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

**Condicionamento fisiológico de sementes de pimentão com
biorreguladores**

Clíssia Barboza da Silva

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

**Piracicaba
2015**

Clíssia Barboza da Silva
Engenheira Agrônoma

Condicionamento fisiológico de sementes de pimentão com biorreguladores
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JULIO MARCOS FILHO**

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

Piracicaba
2015

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

Silva, Clíssia Barboza da

Condicionamento fisiológico de sementes de pimentão com bioreguladores / Clíssia Barboza da Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

100 p. : il.

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

1. *Capsicum annuum* 2. Potencial fisiológico 3. Superóxido dismutase 4. Esterase
Hidrocondicionamento 6. Armazenamento I. Título

CDD 635.643
S586c

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

Dedico

À Deus, por todas as coisas concedidas em minha vida!

Ofereço

*Aos meus amados pais Cristovão e Sandra,
e irmãos Micaela e Jonathan, pelo amor e
por acreditarem sempre. Obrigada por
serem uma família tão especial e me
fazerem tão feliz.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, me dando força e sabedoria.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, da Universidade de São Paulo - USP, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Julio Marcos Filho, pela confiança, incentivo, sugestões, conversas, e todos os conhecimentos repassados. Tudo foi de extrema importância para meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço pelo privilégio de ter sido sua orientada e pela sua valiosa amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado e bolsa de estágio em pesquisa no exterior (BEPE) “bolsa sanduíche”, e demais auxílios financeiros, tornando possível a realização dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida entre 01 de março a 31 de Julho de 2011.

Aos meus supervisores nos Estados Unidos, Prof. Dr. Mark Bennett e Prof. Dr. Pablo Jourdan, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de agosto de 2013 a agosto de 2014 na The Ohio State University, durante meu doutorado sanduíche, e ao Prof. Dr. David Mackey, por ter cedido o Laboratório de Genética Molecular para realização de análises de isoenzimas, e à pesquisadora Wanying Zhao pela ajuda nas análises e manuseio de equipamentos.

À Empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda, pelo fornecimento das sementes, e à Dra. Simone Fessel pela ajuda durante esse processo.

À empresa Stoller do Brasil pelo fornecimento do bioestimulante Stimulate®.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia que fizeram parte da minha vida acadêmica, pelos ensinamentos, e, muitas vezes, pela amizade cultivada, em especial aos professores Dr. Silvio Cícero e Dra. Ana Novembre, pelos ensinamentos em Sementes.

À querida MSc. Helena Chamma pela assistência durante as análises laboratoriais, e pela amizade, sempre com um enorme coração, tornando nosso ambiente de trabalho tão agradável.

À Dra. Salete Gaziola pela ajuda nas avaliações de isoenzimas, e ao Prof. Dr. Ricardo Azevedo pelos ensinamentos e por ceder o Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas.

Ao Valdinei, Diego, Felipe e Julian pela ajuda na instalação dos rizotrons, e ao Prof. Dr. Paulo Castro por ter cedido a casa de vegetação.

Aos funcionários da Pós-Graduação que me ajudaram direta ou indiretamente no decorrer do curso, em especial à secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Luciane Toledo, pelo apoio e atenção prestada.

Ao Prof. Dr. Roberval Vieira, da Unesp/Jaboticabal, pelo incentivo e apoio sempre constante.

Aos professores Dra. Vilma Ferreira e Dr. João Araújo-Neto, da Universidade Federal de Alagoas, por acreditarem sempre.

Às companheiras de moradia Stefania e Anirene, e especialmente à Sabrina que conviveu comigo a maior parte do meu doutorado, pelas conversas, risadas e por ter sido tão companheira em todos os momentos.

À minha amada tia Sônia e meu querido tio Augusto por todo o amor me dado, e por estarem sempre comigo, aconselhando, apoiando e me dando força. Vocês são muito importantes na minha vida.

Aos amigos Bruno Vieira, Caroline Rabelo, Claudiana Moura, Daniel Carvalho, Danila Conceição, Esteban Galeano e Rafael Marani pelo apoio e amizade sincera, e especialmente ao Euménes Farias, pelo cuidado, carinho e amor, em absolutamente todos os momentos.

Ao meu grande amigo Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior, pelo apoio e amizade, sempre tão prestativo e atencioso.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Sementes: Adriana, Bruna, Cartiane, Cesia, Cibele, Cristiane, Danielle, Denis, Francisco Ortolan, Haynna, Henrique, Iuri, Juliana, Luís Felipe, Maicon, Marcão, Marcela, Márcio, Mário, Natália, Nayara, Renata, Renê, Roberta, Simone, Sibelle, Patricia, Vanessa, Victor e Zé Luiz, por todos os bons momentos que partilhamos juntos, e do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas: Berenice, Georgia, Maressa, Mônica e Vanessa, pela ajuda e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal: Adilson, Cláudio, Hodair, João, Rafael, Ticão e Zezé pela convivência e amizade.

Aos amigos de Ohio/E.U.A.: Prof. Dr. Mark Sulc e sua esposa Sally Sulc, Camila, Claudia, Dalila, Elmeson, Elias Balimponya, Fernanda, Jaciara, Juliana, Krzysztof, Leyva, Natalia, Nathan, Rafaela, Ricardo, Sipra, Steven Lowy e Steven Haba.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes, tornando este trabalho possível.

Tudo posso naquele que me fortalece.

(Filipenses 4:13)

Quando o sonho se desfaz, Deus reconstrói.

Quando se acabam as forças, Deus renova.

Quando parece ser o final, Deus te diz: Não é o fim!

Quando tudo parece se fechar, Deus abre uma nova porta.

Quando você diz: "Não vou conseguir", Deus diz: Não temas, pois estou contigo.

Quando não há possibilidade, Deus faz o milagre!

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão bibliográfica.....	19
2.2 Material e métodos.....	29
2.2.1 Avaliação do potencial fisiológico inicial das sementes.....	29
2.2.1.1 Teor de água.....	29
2.2.1.2 Germinação.....	30
2.2.1.3 Primeira contagem de germinação.....	30
2.2.1.4 Envelhecimento acelerado com solução saturada de sal - EASS.....	30
2.2.1.5 Análise computadorizada de análise de imagens de plântulas - SVIS® ..	30
2.2.1.6 Peroxidação lipídica.....	31
2.2.2 Marcha de absorção de água pelas sementes.....	32
2.2.3 Estudo do período de secagem de sementes condicionadas.....	33
2.2.4 Condicionamento com biorreguladores.....	33
2.2.4.1 Atividade enzimática.....	33
2.2.5 Crescimento radicular de plantas em rizotrons.....	34
2.2.6 Condicionamento fisiológico em tambor.....	35
2.2.7 Comportamento de sementes armazenadas.....	35
2.2.8 Procedimento estatístico.....	35
2.3 Resultados e Discussão.....	36
2.3.1 Potencial fisiológico inicial das sementes.....	36
2.3.2 Marcha de absorção de água pelas sementes.....	39
2.3.3 Estudo do período de secagem de sementes condicionadas.....	41
2.3.4 Condicionamento com biorreguladores.....	42
2.3.4.1 Atividade enzimática.....	49
2.3.5 Crescimento radicular de plantas em rizotrons.....	53
2.3.6 Condicionamento fisiológico em tambor.....	57
2.3.7 Comportamento de sementes armazenadas.....	65
3 CONCLUSÕES.....	83

