nas substâncias de reserva das sementes e do embrião foram representadas por fotomicrografias e imagens de raios X.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos frutos

A determinação dos estádios de maturação para a colheita dos frutos de pimentão foi baseada primeiramente na cor e também nas dimensões (comprimento e largura) e na massa dos frutos.

As dimensões e a massa dos frutos colhidos foram semelhantes, independentemente da cor, como se observa na Figura 8. Esses dados correspondem aos dos primeiros frutos formados de cada planta, os quais estavam situados na base das plantas e tinham, aproximadamente, 120mm de comprimento e 75mm de largura e 160 g de massa. Além de mais uniformes, sementes de frutos colhidos da parte basal da planta, apresentam germinação e vigor superiores (ALAN; ESER, 2007; DIAS et al., 2006).

A avaliação visual da coloração dos frutos indicou que, para os frutos colhidos verdes há alteração da cor verde para vermelha em alguns pontos da parte basal dos frutos (“ombro”), quando foram mantidos em repouso pós-colheita (Tabela 4), pois foram classificados com nota 1 (totalmente verde) e após os períodos de repouso por 3 ou 14 dias, com nota 1,1 ou 1,25, que indica mudança da cor verde para a vermelha (Tabela 3). Essa mudança foi maior quando os frutos foram colhidos com a cor verde-avermelhada (Tabela 4). Visualmente, os frutos dessa categoria foram classificados com nota média de 3,7 antes do repouso e com nota média de 5,2 após os períodos de repouso, o que quer dizer que os frutos colhidos com 50% da área com a cor vermelha estavam quase que 100% vermelhos após o período de repouso (Tabela 4).

Com relação à cor determinada por meio do colorímetro, a luminosidade (L^*), que é a escala de variação entre as cores branca e preta, não variou, prevalecendo valores entre 41,1 e 54,6 para todos os tratamentos, antes e após o repouso dos frutos (Figura 4 e Tabela 4).

Entretanto houve aumento dos valores de a^* e redução dos valores de C^* e h° após o repouso dos frutos por 7 e 14 dias, indicando a redução da cor verde e aumento das cores amarela e vermelha (Figura 4 e Tabela 4).

Figura 8 – Comprimento e largura, em milímetros (mm), e massa, em gramas (g), de frutos de pimentão colhidos em diferentes estádios de maturação, correspondentes às variações de cores verde, verde-avermelhada e vermelha. A barra representa o desvio padrão

Os frutos verdes mantidos em repouso por 3 dias não mudaram de cor. Os frutos colhidos verde-avermelhados aumentaram a proporção da coloração vermelha do pericarpo e pelas leituras do colorímetro foi possível confirmar essa variação, pois os valores médios de a^* alteraram de +6 para +15 após o repouso. Os valores de croma (C^*) também aumentaram, correspondendo ao aumento da intensidade da cor vermelha e o ângulo de tonalidade h° variou de 60° , antes do repouso - que representa a cor vermelha com maior tom da amarela (no caso mais alaranjada) - para 35° , em média, tendendo para a cor vermelha intensa (Figura 4, Tabela 4).

Para os frutos de cor vermelha houve aumento nos valores de a^* , b^* , C^* e h° após o repouso, representado pelo aumento da tonalidade da cor vermelha. Inclusive o ângulo de cor h° dos frutos verde-avermelhados após 14 dias de repouso foi semelhante ao dos frutos colhidos vermelhos ($h^\circ=23^\circ$)

Tabela 4 – Cores de frutos de pimentão, colhidos com as cores verde, verde-avermelhada e vermelha e mantidos em repouso pós-colheita (R) por 3, 7 ou 14 dias ou sem repouso (0), determinadas visualmente e por meio de colorímetro

Cor do fruto	R	Visual*		Colorímetro									
		Antes	Após	Antes do repouso					Após o repouso				
		repouso	repouso	L*	a*	b*	C*	h°	L*	a*	b*	C*	h°
Verde	0	1,05	-	44,6	-4,1	8,8	9,5	113,7	-	-	-	-	-
	3	1,00	1,10	44,9	-3,0	7,3	7,8	111,4	44,0	-3,5	6,8	7,4	117,0
	7	1,00	1,05	43,5	-2,1	6,5	7,0	105,7	41,9	-1,4	6,1	6,5	100,0
	14	1,00	1,25	54,6	-5,7	10,7	12,6	112,4	41,8	-2,5	6,6	7,2	107,9
Verde-avermelhada	0	3,70	-	44,0	6,7	7,0	11,2	57,1	-	-	-	-	-
	3	3,75	4,67	45,1	6,4	7,4	11,4	60,7	42,5	11,4	9,2	16,0	47,2
	7	3,80	5,58	53,3	5,0	8,9	13,3	66,6	44,5	16,2	10,1	19,7	34,3
	14	3,40	5,35	45,5	6,1	7,8	11,9	62,9	41,9	19,9	8,8	21,8	23,8
Vermelha	0	6,00	-	43,5	15,3	7,6	17,2	26,7	-	-	-	-	-
	3	6,00	6,00	41,6	15,3	7,1	16,9	24,7	41,6	16,2	7,0	17,7	23,4
	7	6,00	6,00	42,5	15,0	6,8	16,5	24,2	41,1	17,5	6,7	18,8	20,8
	14	6,00	6,00	42,2	15,0	6,1	16,2	22,4	41,6	14,6	6,4	16,0	23,9

*Nota determinada visualmente (Tabela 3). 1 - 100% verde; 2 - início coloração vermelha; 3 - ¼ do fruto com coloração vermelha; 4 - ½ do fruto com coloração vermelha; 5 - ¾ do fruto com coloração vermelha; 6 - 100% vermelho

4.2 Avaliação das sementes frescas

4.2.1 Avaliação do teor de água, germinação e massa de matéria seca

Os graus de umidade das sementes frescas ou recém colhidas foram 70% para as sementes de frutos verdes e 50% para as de frutos verde-avermelhados e vermelhos (Tabela 5). O repouso dos frutos não afetou o teor de água das sementes, exceto para as de frutos verdes mantidos em repouso por 3 dias cujas sementes tinham menos água do que as obtidas de frutos mantidos em repouso por 7 e 14 dias.

A germinação de sementes de frutos verdes foi estatisticamente inferior a das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos, independentemente do tempo de repouso dos frutos (Tabela 5). A germinação das sementes frescas de frutos verdes foi estatisticamente superior quando os frutos foram mantidos em repouso por qualquer período de tempo em relação aos frutos sem repouso. Para sementes de frutos verde-avermelhados a germinação foi estatisticamente superior quando os frutos mantidos em repouso por 7 e 14 dias foi em relação a dos mantidos em repouso por 3 dias e sem repouso. Entretanto, a germinação das sementes de frutos vermelhos foi superior quando o fruto foi mantido em repouso por 3 dias e, o repouso por 7 e 14 dias foi prejudicial à germinação(Tabela 5).

Não houve interação significativa entre os resultados da massa de matéria seca por 100 sementes. Entretanto a massa praticamente dobrou em sementes de frutos vermelhos e de verde-avermelhados em relação às sementes de frutos verdes, sendo que o repouso do fruto não aumentou a matéria seca das sementes (Tabela 5).

Tabela 5 – Grau de umidade, GU (%), germinação, G(%), massa de matéria seca de 100 sementes (MMS/100 sementes) e massa de 1000 sementes com 6% de água, em gramas, de sementes recém extraídas de frutos de pimentão (sementes frescas) colhidos em diferentes estádios de maturação correspondentes aos frutos de cores verde, verde-avermelhada e vermelha e mantidos em repouso por 3, 7, 14 dias e sem repouso (0)

Cor do fruto	GU (%)				G			
	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	70,2 aAB	66,4 aB	73,9 aA	73,5 aA	2 cB	8 cA	8 cA	9 cA
Verde-avermelhada	55,5 bA	53,5 bA	51,3 bA	53,2 bA	37 bB	40 bB	62 aA	68 aA
Vermelha	53,0 bA	51,9 bA	50,5 bA	51,5 bA	54 aBC	72 aA	49 bC	58 bB

Cor do fruto	MMS/100 sementes (g)				Massa 1000 sementes (g)			
	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	0,36	0,36	0,31	0,33	2,48 cB	3,60 cA	2,03 bB	2,43 cB
Verde-avermelhada	0,60	0,57	0,57	0,60	5,21 bA	4,60 bB	5,48 aA	5,41 aA
Vermelha	0,56	0,63	0,60	0,60	5,75 aA	5,50 aA	5,30 aA	4,67 bB

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Ausência de letras significa que não houve interação significativa

Na medida em que houve alteração da cor dos frutos aumentou, a matéria seca das sementes e, conseqüentemente, a massa de 1000 sementes (Tabela 5), que variou conforme a cor do fruto e o tempo de repouso. A massa de 1000 sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 3 dias foi estatisticamente superior à dos frutos mantidos em repouso por 7 e 14 dias e sem repouso. Já a das sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 3 dias foi estatisticamente inferior aos demais período de repouso e sem repouso. Para frutos vermelhos, a massa de 1000 sementes foi estatisticamente inferior quando os frutos foram mantidos em repouso por 14 dias em relação aos demais períodos de repouso e sem repouso (Tabela 5).

4.2.2 Avaliação de imagens de raios X

As imagens das sementes obtidas por meio de raios X das sementes frescas (teor de água maior que 50%) indicaram que predominaram as sementes com espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião menor do que 10% (Tabela 6). Entretanto, não é possível afirmar que essas sementes tenham completado seu crescimento, pois quando essas secaram, o espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião aumentou, principalmente nas de frutos verdes.

Conforme aumentou o tempo de repouso dos frutos das sementes extraídas de frutos verdes, a porcentagem de sementes com espaço livre maior do que 10%, entre o tegumento e o endosperma-embrião também aumentou (Tabela 6). Entretanto apesar de as sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 14 dias apresentarem espaços vazios maiores do que 10%, o que indicaria que essas sementes não terminaram seu desenvolvimento, a quantidade de plântulas normais e anormais foi superior a dos demais períodos de repouso.

Com relação as anormalidades de plântulas, a maior parte delas relacionou-se à emissão da raiz primária sem o desenvolvimento das demais partes (Figura 9A), à retenção do tegumento na parte aérea (Figura 9B) ou na raiz primária (Figura 9C), à raiz não desenvolvida (Figura 9E) ou à ausência de raiz primária (Figura 9D).

Tabela 6 – Porcentagem de espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião e a respectiva quantidade de sementes para cada espaço livre(%), e porcentagens de plântulas normais (PN), anormais (PA) e semente não germinada (NG) de sementes recém extraídas de frutos de pimentão (sementes frescas) colhidos em diferentes estádios de maturação correspondentes às cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, aos períodos de repouso (R) de 3, 7, 14 dias e sem repouso (0)

Cor do fruto	R	Espaço livre	Quantidade de sementes (%)	PN (%)	PA (%)	NG (%)
Verde	0	≤10%	92	0	0	100
		10%-19%	7	0	20	80
		20%-30%	1	0	0	100
		≥30%	0	0	0	0
	3	≤10%	40	5	13	83
		10%-19%	50	6	10	84
		20%-30%	7	14	14	72
		≥30%	3	0	0	100
	7	≤10%	13	0	17	83
		10%-19%	54	4	4	92
		20%-30%	27	8	8	84
		≥30%	6	0	0	100
	14	≤10%	15	53	7	40
		10%-19%	37	14	3	83
		20%-30%	48	6	13	81
		≥30%	0	0	0	0
Verde-avermelhada	0	≤10%	64	54	13	33
		10%-19%	27	35	27	38
		20%-30%	4	25	0	75
		≥30%	5	0	0	100
	3	≤10%	70	39	30	31
		10%-19%	21	33	33	33
		20%-30%	8	0	38	63
		≥30%	1	0	0	100
	7	≤10%	63	50	35	15
		10%-19%	29	38	41	21
		20%-30%	5	20	60	20
		≥30%	3	0	0	100
	14	≤10%	71	51	40	9
		10%-19%	20	60	35	5
		20%-30%	4	100	0	0
		≥30%	5	20	0	80
Vermelha	0	≤10%	83	51	27	2
		10%-19%	9	44	56	0
		20%-30%	3	33	33	33
		≥30%	6	0	17	83
	3	≤10%	79	66	29	5
		10%-19%	17	50	50	0
		20%-30%	1	100	0	0
		≥30%	3	0	0	100
	7	≤10%	69	54	39	7
		10%-19%	20	42	42	16
		20%-30%	5	40	20	40
		≥30%	6	0	0	100
	14	≤10%	75	60	37	3
		10%-19%	20	50	35	15
		20%-30%	2	50	0	50
		≥30%	3	0	0	100

Figura 9 – Anormalidades comuns das plântulas oriundas de sementes frescas de pimentão provenientes de diferentes estádios de maturação do fruto representados pelas cores verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos em repouso por 3, 7 e 14 dias ou sem repouso. A: emissão da raiz primária; B: retenção do tegumento na parte aérea; C: retenção do tegumento na raiz primária; D: ausência de raiz primária; E: raiz primária não desenvolvida. As setas indicam as anormalidades. Barra: 0,5 cm

Para as sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos predominou o espaço livre menor do que 10% e entre 10 e 19%, pois visualmente essas sementes já tinham atingido tamanho máximo, como pode ser observado nas imagens de raios X (Figuras 10C, 10D, 10E e 10F). Em outras palavras, o endosperma-embrião estava ocupando praticamente todo o espaço livre disponível, até o tegumento, diferentemente das sementes de frutos verdes (Figura 10B).

A quantidade de plântulas normais foi superior a de anormais quando o espaço livre das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos foi menor do que 10%; para o espaço livre entre 10 a 19%, a porcentagem de plântulas normais e anormais foi similar, independentemente do período de repouso do fruto.

Entretanto, analisando as imagens de raios X das sementes frescas juntamente com a das plântulas (Figuras 10, 11 e 12) não é possível estabelecer relação entre as plântulas normais e as anormais e as sementes não germinadas e as imagens de raios X. Sementes totalmente formadas ou com espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião até 30%, originaram plântulas normais (Figura 10), anormais (Figura 11) ou semente não germinada (Figura 12).

O que é possível perceber é que quando as sementes estavam vazias ou quando o endosperma estava concentrado na região central da semente, próximo à

micrópila (espaço livre superior a 30%) a semente não germinou (Figura 12C) e que quando há problema visível no embrião, como embrião com diferentes densidades de tecido, visualizado pela cor mais escura na Figura 12 D (indicado pela seta), a plântula é anormal ou a semente não germina.

Figura 10 – Imagens de raios X de sementes frescas de frutos A: verdes mantidos em repouso por 3 dias; B: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C: verde-avermelhados sem repouso; D: verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 dias; E: vermelhos sem repouso e F: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias. Todas essas sementes originaram plântula normal (G), independentemente do espaço livre vazio entre o tegumento e o endosperma-embrião (o valor do lado esquerdo de cada imagem representa a porcentagem desse espaço livre vazio em cada semente). Barra: 0,5 cm (G)

Figura 11 – Imagens de raios X de sementes frescas de frutos A: verde-avermelhados sem repouso; B e C: verde-avermelhados mantidos em repouso por 3 dias; D: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias; E: vermelhos sem repouso e F: vermelhos mantidos em repouso por 7 dias. Todas essas sementes originaram plântula anormal, independentemente do espaço livre vazio entre o tegumento e o endosperma-embrião (o valor do lado esquerdo de cada imagem representa a porcentagem desse espaço livre vazio em cada semente). Barra: 0,5 cm

Figura 12 - Imagens de raios X de sementes frescas de frutos A: verdes sem repouso; B: verdes mantidos em repouso por 7 dias; C e D: verde-avermelhados sem repouso; E: vermelhos mantidos em repouso por 7 dias. Todas essas sementes não germinaram (F), independentemente do espaço livre vazio entre o tegumento e o endosperma-embrião (o valor do lado esquerdo de cada imagem representa a porcentagem desse espaço livre em cada semente). Em D o segundo número representa a porcentagem do espaço livre entre o embrião e o endosperma, indicado pela seta. Barra: 0,5 cm (F)

4.3 Avaliação das sementes secas

4.3.1 Primeira época

4.3.1.1 Avaliação da viabilidade e do vigor

O teor de água das sementes secas variou de 8,1% a 9,9% (Tabela 7) entre os tratamentos e não apresentou interação significativa.

A germinação das sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 14 dias foi estatisticamente superior à dos demais períodos de repouso e sem repouso (Tabela 7). A germinação das sementes de frutos verde-avermelhados mantidas em repouso por 7 e 14 dias foi estatisticamente superior a das mantidas em repouso por 3 dias e sem repouso. A germinação das sementes de frutos vermelhos mantidos em repouso por 3 dias foi estatisticamente superior a das de frutos mantidos em repouso por 7 e 14 dias e sem repouso (Tabela 7).

Apesar dos resultados entre as épocas de avaliação não terem sido avaliados estatisticamente, em valores absolutos é possível afirmar que a porcentagem de germinação das sementes secas (Tabela 7) aumentou em relação a das sementes frescas com exceção das sementes extraídas de frutos verdes sem repouso e mantidos em repouso por 3 e 7 dias. A germinação das sementes de frutos verdes foi estatisticamente inferior a das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos como também observado para os resultados da avaliação das sementes frescas.

A emergência da plântula (porcentagem e velocidade) foi estatisticamente superior para as sementes de frutos verde-avermelhados e de vermelhos quando comparadas com a das sementes de frutos verdes (Tabela 7). A porcentagem e a velocidade de emergência da plântula foram estatisticamente superiores quando as sementes de frutos verdes foram mantidos em repouso por 14 dias em relação aos demais períodos de repouso e sem repouso. Para as sementes extraídas de frutos verde-avermelhados a emergência da plântula foi superior quando esses foram mantidos em repouso por 3 e 14 dias em relação aos resultados das extraídas de frutos sem repouso e mantidos em repouso por 7 dias; o repouso não interferiu na velocidade de emergência da plântula de sementes originadas desses frutos. A porcentagem de emergência da plântula das sementes de frutos vermelhos sem repouso e mantidos em repouso por 7 dias foi estatisticamente superior à das de frutos vermelhos dos demais períodos de repouso.

As sementes extraídas de frutos verdes não germinaram após o teste de envelhecimento acelerado ou germinou apenas 1%, mesmo após o repouso dos frutos sem diferenças estatísticas significativas. A germinação das sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias após o teste de envelhecimento acelerado foi estatisticamente superior a dos demais períodos com e sem repouso. Para as sementes de frutos vermelhos o repouso por 3 dias foi benéfico para a germinação após o envelhecimento acelerado, resultado estatisticamente superior aos dos demais períodos de repouso e sem repouso (Tabela 7).