REFERÊNCIAS..... 85

RESUMO

Condicionamento fisiológico de sementes de pimentão com biorreguladores

A emergência rápida e uniforme de plântulas em campo constituem pré-requisitos essenciais para o sucesso da produção comercial de sementes de hortaliças. Um dos principais problemas enfrentados por produtores de pimentão refere-se à germinação lenta e estabelecimento de estande desuniforme, o que ressalta a importância do desenvolvimento de técnicas que visem aprimorar o desempenho de lotes de sementes. Com o objetivo de verificar a eficiência do condicionamento fisiológico de sementes de pimentão associado a biorreguladores sobre o potencial fisiológico das sementes, foi desenvolvida esta pesquisa utilizando dois cultivares, AF-6 e AF-7, representados por três e quatro lotes de sementes, respectivamente. Foram investigados possíveis efeitos do condicionamento com 24-epibrassinolídeo, ácido giberélico ou o bioestimulante Stimulate[®]. As sementes foram avaliadas quanto à germinação e vigor, incluindo observações de atividade enzimática das sementes e análises de parâmetros de crescimento de plântulas utilizando o *software* SVIS[®]. Por fim, o tratamento considerado promissor, condicionamento com 24-epibrassinolídeo na concentração de 10^{-8} M, foi avaliado quanto ao crescimento radicular das plantas, eficiência pela utilização do condicionamento em sistema de tambor, e comportamento das sementes durante o armazenamento. Diversos benefícios foram verificados após o condicionamento utilizando 24-epibrassinolídeo a 10^{-8} M, sobretudo a velocidade de germinação das sementes, atividade de enzimas antioxidantes e hidrolíticas, crescimento e uniformidade de desenvolvimento das plântulas. O condicionamento com 24-epibrassinolídeo a 10^{-8} M também favoreceu o desempenho dos lotes de sementes durante o armazenamento. A inclusão desse biorregulador no condicionamento em sistema de tambor é eficiente para o tratamento comercial de sementes de pimentão.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*; Potencial fisiológico; Superóxido dismutase; Esterase; Hidrocondicionamento; Armazenamento

ABSTRACT

Bell pepper seed priming with bioregulators

Rapid and uniform seedling emergence in field are essential for successful commercial production of vegetables. One of the main problems faced by bell pepper growers is the slow germination and uneven stand establishment, which highlights the importance of developing techniques that improve the performance of seed lots. In order to evaluate the efficiency of seed priming with bioregulators on physiological potential of bell pepper seeds, this research was developed using two cultivars, AF-6 and AF-7, represented by three and four seed lots, respectively. Possible effects of seed priming using 24-epibrassinolide were compared to gibberellic acid, and Stimulate[®]. Germination and vigor evaluations were carried out, including analysis of seed enzymatic activity and parameters of seedlings growth using the SVIS[®] software. At the end, the most promising treatment, seed priming with 24-epibrassinolide of 10^{-8} M was evaluated regarding to plant root growth, drum priming and seed performance during storage. Several benefits were verified after seed priming with 24-epibrassinolide, especially on germination speed, antioxidant and hydrolytic enzymes as well as seedling growth and uniformity development. Primed seeds with 24-epibrassinolide also showed better performance during seed storage. This bioregulator can be used during drum priming for commercial bell pepper seed treatment.

Keywords: *Capsicum annuum*; Physiological performance; Superoxide dismutase; Esterase; Hydropriming; Seed storage

1 INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento da técnica de condicionamento fisiológico de sementes tem proporcionado avanços tecnológicos nos sistemas de produção de hortaliças, pelo aumento na velocidade de germinação de sementes e sincronismo de emergência das plântulas em campo, auxiliando produtores na distribuição comercial de sementes de maior qualidade.

A produção do pimentão ocorre por meio da utilização de sementes, caracterizadas por apresentar germinação lenta e desuniforme, o que torna a semeadura direta economicamente inviável para a implantação de campos uniformes e estandes adequados. O gasto excessivo de sementes e a prática do desbaste elevam consideravelmente o custo de produção, levando produtores à busca pela adoção de técnicas que visem aprimorar o desempenho dos lotes de sementes em campo, de modo a incidir em estabelecimento rápido e eficaz das plântulas. Deste modo, o condicionamento fisiológico das sementes tem constituído em forte aliado do sistema produtivo, pelo realce de características fisiológicas dos lotes, que levam a um desenvolvimento mais rápido e uniforme das plântulas.

A combinação do condicionamento com outras técnicas de tratamento de sementes, como a aplicação de biorreguladores, pode ainda, resultar em benefícios adicionais, favorecendo a atividade de enzimas e desenvolvimento de plântulas. O 24 epibrassinolídeo (24-EpiBL), que pertence ao grupo dos hormônios esteróides chamado brassinosteróides (BRs), bem como o ácido giberélico (GA_3) e o bioestimulante Stimulate[®] (mistura de cinetina, ácido giberélico e de ácido indolbutírico) estão entre os principais biorreguladores utilizados na agricultura para este fim, provocando ação marcante sobre a germinação, crescimento e desenvolvimento de plântulas de várias espécies. Porém, cada tratamento pode apresentar diferentes efeitos, dependendo da espécie, cultivar, concentração, tempo de tratamento e vigor das sementes.

Em sementes de pimentão, não há relatos na literatura sobre efeitos do condicionamento fisiológico utilizando biorreguladores sobre o potencial fisiológico das sementes. Assim, esta pesquisa buscou verificar possíveis impactos da associação do condicionamento fisiológico com biorreguladores sobre alterações endógenas das sementes, relacionadas à atividade enzimática que refletem o vigor;

além disso, o emprego de procedimentos tradicionais em associação com um sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas foi utilizado para obtenção de informações sobre parâmetros fisiológicos associados ao potencial de crescimento das plântulas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

O pimentão (*Capsicum annuum* L.), pertencente à família das solanáceas, é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, ocupando posição relevante no setor agrícola, com cerca de 12.000 hectares de área plantada e produção estimada de 280.000 toneladas, situando-o entre as dez hortaliças mais cultivadas no território nacional (EMBRAPA, 2011). São Paulo e Minas Gerais apresentam 40% da produção nacional.

A cultura do pimentão teve origem na América Latina, sobretudo no México. É uma planta herbácea anual, autógama, com ocorrência de taxas de cruzamentos dependendo da ação de insetos polinizadores. Cerca de 58% dos cultivares de pimentão são híbridos, com vantagens sobre os cultivares de polinização aberta, por atender melhor às exigências do produtor e do mercado, devido ao maior potencial produtivo, melhor adaptação aos sistemas de cultivo, resistência à pragas e doenças (BLAT; BRAZ; ARRUDA, 2007).

A multiplicação de plantas dessa espécie é feita exclusivamente por meio de sementes, o que ressalta a importância de estratégias dentro de programas de controle de qualidade, de modo a assegurar desempenho adequado das plântulas em campo. O vigor das sementes é um importante atributo de qualidade para o sucesso da multiplicação de plantas e produção de alimentos (RAJJOU et al., 2012). Em um sistema de produção de sementes de hortaliças, particularmente quando são utilizadas sementes híbridas ou novos cultivares, a obtenção de sementes vigorosas é essencial para garantia da qualidade do produto, pelo alto valor das sementes.

Sementes de pimentão são caracterizadas por apresentar germinação lenta e desuniforme, mesmo sob condições ambientais favoráveis (LAKSHMANAN; BERKE, 1998; NASCIMENTO; DIAS; FREITAS, 2006; BOSLAND; VOTAVA, 2012), sendo a primeira e última contagem do teste de germinação realizadas, respectivamente, aos sete e 14 dias após a semeadura (BRASIL, 2009). Um dos fatores relacionados à baixa velocidade de germinação dessas sementes, refere-se à características da parede celular do endosperma micropilar, que oferece resistência mecânica ao

crescimento do embrião, afetando deste modo, o processo germinativo (WATKINS; CANTLIFFE, 1983).

Portanto, para garantia de populações de plantas uniformes em campo, a produção de mudas ocorre em bandejas para posterior transplântio. Porém, gastos excessivos de sementes e a prática do desbaste durante esse processo, elevam consideravelmente os custos de produção. Na tentativa de minimizar este impasse, o uso de lotes de sementes condicionados tem se tornado em alternativa promissora, uma vez que tal tratamento favorece o desempenho fisiológico das sementes, conduzindo à emergência rápida de plântulas e a obtenção de estandes uniformes em campo (BRADFORD; STEINER; TRAWATHA, 1990; DEMIR; OKCU, 2004).

O condicionamento fisiológico de sementes, também conhecido como "*priming*", tem constituído em aliado de sistemas produtivos de diversas espécies de hortaliças, tais como berinjela (REIS et al., 2013), couve-flor (MARCOS-FILHO; KIKUTI, 2008; KIKUTI; MARCOS-FILHO; KIKUTI; LIMA, 2009), cenoura (NASCIMENTO et al., 2009), cebola (SINGH et al., 2014), pepino (LIMA; MARCOS-FILHO, 2010), tomate (AMOOAGHAIE; NIKZAD; SHAREGHI, 2010; ASGHARIPOUR; RAFIEI, 2011) e quiabo (PANDITA et al., 2010; RAI; BASU, 2014), tornando-se consistentemente fundamental para a maioria das empresas de sementes.

A técnica de condicionamento consiste na hidratação controlada das sementes, permitindo ativação de eventos metabólicos essenciais à germinação, porém, impedindo a emissão da raiz primária, ou a conclusão do processo germinativo; deste modo, sementes condicionadas podem originar plântulas precoces e uniformes em campo (JOSÉ et al., 1999; KIKUTI; KIKUTI; MINAMI, 2005; BHANUPRAKASH et al., 2008; GHASSEMI-GOLEZANI et al., 2008; YARI; AGHAALIKANI; KHAZAEI, 2010; BHARGAVA et al., 2015).

O condicionamento fisiológico tem como base os estádios I e II do processo de absorção de água pelas sementes. Durante a germinação, a absorção de água ocorre em três estádios (BEWLEY; BLACK, 1994; VARIER; VARI; DADLANI, 2010): no estádio I ocorre uma rápida absorção de água devido ao baixo potencial hídrico das sementes; nesta fase, há um aumento acentuado na atividade respiratória das sementes, início da digestão de reservas, liberação de energia para a germinação,

síntese de proteínas utilizando mRNA e DNA existentes, ativação de enzimas e reparo de mitocôndrias.

O estágio II é caracterizado pela lenta absorção de água e redução na intensidade de respiração; há digestão de reservas e a sua translocação e assimilação, para que as sementes componentes do lote, alcancem estado metabólico relativamente uniforme quando o acesso à água é interrompido (MARCOS-FILHO, 2005), há também síntese de proteínas pela tradução de novos mRNA e síntese de novas mitocôndrias. No estágio III, ocorre novamente uma rápida absorção de água, e o processo germinativo é completado pela emissão da raiz primária. Para que o condicionamento fisiológico de sementes seja bem sucedido, os estádios I e II devem ser monitorados minuciosamente, permitindo avanços metabólicos sem que as sementes se tornem intolerantes à desidratação, ou seja, alcancem o estágio III do processo de absorção de água.

Diversos tipos de procedimentos têm sido desenvolvidos e aprimorados para o condicionamento fisiológico de sementes, incluindo o osmocondicionamento, matricondicionamento, biocondicionamento e o hidrocondicionamento. No osmocondicionamento, a absorção de água é controlada por meios osmóticos utilizando polietilenoglicol (PEG) ou manitol (ARIF et al., 2014; PAPASTYLIANOU; KARAMANOS, 2012). Para o matricondicionamento são utilizadas matrizes sólidas, como vermiculita ou terra de diatomácea (PILL; KILIAN, 2000; SRINIVASAN et al., 2009; PANDITA et al. 2010; SINGH et al., 2014). No biocondicionamento, o tratamento das sementes é feito pela combinação da hidratação das sementes e a inoculação de organismos benéficos, como fungos e bactérias (ENTESARI et al., 2013; RAI; BASU, 2014).

O hidrocondicionamento consiste na adição lenta de água às sementes até que estas alcancem um conteúdo de água específico (ELKOCA et al., 2007; LI et al., 2011). No condicionamento em tambor, por exemplo, o fornecimento de água é controlado por meios físicos, limitando a quantidade de água fornecida à semente por meio de uma válvula solenóide. A água é distribuída uniformemente em toda a massa de sementes, de maneira gradual (hidratação em vários ciclos) utilizando volumes de água pré-determinados (WARREN; BENNETT, 1997; CASEIRO; BENNETT; MARCOS-FILHO, 2004).

O condicionamento em tambor foi patenteado por Rowse (1991), e é um dos métodos mais utilizados para o tratamento comercial de sementes (ROWSE, 1996;

CASEIRO; BENNETT; MARCOS-FILHO, 2004; BENNETT; WHIPPS, 2008), pois permite o condicionamento de maior quantidade de sementes, facilitando o tratamento em larga escala. É um método rápido, preciso e de baixo custo operacional, tendo sido utilizado com êxito em várias espécies, como tomate, alface e beterraba, e é amplamente empregado na produção comercial de sementes de alho-porro e cebola na Grã-Bretanha (BREWSTER, 2008).

A duração do tratamento de condicionamento fisiológico depende das características particulares de absorção de água do lote de sementes, espécie e cultivar, bem como o grau de umidade final desejado. Após o tratamento, é recomendável realizar a secagem das sementes, até que estas atinjam o teor de água inicial, uma vez que alto teor de água é reconhecido por acelerar a taxa de deterioração das sementes durante o armazenamento (ABBA; LOVATO, 1999).