Tabela 7- Grau de umidade (GU), germinação (G), emergência da plântula (EP), envelhecimento acelerado (EA)(%), condutividade elétrica (CE, em $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e índice de velocidade de emergência da plântula (IVE) de sementes secas de pimentão, de diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos em repouso por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0). Primeira época de avaliação (julho a agosto de 2011)

Cor do fruto	GU (%)				G (%)				EP (%)			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	8,6	9,9	8,2	8,3	0 cB	1 cB	4 cB	17 cA	1 cC	4 cC	8 cB	37 bA
Verde-avermelhada	8,8	8	8,4	8,1	47 bC	64 bB	76 aA	79 aA	59 bB	64 aA	56 bC	64 bA
Vermelha	9,3	8,3	8,4	8,2	60 aB	81 aA	64 bB	65 bB	76 aA	56 bC	77 aA	71 aB

Cor do fruto	EA (%)				CE ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$)				IVE			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	0 cA	1 cA	0 cA	1 bA	1831,9 bAB	1592, 0 bA	2144,5 bB	1851,9 bAB	0,09 cB	0,10 bB	0,26 cB	1,46 bA
Verde-avermelhada	19 bC	31 bB	41 a bB	57 aA	849,7 aA	724,7 aAB	728,6 bAB	683,9 aA	2,20 bA	2,53 aA	2,20 bA	2,80 aA
Vermelha	47 aB	70 aA	51 aB	51 aB	723,6 aA	660,4 aA	633,5 aA	568,7 aA	3,20 aA	2,08 aB	3,19 aA	2,89 aA

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Ausência de letras significa que não houve interação significativa

Com relação aos resultados do teste de condutividade elétrica, as sementes de frutos verdes apresentaram valores superiores aos das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos. Os valores da condutividade elétrica para as sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 3 dias foram estatisticamente inferiores aos das sementes de frutos mantidos em repouso por 7 dias. Para sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias os resultados do teste de condutividade elétrica foram estatisticamente inferiores quando comparados aos das sementes dos frutos sem repouso. Os resultados da condutividade elétrica das sementes de frutos vermelhos para os diferentes períodos de repouso não foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 7).

4.3.1.2 Avaliação de imagens de raios X

Quando as sementes foram avaliadas secas, foi observado que o espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião aumentou em relação ao das sementes frescas, em função da redução da quantidade de água, principalmente as de frutos verdes (Tabela 8).

Ao analisar o espaço livre das sementes de frutos verdes, foi observado o predomínio de sementes com espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião maior ou igual a 20% e a maioria não germinou, exceto para as sementes extraídas de frutos mantidos em repouso por 14 dias, que originaram mais plântulas normais e anormais em relação aos demais períodos, com e sem repouso.

Conforme os frutos amadureceram (verde-avermelhados e vermelhos), 75% a 88% das sementes apresentaram espaço livre menor do que 10% e a quantidade de plântulas normais foi superior a das sementes de frutos verdes (Tabela 8).

Quanto maior o período de repouso do fruto, maior a porcentagem de plântulas normais, porém o espaço livre entre tegumento e endosperma-embrião da maioria das sementes manteve-se menor do que 10%, ou seja, não houve alteração do tamanho do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião das sementes extraídas dos frutos verde-avermelhados e vermelhos, mantidos em repouso por diferentes períodos de tempo.

Tabela 8 - Porcentagem de espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião e a respectiva quantidade de sementes para cada espaço livre (%) e, porcentagens de plântulas normais (PN), anormais (PA) e semente não germinada (NG) de sementes secas de pimentão extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação correspondentes aos frutos de cores verde, verde-avermelhada e vermelha, aos períodos de repouso (R) de 3, 7, 14 dias e sem repouso (0). Primeira época de avaliação (julho a agosto de 2011)

Cor do fruto	R	Espaço livre	Quantidade de sementes (%)	PN (%)	PA (%)	NG (%)
Verde	0	≤10%	12	0	8	92
		10%-19%	35	0	0	100
		20%-30%	38	0	0	100
		≥30%	15	0	0	100
	3	≤10%	9	0	44	56
		10%-19%	34	3	3	94
		20%-30%	44	0	0	100
		≥30%	13	0	0	100
	7	≤10%	0	0	0	0
		10%-19%	21	5	10	85
		20%-30%	57	0	7	93
		≥30%	22	0	0	100
	14	≤10%	3	67	33	0
		10%-19%	11	0	73	27
		20%-30%	59	14	31	55
		≥30%	27	0	11	89
Verde-avermelhada	0	≤10%	81	2	56	20
		10%-19%	16	13	56	31
		20%-30%	2	0	0	100
		≥30%	1	0	0	100
	3	≤10%	75	10	73	17
		10%-19%	17	12	53	35
		20%-30%	4	0	25	75
		≥30%	4	0	50	50
	7	≤10%	79	18	74	9
		10%-19%	17	13	80	7
		20%-30%	2	50	50	0
		≥30%	0	0	0	0
	14	≤10%	80	54	37	9
		10%-19%	17	47	47	7
		20%-30%	1	100	0	0
		≥30%	2	0	0	100
Vermelha	0	≤10%	77	18	75	6
		10%-19%	12	17	75	8
		20%-30%	2	0	100	0
		≥30%	9	11	11	78
	3	≤10%	85	42	48	10
		10%-19%	11	36	64	0
		20%-30%	1	100	0	0
		≥30%	9	0	11	89
	7	≤10%	81	38	53	9
		10%-19%	10	20	60	20
		20%-30%	2	0	0	100
		≥30%	7	0	29	71
	14	≤10%	88	51	44	6
		10%-19%	4	75	25	0
		20%-30%	0	0	0	0
		≥30%	8	0	0	100

A avaliação do teste de germinação das sementes secas, radiografadas pelos raios X, indicou que a maioria das anormalidades das plântulas foi similar às anormalidades das plântulas originadas das sementes frescas, e relacionou-se à emissão da raiz primária sem o desenvolvimento das demais partes (Figura 13A), à retenção do tegumento na parte aérea (Figura 13B) ou na raiz primária (Figura 13C), ao nível de desenvolvimento da raiz (Figura 13D) ou à ausência de raiz primária (Figura 13E).

Não foi possível estabelecer a relação entre as plântulas normais, anormais e sementes não germinadas e a morfologia interna das sementes secas e nem das sementes frescas. Uma vez que, sementes totalmente formadas ou com espaço livre entre tegumento e o endosperma-embrião até 30%, originaram plântulas normais (Figura 14), anormais (Figura 15) ou semente não germinada (Figura 16), para todos os tratamentos. Sementes de frutos verdes com espaço livre maior do que 30% não germinam, exceto as de frutos mantidos em repouso por 14 dias que podem originar plântula anormal (Tabela 8). Sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos com espaço maior do que 30% raramente originaram plântula normal.

Figura 13 - Anormalidades comuns das plântulas originadas de sementes secas de pimentão provenientes de diferentes estádios de maturação do fruto representados pelas cores verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos em repouso por 3, 7 e 14 dias ou sem repouso. A: emissão da raiz primária; B: retenção do tegumento na parte aérea; C: retenção do tegumento na raiz primária; D: sem raiz primária; E: raiz primária não desenvolvida. As setas indicam as anormalidades. Barra: 0,5 cm

Além do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião, algumas sementes também apresentaram espaço livre entre o embrião e o endosperma (Figuras 14H, 14J e 14K). Segundo Dell'Aquila (2007) sementes de pimentão com menos de 2,7% de espaço livre entre o endosperma e o embrião foram classificadas como viáveis com germinação entre 97% e 100%. Essa afirmação também foi confirmada por Gagliardi e Marcos Filho (2011). A porcentagem de sementes com espaço livre entre o embrião e o endosperma foi inferior a 6% como se observa na Tabela 9, e não confirmou essa relação como adequada para a caracterização das sementes de pimentão cultivar "Ikeda" utilizadas nessa pesquisa. Todas as sementes de frutos verdes que apresentaram espaço livre entre o endosperma e o embrião não germinaram (Tabela 9); sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos que tinham espaço livre entre o endosperma e o embrião menor ou igual a 2,7% originaram plântulas normais (Figuras 14J e 14K), anormais (Figuras 15D) e sementes não germinadas (Figura 16C), assim como as que tinham espaço livre maior que 2,7% (Figuras 14H, 16I e 16L).

Sementes com espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião originaram plântulas normais menores que sementes totalmente formadas (sem espaço livre) (Figuras 17A, 17B e 17D), como também observado por Gagliardi (2009) e Gagliardi e Marcos Filho (2011) em sementes de pimentão. Sementes com espaço livre entre o endosperma e o embrião, também podem originar plântula normal menor (Figura 17C).

Tabela 9 - Porcentagem de sementes secas de pimentão que apresentaram espaço livre entre o embrião e o endosperma (% sementes), maior ou menor do que 2,7% e a porcentagem de plântulas normais (N), anormais (A) e semente não germinada (NG) de cada categoria de espaço livre, provenientes de frutos de coloração verde, verde-avermelhada e vermelha mantidos em repouso pós-colheita (R) por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0) de todas as épocas de avaliação

Cor do fruto	R	Espaço livre	Época 1				Época 2				Época 3				Época 4			
			% sementes	N	A	NG	% sementes	N	A	NG	% sementes	N	A	NG	% sementes	N	A	NG
Verde	0	≤2,7%	0	0	0		0	0	0	0	1	0	0	100	0	0	0	0
		>2,7%	5	0	0	100	1	0	0	100	1	0	0	100	1	0	0	100
	3	≤2,7%	1	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100
		>2,7%	0	0	0	0	2	0	0	100	0	0	0	0	1	100	0	0
	7	≤2,7%	2	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100
		>2,7%	1	0	0	100	1	0	0	100	2	0	0	100	0	0	0	0
	14	≤2,7%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100	1	0	0	100
		>2,7%	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	50	50	1	0	0	100
Verde-avermelhada	0	≤2,7%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100	3	0	0	100
		>2,7%	3	33	0	67	3	0	0	100	3	0	0	100	2	50	50	0
	3	≤2,7%	1	0	0	100	1	0	100	0	2	50	0	50	0	0	0	0
		>2,7%	0	0	0	0	7	0	43	57	6	0	50	50	4	33	33	33
	7	≤2,7%	2	0	100	0	1	0	100	0	5	0	50	50	1	0	100	0
		>2,7%	0	0	0	0	1	0	100	0	5	22	66	12	1	0	100	0
	14	≤2,7%	2	0	100	0	1	0	100	0	1	0	100	0	2	50	50	0
		>2,7%	5	22	44	22	1	0		100	3	67	33	0	3	0	67	33
Vermelha	0	≤2,7%	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0
		>2,7%	2	0	100	0	3	33	0	67	2	0	50	50	0	0	0	0
	3	≤2,7%	0	0	0	0	3	0	67	33	2	50	0	50	0	0	0	0
		>2,7%	1	0	0	100	1	0	0	100	5	0	80	20	0	0	0	0
	7	≤2,7%	6	50	33	17	0	0	0	0	2	50	50	0	1	100	0	0
		>2,7%	5	0	0	100	6	0	17	83	1	0	0	100	4	0	50	50
	14	≤2,7%	0	0	0	0	1	0	100	0	1	0	100	0	2	0	50	50
		>2,7%	5	20	60	20	5	20	40	40	5	40	0	60	1	0	0	100

Figura 14 – Imagens de raios X de sementes secas extraídas de frutos verdes (A, B, C e D), verde-avermelhado (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), sem repouso (A, E e I) e mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) e 14 dias (D, H e L). Todas essas sementes originaram plântula normal (M), independentemente do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião (o valor do lado esquerdo de cada imagem representa a porcentagem desse espaço livre de cada semente). Em H, J e K o segundo número representa a porcentagem do espaço livre entre o embrião e o endosperma, indicado pelas setas. Barra: 0,5 cm

Figura 15 – Imagens de raios X de sementes secas extraídas de frutos A: verdes mantidos em repouso por 3 dias; B: verdes mantidos em repouso por 7 dias; C: verde-avermelhados sem repouso; D: verde-avermelhado mantidos em repouso por 7 dias; E e F: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias. Todas essas sementes originaram plântulas anormais, independentemente do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião (o valor do lado esquerdo de cada imagem representa a porcentagem desse espaço livre em cada semente). Em D o segundo número representa a porcentagem do espaço livre entre o embrião e o endosperma, indicado pela seta. Barra: 0,5 cm

Figura 16 - Imagens de raios X de sementes secas de frutos verdes (A, B, C e D); verde-avermelhado (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), sem repouso (A, E e I) e mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) e 14 dias (D, H e L). Todas essas sementes não germinaram (M), independentemente do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião (o valor do lado esquerdo de cada imagem representa a porcentagem desse espaço livre de cada semente). Em C, I e L o segundo número representa a porcentagem do espaço livre entre o embrião e o endosperma, indicados pelas setas. Barra: 0,5 cm (M)

Figura 17 - Imagens de raios X de sementes secas de frutos A: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias; B e C: verde-avermelhados sem repouso; D: verdes mantidos em repouso por 14 dias que originaram plântulas normais. O valor do lado esquerdo de cada imagem representa a porcentagem desse espaço livre de cada semente. Em C o segundo número representa a porcentagem do espaço livre entre o embrião e o endosperma, indicado pela seta. Barra: 0,5 cm

4.3.1.3 Avaliação da atividade da enzima endo- β -mananase

O grau de umidade das sementes secas variou de 8,1% a 9,9% (Tabela 10) e o das hidratadas por 24h e variou de 71,8% (sementes de frutos verdes) a 49,1% (sementes de frutos vermelhos). Sementes secas extraídas de frutos verdes têm os maiores níveis de atividade enzimática (entre 39,9 e 115,5 pmol.s^{-1}), quando comparados aos níveis nas sementes secas de frutos verde-avermelhados (entre 1,0 e 9,1 pmol.s^{-1}) e vermelhos (entre 0,5 e 1,0 pmol.s^{-1}) (Tabela 10). Os níveis da atividade da enzima das sementes secas de frutos verdes e verde-avermelhados diminuiu com o repouso dos frutos e a de frutos vermelhos a atividade da enzima manteve-se constante.

Tabela 10 – Grau de umidade (GU%) e atividade da enzima endo- β -mananase (pmol.s^{-1}), de sementes de pimentão avaliadas secas ou hidratadas por 24 horas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos em repouso (R) por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0). Primeira época de avaliação (julho a agosto de 2011)

Cor fruto	R	Seca		24h	
		GU (%)	Atividade (pmol.s^{-1})	GU (%)	Atividade (pmol.s^{-1})
Verde	0	8,6	75,2	71,8	5,2
	3	9,9	115,5	71,4	3,0
	7	8,2	102,2	71,6	2,8
	14	8,3	39,9	69,9	2,6
Verde-avermelhada	0	8,8	9,1	53,3	12,2
	3	8,0	3,3	54,1	21,3
	7	8,4	1,0	57,1	22,8
	14	8,1	1,0	50,9	14,4
Vermelha	0	9,3	0,5	53,5	29,4
	3	8,3	0,5	50,5	27,8
	7	8,4	1,0	50,0	58,9
	14	8,2	1,0	49,1	67,4

Os níveis da atividade da enzima endo- β -mananase das sementes retiradas de frutos verdes e hidratadas por 24h, foi menor em relação aos das sementes retiradas de frutos verde-avermelhados e vermelhos e aos das sementes secas (Tabela 10). A atividade enzimática das sementes hidratadas de frutos verdes também diminuiu com o repouso dos frutos.

A atividade enzimática das sementes hidratadas extraídas de frutos verde-avermelhados aumentou quando os frutos ficaram em repouso por 3 ou 7 dias em relação à das sementes extraídas de frutos sem repouso pós-colheita; a atividade enzimática das sementes extraídas de frutos vermelhos aumentou quando os frutos foram mantidos em repouso por 7 ou 14 dias em relação às extraídas dos frutos sem repouso ou mantidos em repouso por 3 dias.

4.3.1.4 Testes histoquímicos

Para a análise de compostos fenólicos, os cortes de todas as partes das sementes não foram corados pelo cloreto férrico, indicando ausência desses compostos.

Foi verificado que nos cortes das extremidades das radículas, que foram corados com Xylidine Ponceau, maior concentração de núcleos visíveis e, nos frutos verde-avermelhados, tal concentração foi menor em relação às dos frutos verdes (Figura 18). Foi observado também que as extremidades de radículas de sementes de frutos verdes coradas com o Xylidine Ponceau apresentaram coloração mais intensa quando os frutos não ficaram em repouso pós-colheita ou ficaram em repouso por 3 dias e coloração mais fraca para as extremidades da radícula de sementes de frutos mantidos em repouso por 7 e 14 dias e para as demais cores de frutos, independentemente do período de repouso.

As extremidades das radículas das sementes extraídas de frutos verdes sem repouso coloridas com Sudan IV tinham coloração vermelha, enquanto que as dos frutos verdes mantidos em repouso a coloração era rósea ou não houve alteração da coloração, indicando que nesses tecidos não há lipídeos (Figuras 19A e 19B). Provavelmente as extremidades das radículas que não foram coradas, os lipídeos foram consumidos ou transformados durante o repouso do fruto ou em alguns casos podem indicar a morte das sementes. Para os demais tratamentos, tanto as sementes extraídas de frutos verde-avermelhados como as extraídas de frutos vermelhos, todas as extremidades das radículas estavam coloridas, indicando a presença de lipídeos (Figuras 19C, 19D, 19E e 19F).

Nas reações com PAS e azul de toluidina (Figuras 20 e 21) foi possível verificar que as células do hipocótilo das sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos são maiores que as dos frutos verdes, principalmente as células dos hipocótilos das sementes de frutos vermelhos mantidos em repouso por 7 e 14 dias que visualmente apresentaram a maior largura (Figuras 20K, 20L, 21K, 21L). As células dos hipocótilos das sementes de frutos vermelhos mantidos em repouso por 14 dias apresentaram coloração mais clara indicando diminuição de polissacarídeos neutros tanto no citoplasma como nas paredes.

Nas extremidades das radículas e dos hipocótilos de sementes, extraídas de frutos verdes sem repouso (Figura 21A), coloridas com PAS, existe no citoplasma dessas células conteúdo granular que não são observados no conteúdo celular das sementes extraídas dos frutos após o repouso.

Figura 18 - Extremidades das radículas de sementes de pimentão extraídas de frutos verdes (A, B, C e D), verde-avermelhados (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) ou 14 dias (D, H e L) ou sem repouso (A, E e I), e coradas com Xylidine Ponceau. (Primeira época de avaliação). Barra: 20μm

Figura 19 - Extremidades de radículas de sementes de pimentão extraídas de frutos: A: verdes sem repouso; B: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C: verde-avermelhados sem repouso; D: verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 dias; E: vermelhos sem repouso e F: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias e hipocótilos de sementes de frutos G: verdes sem repouso; H: verdes mantidos em repouso por 7 dias; I: verdes mantidos em repouso por 14 dias; J: verde-avermelhados sem repouso; K: verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 dias e L: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias e corados com Sudan IV. (Primeira época de avaliação). Barra: 20µm

Figura 20 - Hipocótilos de sementes de pimentão extraídas de frutos verdes (A, B, C e D), verde-avermelhados (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) ou 14 dias (D, H e L) ou sem repouso (A, E e I), e corados com azul de toluidina. (Primeira época de avaliação). Barra: 20 μ m

Figura 21 - Hipocótilos de sementes de pimentão extraídas de frutos verdes (A, B, C e D), verde-avermelhados (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) ou 14 dias (D, H e L) ou sem repouso (A, E e I), e coradas com PAS. (Primeira época de avaliação). Barra: 20μm

Os resultados das análises da coloração dos hipocótilos com Sudan IV foram similares aos resultados dos tecidos das extremidades das radículas, ou seja, hipocótilos de sementes de frutos verdes sem repouso foram corados (Figura 19G) indicando que houve reação dos lipídeos durante o repouso dos frutos verdes; os hipocótilos das sementes dos frutos mantidos em repouso permaneceram sem coloração, indicando ausência de lipídios (Figura 19H) ; para as sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos a reação foi positiva para lipídios (Figura 19I, 19J, 19k, 19L).

Na Figura 22 observa-se que as células da parte interna do endosperma são justapostas, com espaço intercelulares reduzidos, provavelmente devido ao aumento da espessura da parede em relação à parede das células da parte externa do endosperma (Figura 22A, 22B, 22C, 22D, 22E, 22F), que são delgadas e os espaço intercelulares proeminentes. A coloração com o PAS indicou que existiam açúcares neutros, que foram solubilizados com o processo de amadurecimento do fruto (Figuras 22I, 22J, 22K, 22L, indicado pelas setas), pois a substância que preenche o espaço corou-se intensamente, indicando que há carboidratos neutros entre as paredes.

As partes interna e externa do endosperma das sementes de frutos verdes sem repouso tinham a parede celular delgada (coloração mais clara, Figuras 22A e 22G) em relação a das sementes dos frutos verdes mantidos em repouso por 14 dias (Figura 22B e 22H) e em relação a das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos (Figuras 22C, 22D, 22E e 22F). As células da parte externa do endosperma das sementes de frutos verdes (Figuras 22G e 22H) apresentam semelhanças anatômicas com as células da parte interna do endosperma quando comparadas com as células das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos.

Os corpos protéicos da parte interna do endosperma corados com Xylidine Ponceau das células das sementes de frutos verdes atinham granulações menores e coloração intensa (Figuras 23A e 23B); as células das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos tinham granulações maiores e a intensidade de coloração variou dentro do citoplasma de uma célula, na maior parte do tecido estudado (Figuras 23C, 23D, 23E e 23F).

Figura 22 – Endospermas de sementes de pimentão de frutos A, G: verdes sem repouso; B, H: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C, I: verde-avermelhados sem repouso; D, J: verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 dias; E, K: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias e F, L: vermelhos mantidos em repouso por 14 dias e coradas com PAS. A, B, C, D, E e F representam a parte interna do endosperma e G, H, I, J, K e L a parte externa do endosperma.(Primeira época de avaliação). As setas indicam espaço intercelulares. Barra: 20µm

Figura 23 – Endospermas de sementes de pimentão de frutos A: verdes mantidos em repouso por 3 dias; B, H: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C: verde-avermelhados sem repouso; D: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias; E, K: vermelhos mantidos em repouso por 2 dias; F, L: vermelhos mantidos em repouso por 14 dias; G: verdes sem repouso; I: verde-avermelhados mantidos em repouso por 3 dias e; J: verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 dias e coradas com Xylidine Ponceau. A, B, C, D, E e F representam a parte interna endosperma e G, H, I, J, K e L a parte externa do endosperma.(Primeira época de avaliação). Barra: 20µm

Os corpos proteicos das células da parte externa do endosperma das sementes dos frutos verde-avermelhados são menores que os das células da parte interna do endosperma e, devido às diferentes tonalidades de vermelho desses corpos, é possível sugerir que essas proteínas têm composições diferentes.

As células da parte interna do endosperma das sementes, retiradas de frutos verdes sem repouso, apresentaram coloração positiva para Sudan IV e as células do endosperma das sementes dos frutos após o repouso não reagiram, pois se mantiveram incolores (Figuras 24A, e 24B), conforme verificado na extremidade da radícula e no hipocótilo. Para as células da parte externa do endosperma ocorreu o inverso, sementes de frutos sem repouso não foram coradas enquanto que as dos frutos mantidos em repouso, foi positiva para lipídeos (Figura 24G e 24H). No endosperma de sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos houve reação para lipídeos e a coloração foi intensa e uniforme, independentemente do tempo de repouso (Figura 24C, 24D, 24E, 24F, 24I, 24J, 24K, 24L).

Não foram encontradas diferenças anatômicas entre as células do endosperma micropilar nem entre as dos cotilédones para nenhum dos tratamentos.

Figura 24 – Endospermas de sementes de pimentão de frutos A: verdes sem repouso; B, G: verdes mantidos em repouso por 3 dias; C, H: verdes mantidos em repouso por 14 dias; D, I: verde-avermelhados sem repouso; E, K: vermelhos mantidos em repouso por 2 dias; F, L: vermelhos mantidos em repouso por 7 dias; J: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias e coradas com Sudan IV. A, B, C, D, E e F representam a parte interna do endosperma e G, H, I, J, K e L a parte externa do endosperma. (Primeira época de avaliação). Barra: 20µm

4.3.2 Segunda época

4.3.2.1 Avaliação da viabilidade e do vigor

Após três meses de armazenamento (segunda época), o teor de água das sementes diminuiu em relação à primeira época e variou de 5,1 a 6,4%, porque as sementes entraram em equilíbrio higroscópico com o meio em que estavam armazenadas (50% umidade relativa do ar e 20 °C).

A germinação das sementes extraídas de frutos verdes foi estatisticamente inferior a das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos (Tabela 11).

A germinação das sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 7 e 14 dias foi superior à das dos frutos verdes sem repouso. A germinação das sementes de frutos verde-avermelhados que foram mantidos em repouso superou a das de frutos sem repouso. A germinação das sementes de frutos vermelhos não foi significativamente diferente em função dos períodos de repouso.

Os resultados da porcentagem e da velocidade de emergência da plântula foram semelhantes aos da germinação (Tabela 11). A emergência da plântula de sementes extraídas de frutos verdes foi superior quando os frutos ficaram em repouso por 7 e 14 dias em relação a das sementes dos frutos sem repouso; para o índice de velocidade de emergência, os resultados das sementes de frutos verdes mantidos em repouso por qualquer período de tempo foram superiores aos das sementes sem repouso. A porcentagem de emergência da plântula das sementes de frutos verde-avermelhados e a porcentagem e velocidade de emergência da plântula das sementes de frutos vermelhos mantidos em repouso por 3 dias foram inferiores aos resultados dos demais períodos de repouso e sem repouso.

Os valores da velocidade de germinação foram maiores que os da primeira época provavelmente devido a oscilação da temperatura (Figura 25). A temperatura média do ambiente na segunda época foi entre 20 °C e 25 °C em todo o período, enquanto que na primeira época oscilou entre 15 °C e 26 °C.

Figura 25 - Temperatura média, máxima e mínima em °C, durante os teste de emergência da plântula das sementes de pimentão de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, representados pelas cores verde, verde-avermelhada e vermelha, os quais ficaram em repouso pós-colheita por 3, 7 e 14 dias ou sem repouso, para as quatro épocas de avaliação

As plântulas originadas de sementes extraídas de frutos vermelhos e verde-avermelhados emergiram mais rapidamente e em maior quantidade que as dos frutos verdes.

A germinação das sementes de frutos verdes após o teste de envelhecimento acelerado não foi influenciada pelo repouso do fruto e, portanto, não apresentou diferenças estatísticas significativas; a germinação de sementes extraídas de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias foi superior à germinação das sementes dos demais períodos de repouso do fruto. A germinação das sementes após o teste de envelhecimento acelerado extraídas de frutos vermelhos mantidos repouso por 3 dias superou significativamente à das sementes sem repouso e à das dos frutos mantidos em repouso por 7 dias. Após o teste de envelhecimento acelerado, a germinação das sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos superou significativamente a das sementes obtidas dos frutos verdes (Tabela 11).

Tabela 11 - Grau de umidade (GU), germinação (G), emergência da plântula (EP), envelhecimento acelerado (EA) (%), condutividade elétrica (CE, em $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e índice de velocidade de emergência da plântula (IVE) de sementes de pimentão secas, de diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos repouso por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0). Segunda época de avaliação (novembro e dezembro de 2011)

Cor do fruto	GU (%)				G (%)				EP (%)			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	5,7	5,1	6,2	6,2	0 cB	5 cAB	8 bA	9 bA	0 bB	7 bAB	10 cA	12 bA
Verde-avermelhada	5,9	6,4	5,8	6,0	55 bB	71 bA	77 aA	76 aA	75 aA	61 aB	79 aA	76 aA
Vermelha	5,3	6,4	6,3	6,2	74 aA	84 aA	74 aB	73 aA	74 aA	59 aB	71 bA	74 aA

Cor do fruto	EA (%)				CE ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$)				IVE			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	0 cA	0 cA	1 bA	7 bA	2037,3	1675,1	2218,5	1830,7	0,00 bB	0,22 bA	0,33 bA	0,43 bA
Verde-avermelhada	20 bB	45 bB	41 aB	56 aA	790,3	683,5	685,4	641,9	3,39 aA	2,27 aB	3,42 aA	3,33 aA
Vermelha	47 aBC	63 aA	41 aC	55 aAB	622,3	565,9	599,8	558,7	3,22 aA	2,24 aB	2,9 aAB	3,09 aA

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Ausência de letras significa que não houve interação significativa

A análise dos resultados do teste de condutividade elétrica da segunda época (Tabela 11) não apresentou interação significativa entre os fatores (cor do fruto x período de repouso). Apesar disso, em valores absolutos, os resultados da condutividade elétrica das sementes de frutos verdes foram superiores ao dos da condutividade das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos.

4.3.2.2 Avaliação de imagens de raios X

Da mesma maneira que na primeira época, para as sementes extraídas de frutos verdes, independentemente do período de repouso do fruto, predominou o espaço livre maior do que 20%. Para as sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos predominou o espaço livre menor do que 10% (Tabela 12).

A maioria das sementes de frutos verdes não germinou (Tabela 12), independentemente do tamanho do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião e assim como na primeira época, sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 14 dias continuaram apresentando maior porcentagem de plântulas normais e anormais em relação aos demais períodos de repouso e sem repouso quando tinham menos de 30% de espaço livre.

Conforme os frutos amadureceram e ficaram em repouso por mais tempo (frutos verde-avermelhados a partir de 7 dias de repouso), mais de 70% das sementes apresentaram espaço livre menor do que 10% e a quantidade de plântulas normais foi maior, principalmente em sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias, e de frutos vermelhos mantidos em repouso por 3 dias (Tabela 12).

Assim como nos resultados de germinação, quanto maior o período de repouso do fruto, maior a porcentagem de plântulas normais, porém o espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião da maioria das sementes manteve-se menor do que 10%, ou seja, o repouso do fruto e o armazenamento das sementes não interferiram no tamanho do espaço livre das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos.

As sementes com espaço livre maior que 30% não germinaram e as que germinaram originaram plântula anormal (Tabela 12), para todos os tratamentos.

Tabela 12 - Porcentagem de espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião e a respectiva quantidade de sementes para cada espaço livre (%) e, porcentagens de plântulas normais (PN), anormais (PA) e semente não germinada (NG) de sementes secas de pimentão extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação correspondentes aos frutos de cores verde, verde-avermelhada e vermelha, aos períodos de repouso (R) de 3, 7, 14 dias e sem repouso (0). Segunda época de avaliação (novembro e dezembro de 2011)

Cor do fruto	R	Espaço livre	Quantidade de sementes (%)	PN (%)	PA (%)	NG (%)
Verde	0	≤10%	10	0	0	100
		10%-19%	27	4	0	95
		20%-30%	41	0	0	100
		≥30%	21	0	0	100
	3	≤10%	10	0	30	70
		10%-19%	35	0	3	97
		20%-30%	35	0	0	100
		≥30%	20	0	0	100
	7	≤10%	9	0	100	0
		10%-19%	16	0	13	88
		20%-30%	50	0	0	100
		≥30%	25	0	0	100
	14	≤10%	2	0	0	100
		10%-19%	19	6	39	56
		20%-30%	55	2	25	74
		≥30%	25	0	8	92
Verde-avermelhada	0	≤10%	66	17	51	32
		10%-19%	15	7	33	60
		20%-30%	4	25	25	50
		≥30%	14	7	0	93
	3	≤10%	69	28	52	20
		10%-19%	24	29	54	17
		20%-30%	4	25	50	25
		≥30%	3	0	0	100
	7	≤10%	81	60	32	7
		10%-19%	15	60	33	7
		20%-30%	2	0	50	50
		≥30%	2	0	0	100
	14	≤10%	80	74	22	4
		10%-19%	15	87	13	0
		20%-30%	2	50	0	50
		≥30%	3	0	0	100
Vermelha	0	≤10%	78	55	42	3
		10%-19%	12	83	8	8
		20%-30%	2	50	50	0
		≥30%	8	13	0	88
	3	≤10%	86	75	21	4
		10%-19%	8	50	38	13
		20%-30%	3	0	33	67
		≥30%	3	0	0	100
	7	≤10%	78	60	35	5
		10%-19%	11	36	45	18
		20%-30%	4	0	25	75
		≥30%	7	0	0	100
	14	≤10%	92	61	32	7
		10%-19%	5	40	40	20
		20%-30%	0	0	0	0
		≥30%	3	0	33	67

Com relação às sementes com espaço livre entre o embrião e o endosperma, assim como na primeira época, as sementes de frutos verde-avermelhados mantidos repouso por 7 dias foram as que apresentaram a maior porcentagem de sementes

com espaço livre (6%) (Tabela 9). Porém, a relação observada por Dell'Aquila (2007) e Gagliardi e Marcos Filho (2011), não foi similar à determinada nessa pesquisa.

Todas as sementes de frutos verdes que apresentaram espaço livre entre o endosperma e o embrião não germinaram (Tabela 9); sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos que tinham espaço livre entre o endosperma e o embrião menor ou igual a 2,7% originaram plântulas normais (Figuras 14J e 14K), anormais (Figura 15D) e sementes não germinadas, assim como as que tinham espaço livre maior que 2,7% (Figuras 14H e 16C).

Na segunda época as anormalidades das plântulas observadas foram as mesmas da primeira: emissão da raiz primária sem o desenvolvimento das demais partes (Figura 13A), retenção do tegumento na parte aérea (Figura 13B) ou na raiz primária (Figura 13C), nível de desenvolvimento da raiz (Figura 13D) ou ausência de raiz primária (Figura 13E).

4.3.3 Terceira época

4.3.3.1 Avaliação da viabilidade e do vigor

O teor de água das sementes manteve-se semelhante ao da segunda época (Tabela 11), indicando que as sementes mantiveram-se em equilíbrio higroscópico com o ambiente (Tabela 13). Os valores variaram de 5,3 a 6,4%.

Na terceira época a porcentagem de germinação das sementes de todos os tratamentos diminuiu cerca de 50% quando comparada com a época anterior (Tabela 11), indicando a deterioração natural das sementes (Tabela 13).

De maneira geral, a qualidade das sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos superou a das sementes extraídas de frutos verdes.

A porcentagem de germinação das sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 14 dias foi superior a das sementes de frutos mantidos em repouso por 3 dias ou sem repouso (Tabela 13). A germinação de sementes extraídas de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 ou 14 dias foi estatisticamente superior a das de frutos sem repouso e a germinação das de frutos mantidos em repouso por 3 dias. A germinação das sementes de frutos vermelhos sem repouso ou mantidos em repouso pós-colheita por 3 dias foi superior a das sementes de frutos mantidos em repouso por 7 ou 14 dias.

A porcentagem e a velocidade de emergência da plântula das sementes de frutos verdes não diferiram com o período de repouso. A porcentagem de emergência da plântula de sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias foi significativamente superior aos demais períodos de repouso e sem repouso. Por outro lado, o índice de velocidade da plântula das sementes de frutos verde-avermelhados sem repouso foi inferior ao índice das sementes de frutos que foram mantidos em repouso. A porcentagem e a velocidade de emergência da plântula de sementes de frutos vermelhos em todos os períodos de repouso foram superiores a das de frutos sem repouso (Tabela 13).

A temperatura média mais elevada da terceira época (variação entre 15 °C e 37 °C) favoreceu índice de velocidade de emergência da plântula de alguns tratamentos, principalmente das sementes de frutos vermelhos, em relação à época anterior em que a temperatura variou entre 14 °C e 34 °C.

O repouso do fruto não interferiu na germinação das sementes extraídas de frutos verdes e vermelhos avaliada pelo teste de envelhecimento acelerado; para as sementes extraídas de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 3 dias os resultados superaram estatisticamente os obtidos para as sementes extraídas de frutos mantidos em repouso por 14 dias e sem repouso (Tabela 13).

Na terceira época de avaliação, não houve interação significativa para os resultados do teste de condutividade elétrica. Entretanto, os resultados da condutividade elétrica das sementes obtidas de frutos vermelhos foram significativamente inferiores que os das sementes de frutos verde-avermelhados, que, por sua vez, foram inferiores aos das sementes extraídas de frutos verdes.

4.3.3.2 Avaliação de imagens de raios X

As imagens de raios X foram similares as das demais épocas, ou seja, para as sementes de frutos verdes, independentemente do período ou não de repouso pós-colheita do fruto, predominou o espaço livre entre tegumento e endosperma-embrião superior a 20% e para as sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos predominou o espaço livre inferior a 10% (Tabela 14).

Tabela 13 - Grau de umidade (GU), germinação (G), emergência da plântula (EP), envelhecimento acelerado (EA) (%), condutividade elétrica (CE, em $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e índice de velocidade de emergência da plântula (IVE) de sementes de pimentão secas, de diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos repouso por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0). Terceira época de avaliação (fevereiro e março de 2012)

Cor do fruto	GU (%)				G (%)				EP (%)			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	5,7	5,1	6,2	6,2	1 cB	2 cB	2 bAB	8 bA	0 cA	3 bA	5 bA	9 bA
Verde-avermelhada	5,9	6,4	5,8	6,0	34 bB	27 bC	42 aA	44 aA	42 bC	56 bB	51 bB	68 aA
Vermelha	5,3	6,4	6,3	6,2	49 aA	50 aA	37 aB	39 aB	59 aB	72 aA	71 aA	71 aA

Cor do fruto	EA (%)				CE ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$)				IVE			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	0 cA	3 bA	0 bA	8 bA	1994,8	1823,8	2117,3	1798,6	0 cA	0,15 cA	0,18 cA	0,38 bA
Verde-avermelhada	37 bC	63 aA	58 aAB	49 aBC	759,6	702,7	673,5	654,3	1,44 bB	2,66 bA	2,68 bA	3,27 aA
Vermelha	55 aA	54 aA	60 aA	57 aA	664,8	575,6	610,6	518	2,65 aB	3,97 aA	3,46 aA	3,77 aA

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%)

Ausência de letras significa que não houve interação significativa

A maioria das sementes de frutos verdes não germinou (Tabela 14), independentemente do tamanho do espaço livre entre tegumento e endosperma-embrião e assim como na primeira e na segunda época, sementes de frutos verdes mantidos repouso por 14 dias apresentaram maior porcentagem de plântulas normais e anormais em relação aos demais períodos de repouso e sem repouso quando tinham espaço livre menor que 30%.

As anormalidades das plântulas foram similares as da primeira e da segunda época (Figura13).

Com relação às sementes com espaço livre entre o embrião e o endosperma, nessa época houve maior quantidade de sementes mortas (Tabela 9), provavelmente devido a deterioração das mesmas. Todas as sementes de frutos verdes que apresentaram espaço livre entre o endosperma e o embrião não germinaram (Tabela 9), exceto uma semente com espaço livre menor que 2,7% cujo fruto ficou em repouso por 14 dias; sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos que tinham espaço livre entre o endosperma e o embrião menor ou igual a 2,7% originaram plântulas normais, anormais e sementes não germinadas, assim como as que tinham espaço livre maior que 2,7%.