O condicionamento fisiológico, em geral, pode favorecer eventos bioquímicos importantes para a germinação das sementes, dentre eles a divisão ativa de células durante o crescimento de plântulas (WATERWORTH et al., 2011), reparação e replicação do DNA, que são altamente afetados durante o processo de desidratação das sementes, e comprometem a síntese de enzimas essenciais ao processo germinativo (ASHRAF; BRAY, 1993; SLIWINSKA; BASSEL; BEWLEY, 2009; CHEN; ARORA, 2013).

A atividade de enzimas antioxidantes removedoras de espécies reativas de oxigênio – EROs também é favorecida pelo condicionamento (DEARMAN; BROCKLEHURST; DREW, 2008; FAROOQ et al, 2009). As EROs provocam a peroxidação de lipídios, tida como a principal causa da perda de integridade de membranas, e da deterioração das sementes (McDONALD, 1999; AL-MASKRI et al, 2003). EROs também causam modificações oxidativas de proteínas (TERSKIKH et al, 2008), inativando enzimas hidrolíticas, dentre outras (RAHMAN et al., 2013). Com o sistema enzimático comprometido, as reservas armazenadas não são hidrolisadas e, conseqüentemente, a síntese de ATP é prejudicada, provocando retardamento no desenvolvimento do embrião (McDONALD, 1999).

Atualmente, visando aprimoramento e ampliação dos efeitos alcançados pela técnica de condicionamento fisiológico, tem se verificado, ainda, sua potencialidade associada ao emprego de biorreguladores. Biorreguladores são substâncias sintetizadas com ação similar a dos hormônios vegetais, modulando e regulando o crescimento de sementes e plantas (VIEIRA; CASTRO, 2001). A mistura de diversas

substâncias (biorreguladores, aminoácidos, nutrientes, vitaminas, etc.) e, ou microorganismos que induzem o crescimento de órgãos vegetais é designado de bioestimulante (CASTRO; VIEIRA, 2001; CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014).

Tem sido relatado que o tratamento de sementes com estas substâncias, pode induzir uma série de alterações endógenas em sementes, capazes de favorecer o desenvolvimento vegetal de hortaliças economicamente importantes, como tomate (WANG; JIANG; YU, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2010), pepino (YU et al., 2004), salsa (PILL; KILIAN, 2000), pimentão (ALBUQUERQUE et al., 2009), escarola e chicória (TZORTZAKIS, 2009), além de espécies de grandes culturas, como arroz (WU et al., 2008), amendoim, sorgo, trigo (CATO, 2006) e feijão (ALLEONI; BOSQUEIRO; ROSSI, 2000).

Dentre os biorreguladores mais estudados, destacam-se o 24-EpiBL (FRIDMAN; SAVALDI-GOLDSTEIN, 2013) e o GA₃ (EISVAND et al., 2010), e dentre os bioestimulantes, o produto comercial contendo a mistura de 0,009 % de cinetina (CIN), 0,005 % de GA₃ e 0,005 % de ácido indolbutírico (AIB), denominado de Stimulate® (STOLLER DO BRASIL, 1998).

O 24-EpiBL é um brassinosteróide (BR), um grupo de regulador vegetal reconhecido por apresentar efeitos positivos sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de diversas espécies, tais como *Arabidopsis* (CHOE et al., 2000; TANAKA et al., 2003; DIVI; KRISHNA, 2010), ervilha (NOMURA et al., 2007) e pepino (JIANG et al., 2012), pois de acordo com vários autores, os BRs estão ativamente envolvidos nesses processos (FRIDMAN; SAVALDI-GOLDSTEIN, 2013).

Em estudos realizados por Fukuta et al. (2006), mutantes de feijão apresentaram incremento no tamanho das sementes após aplicação de BRs na superfície de vagens em início de formação, demonstrando um possível papel desse biorregulador na regulação do tamanho das sementes; observações semelhantes foram feitas por Jiang et al. (2013) em sementes de *Arabidopsis*. Nagata, Asami e Yoshida (2001) estudando a vascularização de hipocótilos de agrião, verificaram efeito promotor de BRs sobre o processo de diferenciação.

Mutantes de *Arabidopsis* deficientes em BRs apresentaram velocidade de germinação inferior às sementes do tipo selvagem (CHOE et al., 2000). Já em mutantes de ervilha, também deficientes em BRs, houve supressão no crescimento das plântulas (NOMURA et al., 2004). Nomura et al. (2007), ao estudarem as várias fases da maturação de sementes de ervilha, demonstraram picos máximos de BRs

em fases de crescimento rápido das sementes e redução drástica em sementes totalmente expandidas. Yusuf, Fariduddin e Ahmad (2012) observaram benefícios no crescimento de plântulas de feijão-mungo após o condicionamento com BRs, e neutralização de efeitos prejudiciais causados pelo estresse por níquel.

O condicionamento de sementes com BRs, ainda, tem sido relatado por suprimir os efeitos negativos de estresses abióticos provocados por poluentes orgânicos (AHAMMED et al., 2012a; AHAMMED et al., 2012b). Em tomate contaminado com bifenilpoliclorado, composto pertence à classe de poluentes orgânicos persistentes, a aplicação de 24-EpBL reduziu significativamente a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malondialdeído (MDA) (AHAMMED et al., 2013). A alta concentração de H_2O_2 na célula ocasiona a peroxidação de lipídios, e o MDA é o produto final da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados decorrentes da peroxidação de lipídios (LYKKESFELDT, 2007; SCHWEMBER; BRADFORD, 2010).

Os BRs são reconhecidos também por mediar a indução de genes que codificam importantes enzimas antioxidantes do sistema de defesa contra EROs (KUMAR et al., 2010; CUI et al., 2011; SCHWITZGUÉBEL et al., 2011), o que tem conferido maior tolerância às sementes a condições de estresse, como altas ou baixas temperaturas, umidade, seca, salinidade, metais pesados e ataque de patógenos (HNILICKA et al., 2007; ZHANG et al., 2007; SHARMA; BHARDWAJ, 2007; BAJGUZ; HAYAT, 2009; HNILICKA et al., 2009; DIVI; KRISHNA, 2010; RADY, 2011; PRADHAN; GUPTA; KUMAR, 2013; AGAMI, 2013; AHAMMED et al., 2013; ZHANG et al., 2014; WU et al., 2014).

Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), que atuam na degradação de EROs gerados continuamente durante a dessecação, armazenamento e germinação de sementes, reduzindo a deterioração, associada à perda de vigor e viabilidade das sementes (EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2011; PERGO; ISHII-IWAMOTO, 2011).

A SOD pode ser mitocondrial ou citosólica, e representa a enzima de primeira linha de defesa contra as EROs, pois ela reage sobre o radical superóxido (O_2^-) convertendo-o em oxigênio (O_2) e H_2O_2 (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992; SCANDALIOS, 1993; APEL; HIRT, 2004). O H_2O_2 , por sua vez, é tóxico em altas concentrações, sendo convertido em água e oxigênio pela atividade antioxidante da CAT nos peroxissomos, e pela POX a nível citozóico (ASHRAF, 2009). Os radicais

O_2^- e H_2O_2 podem conduzir a formação do radical hidroxila ($OH^\cdot$) pelas reações de Haber-Weiss e Fenton, que é a forma mais agressiva dos derivados oxigenados (BAILLY, 2004). Assim, o balanço entre as atividades de SOD, CAT e POX é crucial, uma vez que o $OH^\cdot$ não é eliminado por via enzimática.

Estresses bióticos ou abióticos, normalmente, podem levar a excesso na concentração de EROs, e sob essas circunstâncias a capacidade antioxidante de enzimas pode não ser suficientemente eficiente para completar a desintoxicação gerada por esses fatores (VAN AKEN; CORREA; SCHNOOR, 2009). Contudo, o tratamento com 24-EpiBL, parece favorecer a desintoxicação de células e o crescimento de plântulas. Ali et al. (2008) constataram indução na atividade antioxidante de enzimas em plântulas de *Brassica juncea* com 24-EpiBL sob estresse salino, de modo que o crescimento das plântulas foi semelhante às plântulas produzidas sob condições ambientais favoráveis.

O 24-EpiBL também melhorou o potencial antioxidante de enzimas em rabanete, reduzindo efeitos tóxicos provocados por cromo (VI) e favorecendo o crescimento das plântulas, de modo que estas também atingiram crescimento semelhante à testemunha (CHOUDHARY et al., 2011). Papel ativo de 24-EpiBL na atividade de enzimas antioxidantes e desintoxicação de células também foi apoiado por observações realizadas por Ahammed et al. (2012a) em estudos com tomate.

A eficiência de mecanismos antioxidantes de defesa contra EROs é fundamental na manutenção da viabilidade e vigor das sementes. Durante a secagem, por exemplo, as EROs são uma das principais causas da deterioração (SMIRNOFF, 1993; KRANNER et al., 2002). A maior parte das macromoléculas presentes na célula, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos podem ser oxidados por EROs, resultando na ruptura da célula e afetando fortemente o metabolismo normal da semente (CHEN; FESSEHAIE; ARORA, 2012). As EROs são, ainda, as principais causadoras de danos ao DNA durante a germinação e armazenamento de sementes (WEST, 2010).

Tem sido citado, também, que o tratamento com BRs pode melhorar o fluxo de fotoassimilados e o acúmulo de amido em sementes de arroz (WU et al., 2008). Hayat e Ahmad (2003) também verificaram aumentos na produção de α -amilase, açúcares solúveis e proteínas em sementes de trigo, o que culminou com o surgimento precoce da raiz primária.

Em sementes de feijão, o condicionamento com BRs refletiu em uma série de mudanças bioquímicas e fisiológicas, como reforço na atividade da anidrase carbônica e nitrato redutase, no teor de clorofila, taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática, eficiência de carboxilação, massa seca e número de vagens (FARIDUDDIN et al., 2008). Em soja, colza e trigo, mudanças bioquímicas foram constatadas no incremento dos teores de vitamina A (β -caroteno), vitamina E (tocoferóis), bem como alterações nos teores de lipídios (fitoesteróis e ácidos graxos) (JANECZKO; BIESAGA-KOSCIELNIAK; DZIURKA, 2009).

Várias pesquisas também têm relatado sobre os efeitos positivos do condicionamento fisiológico associado ao GA_3 sobre o desempenho de sementes, principalmente no tocante à germinação, devido à maior atividade de enzimas hidrolíticas que atuam no desdobramento de substâncias de reserva (LUO; XIE; LUO, 2012), e também à atividade de enzimas antioxidantes, conforme observado em alface por Mahmoudi et al. (2012) e em trigo por Eisvand et al. (2010).

Em sementes de pimentão, Albuquerque et al. (2009) verificaram aumentos na velocidade de germinação após o condicionamento das sementes com GA_3 . Em sementes de escarola e chicória, Tzortzakis (2009) relatou efeitos benéficos sobre a taxa de germinação, velocidade de emergência e desenvolvimento de plântulas. Parâmetros de crescimento de embriões de banana também foram melhorados após condicionamento com GA_3 (ARUN et al., 2013).

Para o condicionamento fisiológico com Stimulate[®], a combinação condicionamento + bioestimulante tem apresentado resultados benéficos particularmente sobre a quebra de dormência de sementes e incremento no crescimento radicular de plantas (CASTRO; GONÇALVES; DEMÉTRIO, 1985). A combinação de CIN, GA_3 , AIB, contidos nesse produto comercial, desempenha importante papel na regulação da germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, com respostas fisiológicas específicas em função da espécie, genótipo e lote de sementes.

Em alface, o tratamento de sementes com Stimulate[®] beneficiou a percentagem de germinação das sementes (DINIZ, 2005). Em tomate, verificou-se maior velocidade de emergência de plântulas (ALBUQUERQUE et al., 2010). Em canafístula, os efeitos positivos foram constatados sobre a percentagem e velocidade de germinação das sementes (CANESIN et al., 2012), e em soja

(SANTOS, 2009) e jenipapo (PRADO-NETO et al., 2007) houve maior crescimento radicular de plântulas.

Os biorreguladores CIN, GA₃, AIB, são essenciais para a comunicação entre células e tecidos das sementes durante a germinação, com respostas fisiológicas dependentes ou não da interação entre eles (KUCERA; COHN; LEUBNERMETZGER, 2005; VEGVARI; VIDEKI, 2014). O GA₃, por exemplo, está envolvido na transcrição genética e atividade de hidrolases; a CIN na tradução genética, crescimento e diferenciação celular, e o AIB na permeabilidade de membranas, alongamento celular e iniciação radicular (JAN; AMEN, 1977), com pico de AIB observado durante o processo de embebição das sementes para permitir a expansão da célula, e também antes do início do crescimento radicular das plântulas (LJUNG et al., 2001; KUCERA; COHN; LEUBNERMETZGER, 2005).

Particularmente em sementes de pimentão, apesar do AIB estimular o alongamento celular e iniciação radicular, a complexidade estrutural da parede celular do endosperma micropilar das sementes, constituída por camadas espessas, pode oferecer resistência mecânica ao crescimento do eixo embrionário (WATKINS; CANTLIFFE, 1983; CHEN; NONOGAKI; BRADFORD, 2002). Portanto, a participação do GA₃ também é importante por promover o enfraquecimento desses tecidos circundantes à radícula, ativando várias hidrolases da parede celular e permitindo a protrusão da raiz primária (BRADFORD et al., 2000; YAMAGUCHI; KAMIYA; SUN, 2001), havendo, porém, a participação de BRs também nesse processo (LEUBNER-METZGER, 2003). De acordo com Kucera, Cohn e Leubnermetzger (2005), de modo similar ao GA₃, BRs atuam na transcrição genética e atividade de hidrolases, porém sob mecanismos e vias de transdução de sinais diferentes do GA₃.