Tabela 14 - Porcentagem de espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião e a respectiva quantidade de sementes para cada espaço livre (%) e, porcentagens de plântulas normais (PN), anormais (PA) e semente não germinada (NG) de sementes secas de pimentão extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação correspondentes aos frutos de cores verde, verde-avermelhada e vermelha, aos períodos de repouso (R) de 3, 7, 14 dias e sem repouso (0). Terceira época de avaliação (fevereiro e março de 2012)

Cor do fruto	R	Espaço livre	Quantidade de sementes	PN (%)	PA (%)	NG (%)
Verde	0	≤10%	25	4	0	96
		10%-19%	53	0	2	96
		20%-30%	15	0	0	100
		≥30%	7	0	0	100
	3	≤10%	15	0	31	69
		10%-19%	36	0	3	97
		20%-30%	39	0	0	100
		≥30%	10	0	0	100
	7	≤10%	5	0	40	60
		10%-19%	24	0	25	75
		20%-30%	57	0	0	100
		≥30%	14	0	0	100
	14	≤10%	4	25	50	25
		10%-19%	23	26	39	35
		20%-30%	57	5	25	70
		≥30%	16	6	6	88
Verde-avermelhada	0	≤10%	69	44	43	13
		10%-19%	21	10	29	62
		20%-30%	5	0	20	80
		≥30%	5	0	0	100
	3	≤10%	72	47	33	20
		10%-19%	16	29	29	40
		20%-30%	6	0	80	20
		≥30%	7	0	0	100
	7	≤10%	75	32	36	32
		10%-19%	18	44	19	38
		20%-30%	3	0	100	0
		≥30%	3	0	0	100
	14	≤10%	80	71	20	9
		10%-19%	11	50	30	20
		20%-30%	3	33	0	67
		≥30%	5	0	25	75
Vermelha	0	≤10%	73	48	23	29
		10%-19%	9	33	56	11
		20%-30%	4	25	0	75
		≥30%	14	0	7	93
	3	≤10%	75	49	31	20
		10%-19%	11	27	36	36
		20%-30%	5	20	40	40
		≥30%	9	0	0	100
	7	≤10%	74	56	17	27
		10%-19%	10	33	33	33
		20%-30%	6	40	0	60
		≥30%	10	0	1	9
	14	≤10%	88	72	14	14
		10%-19%	8	50	13	38
		20%-30%	0	0	0	0
		≥30%	4	0	0	100

4.3.4 Quarta época

4.3.4.1 Avaliação da viabilidade e do vigor

O teor de água das sementes variou de 6,8 a 8,9 e não foi estatisticamente diferentes (Tabela 15).

A germinação das sementes de frutos verdes foi significativamente superior a das de frutos mantidos em repouso por 7 dias e sem repouso. A germinação das sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 3 e 14 dias foi superior à das de frutos sem repouso e mantidos em repouso por 7 dias; a das de frutos vermelhos mantidos em repouso por 3 dias foi superior à germinação das sementes de frutos mantidos em repouso por 7 e 14 dias e sem repouso (Tabela 15). A germinação das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos superou a das de frutos verdes.

Os resultados da porcentagem e da velocidade de emergência da plântula foram superiores para as sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos em relação aos das sementes extraídas de frutos verdes (Tabela 15). A porcentagem de emergência da plântula das sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 3 e 14 dias foi superior a das sementes de frutos sem repouso. Já, a porcentagem de emergência da plântula de sementes de frutos verde-avermelhados superou a dos demais períodos de repouso e sem repouso.

O resultado da avaliação do índice de velocidade de emergência apresentou classificação parecida com o da porcentagem de emergência da plântula. Não foi verificada diferença estatística entre as sementes de frutos verdes, independentemente do período de repouso. Sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias tiveram velocidade de emergência superior a das de frutos mantidos em repouso por 3 dias e sem repouso. O índice de velocidade de emergência das sementes de frutos vermelhos mantidos em repouso por 3 dias foi superior a das de frutos mantidos em repouso por 7 dias e sem repouso.

Tabela 15 - Grau de umidade (GU), germinação (G), emergência da plântula (EP), envelhecimento acelerado (EA) (%), condutividade elétrica (CE, em $\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e índice de velocidade de emergência da plântula (IVE) de sementes de pimentão secas, de diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos repouso por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0). Quarta época de avaliação (julho e agosto de 2012)

Cor do fruto	GU (%)				G (%)				EP (%)			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	8,9	8,2	8,7	7,3	0 cC	4 cAB	2 cBC	7 cA	0 cB	6 cA	2 bAB	6 bA
Verde-avermelhada	7,4	8,0	6,8	6,9	44 aB	52 bA	46 bB	54 aA	48 bC	51 bC	59 aB	71 aA
Vermelha	6,9	7,5	7,2	7,7	40 bC	60 aA	53 aB	50 bB	61 aB	78 aA	59 aB	74 aA

Cor do fruto	EA (%)				CE ($\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$)				IVE			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
Verde	0 cA	0 cA	0 bA	2 bA	1859,1 bAB	1755,2 bA	2077,1 bB	1870,2 bAB	0,00 bA	0,18 cA	0,28 bA	0,21 bA
Verde-avermelhada	17 bD	30 bC	53 aA	46 aB	794,6 aA	703,9 aA	600,5 aA	646,4 aA	1,92 aC	2,13 bBC	2,53 aAB	2,81 aA
Vermelha	38 aC	56 aA	48 aB	50 aAB	654,6 aA	620,6 aA	649,7 aA	592,6 aA	2,37 aB	3,37 aA	2,46 aB	2,92 aAB

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Ausência de letras significa que não houve interação significativa

A germinação das sementes após o teste de envelhecimento acelerado das sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos, independentemente do período de repouso, foi superior a das sementes de frutos verdes. Não houve diferenças estatísticas para a germinação das sementes após o teste de envelhecimento acelerado das sementes de frutos verdes em relação aos diferentes períodos de repouso do fruto. A germinação após o teste de envelhecimento das sementes de frutos verde-avermelhados após 7 dias de repouso do fruto foi superior em relação a dos demais períodos de repouso e sem repouso. A germinação após o teste de envelhecimento acelerado das sementes de frutos vermelhos mantidos em repouso por 3 dias foi superior a das sementes extraídas de frutos sem repouso e mantidos em repouso por 7 dias.

O repouso do fruto não afetou os valores da condutividade elétrica das sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos que foi inferior a das sementes de frutos verdes. Para essas, quando os frutos foram mantidos em repouso por 3 dias a condutividade foi inferior à das sementes dos frutos mantidos repouso por 7 dias.

Após um ano de armazenamento das sementes (quarta época) foi possível observar algumas mudanças, devidas, principalmente, à deterioração natural das sementes. Redução da viabilidade (germinação das sementes e emergência da plântula) e do vigor decorrentes da deterioração natural das sementes, independentemente dos tratamentos (Tabela 7 e Tabela 15).

4.3.4.2 Avaliação de imagens de raios X

A proporção do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião das sementes da quarta época (após um ano de armazenamento) permaneceu semelhante à da primeira época, mostrando que durante o armazenamento das sementes a morfologia interna das sementes de pimentão não foi alterada. A maioria das sementes de frutos verdes apresentou espaço livre superior a 10%, indicando que o endosperma-embrião ainda estava em processo de desenvolvimento (Tabela 16). Quando os frutos tornaram-se verde-avermelhados ou vermelhos a maioria das sementes apresentou espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião inferior a 10%.

Tabela 16 - Porcentagem de espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião e a respectiva quantidade de sementes para cada espaço livre (%) e, porcentagens de plântulas normais (PN), anormais (PA) e semente não germinada (NG) de sementes secas de pimentão extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação correspondentes aos frutos de cores verde, verde-avermelhada e vermelha, aos períodos de repouso (R) de 3, 7, 14 dias e sem repouso (0). Quarta época de avaliação (julho e agosto de 2012)

Cor do fruto	R	Espaço livre	Quantidade de sementes (%)	PN (%)	PA (%)	NG (%)
Verde	0	≤10%	19	0	0	100
		10%-19%	44	5	0	93
		20%-30%	23	0	0	100
		≥30%	14	0	0	100
	3	≤10%	17	6	24	71
		10%-19%	42	2	2	95
		20%-30%	26	4	0	96
		≥30%	15	0	0	100
	7	≤10%	1	0	0	100
		10%-19%	38	11	8	82
		20%-30%	51	0	0	100
		≥30%	10	0	0	100
	14	≤10%	13	69	31	0
		10%-19%	20	16	26	58
		20%-30%	47	4	11	85
		≥30%	20	1	0	95
Verde-avermelhada	0	≤10%	80	35	44	21
		10%-19%	14	36	21	43
		20%-30%	1	0	0	100
		≥30%	5	0	0	100
	3	≤10%	71	65	29	6
		10%-19%	22	63	25	13
		20%-30%	3	100	0	0
		≥30%	4	0	0	100
	7	≤10%	74	54	43	3
		10%-19%	21	48	43	10
		20%-30%	1	100	0	0
		≥30%	4	0	0	100
	14	≤10%	83	64	25	11
		10%-19%	10	60	30	10
		20%-30%	3	33	33	33
		≥30%	4	0	0	100
Vermelha	0	≤10%	82	57	40	2
		10%-19%	12	67	25	8
		20%-30%	2	50	0	50
		≥30%	4	0	0	100
	3	≤10%	84	60	37	4
		10%-19%	12	67	33	0
		20%-30%	0	0	0	0
		≥30%	4	0	25	75
	7	≤10%	80	59	29	12
		10%-19%	8	63	13	25
		20%-30%	3	33	0	67
		≥30%	3	0	0	100
	14	≤10%	93	57	30	13
		10%-19%	2	100	0	0
		20%-30%	2	0	0	100
		≥30%	3	0	0	100

Quando as sementes foram avaliadas quanto à germinação após o teste de raios X, houve maior quantidade de sementes mortas que nas épocas anteriores para todos os tratamentos (Tabela 16) independentemente da porcentagem de espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião.

A porcentagem de sementes com espaço livre entre o endosperma e o embrião foi igual ou inferior a 4% (Tabela 9) e não houve relação com o tamanho do espaço livre e a porcentagem de plântulas normais, anormais ou sementes não germinadas.

4.3.4.3 Avaliação da atividade da enzima endo- β -mananase

O grau de umidade das sementes secas variou de 6,9 a 8,9 e as hidratadas por 24h (Tabela 17) variou de 72,1% (sementes de frutos verdes) a 47,1% (sementes de frutos vermelhos) e foi similar ao das sementes da primeira época (Tabela 10).

Tabela 17 - Grau de umidade (GU%) e atividade da enzima endo- β -mananase (pmol.s^{-1}), de sementes de pimentão avaliadas secas ou hidratadas por 24h ou 72h, de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos repouso (R) por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0). Quarta época de avaliação realizada (julho a agosto de 2012)

Cor fruto	R	Seca		24h		72h	
		GU (%)	Atividade (pmol.s^{-1})	GU (%)	Atividade (pmol.s^{-1})	GU (%)	Atividade (pmol.s^{-1})
Verde	0	8,9	60,7	2,5	70,2	67,2	7,3
	3	8,2	31,0	3,4	65,6	69,0	47,0
	7	8,7	37,5	2,9	72,1	69,4	236,2
	14	7,3	24,2	2,5	70,3	69,5	201,3
Verde-avermelhada	0	7,4	6,6	1,1	56,2	54,3	656,7
	3	8,0	4,5	2,6	52,8	54,4	327,1
	7	6,8	1,5	1,8	52,5	53,9	343,3
	14	6,9	0,6	2,4	53,0	51,8	153,7
Vermelha	0	6,9	1,4	1,0	52,6	53,0	201,3
	3	7,5	0,6	0,7	48,7	50,3	155,2
	7	7,2	0,5	7,1	47,1	49,3	60,9
	14	7,7	0,4	4,5	53,2	50,7	15,8

Após o armazenamento das sementes, a atividade da endo- β -mananase diminuiu em relação à primeira época, porém sementes secas extraídas de frutos verdes ainda tiveram mais atividade enzimática, que as extraídas de frutos verde-

avermelhados e vermelhos (Tabela 17). A atividade da enzima das sementes secas diminuiu com o repouso dos frutos, independentemente da cor do fruto.

Quando as sementes de frutos verdes foram hidratadas por 24h, a atividade da endo- β -mananase diminuiu em relação às extraídas de frutos vermelhos mantidos repouso por 7 e 14 dias e em relação às sementes secas (Tabela 17).

A atividade enzimática de sementes hidratadas que foram extraídas de frutos verde-avermelhados aumentou quando os frutos ficaram em repouso por 3 ou 14 dias e das de frutos vermelhos aumentou quando os frutos ficaram em repouso por 7 ou 14 dias.

Quando essas sementes foram hidratadas por 72 h, a atividade da enzima aumentou em relação a das hidratadas por 24 h, indicando que esse tempo de hidratação para sementes deterioradas não foi suficiente para ativar a enzima. Nesse caso, a atividade das sementes de frutos verdes aumentou com o repouso do fruto (Tabela 17) e para as sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos a atividade diminuiu com o repouso.

4.3.4.4 Testes histoquímicos

Após um ano de armazenamento, observa-se nas Figuras 26, 27, 28, 31 e 32, que a cor das imagens das células dos tecidos dos tratamentos estudados está mais clara, em relação à primeira época, o que indica degradação das substâncias de reserva.

Aparentemente há maior concentração de núcleos visíveis nas extremidades da radícula de sementes de frutos verdes (Figuras 26A, 26B, 26C, 26D) e essa quantidade diminuiu na radícula de sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos (Figuras 26E a 26L) como ocorreu na primeira época.

Tanto as extremidades das radículas como os hipocótilos corados com Sudan IV apresentam coloração mais clara (Figura 27) quando comparados com a primeira época. Tal reação poderá indicar que houve deterioração de lipídios. Extremidades de radícula de sementes de frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias e vermelhos sem repouso foram coradas com tonalidade mais forte (Figura 27D e 27E) que os demais tratamentos (Figura 27A, 27B e 27C); o hipocótilo das sementes de frutos verdes com e sem repouso não foram corados (Figura 27G e 27H), e o dos frutos verde-avermelhados e vermelhos, coraram (Figura 27I, 27J, 27K, 27L).

Figura 26 - Extremidades das radículas de sementes de pimentão extraídas de frutos verdes (A, B, C e D), verde-avermelhados (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) ou 14 dias (D, H e L) ou sem repouso (A, E e I), e coradas com Xylidine Ponceau. (Quarta época de avaliação). Barra: 20μm

Figura 27 - Extremidades das radículas de sementes de pimentão extraídas de frutos A: verdes sem repouso; B: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C: verde-avermelhados mantidos em repouso por 3 dias; D: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias; E: vermelhos sem repouso; F: vermelhos mantidos em repouso por 7 dias e hipocótilos de sementes de frutos G: verdes sem repouso; H: verdes mantidos em repouso por 14 dias; I: verde-avermelhados sem repouso; J: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias; K:vermelhossem repouso e L: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias e coradas com Sudan IV. (Quarta época de avaliação). Barra: 20µm; 50µm (A, G, H, L)

Figura 28 - Hipocótilos de sementes de pimentão extraídas de frutos verdes (A, B, C e D), verde-avermelhados (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) ou 14 dias (D, H e L) ou sem repouso (A, E e I), e coradas com azul de toluidina. (Quarta época de avaliação) Barra: 20 μ m

Figura 29 - Hipocótilos de sementes de pimentão extraídas de frutos verdes (A, B, C e D), verde-avermelhados (E, F, G e H) e vermelhos (I, J, K e L), mantidos em repouso por 3 (B, F e J), 7 (C, G e K) ou 14 dias (D, H e L) ou sem repouso (A, E e I), e coradas com PAS. (Quarta época de avaliação). Barra: 20µm

Figura 30 – Endospermas de sementes de pimentão de frutos A, G: verdes sem repouso; B, H: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C: verde-avermelhados mantidos em repouso por 3 dias; D, J: verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 dias; E, K: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias; F: vermelhos mantidos em repouso por 14 dias; I: verde-avermelhados sem repouso e L: vermelhos mantidos em repouso por 14 dias e coradas com reagente de Schiff. A, B, C, D, E e F representam a parte interna do endosperma e G, H, I, J, K e L a perna externa do endosperma.(Quarta época de avaliação). Barra: 20µm

Figura 31 – Endospermas de sementes de pimentão de frutos A,G: verdes sem repouso; B, H: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C,I: verde-avermelhados sem repouso; D, J: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias; E, K: vermelhos mantidos em repouso por 3 dias e F, L: vermelhos mantidos em repouso por 7 dias; e coradas com Xylidine Ponceau. A, B, C, D, E e F representam a parte interna do endosperma e G, H, I, J, K e L a parte externa do endosperma.(Quarta época de avaliação). Barra: 20µm

Figura 32 – Endospermas de sementes de pimentão de frutos A,G: verdes sem repouso; B: verdes mantidos em repouso por 14 dias; C, H: verde-avermelhados sem repouso; D, J: verde-avermelhados mantidos em repouso por 14 dias; E, K: vermelhos mantidos em repouso por 2 dias; F, L: vermelhos mantidos em repouso por 7 dias; H: verdes mantidos em repouso por 7 dias e coradas com Sudan IV. A, B, C, D, E e F representam a parte interna do endosperma e G, H, I, J, K e L a parte externa do endosperma.(Quarta época de avaliação).Barra: 20 μ m; 50 μ m (A, B e G)

Foi verificado que as paredes celulares das células do hipocótilo coradas pelo azul de toluidina estavam mais claras apresentam densidade mais baixa que as da primeira época ou que as paredes foram solubilizadas em substâncias não reativas ao azul de toluidina e que ocorreu vacuolização nas células do hipocótilo de sementes de frutos verdes (Figuras 28A a 28D) e nas de frutos verde-avermelhados e vermelhos sem repouso (Figuras 28E e 28I) e mantidos em repouso por 3 dias (Figuras 28F e 28J).

Apesar de as paredes celulares das células do hipocótilo estarem mais claras quando foram coradas com azul de toluidina, quando foram coradas com PAS a coloração das paredes se mantiveram similares a da primeira época (Figura 29). As substâncias que aparecem como grânulos continuaram presentes no hipocótilo das sementes de frutos verdes sem repouso (Figura 29A), após um ano de armazenamento das sementes.

A parte interna e externa do endosperma apresentaram a mesma coloração e formato das células para polissacarídeos neutros que a primeira época (Figura 30).

Os corpos proteicos das células da parte interna do endosperma não estavam tão nítidos como os da primeira época (Figura 31A a 31F) visualmente não estavam maiores que os da parte externa do endosperma. Aparentemente houve um aumento tamanho dos corpos proteicos das células da parte externa do endosperma

das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos (Figura 31I, 31J, 31K, 31L) em relação à época anterior.

O endosperma corado com Sudan IV das sementes de frutos verdes sem repouso estavam descoloridos e os demais tratamentos apresentaram manchas com cores mais fortes, fracas ou até mesmo incolores (Figura 32).

4.3.4.5 Avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo

Quando as sementes de pimentão foram analisadas inteiras, os conteúdos de DNA 2C e 3C representaram o DNA nuclear do embrião e do endosperma, respectivamente, nas fases G_0 e G_1 da mitose (DNA não duplicado) e os conteúdos 4C e 6C, embrião e o endosperma, respectivamente, na fase G_2 da mitose e representam o conteúdo do DNA duplicado.

O conteúdo de DNA endospermático (3C+6C) aumentou e o do embrião diminuiu (2C+4C) com o repouso dos frutos verdes e verde-avermelhados. Para sementes de frutos vermelhos, isso ocorreu com o repouso do fruto por 3 dias. Após 7 dias de repouso, o conteúdo de DNA endospermático diminuiu e o do embrião aumentou e após 14 dias de repouso do fruto, ambos os valores aumentaram (Tabela 18).

A relação 4C/2C das sementes de frutos verdes aumentou na medida em que os frutos permaneceram em repouso, até o repouso por 7 dias. O mesmo ocorreu para sementes de frutos verde-avermelhados. A razão 6C/3C também aumentou (Tabela 18).

As extremidades das radículas foram avaliadas, tanto secas como hidratadas por 72h, pois é nesse tecido em que ocorrem as divisões celulares de maneira mais eficiente (LIU, 1996; PORTIS et al., 1999).

Quando foram analisadas as extremidades das radículas de sementes secas o conteúdo duplicado de DNA (4C) foi maior em sementes de frutos verdes do que nas sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos, assim como a razão 4C/2C, (Figuras 33, 34A, 34B, 34C, 34D, 34E e 34F). A variação do conteúdo de DNA foi pequena quando as extremidades das radículas foram avaliadas secas (Tabela 19). Entretanto o conteúdo de DNA 4C das extremidades das radículas de sementes de frutos verde-avermelhados diminuiu com o repouso e foi menor quando comparado com o das sementes de frutos vermelhos cujo conteúdo 4C aumentou com o repouso.

Tabela 18 – Quantidade de núcleos (%) com conteúdo de DNA 4C, 6C, 2C+4C e 3C+6C e a relação 4C/2C e 6C/3C, avaliada de células de sementes inteiras (sem tegumento) extraídas de sementes de pimentão de frutos de diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos em repouso (R) por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0)

Cor do fruto	R	4C	6C	2C+4C	3C+6C	4C/2C	6C/3C
		%					
Verde	0	0,2	0,2	65,7	34,3	0,004	0,006
	3	0,5	0,3	63,1	36,9	0,008	0,007
	7	0,8	0,7	62,1	37,9	0,013	0,020
	14	1,0	0,4	57,8	42,2	0,019	0,009
Verde-avermelhada	0	1,0	0,3	61,8	38,2	0,018	0,007
	3	0,9	0,8	57,6	42,4	0,016	0,020
	7	0,8	0,8	56,9	43,1	0,014	0,021
	14	1,1	1,4	54,7	45,3	0,020	0,030
Vermelha	0	0,6	0,3	57,2	42,8	0,012	0,008
	3	0,8	0,8	53,5	46,5	0,016	0,016
	7	0,7	0,4	57,8	42,2	0,012	0,009
	14	0,4	0,8	57,4	42,6	0,008	0,018

Figura 33 - Esquema da razão 4C/2C em sementes durante a maturação (sementes secas) e a germinação (sementes hidratadas) (FORTI, 2013)

Tabela 19 - Quantidade de núcleos (%) com conteúdo de DNA 4C e a relação 4C/2C, avaliada de células das extremidades de radícula de sementes secas, hidratadas por 72h e de raiz primária (protrusão) extraídas de sementes de pimentão de frutos de diferentes estádios de maturação representados pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos em repouso (R) por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0)

Cor do fruto	R	Secas		72h		Protrusão	
		4C	4C/2C	4C	4C/2C	4C	4C/2C
Verde	0	1,9	0,022	2,8	0,029	-	-
	3	2,2	0,022	5,4	0,057	72	2,500
	7	2,1	0,021	6,6	0,071	70	2,400
	14	2,2	0,023	18,9	0,240	60	1,600
Verde-avermelhada	0	0,8	0,008	16,5	0,200	63	1,700
	3	0,8	0,008	27,2	0,377	61	1,600
	7	0,7	0,007	35,0	0,555	62	1,700
	14	0,6	0,006	34,2	0,554	62	1,700
Vermelha	0	0,9	0,009	31,9	0,470	65	1,900
	3	0,9	0,009	33,6	0,512	61	1,600
	7	1,0	0,010	23,6	0,334	63	1,800
	14	1,0	0,010	29,8	0,427	63	1,700

Quando as sementes foram hidratadas por 72h e as pontas de radículas foram analisadas, os resultados foram opostos ao das sementes secas, como esquematizado na Figura 33, e houve maior variação dos resultados entre os tratamentos (Figuras 34A', 34B', 34C', 34D', 34E' e 34F'). O conteúdo de DNA 4C e a razão 4C/2C das sementes de frutos verdes e verde-avermelhados aumentaram conforme o tempo de repouso do fruto foi maior (Tabela 19). Para sementes de frutos vermelhos, o conteúdo de DNA 4C e a razão 4C/2C aumentou com o repouso de 3 dias e depois diminuiu com o repouso de 7 e 14 dias.

Quando foi analisado o conteúdo de DNA das raízes que emergiram das sementes extraídas de frutos verdes mantidos em repouso por 14 dias e das sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos, o conteúdo de DNA 4C foi entre 60% e 65% e a relação 4C/2C, entre 1,6 e 1,9 (Tabela 19). Sementes extraídas de frutos verdes e mantidos em repouso por 3 e 7 dias tinham conteúdo 4C de DNA entre 72% e 70%, respectivamente, de conteúdo 4C de DNA e 2,5 de 4C/2C.

Nenhuma semente extraída de frutos verdes sem repouso pós-colheita emitiu a raiz primária e por isso não foi possível fazer a determinação.

Figura 34 – Histogramas dos resultados da citometria de fluxo de núcleos de extremidades de radícula de sementes de pimentão de frutos A e A': verdes sem repouso; B e B': verdes mantidos repouso por 14 dias; C, C':verde-avermelhados sem repouso; D e D': verde-avermelhados-mantidos repouso por 14 dias; E e E': vermelhos sem repouso; F e F':vermelhos mantidos repouso por 14 dias de sementes secas (A, B, C, D, E e F) ou hidratadas por 72h (A', B', C', D', E' e F'). Picos que estão indicados pelo número 1 representam o conteúdo 2C de DNA e pelo número 2, 4C

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da viabilidade e do vigor

As sementes frescas que foram extraídas de frutos verdes tinham 70% de água (Tabela 5), valor similar ao relatado por outros pesquisadores (OLIVEIRA et al., 1999; PEREIRA, 2009; SANCHEZ et al., 1993). Conforme houve a alteração da cor do fruto, da verde para a vermelha houve redução do teor de água das sementes que atingiu 50%. Em função do fruto do pimentão ser carnoso, as sementes não secam naturalmente na planta e o teor de água mantém-se consideravelmente alto quando as sementes já estão maduras, por volta de 40% (DEMIR; ELLIS, 1992b). Para sementes de pimenta, o grau de umidade variou de 45% a 59% durante o processo de maturação (DEMIR et al., 2008).

Em todas as épocas de avaliação, os resultados de germinação das sementes, referentes a alguns dos tratamentos, foram inferiores aos resultados da emergência da plântula em casa de vegetação (Tabelas 7, 11, 13 e 15). Isso pode ter ocorrido porque no teste de germinação havia muitos fungos que causaram a morte das sementes e das plântulas o que reduziu a porcentagem de plântulas normais. Houve também o predomínio de fungos do gênero *Aspergillus* nas sementes, independentemente do tratamento (Tabela 20). Henning e França Neto (1980) afirmaram que durante a emergência da plântula o tegumento fica no substrato, enquanto que no teste de germinação realizado em laboratório o tegumento fica aderido aos cotilédones, o que facilita apodrecimento das plântulas pelos fungos.

Os resultados de germinação após o teste de envelhecimento acelerado também superaram os da germinação, na terceira época de avaliação (Tabela 13). Isso pode ter ocorrido devido aos fungos nas sementes que podem ter sido inviabilizados após a exposição das sementes em temperatura superior a do ambiente elevada visto que temperatura e umidade elevadas podem inibir a manifestação de alguns microrganismos (JIANHUA; McDONALD, 1997; MARCOS FILHO, 1994).

Tabela 20 – Porcentagem de sementes que apresentaram fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma* e *Fusarium* extraídas de frutos de pimentão de diferentes estádios de maturação representadas pelas cores de fruto verde, verde-avermelhada e vermelha, mantidos repouso (R) por 3, 7, 14 dias ou sem repouso (0)

Cor do fruto	R	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Phoma</i>	<i>Fusarium</i>
Verde	0	4	0	0	2
	3	19	1	6	7
	7	16	3	9	2
	14	18	5	2	4
Verde-avermelhada	0	8	6	2	1
	3	4	5	2	0
	7	6	4	2	0
	14	2	3	0	0
Vermelha	0	4	13	1	1
	3	3	6	2	1
	7	45	3	3	1
	14	21	4	1	3

Em princípio, as condições de clima não limitaram a germinação das sementes e nem o desenvolvimento da planta, em função das informações obtidas de Costa e Henz (2007), Filgueira (2008) e Reifschneider (2000) que afirmaram que as temperaturas adequadas para o pimentão são 25 °C e 30 °C, condição que favorece a germinação da semente e o desenvolvimento da planta e a frutificação; o plantio na estação chuvosa deve ser evitado por dificultar o preparo de solo, tratamentos culturais e o controle fitossanitário. Além disso, temperaturas superiores a 35 °C comprometem a floração e a frutificação provocando o aborto e a queda de flores; temperaturas inferiores a 8-10 °C reduzem a qualidade dos frutos, pois favorecem a formação de frutos partenocárpicos, que praticamente não têm semente (BLAT; COSTA, 2007).

A condutividade elétrica das sementes de pimentão foi elevada, e variou de 2.218 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ nas sementes de frutos verdes (Tabela 11) até 518 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Tabela 13). Vidigal et al. (2009) também encontraram valores de condutividade entre 500 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ e 2200 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para sementes de pimenta colhidas em diferentes estádios de maturação e mantidas em repouso dentro do fruto por vários períodos de tempo, assim como para pimenta doce que foi de 4500 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (VIDIGAL, 2011). Isso pode ter ocorrido porque a secagem de sementes imaturas que ainda não são tolerantes à desidratação causa a deterioração das membranas celulares e

o efeito deletério da secagem nas membranas diminui durante o desenvolvimento das sementes (CORBINEAU et al., 2000).

5.2 Raios X e o parâmetro fisiológico das sementes

A quantidade de sementes frescas de pimentão com espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião foi menor devido ao teor de água entre 70% e 50%. O teor de água das sementes influencia a densidade ótica, ou seja, a redução da quantidade de água da semente amplia a densidade ótica e favorece a diferenciação das partes das sementes visualizadas nas radiografias (SIMAK, 1991 apud OLIVEIRA et al., 2004). Ao observar as imagens de raios X das sementes frescas não é possível diferenciar o embrião do endosperma (Figura 10), enquanto que nas sementes secas (Figura 14) o embrião fica mais nítido.

A maioria das sementes de pimentão, independentemente do momento de colheita e do período de repouso do fruto, tinha espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião. Esse espaço livre está relacionado ao nível de desenvolvimento desses tecidos, cujas células, provavelmente, estão em processo de expansão e, ou divisão celular (Figura 3) ou mesmo de diferenciação. Aliás, Van Der Burg et al. (1994) haviam relatado que sementes de tomate com espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião raramente produzem plântulas com desenvolvimento adequado para o transplante, além da maior quantidade de plântulas anormais e sementes não germinadas (GAGLIARDI; MARCOS FILHO, 2011).

Os resultados dessa pesquisa (Figura 17) possibilitaram identificar que quanto maior o espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião, menor é a plântula em relação às sementes com espaço livre inferior a 10%, como também observado por Gagliardi e Marcos Filho (2011).

Apesar dos relatos de que as sementes de *Capsicum esculentum* com embrião curvado (como ocorre com o embrião de sementes de pimentão), ausência de espaço livre ou espaço livre reduzido entre o embrião e o endosperma germinam bem (MICÓ; LABRADA; CALDERÓN, 1999), para pimentão não é possível afirmar isso. Não houve relação entre o espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião ou entre o embrião e o endosperma e a formação de plântulas normais, anormais e sementes não germinadas (Tabelas 6, 8, 9, 12, 14 e 16). Sementes de embaúba totalmente formadas originaram plântulas normais, anormais ou sementes

não germinadas e esse tipo de resultado é esperado para esse teste, pois, na radiografia, as imagens indicam se há ou não tecidos formados, mas não estabelecem, necessariamente, relação direta com os processos fisiológicos da semente (PUPIM et al., 2008), assim como ocorreu para as sementes de pimentão híbrido (GAGLIARDI; MARCOS FILHO, 2011).

5.3 Atividade da endo- β -mananase e o parâmetro fisiológico das sementes

A ruptura do endosperma é a principal limitação durante a germinação das sementes de solanáceas e nesse caso é necessário o enfraquecimento do endosperma micropilar que envolve a extremidade da radícula, ou seja, ocorre hidrólise da parede celular por enzimas hidrolíticas, como a endo- β -mananase (KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005). A força exercida pelo endosperma diminui quanto maior o grau de hidratação das sementes (WATKINS; CANTLIFE, 1983).

Para sementes de espécies como as de cenoura (HOMRICHHAUSEN et al., 2003), de gergelim (CARVALHO et al., 2001) e de tomate (GROOT et al., 1988) não há atividade da endo- β -mananase quando as sementes são avaliadas secas. Para as sementes de pimentão a atividade dessa enzima nas sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos foi baixa, porém a atividade enzimática das sementes de frutos verdes foi alta. Esse resultado foi o oposto ao obtido para sementes de pimenta (QUEIROZ et al., 2011) e de café (VEIGA et al., 2007) utilizando o mesmo método de detecção da atividade enzimática. Para as sementes dessas espécies, a atividade dessa enzima foi menor quando extraídas de frutos verdes e aumentou juntamente com a porcentagem de germinação, em função do estágio de maturação dos frutos (VEIGA et al., 2007, QUEIROZ et al., 2011). Pouca ou nenhuma atividade da endo- β -mananase foi detectada no endosperma micropilar de sementes de tomate hidratadas por 4h (DOWNIE; GURUSINGHE; BRADFORD, 1999). Hilhorst e Downie (1996) também detectaram atividade da endo- β -mananase em sementes secas de tomate e os autores afirmaram que essa discrepância é desconhecida e que a enzima pode ter sido sintetizada durante o processo de desenvolvimento das sementes, assim como Albuquerque (2009) também verificou níveis superiores da atividade da endo- β -mananase em sementes de pimentão híbrido extraídas de frutos verdes que nas sementes de frutos verde-avermelhados ou vermelhos. Inclusive a atividade também diminuiu com o repouso do fruto verde e os valores obtidos foram

de aproximadamente 250 pmol.s^{-1} para sementes de frutos verdes sem repouso e de 33 pmol.s^{-1} para as de frutos verdes mantidos em repouso por 6 e 9 dias. A atividade das sementes de frutos vermelhos foi 33 pmol.s^{-1} .

Nos frutos verdes de pimentão mantidos em repouso por 14 dias a atividade enzimática das sementes secas diminuiu e houve aumento significativo da germinação.

Resultados de pesquisa indicaram que o gene LeMAN4, que expressa a enzima endo- β -mananase em frutos maduros de tomate, pode atuar como hidrolase na presença de água ou transglicosilase, na presença de oligossacarídeos ou polissacarídeos derivados de mananos (SCHRÖDER et al., 2004,2006).A transglicosilação causa a elongação da cadeia ao invés da degradação, através da hidrólise além de ser necessária para a integração de novos polissacarídeos sintetizados na parede celular em crescimento, para o re-arranjo de polissacarídeos durante o desenvolvimento e para a criação de ligações cruzadas entre diferentes polissacarídeos(SCHRÖDER et al., 2004, 2006).

Iglesias-Fernández e Matilla (2009) também verificaram que há atividade da endo- β -mananase em sementes secas de *Sisymbrium officinale* armazenadas por seis meses e como não era esse o resultado esperado, sugeriram que esta forma de proteína faz parte de um grupo de proteínas armazenadas durante a embriogênese ou que o armazenamento das sementes (ou o repouso dos frutos) promoveu a expressão do gene nas sementes secas (IGLESIAS-FERNÁNDEZ; MATILLA, 2009).

Por outro lado, sementes de pimentão provenientes de frutos verdes e hidratadas por 24h tiveram menos atividade da endo- β -mananase (Tabelas 10 e 17) e germinação inferior quando comparadas com as sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos (Tabela 8), avaliadas no início e após um ano de armazenamento (quarta época). Nesse caso a enzima endo- β -mananase teve função hidrolítica e degradou o endosperma micropilar facilitando a protrusão da raiz primária (MO; BEWLEY, 2003) durante a germinação.

Após um ano de armazenamento (quarta época de avaliação) das sementes de pimentão (Tabela 17), a atividade da endo- β -mananase das sementes extraídas de frutos verde-avermelhados e vermelhos e hidratadas por 24h foi menor quando comparada à da avaliação inicial. Porém, foi verificado que esse tempo de hidratação não foi suficiente para ativar a enzima porque após 72h de hidratação da atividade foi alta para todos os tratamentos. Com esses dados é possível considerar

que a hidratação por 24h não foi suficiente para ativar a enzima quando as sementes apresentavam certo grau de deterioração. Isso significa que além do tempo de hidratação para atingir o nível de atividade detectável depender da espécie (IGLESIAS-FERNÁNDEZ; MATILLA, 2009) depende também do progresso metabólico da semente.

5.4 Testes histoquímicos e o parâmetro fisiológico das sementes

Com o desenvolvimento das sementes, nas diferentes épocas de maturação, as células do embrião não apresentaram alterações quanto à espessura da parede celular, como também foi verificado para sementes de pimenta (ABUD, 2013). O repouso também não alterou as substâncias de reserva, com exceção dos lipídios das sementes verdes (Figuras 19A, 19B, 19G e 19H).

As características dos corpos proteicos do embrião e do endosperma são diferentes, como também verificado por Chen e Lott (1992) em sementes de pimentão. Os corpos proteicos do endosperma são mais homogêneos em tamanho que os do embrião por razões desconhecidas (CHEN; LOTT, 1992).

As células do endosperma da parte externa (próxima ao tegumento) das sementes de pimentão de frutos verde-avermelhados e vermelhos também são diferentes das da parte interna do endosperma. Em sementes de coentro o endosperma foi separado em duas regiões principais de acordo com as substâncias de reserva: a região envolvida pelo embrião (região central, interna) e a região próxima ao tegumento que envolve o embrião (parte externa do endosperma) (YEUNG; BOWRA, 2011). As proteínas de reserva para essas sementes são abundantes nas células da parte externa do endosperma e podem ser proteínas armazenadas nos vacúolos ou corpos proteicos sendo que o primeiro é maior em tamanho que o segundo. Nas células do endosperma localizadas centralmente, os vacúolos no citoplasma são rapidamente preenchidos com proteínas de armazenamento e como resultado, são formadas poucas proteínas armazenadas no vacúolo, de tamanho maior, e próximo ao tegumento, as células do endosperma contêm muitos corpos proteicos pequenos (YEUNG; BOWRA, 2011), como também observados nos endospermas de sementes de pimentão de frutos verde-avermelhados e vermelhos.

A parte interna do endosperma, próximo ao embrião difere do endosperma restante em termos de características estruturais e padrões de expressão gênica

(BECRAFT et al., 2001 apud YEUNG; BOWRA, 2011). Apesar das funções ainda serem desconhecidas esse endosperma deve atuar na nutrição e na sinalização entre o embrião e o endosperma restante (BECRAFT et al., 2001 apud YEUNG; BOWRA, 2011). Em sementes de coentro a parte interna do endosperma é degenerada e cria um espaço livre para o crescimento e desenvolvimento do embrião (YEUNG; BOWRA, 2011). Em sementes de pimentão, a parte interna do endosperma é permanente e provavelmente, tem as funções já mencionadas.