A disponibilidade de técnicas eficientes para avaliação do vigor das sementes durante o condicionamento fisiológico, constitui aspecto fundamental na verificação dos reais efeitos proporcionados por este tratamento. Dentre as técnicas existentes, o sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas (*Seed vigor imaging system* - SVIS[®]), pode fornecer resultados consistentes e reproduzíveis sobre o desempenho das sementes (BRANCALION et al., 2010; DIAS; MONDO; CICERO, 2014). O SVIS[®] foi desenvolvido pela The Ohio State University, em Columbus, Ohio, Estados Unidos (SAKO et al., 2001).

Este sistema permite a obtenção de informações refinadas sobre o potencial fisiológico de sementes, mediante análises digitais do crescimento de plântulas, fornecendo informações precisas sobre o índice de vigor, uniformidade de desenvolvimento e comprimento de plântulas, conforme verificado para alface (KIKUTI; MARCOS-FILHO, 2012), quiabo (KIKUTI; MARCOS-FILHO, 2013), berinjela (SILVA; CICERO, 2014a), tomate (SILVA; CICERO, 2014b), e outras culturas como melão (MARCOS-FILHO et al., 2006), algodão (XU; FUJIMURA; McDONALD, 2007) e soja (MARCOS-FILHO; KIKUTI; LIMA, 2009).

Marcadores bioquímicos baseados em eletroforese de isoenzimas, também podem ser utilizados no monitoramento de aspectos associados ao vigor das sementes durante o condicionamento fisiológico. As isoenzimas referem-se a um grupo de enzimas com múltiplas formas moleculares de uma mesma enzima, como resultado da codificação de mais de um gene, porém apresentando a mesma especificidade por substrato (MARKET; MOLLER, 1959).

Dentre as isoenzimas mais estudadas, destacam-se as removedoras de EROs, como a SOD, CAT e POX. Outras isoenzimas incluem aquelas envolvidas no processo de respiração, como a malato desidrogenase (MDH), e as que possuem funções específicas no metabolismo de lipídios, como as esterases (EST) (CARVALHO; VIEIRA; PINHO, 2000). A MDH é uma enzima crucial do metabolismo respiratório das sementes, pois ela catalisa a conversão do malato à oxaloacetato, apresentando, portanto, importante função no ciclo de Krebs durante a germinação, além de participar do movimento do malato através da membrana mitocondrial e de outros compartimentos celulares (SPINOLA; CICERO; MELO, 2000). Sementes condicionadas podem apresentar maior atividade de MDH durante a germinação, conforme observado por Pandita et al. (2010) em sementes de quiabo. Esses autores observaram picos de atividade de MDH de 3 a 4 vezes maiores em sementes condicionadas em relação às não tratadas. Maior atividade de MDH pode favorecer a emergência precoce de plântulas, conforme constatado em sementes de abóbora (LIN; SUNG, 2001) e pimenta (PANDITA; ANAND; NAGARAJAN, 2007).

A isoenzima EST, envolvida em reações de hidrólises de ésteres, está diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, liberando ácidos graxos que são utilizados como fonte de energia durante os eventos germinativos (SCANDÁLIOS, 1969). De acordo com observações realizadas por Hameed et al. (2013), esta

enzima também pode ser ativada durante o condicionamento fisiológico, induzindo maior mobilização de reservas para a conclusão do processo germinativo.

O desenvolvimento dessas novas técnicas para elucidação dos efeitos proporcionados pelo condicionamento fisiológico de sementes, tem contribuído na tomada de decisões seguras nos sistemas produtivos, por fornecer subsídios que atendem a demanda do conhecimento. Porém, em sementes de pimentão, estudos ainda precisam ser realizados para o aprimoramento das técnicas empregadas, pois informações ainda são limitadas.

2.2 Material e métodos

Esta pesquisa foi conduzida nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal, em casa de vegetação do Departamento de Ciências Biológicas e no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética, pertencentes à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP/ESALQ), em Piracicaba, SP, e no Department of Horticulture and Crop Science, da The Ohio State University, Columbus, OH, Estados Unidos.

Foram utilizadas sementes híbridas de dois cultivares de pimentão, identificados como AF-6 e AF-7, representados respectivamente por três e quatro lotes de sementes, tratados com o fungicida Thiram a 2% .

O trabalho foi dividido em três etapas: 1) avaliação do potencial fisiológico inicial das sementes, marcha de absorção de água e estudo do período de secagem de sementes condicionadas; 2) comparação do condicionamento fisiológico de sementes utilizando diferentes biorreguladores; 3) condicionamento fisiológico de sementes com o tratamento considerado promissor nas etapas anteriores: avaliação do crescimento radicular de plantas, condicionamento em tambor e armazenamento de sementes.

2.2.1 Avaliação do potencial fisiológico inicial das sementes

Foi realizada por meio de testes de germinação e vigor (primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl), análises computadorizadas de imagens de plântulas e peroxidação lipídica. Os procedimentos utilizados para a condução de cada teste estão descritos a seguir.

2.2.1.1 Teor de água

Determinado pelo método de estufa, a 105 ± 3 °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem (base úmida) para cada lote e cultivar.

2.2.1.2 Germinação

Quatro repetições de 50 sementes foram distribuídas sobre papel mata-borrão, previamente umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, colocado no interior de caixas de plástico transparentes (11 x 11 x 3,5 cm). As caixas foram envoltas em sacos de plástico para prevenir a perda de água e mantidas sob temperatura alternada 20-30 °C e fotoperíodo de oito horas (em conjunto com a temperatura mais alta). As avaliações foram realizadas aos 14 dias após a semeadura e, os resultados, expressos em percentagem de plântulas normais para cada lote e cultivar (BRASIL, 2009).

2.2.1.3 Primeira contagem de germinação

Constou da determinação da percentagem de plântulas normais aos sete dias após a semeadura do teste de germinação.

2.2.1.4 Envelhecimento acelerado com solução saturada de sal - EASS

Foram utilizados 2,0 g de sementes por lote, distribuídas em camada única sobre tela de aço inox posicionada na superfície superior de caixa de plástico transparente (11 x 11 x 3,5 cm), contendo 40 mL de solução saturada de NaCl (40 g/100 mL de água), estabelecendo ambiente com aproximadamente 76% de umidade relativa do ar (JIANHUA; McDONALD, 1996). As caixas foram tampadas e mantidas a 41 °C durante 48 horas (PANOBIANCO; MARCOS-FILHO, 1998; GAGLIARDI, 2009). Decorrido esse período, quatro repetições de 50 sementes por lote foram colocadas para germinar. As avaliações foram realizadas aos 10 dias após a semeadura e, os resultados, expressos em percentagem de plântulas normais para cada lote e cultivar.