Não foi detectado amido nas células das sementes de pimentão assim como também relatado Chen e Lott (1992) e Fang e Zhang (1987). Entretanto, em embriões de sementes de pimentão de frutos verdes sem repouso também foi verificado grânulos na reação de PAS (Figura 22) que pode ser amido ou outro polissacarídeos que foi mobilizado durante o repouso do fruto. Em sementes de pimenta foi verificada pequena quantidade de grânulos no tegumento das sementes imaturas, detectados pelo PAS o que sugere que o amido foi mobilizado e utilizado no desenvolvimento do embrião, durante o processo de maturação (ABUD, 2013).

5.5 A quantidade de DNA, tolerância à desidratação, maturidade fisiológica eo parâmetro fisiológico das sementes

Há várias fases durante o desenvolvimento das sementes e a morfogenética inicial, que origina o eixo embrionário e os tecidos que acumularão reservas, é caracterizada pela divisão celular rápida e início da diferenciação celular (MEINKE, 1995). Isso significa que as células dos embriões das sementes imaturas terão mais DNA 4C por causa da divisão celular (Figura 33). Nas fases seguintes, ocorre a maturação, que é marcada pelo aumento da massa das sementes, acúmulo de produtos de reserva e preparação para desidratação, dormência e germinação das sementes (MEINKE, 1995), o que coincide com a diminuição do conteúdo de DNA 4C e, conseqüentemente, as sementes estão maduras.

Quando sementes secas de pimentão foram analisadas no citômetro de fluxo (inteiras ou extremidades das radículas) não houve variação dos conteúdos de DNA (Tabelas 18 e 19). Isso ocorreu porque em pimentão, a replicação do DNA nuclear em tecido embrionário cessa em uma a duas semanas após o embrião alcançar o estágio morfológico curvado e a suspensão da síntese de DNA nuclear coincide com o início da tolerância à desidratação (PORTIS et al., 1999). Nessa fase, núcleos 4C

não estão presentes (PORTIS et al., 1999) ou estão presentes em pequena quantidade (CASTRO et al., 2001).

A suspensão da replicação de DNA no embrião também coincide com o decréscimo na frequência de núcleos do endosperma com redução do conteúdo 6C de DNA até completar a maturação das sementes (PORTIS et al., 1999). Isso indica que, durante a maturação das sementes de pimentão, a atividade de replicação nuclear da maioria das células para na fase G_1 de divisão nuclear (LANTERI et al., 1994). Além disso, em sementes de pimentão maduras e secas, assim como na maioria das sementes ortodoxas, o teor de água é muito baixo para que o ciclo celular continue (BINO et al., 1993).

A relação 4C/2C das sementes inteiras aumentou durante o repouso dos frutos verdes e verde-avermelhados e esse resultado não era esperado, pois quanto maior o grau de maturação das sementes, menor é a razão 4C/2C e o conteúdo 4C de DNA (Figura 33), como já mencionado. Isso pode ter ocorrido porque foi avaliado o embrião inteiro e não somente as extremidades das radículas.

Entretanto o conteúdo 4C de DNA das extremidades das radículas de sementes de frutos vermelhos também aumentou em relação às de frutos verde-avermelhados. Possivelmente, a elevação dos níveis 4C de DNA poderia ser explicado, então, pelas condições externas de clima que influenciam de maneira aleatória (BINO et al., 1993) já que frutos vermelhos permaneceram mais tempo expostos a essas condições que os demais frutos, o que foi acentuado pelo repouso pós-colheita dos frutos vermelhos.

Durante a hidratação das sementes, o teor de água elevado pode ativar o ciclo celular e induzir o início da germinação (BINO et al., 1993; PORTIS et al., 1999). Em sementes de tomate o aumento de núcleos 4C nas sementes após 24h de hidratação coincidiu com a ocorrência de divisões mitóticas (CASTRO et al., 2000). Além disso, a progressão das células do meristema da radícula no ciclo celular, indicado pelo aumento na porcentagem de núcleos contendo conteúdo 4C de DNA, foi associada com germinação mais rápida (LANTERI et al., 1994; LIU et al., 1997) quando hidratadas. Sementes de tomate que germinaram mais, também apresentaram aumentados núcleos 4C (LIU et al., 1997), assim como as sementes de pimentão, por isso a relação 4C/2C pode ser considerada um marcador precoce do progresso da germinação (SLIWINSKA, 2009).

A germinação das sementes de pimentão aumentou com o amadurecimento dos frutos (de verde para vermelho) (Tabelas 7, 11, 13 e 15), mas foram encontrados núcleos com conteúdo 4C de DNA em sementes de frutos de todos os momentos de colheita (Tabela 18), independentemente do tempo de repouso do fruto e a relação 6C/3C aumentou com o desenvolvimento das sementes, o que indica que ainda estava ocorrendo divisão celular no endosperma. Portis et al. (1999) relataram que sementes frescas de pimentão germinam por volta dos 42 DAA (provavelmente quando os frutos estavam verdes) com aumento da germinação entre 56 e 63 DAA e a germinação máxima aos 70 DAA, quando os frutos mudaram de cor. Nenhum núcleo em fase pós-replicativa (4C) foi registrado a partir de 56 DAA em diante em sementes inteiras de pimentão e a relação 6C/3C diminuiu com o desenvolvimento das sementes (PORTIS et al., 1999). Esses resultados confirmam em parte o que foi visto nessa pesquisa.

Quando houve emissão da raiz primária, a quantidade de DNA 4C duplicou em relação às extremidades das radículas de sementes hidratadas por 72h. Em sementes de tomate a maior intensidade do ciclo celular precedeu a protrusão da raiz primária e foi de aproximadamente 30% (CASTRO et al., 2001). Em sementes de *Medicago trunculata* o maior conteúdo 4C de DNA (45%) foi obtido durante a germinação da semente e o crescimento da raiz primária até 2 mm aumentou para 63% quando tinham 3 mm e estabilizou com 65% de DNA 4C com 4 mm (FARIA et al., 2005). Para pimentão a porcentagem de núcleos 4C antes da emergência da raiz primária foi de 54% (SARACCO et al., 1995).

Em embriões de sementes de pimentão “Quadrato di Carmagnola” a síntese de DNA parou aos 40 DAA e nesse momento as sementes eram tolerantes à desidratação (PORTIS et al., 1999). Nessa pesquisa os autores não mencionaram a cor do fruto correspondente ao momento de colheita citado, mas para a presente pesquisa, 40 DAA é, aproximadamente, o momento em que os frutos foram colhidos verdes e a síntese de DNA estabilizou a partir de sementes de frutos verde-avermelhados sem repouso, mas a tolerância à desidratação se manifestou quando os frutos verdes ficaram em repouso por 14 dias, pois a germinação das sementes secas foi maior que a das sementes frescas (Tabelas 5 e 7), ocorreu aumento da matéria seca (Tabela 5) assim como a germinação após o envelhecimento acelerado, aumentaram e a condutividade elétrica diminuiu (Tabela 7 Tabela 11, Tabela 13 e Tabela 15) indicando melhor organização das membranas.

A habilidade das sementes de tolerar a desidratação aumenta progressivamente durante o desenvolvimento que é, provavelmente, consequência das mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem gradualmente durante o desenvolvimento, incluindo a síntese de substâncias protetoras como os açúcares, oligossacarídeos e tipos específicos de proteínas (BEWLEY; BLACK, 1994) e um marcador para esse momento ocorre quando as células param em G_1 (LIU et al., 1997).

O aumento da massa de matéria seca com posterior estabilização também indica que as sementes atingiram a maturidade fisiológica, a qual, de acordo com Black, Bewley e Halmer (2008) ocorre quando cessa a transferência de nutrientes da planta para a semente. Esse ponto indica que a semente tem nível de formação, que possibilita o desenvolvimento da plântula, caracterizando a germinação, como é definida na área de Tecnologia de Sementes. Portanto, é possível afirmar que as sementes de pimentão atingiram a maturidade fisiológica quando os frutos tinham coloração verde-avermelhada (sem repouso) porque a massa de matéria seca estabilizou, assim como o teor de água (Tabela 5) e as sementes já tinham completado o seu desenvolvimento, pois a maioria tinha espaço livre entre tegumento e endosperma-embrião menor do que 10% (Tabelas 8, 12, 14 e 16 e Figura 8). Além disso, a partir desse ponto, o conteúdo 4C de DNA também estabilizou (Tabela 19), indicando que não estava ocorrendo divisão celular.

Entretanto, nesse momento a germinação não foi máxima, mas após o repouso do fruto verde-avermelhado houve aumento da porcentagem de germinação. Provavelmente o fruto transferiu nutrientes ou outras substâncias para as sementes durante o repouso, que contribuíram para a germinação, sem, no entanto, interferir na massa de matéria seca.

Portanto, não se recomenda que as sementes de pimentão sejam extraídas logo após a colheita dos frutos verde-avermelhados (valor médio do ângulo h° do colorímetro de $57,1^\circ$). É necessário que após a colheita o fruto seja mantido em repouso de 7 a 14 dias até atingir ângulo h° de $23,8^\circ$ (Tabela 4). Pode-se também esperar o fruto ficar vermelho na planta e então a germinação será superior quando esses ficarem em repouso por 3 dias e terão ângulo de cor h° também de $23,4$ (Tabela 4).

Apesar de alguns autores afirmarem que o ponto de maturidade fisiológica coincide com os valores máximos de germinação e da quantidade de matéria seca, Vidigal et al. (2009) consideraram que nem sempre é o que ocorre. Para as sementes

de pimentão Oliveira et al. (1999) verificaram que o máximo acúmulo de matéria seca foi atingido antes do nível máximo de qualidade da semente e que o peso de matéria seca atingiu valor máximo no período estimado de 55 DAA, que correspondeu à coloração verde-avermelhada dos frutos, o que caracterizou a maturidade fisiológica. Já, para sementes de tomate, Dias et al. (2006) verificaram que o acúmulo máximo de matéria seca ocorreu, em geral, depois que a semente atingiu a qualidade máxima..

Em valores absolutos a máxima germinação coincidiu com o valor máximo de massa de matéria seca e de massa de 1000 sementes (Tabela 5), mas não foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Esses resultados confirmaram a hipótese proposta por Harrington (1972) de que as sementes apresentam qualidade máxima no final do acúmulo de matéria seca e após este período a viabilidade e o vigor diminuem. Entretanto, há relatos de que o acúmulo máximo de matéria seca das sementes de pimentão e de pimenta não coincide com a máxima qualidade (DEMIR; ELLIS, 1992a; OLIVEIRA et al., 1999; SANCHEZ et al., 1993).

Houve o aumento significativo no conteúdo de matéria seca e do vigor promovido pelo repouso por 12 dias dos frutos de tomate colhidos verde-avermelhados (VIDIGAL et al., 2006). Quando os frutos foram colhidos vermelhos o maior conteúdo de matéria seca foi verificado nas sementes obtidas de frutos sem repouso, mas não o maior vigor (VIDIGAL et al., 2006). Pereira (2009) encontrou o valor máximo de germinação para sementes de pimentão Ikeda quando as sementes foram extraídas de frutos verde-avermelhados mantidos repouso por 10 dias.

5.6 A influência do repouso do fruto no parâmetro fisiológico das sementes

A maturação de sementes é um dos principais fatores que determina a qualidade de sementes de hortaliças e é um pré-requisito para a boa germinação e emergência da plântula (DIAS et al., 2006). Como mencionado anteriormente, a qualidade das sementes de pimentão varia de acordo com o cultivar (BARBEDO et al., 1999; CAVERO; ORTEGA; ZARAGOZA, 1995; OLIVEIRA et al., 1999; PEREIRA 2009; SANCHEZ et al., 1993; TEIXEIRA; NASCIMENTO; FREITAS, 2006). Além disso, pelos resultados obtidos nessa pesquisa, é possível afirmar que o repouso do fruto alterou o parâmetro fisiológico das sementes. Dessa maneira, foi possível observar que (Figura 35):

- sementes de frutos verdes estavam formadas, mas visualmente, não atingiram o máximo desenvolvimento e o repouso pós-colheita do fruto por 14 dias interferiu positivamente e de forma significativa na germinação e NO vigor dessas sementes;
- sementes de frutos verde-avermelhados, visualmente atingiram o máximo desenvolvimento e quanto maior o tempo de repouso dos frutos, favoreceu germinação e o vigor dessas sementes;
- sementes de frutos vermelhos apresentaram máxima germinação quando os frutos foram armazenados por 3 dias, sendo que o repouso por 7 e 14 dias foi prejudicial à germinação. Isso ocorreu em todas as épocas, independentemente do período de armazenamento das sementes.

A Figura 35 resume os principais resultados das sementes de frutos verdes e verde-avermelhados sem repouso e mantidos em repouso por 14 dias e vermelhos sem repouso e mantidos em repouso por 3 e 14 dias.

A partir dessas afirmações e com base em todos os resultados dessa pesquisa é possível afirmar que o repouso alterou a cor dos frutos, evidente para frutos verde-avermelhados, como pode ser observado na Figura 35 e na Tabela 4.

O repouso não alterou estatisticamente a massa de matéria seca nem a massa de 1000 sementes (Tabela 5, Figura 35), com exceção do repouso dos frutos verdes por 3 dias, em que houve aumento da massa de 1000 sementes. Sanchez et al. (1993) relataram que o repouso não afetou o conteúdo de matéria seca das sementes de pimentão, porém houve oscilações, ou seja, os valores não se mantiveram constantes, em ambos os parâmetros para todos os tratamentos. Isso pode ter ocorrido porque sementes mantidas dentro do fruto tendem a respirar mais e consumir mais matéria seca (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Outros estudos indicaram que o aumento da matéria seca das sementes no repouso pós-colheita ocorre devido à transferência de nutrientes do fruto (ALVARENGA et al., 1991; BARBEDO et al., 1994).

Durante a maturação dos frutos ocorre o transporte de sacarose através dos tecidos vasculares no interior do fruto para as sementes em desenvolvimento, onde é utilizada como fonte de carbono e energia para o crescimento e desenvolvimento e a biossíntese de outros produtos (HANDLEY; PHARR; MCFEETERS, 1983). Durante o amadurecimento de frutas vermelhas (morango, groselha, framboesa e mirtilo), conforme aumentou a quantidade de antocianina do

fruto, também houve aumento da massa seca e fresca, conteúdo de sólidos solúveis e de açúcares, como glicose, frutose e sacarose das sementes (FAMIANI et al., 2005).

Para sementes de frutos verdes, a germinação (Figura 35) e o vigor estatisticamente superiores (Tabelas 5, 8, 11, 13 e 15) conforme aumentou o tempo de repouso do fruto, mas esses valores foram inferiores aos das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos.

O repouso de 14 dias induziu a divisão e expansão das células do endosperma, porém não ocorreu diminuição do espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião, verificado pelo teste de raios X (Tabela 6, 8, 12, 14, 16 e Figura 35). A divisão foi confirmada pelo aumento do conteúdo 3C+6C das células do endosperma. A expansão pode ser visualizada nas imagens dos testes histoquímicos (Figuras 18, Figura 20 e Figura 22). A coloração dos cortes histoquímicos das sementes de frutos verdes também estava mais forte e as células mais densas que a de sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos (Figura 18). Além disso, o conteúdo de DNA 3C aumentou e o de 2C diminuiu indicando que o embrião estava formado e somente no endosperma estava ocorrendo divisão celular (Tabela 19 e Figura 35).

Sementes de frutos verdes também têm maior quantidade de núcleos 4C (G_2). A desidratação causou a diminuição na proporção de núcleos em G_2 de embriões de sementes de beterraba, principalmente nas sementes colhidas imaturas (ŚLIWIŃSKA, 2003). Esses núcleos parecem ser menos resistentes à perda de água após a retirada do fruto da planta que aqueles que estão na fase G_1 e não resistem à desidratação. Existe a hipótese que células com conteúdo de DNA maior (4C) são mais sensíveis às condições de estresse que aqueles com menor conteúdo de DNA (2C). Possivelmente, além do conteúdo de DNA, a integridade das membranas, incluindo o envoltório nuclear, atua nesse momento. Sabe-se que a desidratação prematura durante o início do desenvolvimento das sementes de algumas espécies causa danos na membrana e, rompimento e degeneração dos núcleos, enquanto que as membranas se mantêm intactas quando a desidratação ocorre no final do desenvolvimento (CORBINEAU et al., 2000). As células que param em G_2 , outalvez, até mesmona fase Spodemter acumuladolesões cromossômicasdurante a maturaçãodas sementese na secagem, devido à fragilidade de DNA eas células podem não ser capazes de sobreviver (SARACCO et al., 1995; VÁZQUES-RAMOS;

SÁNCHEZ, 2003). Isso explica a maior quantidade de sementes não germinadas e de plântulas anormais (Tabela 6, Tabela 8, Tabela 12, Tabela 14 e Tabela 16) das sementes de frutos verdes, além do maior valor de condutividade elétrica (Tabela 7, Tabela 11, Tabela 13 e Tabela 15).

O repouso dos frutos verdes também aumentou a velocidade da divisão celular quando as sementes foram hidratadas. Como consequência, a germinação foi superior para sementes de frutos verdes mantidos em repouso por 14 dias.

Apesar de o repouso dos frutos ter melhorado a qualidade das sementes, promovendo aumento da germinação, da porcentagem e da velocidade de emergência da plântula para alguns dos tratamentos, esse fato pode não estar diretamente relacionado à atuação da enzima endo- β -mananase (Figura 35), mesmo considerando que para sementes de pimenta houve aumento da germinação e da atividade da enzima endo- β -mananase quando os frutos foram colhidos maduros e foram mantidos em repouso por 7 dias (QUEIROZ et al., 2011).

O repouso alterou os lipídios das células das sementes de frutos verdes (Figura 19A e 19B). As demais substâncias (proteínas do endosperma e do embrião e polissacarídeos neutros do embrião) estavam presentes e sem alterações aparentes, mas a germinação foi menor que a das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos. Embriões jovens demoram mais para germinar que os mais desenvolvidos, porque faltam nutrientes para suportar a germinação e o crescimento da plântula (BEWLEY; BLACK, 1994). Sementes de urucum não germinaram nos primeiros estádios de maturação (frutos verdes), devido à insuficiência de materiais de reserva e, quando os frutos mudaram de cor (verde-alaranjado), tinham todo o material de reserva já formado além de apresentarem máximo acúmulo de matéria seca nesse estágio (AMARAL, 1990).

O parâmetro fisiológico das sementes de frutos verde-avermelhados alterou positivamente conforme aumentou o tempo de repouso do fruto.

Nesse caso, a morfologia interna das sementes se modificou em relação à das sementes de frutos verdes, ou seja, o espaço livre entre o tegumento e o endosperma-embrião diminuiu devido ao grau de maturação dos frutos (Figura 35) e consequentemente das sementes, mas não devido ao tempo de repouso dos frutos, assim como o aumento da massa de matéria seca e peso de 1000 sementes. Portis et al. (1999) relataram que no momento em que as sementes de pimentão adquiriram habilidade para germinar, houve o primeiro aumento rápido no peso seco

das sementes e o teor de água das sementes foi de cerca de 80% e uma semana depois as sementes apresentavam tolerância à desidratação e o encerramento da replicação de DNA. Quando ocorreu a mudança de cor dos frutos de pimentão (63 DAA), terminou o período de enchimento (máxima massa de matéria seca), já que não houve aumento no peso seco (PORTIS et al., 1999).

Sementes extraídas de frutos de pimentão com coloração verde-alaranjada e verde-amarelada apresentaram as menores massas em relação às sementes provenientes de frutos colhidos em estádios mais avançados de maturação, mas o repouso dos frutos teve efeito marcante na germinação e no vigor e o aumento no vigor foi suficiente para que essas atingissem qualidade semelhante às sementes extraídas de frutos colhidos em estádios mais avançados de maturação (TEIXEIRA; NASCIMENTO; FREITAS, 2006). Pereira (2009) afirmou que frutos de pimentão do cultivar Casca Dura Ikeda colhidos no estágio verde-avermelhado necessitam de um período de repouso pós-colheita de, no mínimo, 5 dias, para que as sementes atinjam máximo potencial fisiológico.

Da mesma maneira que para as sementes de frutos verdes, o endosperma das sementes de frutos verde-avermelhados continuou em divisão celular (aumento do conteúdo de DNA $3C+6C$, Figura 35 e Tabela 18) durante o repouso e o embrião praticamente cessou a divisão, e quando as sementes foram hidratadas, a divisão celular foi maior nas sementes mantidas em repouso por mais tempo, assim como a germinação (Figura 35).

Sementes extraídas de frutos verde-avermelhados tinham todas as substâncias de reservas estudadas, independentemente do tempo de repouso do fruto.

Figura 35 – Resumo dos resultados de imagens de raios X, teor de água (T.A., %), massa de matéria seca por 100 sementes (MMS, mg), germinação da semente fresca (Gf, %) e seca (Gs, %), e atividade da endo-β-mananase da semente seca (EBMs, pml.s⁻¹) e hidratada por 24h (EBMh, pml.s⁻¹) da primeira época de avaliação e da germinação da semente seca (Gs, %), atividade da endo-β-mananase da semente seca (EBMs, pml.s⁻¹), hidratada por 24h (EBMh, pml.s⁻¹) e hidratada por 72h (EBMhf, pml.s⁻¹) e do conteúdo de DNA das sementes inteiras (DNAi, %) e das extremidades da raiz de sementes secas (DNArs, %) e hidratadas por 72h (DNArh, %) da quarta época de avaliação de, de sementes de pimentão, de frutos de diferentes estádios de maturação representados pelos frutos decoros verde, verde-avermelhado e vermelho, mantidos repouso (R) por 3, ou 14 dias ou sem repouso (0)

O repouso foi benéfico às sementes de frutos vermelhos até certo período (3 dias) e depois disso o parâmetro fisiológico diminuiu (Figura 35). Sementes de pimentão “Casca Dura Ikeda” extraídas de frutos vermelhos mantidos em repouso por 5 e 10 dias também tiveram redução da germinação (PEREIRA, 2009). O autor atribuiu essa redução ao fato de que houve apodrecimento dos frutos deste tratamento durante os 5 dias de repouso, provocando elevação no teor de água das sementes. Na presente pesquisa, os frutos não apodreceram e o teor de água se manteve por volta de 50% quando os frutos vermelhos foram mantidos em repouso por 7 e 14 dias. O período excessivo de repouso dos frutos de pepino, especialmente para as colheitas tardias, causou redução da germinação e caracterizou o início da deterioração das sementes (BARBEDO et al., 1999). O mesmo ocorreu para sementes de tomate (VIDIGAL et al., 2006).

Não foi possível verificar diferenças entre as substâncias de reserva, nem na massa de matéria seca, mas o peso de 1000 sementes diminuiu (Tabela 5) com o repouso dos frutos vermelhos, indicando possível gasto da matéria seca pela respiração das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

O repouso dos frutos aumentou a atividade da endo- β -mananase, tanto das sementes secas como nas hidratadas (Tabela 10, Tabela 17 e Figura 35), mas isso não correspondeu ao aumento da viabilidade e do vigor das sementes. Estudos revelaram que a germinação de sementes como as de alfarroba, café, cuminho, fedegoso, fenogreco e tamareira está relacionada à estrutura das paredes celulares do endosperma micropilar e não à atividade da endo- β -mananase. O endosperma micropilar das sementes dessas espécies tem a parede celular mais fina (GONG et al., 2005). Entretanto, não foram verificadas diferenças no endosperma micropilar das sementes de pimentão. Talvez essas mudanças ocorram quando as sementes estão iniciando o processo de embebição, como em sementes de alface que quando hidratadas por 13h as paredes celulares da camada externa do endosperma micropilar estavam mais espessas do que as da camada interna, o citoplasma endospermal tornou-se menos condensado e rachado, e a radícula foi capaz de avançar esta camada (SUNG et al., 2008).

No endosperma não houve a divisão celular, mas o repouso do fruto induziu a divisão das células da extremidade da radícula, causando aumento da quantidade de núcleos 4C nas sementes secas (Tabela 19 e Figura 35). Como existe a hipótese de que células com conteúdo de DNA maior (4C) são mais sensíveis (ŚLIWIŃSKA, 2003) esse pode ter sido um dos motivos da diminuição do parâmetro fisiológico dessas sementes. Além disso, houve diminuição da atividade da endo- β -mananase das sementes extraídas de frutos vermelhos e hidratadas por 72h, do conteúdo 4C de DNA das extremidades de radícula de sementes hidratadas e da germinação, quando os frutos foram mantidos em repouso por 7 e 14 dias.

Aparentemente houve solubilização ou transformação das reservas de parede da parte externa do endosperma das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos, pois as células estão mais separadas em relação à parte externa do endosperma das sementes de frutos verdes (Figura 22). Se isso for verdadeiro, explica a diminuição da atividade da endo- β -mananase de sementes secas de frutos verde-avermelhados e vermelhos em relação às sementes de frutos verdes, a qual pode ter atuado na parede celular da parte externa do endosperma durante a maturação dos frutos. A enzima também poderia ter função transglicosídica, isto é, poderia ter atuado como sintetizadora de compostos de parede celular, ao invés de degradar, o que explicaria a atividade alta dessa enzima nas sementes secas provenientes de frutos verdes, pois enzimas com atividade de transglicosilase permitem a expansão da parede celular durante o crescimento, sugerindo uma importante função na modificação da parede celular da planta, na germinação da semente e no amadurecimento do fruto (RODRÍGUEZ-GACIO et al., 2012).

Em sementes de pimenta, os menores valores de condutividade elétrica ocorreram quando os frutos foram colhidos aos 70 DAA em todos os momentos de repouso do fruto e sem repouso e os maiores, para sementes de frutos colhidos aos 40 DAA cujos frutos não foram mantidos em repouso, sendo que os valores diminuiriam conforme os frutos ficaram mais tempo em repouso. O repouso dos frutos favoreceu a germinação das sementes de pimenta, assim como o vigor (VIDIGAL et al., 2009). Isso sugere que houve um aumento da integridade das membranas celulares ao longo do desenvolvimento das sementes (DEMIR; ELLIS, 1992a; DIAS et al., 2006).

Quando os frutos de tomate ainda estão verdes e o endosperma está no estado leitoso os embriões já estão totalmente desenvolvidos (LIU et al., 1997). Quando a cor dos frutos começa a mudar para amarela o endosperma se torna sólido. Ao mesmo tempo as sementes apresentam máxima matéria seca, tornam-se tolerante a desidratação e têm germinação alta. As sementes apresentaram maior germinação quando os frutos ficaram totalmente vermelhos e quando esses ficaram passados há decréscimo da germinação (LIU et al., 1997), assim como ocorreu com as sementes de pimentão. Inclusive, durante o corte das sementes a mão livre, para a retirada da extremidade da radícula para avaliação em citômetro de fluxo, foi verificado que o endosperma das sementes de frutos verdes são mais moles e apresentam consistência gelatinosa e o das sementes de frutos verde-avermelhados e vermelhos são sólidos.

5.7 A influencia do armazenamento no parâmetro fisiológico das sementes

Após três meses de armazenamento (segunda época), os resultados relacionados à germinação e ao vigor mantiveram-se similares (Tabela 11) aos da primeira época (Tabela 7), entretanto após o teste de raios X houve aumento da quantidade de plântulas normais. Pereira (2009) verificou que após três meses de armazenamento das sementes de pimentão não houve diminuição da germinação nem da emergência da plântula.

A germinação e o vigor das sementes reduziram após nove meses de armazenamento (terceira época), Tabela 13. Parte dessa diminuição se deve aos patógenos presentes nas sementes. Expressões fisiológicas da deterioração de sementes, como a redução da germinação e do crescimento da plântula, sugerem taxas baixas de síntese. A atenção deve ser voltada para a funcionalidade e possível relação do RNA com a síntese de proteínas no processo deteriorativo (SMITH; BERJAK, 1995).

Estudos que examinaram proteínas totais de sementes sugerem que as ligações cruzadas e a proteólise podem ocorrer com o envelhecimento. Como as enzimas também são proteínas, as ligações cruzadas perturbariam o seu funcionamento. Assim, não é surpreendente que os estudos demonstraram correlação entre a perda de viabilidade e de diminuição da atividade da enzima (McDONALD, 2008; SMITH; BERJAK, 1995). Em alguns casos, o declínio da atividade enzimática pode ser um

evento pós-morte da semente (SMITH; BERJAK, 1995). Isso ocorreu com a atividade da endo- β -mananase das sementes hidratadas por 24h que diminuiu com o armazenamento das sementes.

McDonald (2008) afirmou que o conteúdo de proteínas diminui, enquanto o conteúdo de aminoácido aumenta com o envelhecimento da semente. A fisiologia da deterioração está pautada em duas hipóteses. A primeira é que, de alguma maneira, o DNA é degradado e não há síntese de RNAm e nem a formação da enzima, causando a redução da germinação. Uma segunda possibilidade é que o DNA permanece funcional e forma o RNAm que fica armazenado. Durante o armazenamento, o RNAm armazenado pode ser degradado, causando a redução da transcrição levando a síntese de enzimas incompleta ou defeituosa, essencial para os primeiros estágios de germinação. Sem a atividade da enzima, as reservas armazenadas não são hidrolisadas e as moléculas de energia permanecem indisponíveis para a síntese de ATP e a germinação é lenta (McDONALD, 2008).

Outra mudança marcante foi verificada nas partes das sementes coradas com Sudan IV, para detecção de lipídios. Após um ano de armazenamento (quarta época) as partes estavam com coloração mais fraca ou não reagiram ao corante (Figuras 27 e 32) em relação à primeira época (Figuras 19 24) o que indica deterioração dos lipídios. Pode ter ocorrido autooxidação de lipídios que predomina em sementes com teores de água menor do que 6% (MARCOS FILHO, 2005).

O ácido linoleico e oleico, respectivamente, foram os ácidos graxos mais abundantes em sementes de pimentão e constituíram a máxima quantidade no conteúdo total de lipídios nas sementes frescas e secas (DEMIR et al., 2008; KRSTIĆ et al., 2001). Lipídios insaturados são suscetíveis à oxidação espontânea com potencial para a propagação auto-catalítica (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972). Na decomposição dos hidroperóxidos formados, são sintetizados produtos secundários como aldeídos, os quais são potencialmente danosos. A formação de radicais livres provocam danos às membranas (HARMAN; MATTICK, 1976), o que explica o aumento da condutividade elétrica. A condutividade elétrica de soluções de sementes deterioradas é maior que em sementes novas e foi postulado que a o declínio do vigor das sementes está associado com ou mesmo é devido ao enfraquecimento das membranas celulares (SMITH;

BERJAK, 1995). Além disso, durante a germinação os lipídios são convertidos em sacarose para o desenvolvimento da plântula (TAIZ; ZEIGER, 2009). Se as sementes não têm lipídios ou esse foi degradado, não há germinação não vai ocorrer ou as plântulas serão anormais.

Há relatos que a perda de viabilidade das sementes é resultado da diminuição das reservas, porém isso é questionável já que há grande quantidade de reservas nos tecidos (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972), como visto nos testes histoquímicos. Harrington (1967, apud ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972) sugeriu que a depleção de material oxidável disponível em células meristemáticas (eixo embrionário) pode causar deterioração, mesmo quando os tecidos adjacentes, como cotilédones e endospermas ainda continham substâncias de reservas. Neste caso, a falta de mobilização dessas substâncias nas sementes secas conduziria à inanição dessas células. As células das sementes de pimentão ainda tinham proteínas e polissacarídeos após um ano de armazenamento, mas como foi identificada diferença de tonalidade na coloração dos testes histoquímicos, que estava mais clara, é possível afirmar que houve a degradação de reservas ou a transformação em outras substâncias não reativas aos corantes durante o armazenamento.

Ocorreu vacuolização nas células, independentemente do tratamento das sementes de pimentão após o armazenamento (Figura 28). A vacuolização é um dos resultados da deterioração das sementes, assim como anormalidades nos núcleos, que se tornam alongados e achatados (SONG; TIAN; FU, 2007). A microscopia eletrônica de transmissão indicou ainda degradação progressiva da membrana do núcleo e o núcleo e as outras organelas podem até mesmo não serem reconhecidas (SONG; TIAN; FU, 2007). Berjak e Pammenter (2000) correlacionaram o aparecimento de alterações prejudiciais nas células e tecidos do embrião como desenvolvimento da iniciação da divisão celular e a formação de vacúolos grandes.

Durante a deterioração também é comum ocorrerem anormalidades nos cromossomos, principalmente nas células meristemáticas da radícula (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972) o que pode causar aumento do número de plântulas anormais. Houve aumento das anormalidades de plântulas da primeira para a última época da

germinação (dados não apresentados) que também foi verificado na germinação após o teste de raios X.

A deterioração das sementes não ocorre de maneira uniforme. Em trigo, a deterioração se inicia na ponta da radícula e progride ao longo da radícula, escutelo e por ultimo das folhas e coleoptilo. Em sementes de dicotiledôneas, como as de soja, o eixo embrionário é mais sensível à deterioração que os cotilédones. No eixo embrionário de sementes deterioradas existe mais dialdeído malônico (MDA), que é um produto final da peroxidação lipídica, e peróxidos totais, que são marcadores de radicais livres no eixo quando comparado com os cotilédones (McDONALD,2008).

6 CONCLUSÕES

A colheita das sementes de pimentão “Casca Dura Ikeda” pode ser caracterizada pela coloração dos frutos. Assim, o momento ideal é quando os frutos têm a cor verde avermelhada ou vermelha, avaliada visualmente ou pela leitura do colorímetro correspondente ao ângulo $h^{\circ}=23^{\circ}$, para frutos verde-avermelhados mantidos em repouso por 7 ou 14 dias ou para frutos vermelhos por de 3 dias.

Em função do repouso do fruto há alteração da cor do fruto, do ciclo celular das sementes hidratadas, da atividade da enzima endo- β -mananase e de algumas substâncias de reserva, interferindo positivamente na qualidade das sementes de pimentão. Entretanto, o repouso de frutos, que estão em estágio avançado de desenvolvimento, causa redução da qualidade das sementes.

O teor de água, a massa de matéria seca e a morfologia interna da semente, a anatomia das células do endosperma e a presença de substâncias de reservas das sementes não são alterados durante o repouso do fruto, mas estão relacionados ao estágio de formação das sementes.

Durante o repouso do fruto por 14 dias, as sementes extraídas de frutos verdes têm tolerância à desidratação, caracterizada principalmente pelo aumento da germinação após a secagem das sementes.

Na medida em que há a deterioração natural das sementes durante o armazenamento, há redução da germinação e do vigor, da atividade da endo- β -mananase, da quantidade de lipídios, proteínas e polissacarídeos das células do embrião e do endosperma.

A maturidade fisiológica das sementes é caracterizada pela coloração verde-avermelhada dos frutos e também pela estabilização do teor de água das sementes (30%), pela quantidade de matéria seca e pelo conteúdo de DNA 4C; não há coincidência entre a maturidade fisiológica e a máxima germinação.

Para avaliar rapidamente a viabilidade e o vigor das sementes é possível utilizar a avaliação da quantidade de DNA da extremidade da raiz após a hidratação das sementes.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T.T. (Ed.). **Seed biology**: germination control, metabolism, and pathology. New York: Academic Press, 1972. v. 2, chap. 4, p. 283-317. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=D_T2KF3mfkQC&oi=fnd&pg=PA283&dq=complexation+of+sugars+with+proteins+in+pepper+seeds+AND+deterioration&ots=61uqOjlzW-&sig=cRkatJFBKShqpVWD4yYjmchgPb4#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 27 out. 2013.
- ABUD, H.F. **Caracterização de frutos, histoquímica e qualidade fisiológica de sementes de pimenta durante a maturação**. 2013. 93 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- ABUD, H.F.; GONÇALVES, N.R.; REIS, G.E.; GALLÃO, M.I.; INNECCO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 259-265, 2010.
- AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. 350 p.
- ALAN, O.; ESER, B. Pepper seed yield and quality in relation to fruit position on the mother plant. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Islamabad, v. 10, n. 23, p. 4251-4255, 2007.
- ALBUQUERQUE, K.S. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da maturação de sementes de pimentão**. 2009. 120 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- ALVARENGA, E.M.; SILVA, R.F.; ARAÚJO, E.F.; LEIRO, L.S. Maturação fisiológica de sementes de abóbora italiana. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 147-150, 1991.
- AMARAL, L.I.V. **Germinação e dormência em sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana* L.: aspectos fisiológicos e estruturais**. 1990. 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.
- ANTONIALI, S.; LEAL, P.A.M.; MAGALHÃES, A.M.; FUZIKI, R.T.; SANCHES, J. Respiração de pimentão amarelo sob influência do estágio de maturação e da temperatura de armazenamento. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 71-74, 2006.

ARAÚJO, E.F.; MANTOVANI, E.C.; SILVA, R.F. Influência da idade e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.4, n.1, p.77-87, 1982.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças de 2009**. Disponível em:<http://www.abcsem.com.br/docs/pesquisa_mercado_2009.pdf dados 2009>. Acesso em: 25 out. 2013.

_____. **Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças 2010**. Disponível em:<http://www.abcsem.com.br/docs/direitos_reservados.pdf dados 2010>. Acesso em: 25 out. 2013.

BARBEDO, A.S.C.; ZANIN, A.C.W.; BARBEDO, C.J.; NAKAGAWA, J. Efeitos da idade e do período de repouso pós-colheita dos frutos sobre a qualidade de sementes de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 14-18, 1994.

BARBEDO, C.J.; BARBEDO, A.S.A.C.; NAKAGAWA, J.; SATO, O. Efeito da idade e do repouso pós-colheita de frutos de pepino na semente armazenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 839-847, maio 1999.

BARROS, J.C.S.M. de; GOES, Á. de; MINAMI, K. Condições de conservação pós colheita de frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, n. 2, p. 363-368, 1994.

BENNET, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 2, p. 113-176, 1995.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, ed. esp., p. 22-55, 2000.

BEWLEY, J.D. Breaking down the walls: a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy. **Trend in Plant Science**, Oxford, v.2, n.12, p. 139-144, 1997.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2nded. New York; London: Plenum Press, 1994. 445p.

BINO, R.J.; AARTSE, J.W.; VAN DER BURG, W.J. Non destructive X-ray analysis of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 3, p. 167-170, 1993.

BINO, R.J.; LANTERI, S.; VERHOEVEN, H.A.; KRAAK, H.L. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. **Annals of Botany**, London, v. 72, n. 2, p. 181-187, 1993.

BLACK, M.; BEWLEY, J.D.; HALMER, P. **The encyclopedia of seeds**: science, technology and uses. Wallingford: CABI Publ., 2008. 828 p.

BLAT, S.F.; COSTA, C.P. **A cultura do pimentão**. Piracicaba: ESALQ, Divisão de Biblioteca, 2007. 29 p. (Série Produtor Rural, 34).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA, ACS, 2009. 395 p.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. dos; LIMA, D.U. de. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, ed. esp., p. 137-162, 2000.