2.2.1.5 Análise computadorizada de análise de imagens de plântulas - SVIS[®]

Foi realizada com quatro repetições de 25 sementes por lote. As sementes foram distribuídas sobre duas fileiras horizontais situadas no terço superior da

superfície de papéis toalha previamente umedecidos. Em seguida foram formados rolos, posteriormente transferidos para câmara de germinação regulada a 25 °C e mantidos durante seis dias. Após esses períodos, as plântulas foram ordenadas sobre uma folha de cartolina preta, disposta sobre a superfície de uma caixa de alumínio (60 x 50 x 12 cm), contendo em seu interior um *scanner* HP Scanjet 2004, montado de maneira invertida e operado por *software* Photosmart, com resolução de 98 dpi. As imagens das plântulas foram digitalizadas e, em seguida, analisadas pelo *software* SVIS[®], sendo computados dados referentes ao índice de vigor, comprimento e uniformidade de desenvolvimento das plântulas (Figura 1).

O índice de vigor foi gerado pela combinação dos parâmetros de crescimento (70% de contribuição) e uniformidade de plântulas (30% de contribuição), ambos baseados no comprimento máximo estimado de plântulas de pimentão aos seis dias após a semeadura. Os valores de índice de vigor e de uniformidade de desenvolvimento de plântulas podem variar entre 0 a 1000, e são diretamente proporcionais ao vigor. Os resultados foram expressos pelos valores médios obtidos para cada lote de sementes e cultivar.

Figura 1 – Imagens analisadas de uma amostra de plântulas de pimentão a partir de marcações no eixo hipocótilo/raiz (em vermelho), gerando dados de índice de vigor, comprimento e uniformidade de desenvolvimento de plântulas

2.2.1.6 Peroxidação lipídica

A análise da peroxidação lipídica informa o nível de deterioração oxidativa de lipídios de membranas por meio da estimativa de subprodutos tóxicos que são formados durante o processo, como o malondialdeído (MDA). Na peroxidação lipídica ocorre o rompimento da estrutura fosfolipídica da membrana celular devido à ação de radicais livres que agem sobre os ácidos graxos poliinsaturados, prejudicando deste modo, a capacidade seletiva das membranas da semente, e consequentemente o seu vigor (McDONALD, 1999).

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo conteúdo de substâncias reativas com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), expresso na forma de malondialdeído (MDA), obtido por espectrofotometria a 535 e 600 nm, adaptado de Heath e Packer (1968). Foram macerados 200 mg de sementes em nitrogênio líquido até a textura de pó fino e homogeneizados em 2 mL de uma solução 0,1% TCA. O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, 250 µL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL da solução contendo 20% TCA + 0,5% TBA e a mistura foi aquecida em banho seco a 95 °C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos, protegidas da luz. As leituras foram realizadas a 535 e 600 nm, e a concentração de MDA em nmol/g massa fresca foi calculada utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹.

2.2.2 Marcha de absorção de água pelas sementes

Todos os lotes de sementes pertencentes a ambos os cultivares, foram submetidos a avaliações preliminares para determinação da marcha de absorção de água e identificação do grau de umidade necessário para que estas alcançassem o estágio III de hidratação (BEWLEY; BLACK, 1994); isto foi feito para estabelecer o grau de umidade que as sementes deveriam atingir no condicionamento fisiológico, sem permitir a protrusão da raiz primária (CASEIRO; BENNETT; MARCOS-FILHO, 2004). Quatro repetições de 2,0 g de sementes por lote foram distribuídas entre duas camadas de folhas de papel toalha (cada camada composta de três folhas de 10,3 x 10,3 cm), umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. As camadas de papel toalha foram colocadas sobre tela de alumínio, contidas em caixa de plástico transparente (11 x 11 x 3,5 cm), contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas e mantidas em câmara de germinação, a

25 °C. Para calcular a quantidade de água absorvida, as sementes foram pesadas após 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 54 e 60 horas, sendo a pesagem final correspondente ao início da ocorrência da protrusão da raiz primária dos lotes de sementes. Os resultados foram expressos em percentagem de teor de água obtido em cada período de embebição para cada lote e cultivar.

2.2.3 Estudo do período de secagem de sementes condicionadas

Sementes condicionadas dos lotes 1 e 6, provenientes dos cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, foram submetidas a diferentes períodos de secagem, até que atingissem teores de água dentro dos limites estabelecidos para o armazenamento de sementes de pimentão, que situa-se entre 5 e 7% (TOLEDO; MARCOS-FILHO, 1977). Os dois lotes de sementes foram mantidos em estufa regulada a 32 °C, com aproximadamente 30% de umidade relativa do ar (UR), durante 4, 6, 8, 12, 16 18 e 20 horas. Após determinação do período de secagem considerado adequado, foi adotado o mesmo procedimento para os demais lotes. O grau de umidade foi calculado conforme procedimentos estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

2.2.4 Condicionamento com biorreguladores

Para comparação entre as diferentes técnicas de condicionamento, sete tratamentos foram estabelecidos: 1. sementes não condicionadas (controle); 2. sementes condicionadas apenas com água (hidrocondicionamento); 3. sementes condicionadas com Stimulate[®] (10 mL do produto em 100 mL de água destilada); 4. sementes condicionadas com 24-EpiBL na concentração de 10^{-6} M; 5. 10^{-8} M; 6. 10^{-10} M; 7. sementes condicionadas com GA₃ (100 µM) (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Os procedimentos utilizados foram os mesmos prescritos para a marcha de absorção de água; porém, para o condicionamento com Stimulate[®], 24-EpiBL ou GA₃, as duas camadas de folhas de papel toalha foram umedecidas com solução contendo os biorreguladores. Após condicionamento, as sementes foram submetidas a secagem e, em seguida, avaliadas pelos testes de germinação e vigor (primeira contagem de germinação e EASS) e pelo SVIS[®].

Foi determinada, ainda, a atividade das isoenzimas SOD, EST e MDH, de acordo com protocolos a seguir:

2.2.4.1 Atividade enzimática

Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel não desnaturante (PAGE 12%). Após condicionamento, 1,5 g de sementes de cada tratamento foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e em seguida armazenada em freezer -80 °C até o processamento. As amostras foram maceradas em recipiente de porcelana contendo nitrogênio líquido, e posteriormente foi adicionado o tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 3 mM de DL-Ditiotreitol (DTT) (3:1 volume do tampão/peso fresco) permitindo a extração das proteínas. Após esta etapa, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então recolhido e armazenado em alíquotas a -80 °C até o momento das análises. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando o BSA (*“bovine serum albumin”*) como padrão, por espectrofotometria a 595 nm.