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

CARVALHO, P.G.B. de; BORGHETTI, F.; BUCKERIDGE, M.S.; MORHY, L.; FERREIRA FILHO, E.X. Temperature-dependent germination and endo- β -mannanase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.13, n.2, p.139-148, 2001.

CASTRO, R.D.; BINO, R.J.; JING, H.C.; KIEFT, H.; HILHORST, H.W.M. Depth of dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds is related to the progression of the cell cycle prior to the induction of dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 45–54, 2001.

CASTRO, R.D.; LAMMEREN, A.A.M. van; GROOT, S.P.C.; BINO, R.J.; HILHORST, H.W.M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 122, n. 2, p. 327–335, Feb. 2000.

CAVERO, J.; ORTEGA, R.G.; ZARAGOZA, C. Influence of fruit ripeness at the time of seed extraction on pepper (*Capsicum annuum*) seed germination. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 60, n. 4 p. 345-352, 1995.

CHEN, P.; LOTT, J.N.A. Studies of *Capsicum annum* seeds: structure, storage reserves, and mineral nutrients. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 3, p. 518-529, 1992.

CORBINEAU, F.; PICARD, M.A.; FOUGEREX, A.; LADONNE, F.; COME, D. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 329-339, 2000.

COSTA, C.S.R.; HENZ, G.P. **Pimenta: Capsicum spp.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. (Sistemas de Produção, 2). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/clima.html>. Acesso em: 26 ago. 2013.

DAHAL, P.; NEVINS, D.J.; BRADFORD, K.J. Relationship of endo-[beta]-D-mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 113, n. 4, p. 1243-1252, 1997.

DELL'AQUILA, A. Pepper seed germination assessed by combined X-radiography and computer-aided imaging analysis. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, n. 4, p. 777-781, 2007.

DELOUCHE, J.C. Seed maturation. In: _____. **Handbook of seed technology**. Starkville: Mississippi State University, 1981. p. 17-23.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

DEMİR, İ.; ELLIS, R.H. Changes in seed quality during seed development and maturation in tomato. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 2, p. 81-87, 1992a.

_____. Development of pepper seed quality. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 121, n. 2, p. 385-399, 1992b.

DEMİR, İ.; MAVİ, K.; OZCOBAN, M. Changes in germination and potential longevity of watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds during development. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 32, n. 1, p. 139-145, 2004.

DEMİR, İ.; TEKİN, A.; OKMEN, Z.A.; OKCU, G.; KENANOĞLU, B.B. Seed quality, and fatty acid and sugar contents of pepper seeds (*Capsicum annuum* L.) in relation to seed development and drying temperatures. **Turkish Journal of Agriculture & Forestry**, Ankara, v. 32, n. 6, p. 529-536, Dec. 2008.

DIAS, D.C.F.S.; NASCIMENTO, W.M. Desenvolvimento, maturação e colheita de sementes de hortaliças. In: NASCIMENTO, W.M. (Ed.). **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. cap. 1, p. 11-76.

DIAS, D.C.F.S.; RIBEIRO, F.P.; DIAS, L.A.S.; SILVA, D.J.H.; VIDIGAL, D.S. Tomato seed quality harvested from different trusses. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 34, n. 3, p. 681-689, 2006.

DOWNIE, B.; GURUSINGHE, S.; BRADFORD, K.J. Internal anatomy of individual tomato seeds: relationship to abscisic acid and germination physiology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 2, p. 117-128, 1999.

DOWNIE, B.; HILHORST, H.W.M.; BEWLEY, J.D. A new assay for quantifying endo- β -mannanase activity using Congo red eye. **Phytochemistry**, New York, v. 36, n. 4, p. 829-835, 1994.

FAMIANI, F.; CULTRERA, N.G.M.; BATTISTELLI, A.; CASULLI, V.; PROIETTI, P.; STANDARDI, A.; CHEN, Z.H.; LEEGOOD, R.C.; WALKER, R.P. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 421, p. 2959–2969, Nov. 2005.

FANG, J.; ZHANG, S. Tapetum dimorphism and its histochemical study in sweet pepper (*Capsicum annuum* L. var. *Grossum*). **Acta Botanica Sinica**, Beijing, v. 30, n. 4, p. 352–356, 1988.

FARIA, J.M.R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A.A.M. van; HILHORST, H.W.M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2119–2130, Aug. 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2008. 421p.

FORTI, V.A. **Presença de nematoides em plantas de soja e relação com a ocorrência de sementes esverdeadas e com o potencial fisiológico de sementes**. 2013. 101 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

GAGLIARDI, B. **Procedimentos para avaliação do parâmetro fisiológico de sementes de pimentão e relações com a emergência de plântulas**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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

GEORGE, R.A.T. **Vegetable seed production**. New York: Longman, 1985. 320 p.

GODOY, M.C.; GODOY, A.R.; CARDOSO, A.I.I. Influência do estágio de maturação da flor na produção de sementes de pimentão com polinização manual. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052006000100011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 set. 2013.

GOLDBERG, R.B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed **Science**, Washington, v. 266, n. 5185, p. 605–614, 1994.

GONG, X.; BASSEL, G.W.; WANG, A.; GREENWOOD, J.S.; BEWLEY, J.D. The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- β -mannanase activity. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 7, p. 1165–1173, 2005.

- GROOT, S.P.C.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSSSEN, C.M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellins deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. **Planta**, Berlin, v. 174, n. 4, p. 500-504, 1988.
- HALMER, P.; BEWLEY, J.D. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. **Planta**, Berlin, v. 144, n. 4, p. 33-34, 1979.
- HANDLEY, L.W.; PHARR, D.M.; MCFEETERS, R.F. Carbohydrate changes during maturation of cucumber fruit implications for sugar metabolism and transport. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 72, n. 2, p. 498-502, 1983.
- HARMAN, G.E.; MATTICK, L.R. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. **Nature**, London, v. 260, n. 25, p. 323-324, 1976.
- HARRINGTON, J.F. Seed storage longevity. In: KOZLOWSKY, T.T. (Ed). **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. chap. 3, p. 145-245.
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Evaluation problems in the germination of soybean seed lots with high incidence of *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 2, n. 1, p. 9-22, 1980.
- HILHORST, H.W.M.; DOWNIE, B. Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker): studies with the sitiens mutant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 89-97, 1996.
- HOMRICHHAUSEN, T.M.; HEWITT, J.R.; NONOGAKI, H. Endo- β -mannanase activity is associated with the completion of embryogenesis in imbibed carrot (*Daucus carota* L.) seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 3, p. 219-227, 2003.
- IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R.; MATILLA, A. After-ripening alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellin pathways during early imbibition of *Sisymbrium officinale* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 25-36, 2009.
- IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R.; RODRÍGUEZ-GACIO, M.C.; BARRERO-SICILIA, C.; CARBONERO, P.; MATILLA, A. Three endo- β -mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, Berlin, v. 233, n. 1, p. 219-227, 2011.
- JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1997.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw, 1940. 523 p.
- KARNOWSKY, M.J. A formal dehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 11, p. 137-140, 1965.

KERMODE, A.R. Regulatory mechanism in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 273-332.

KERMODE, A.R.; BEWLEY, D.; DASGUPTA, J. MISRA, S. The transition from seed development to germination: a key role for desiccation? **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1113-1118, 1986.

KIKUTI, A.L.P.; KIKUTI, H.; MINAMI, K. Condicionamento fisiológico em sementes de pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 2, p. 243-248, 2005.

KRSTIĆ, B.; MERKULOV, L.J.; GVOZDENOVIC, Đ.; PAJEVIĆ, S. Anatomical and physiological characteristics of seed in pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. **Acta Agronomica Hungarica**, Budapest, v. 49, n. 3, p. 221–229, 2001.

KUCERA, B.; COHN, M.A; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 15, n. 4, p. 281-307, 2005.

LANTERI, S.; KRAAK, H.L.; DE VOS, C.H.R.; BINO, R.J. Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 89, n. 3, p. 433-440, 1993.

LANTERI, S.; SARACCO, F.; KRAAK, H.L.; BINO, R.J. The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 2, p. 81-87, 1994.

LEUBNER-METZGER, G. Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 1, p. 17-34, 2003.

LIMA, R.B.S.; GONÇALVES, J.F.C.; PANDO, S.C.; FERNANDES, V.; SANTOS, A.L.W. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaedora* Ducke) seeds. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 19–25, 2008.

LIU, Y. **Hormones and tomato seed germination**. 1996.125 p. Thesis (PhD in Plant Physiology) - Wageningen Agricultural University, Wageningen, 1996.

LIU, Y.; HILHORST, H.W.M.; GROOT, S.P.C.; BINO, R.J. amounts of nuclear dna and internal morphology of gibberellin- and abscisic acid-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) seeds during maturation, imbibition and germination. **Annals of Botany**, London, v. 79, p. 161-168, 1997.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCELIS, L.F.M.; BAAN HOFMAN-EIJER, L.R. Effects of seed number on competition and dominance among fruits in *Capsicum annuum* L. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 6, p. 687–693, 1997.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 133-149.

_____. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARRUSH, M.; YAMAGUCHI, M.; SALTVEIT, M.E. Effect of potassium nutrition during bell pepper seed development on vivipary and endogenous levels of abscisic acid (ABA). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 5, p. 925-930, 1998.

MARTY, F. Plant vacuoles. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 587-599, 1999.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. London: Pergamon Press, 1989. 270 p.

McDONALD, M.B. **Physiological causes of seed deterioration**. 2008. 12 p. Disponível em: <http://seedbiology.osu.edu/HCS631_files/9A%20Seed%20deterioration.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2013.

McMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, Baltimore, v. 23, n. 3, p. 99–108, 1948.

MEINKE, D.W. Molecular genetics of plant embryogenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 369–394, 1995.

MENDONÇA, K.; JACOMINO, A.P.; MELHEM, T.J.; KLUGE, R.A. Concentração de etileno e tempo de exposição para desverdecimento de limão ‘Siciliano’. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 179-183, 2003.

MICÓ, M.; LABRADA, A.; CALDERÓN, S. Use of X-ray analysis in studies of quality of seeds of some species of agricultural and forestry interest. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Lausanne, v. 240, n. 2, p. 471-474, 1999.

MIQUEL, M.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis in developing seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 169-193.

MO, B.; BEWLEY, J.D. The relationship between β -mannosidase and endo- β -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 392, p. 2503-2510, 2003.

MURTHY, U.M.N.; SUN, W.Q. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 348, p. 1221-1228, 2000.

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Termarcaphi Pty. Ltd., 1981. 345 p.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, A.P.; GONÇALVES, C.P.; BRUNO, R.L.A.; ALVES, E.U. Maturação fisiológica de sementes de pimentão, em função de idade de frutos após a antese. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 21, n. 2, p. 88-94, 1999.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M.; MASETTO, T.E. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex a. p. de Candolle) Standley - (Bignoniaceae) pelo teste de raios x. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 26, n. 2, p.138-143, 2004.

OLIVEIRA, S.R.S.; NOVENBRE, A.D.L.C. Teste de condutividade elétrica para as sementes de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 31-36, 2005.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: theoretical and applied. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1972. 1230 p.

PEDROSA, J.P.P.; CIRNE, L.E.M.R.; MIRANDA NETO, J.M.M. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 121-123, 1999.

PEREIRA, C.O. **Qualidade fisiológica de sementes de pimentão em função do estágio de colheita, período de repouso de frutos e armazenamento**. 2009. 76 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Estadual de Montes Claros, Lavras, 2009.

PINHEIRO, J.M.S. **Tecnologia pós-colheita para conservação de bananas da cultivar Tropical**. 2009. 59 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2009.

PORTIS, E.; MARZACHÌ, C.; QUAGLIOTTI, L.; LANTERI, S. Molecular and physiological markers during seed development of peppers (*Capsicum annuum* L.): DNA replication and β -tubulin synthesis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, p. 85–90, 1999.

PUPIM, T.L.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CARVALHO, M.L.M.; CICERO, S.M. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222008000200004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08 out. 2013.

QUEIROZ, L.A.F.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, J.A.; FERREIRA, V.F.; CARVALHO, B.O.; BUENO, A.C.R. Influence of maturation stage and drying on the quality of 'habanero yellow' pepper seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 33, p. 472-481, 2011.

RÉGULA, L.M. **Padrões virtuais e tolerâncias colorimétricas no controle instrumental das cores**. 2004. 233 p. Dissertação (Mestrado em Metrologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 113 p.

REN, Y.; BEWLEY, J.D.; WANG, X. Protein and gene expression patterns of endo- β -mannanase following germination of rice. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 18, n. 3, p. 139-149, 2008.

RODRÍGUEZ-GACIO, M.C.; IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R.; CARBONERO, P.; MATILLA, A.J. Softening-up mannan-rich cell walls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 3976-3988, 2012.

SANCHEZ, V.M.; SUNDSTROM, F.J.; MCCLURE, G.N.; LANG, N.S. Fruit maturity, storage and postharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 191-201, 1993.

SARACCO, F.; BINO, R.J.; BERGERVOET, J.H.W.; LANTERI, S. Influence of priming-induced nuclear replication activity on storability of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 25-29, 1995.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000500028&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 set. 2011.

SCHRÖDER, R.; ATKINSON, R.G.; REDGWELL, R.J. Re-interpreting the role of endo- β -mannanases as mannan endotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. **Annals of Botany**, London, v. 104, n. 2, p. 197-204, 2009.

SCHRÖDER, R.; WEGRZYN, T.F.; BOLITHO, K.M.; REDGWELL, R.J. Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 4, p. 590-600, 2004.

SEDIYAMA, M.A.N.; CASALI, V.W.D.; SILVA, E.A.M.; CARDOSO, A.A.; SILVA, R.F. Influência da época de colheita e estágio de maturação na germinação de sementes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* BANC). **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 69-71, 1991.

SEELY, O. **Preparation of acid-base indicators**. Dominguez Hills: California State University, 2013. Disponível em: <<http://www.csudh.edu/oliver/chemdata/ind-prep.htm>>. Acesso em: 20 out. 2013.

SILVA, V.N.; CICERO, S.M.; BENNETT, M. Relationship between eggplant seed morphology and germination. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 4, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222012000400010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 jul. 2013.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, Å. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, Lund, v. 39, n. 3/4, p. 458–468, 1953.

ŚLIWIŃSKA, E. Cell cycle and germination of fresh, dried and deteriorated sugarbeet seeds as indicators of optimal harvest time. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 2, p. 131–138, 2003.

_____. Nuclear DNA content analysis of plant seeds by flow cytometry. In: ROBINSON, J.P.; DARZYŃKIEWICZ, Z.; HOFFMAN, R.; NOLAN, J.P.; ORFAO, A.; RABINOVITCH, P.S.; WATKINS, S. (Ed.) **Current protocols in cytometry**. New York: John Wiley, 2006. v. 1, p. 7.29.1-7.29.13.

_____. Nuclear DNA replication and seed quality. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 19, n. 1, p. 15–25, 2009.

SMITH, M.T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 701-746.

SONG, S.Q.; TIAN, X.; FU, J.R. Possible involvement of programmed cell death events during accelerated ageing of *Glycine max* axes. In: ADKINS, S.W.; NAVIE, S.C.; ASHMORE, S. (Ed.). **Seeds: biology, development and ecology**. Wallingford: Cromwell Press, 2007. chap. 7, p. 71-84. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=IMyaaUy8YaYC&pg=PA81&lpg=PA81&dq=seed+cell+vacuolation+deterioration&source=bl&ots=2IZW9ZlfUw&sig=8063xiF23n8th64lcRAddmsbpOA&hl=pt-BR&sa=X&ei=dXikUuW0CYa1kQfDnICQDA&ved=0CFQQ6AEwAw#v=onepage&q=seed%20cell%20vacuolation%20deterioration&f=false>>. Acesso em: 08 dez. 2013.

SPEARS, J.F. An introduction to seed vigour testing. In: VAN DE VENTER, H.A. (Ed.). **Seed vigor seminar**. Copenhagen: International Seed Testing Association, 1995. p. 1-9.

STILL, D.W.; BRADFORD, K.J. Endo- β -mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radical tips in relation to germination rates. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 113, n. 1, p. 21-29, 1997.

SUNG, Y.; CANTLIFFE, D.J.; NAGATA, R.T.; NASCIMENTO, W.M. Structural changes in lettuce seed during germination at high temperature altered by genotype, seed maturation temperature, and seed priming **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 133, n. 2, p. 300–311, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TEIXEIRA, B.A.; NASCIMENTO, W.M.; FREITAS, R.A. Maturação de sementes de pimentão 'Tico'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42, 2006, Brasília. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 2561, jul. 2006. Resumo 641.

TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; BUCKERIDGE, M.S. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). **Trees**, Santa Monica, v. 20, n. 6, p. 669– 678, 2006.

TSE, Y.C.; WANG, J. MIAO, Y. JIANG, L. Biogenesis of the compound seed protein storage vacuole. In: ADKINS, S.W.; NAVIE, S.C.; ASHMORE, S. (Ed.). **Seeds: biology, development and ecology**. Wallingford: Cromwell Press, 2007. chap. 11, p. 112-119. Disponível em:
<<http://books.google.com.br/books?id=IMyaaUy8YaYC&pg=PA81&lpg=PA81&dq=seed+cell+vacuolation+deterioration&source=bl&ots=2IZW9ZIfUw&sig=8063xiF23n8th64IcRAddmsbpOA&hl=pt-BR&sa=X&ei=dXikUuW0CYa1kQfDnICQDA&ved=0CFQQ6AEwAw#v=onepage&q=seed%20cell%20vacuolation%20deterioration&f=false>>. Acesso em: 08 dez. 2013.

VAN DER BURG, W.J.; AARTSE, J.W.; ZWOL, R.A van; JALINK, H.; BINO, R.J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 2, p. 258–263, 1994.

VÁZQUEZ-RAMOS, J.M.; SÁNCHEZ, M.P. The cell cycle and seed germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v.13, n. 2, p. 113–130, 2003.

VEIGA, A.D.; GUIMARÃES, R.M.; ROSA, S.D.V.F.; PINHO, E.V.R. Von; SILVA, L.H.C.; VEIGA, A.D. Storability of coffee seeds harvested at different maturation stages and submitted to different drying methods. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, p. 83-91, 2007.

VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2 R. **Annales d' Histocimie**, Paris, v. 15, n. 4, p. 289-296, 1970.

VIDIGAL; D.S.; DIAS D.C.F.S.; DIAS, L.A.S.; FINGER, F.L. Changes in seed quality during fruit maturation of sweet pepper. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 535-539, 2011.

VIDIGAL; D.S.; DIAS D.C.F.S.; PINHO, E.V.R. Von; DIAS, L.A.S. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 31, n. 2, p. 129-136, 2009.

VIDIGAL; D.S.; DIAS D.C.F.S.; NAVEIRA, D.S.P.C.; ROCHA, F.B.; BHERING, M.C. Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 3, p. 87-93, 2006.

WATKINS, J.T.; CANTLIFFE, D.J. Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* at low temperature. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 72, n. 1, p. 146-150, 1983.

WATKINS, J.T.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER, D.J.; NELL, T.A. Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 1, p. 61-65, 1985.

WOLFRON, M.L.; LAVER, M.L.; PATIN, D.L. Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterization of mannan. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 26, n. 11, p. 4533-4531, 1961.

YEUNG, E.C.; BOWRA, S. Embryo and endosperm development in coriander (*Coriandrum sativum*). **Botany**, Ottawa, v. 89, n. 4, p. 263-273, 2011.

ZAMSKI, E. Transport and accumulation of carbohydrates in developing seeds: the seed as a sink. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 25-44.