Foi utilizado o sistema Mini Protean II da Bio Rad. O gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida, 2,5 mL de tampão TRIS 3 M (hidroximetil)-aminometano (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (1%). Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL de tampão TRIS 500 mM (pH 6,7) e 2,75 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (1%). Em cada faixa do gel foram aplicadas quantidades iguais de proteínas (40 µg de proteínas dos extratos protéicos). A eletroforese foi realizada a 4 °C em corrente constante de 20 mA/placa. O tampão de eletrodo foi TRIS 25 mM (pH 8,3) acrescido de 192 mM de glicina – 5x concentrado, sendo diluído para 1x. A revelação para os sistemas isoenzimáticos de SOD, EST e MDH foi conduzida segundo metodologia de Alfenas (2006). Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

2.2.5 Crescimento radicular de plantas em rizotrons

A avaliação do crescimento radicular das plantas foi realizada em casa de vegetação. As sementes foram distribuídas em rizotrons semicirculares, com altura de 0,59 m e diâmetro de 0,24 m, apresentando uma face plana de vidro com espessura de 4 mm. Os rizotrons foram preenchidos com areia lavada e inclinados

sobre mesas de madeira formando um ângulo de 25 graus com a horizontal. Foram utilizadas quatro repetições de duas plantas para cada lote. Para tanto, em cada rizotron foram distribuídas quatro sementes em contato com a face interna da placa de vidro. Os sistemas foram umedecidos de modo a manterem o substrato próximo à capacidade de campo. Imediatamente após a emissão da raiz primária, foi registrado diariamente o crescimento radicular de duas plântulas por rizotron, com raízes mais uniformes, utilizando canetas de retroprojektor sobre folhas de plástico transparente previamente identificadas e fixadas na face externa da placa de vidro. A partir desses registros determinou-se o crescimento radicular inicial e o comprimento total da raiz principal aos 25 dias após a semeadura.

2.2.6 Condicionamento fisiológico em tambor

Amostras de 10 g de sementes foram utilizadas por lote. A solução foi aplicada a um sistema de injeção de tambor, a partir de volumes pré-determinados, conforme a velocidade de absorção de água de cada lote de sementes e cultivar, a qual foi estabelecida com base em avaliações preliminares da marcha de absorção de água. A solução foi distribuída em parcelas de seis ciclos com duração de quatro horas, totalizando 24 horas de tratamento. Ao final do período total de condicionamento, foi realizada a secagem subsequente das sementes, a 25 °C durante 48 horas, o que conduziu as sementes ao grau de umidade inicial de 7%. Um tratamento de condicionamento em tambor tradicional (embebição apenas em água destilada) também foi instalado. Sementes não tratadas foram utilizadas como controle. As sementes foram avaliadas quanto a germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação – IVG (MAGUIRE, 1962), SVIS[®] e atividade das enzimas SOD (ALFENAS, 2006), CAT (WOODBURY; SPENCER; STAHMANN, 1971) e POX (HAMILL; BREWBAKER, 1969).

2.2.7 Comportamento de sementes armazenadas

Todos os lotes de sementes condicionados, foram submetidos a secagem até atingirem grau de umidade inicial, e em seguida, acondicionados em embalagens impermeáveis (sacos aluminizados) e armazenados em câmara fria a 10 °C. As avaliações foram realizadas a cada três meses, durante 12 meses, mediante testes de germinação e vigor (primeira contagem de germinação e EASS), SVIS[®] e

análises de atividade das enzimas SOD, EST e MDH. Sementes não tratadas foram utilizadas como controle.

2.2.8 Procedimento estatístico

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado separadamente para cada cultivar e teste. Para estabelecimento do tratamento mais adequado para o condicionamento fisiológico, os dados obtidos foram submetidos à análise da variância, em esquema fatorial 7 X n (sete tratamentos: controle, hidrocondicionamento, condicionamento com Stimulate[®], condicionamento com 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ X n lotes de sementes) para cada cultivar. Para o condicionamento fisiológico em tambor, foi utilizado o esquema fatorial 3 X n (três tratamentos: controle, condicionamento em tambor tradicional, condicionamento em tambor com 24-EpiBL a 10^{-8} M (tratamento considerado promissor) X n lotes de sementes) para cada cultivar. O potencial de armazenamento foi analisado por meio da regressão polinomial. Para contraste entre médias foi utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Potencial fisiológico inicial das sementes

Para as sementes do cultivar AF-6 (Tabela 1), o lote 3 apresentou o menor potencial fisiológico inicial, identificado pela primeira contagem de germinação, uniformidade de desenvolvimento de plântulas e peroxidação de lipídios avaliada pelo acúmulo de MDA (Figura 2). Os resultados apontaram maior conteúdo de MDA em lotes de sementes de menor desempenho. Segundo Schwember e Bradford (2010), isto se deve ao maior dano peroxidativo causado nos sistemas de membranas durante o processo de deterioração, culminando com a redução no vigor das sementes.

A variação nos teores de água iniciais entre os três lotes de sementes do cultivar AF-6 foi de 0,3 ponto percentual (7,0 a 7,3%), variação adequada para obtenção de resultados consistentes na execução dos testes (MARCOS-FILHO, 2005). Todos os lotes apresentaram germinação superior ao padrão para comercialização de sementes de pimentão ($\geq 80\%$) (BRASIL, 2005), com

capacidade germinativa semelhante entre os lotes ($p \leq 0,05$), que variou entre 95 e 98%.

Tabela 1 – Teor de água (TA), germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal (EASS), índice de vigor (IV), uniformidade (U) e comprimento de plântulas (CP), de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6

Lotes	TA (%)	G (%)	PC (%)	EASS (%)	IV SVIS®	U SVIS®	CP (cm) SVIS®
1	7,2	98 A	84 A	87 A	420 A	796 AB	6,6 A
2	7,0	95 A	88 A	94 A	426 A	820 A	6,5 A
3	7,3	97 A	75 B	95 A	381 A	746 B	5,7 A
C.V. (%)	-	2,8	4,8	4,7	6,3	6,2	11,7

(*) Comparação de médias dentro de cada coluna (teste de Tukey, $p \leq 0.05$)

Figura 2 – Quantidade de malondialdeído - MDA (nmol/g massa fresca) de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6

Para os lotes de sementes do cultivar AF-7 (Tabela 2), os teores de água iniciais de água também foram uniformes (7,0 a 7,3%), conferindo segurança na execução dos testes. A germinação inicial foi similar e aceitável para a comercialização das sementes, variando entre 86 a 95%. Com relação ao vigor das sementes, apenas a primeira contagem de germinação identificou diferenças no potencial fisiológico dos lotes, apontando o lote 4 de desempenho inferior. Novamente, o acúmulo de MDA (Figura 3) foi inversamente proporcional ao potencial fisiológico dos lotes observado na primeira contagem de germinação.

O maior conteúdo de MDA nas sementes, proveniente da peroxidação de lipídios, conduz ao aumento da desorganização dos sistema de membranas, acarretando em alterações nas reservas armazenadas das sementes (SIMON, 1974). De acordo com Marcos-Filho (2005), a menor integridade dos sistemas de membranas determina em redução na velocidade de germinação das sementes, considerado o primeiro sintoma da perda de desempenho. Assim, a maior peroxidação lipídica observada em sementes do lote 3 (cultivar AF-6) e 4 (cultivar AF-7), pode ter afetado o comportamento das sementes durante a primeira contagem de germinação das sementes.

O exame dos resultados permitiu, portanto, verificar que os lotes de sementes de ambos os cultivares apresentavam diferenças no potencial fisiológico inicial, possibilitando a avaliação dos efeitos do condicionamento fisiológico sobre sementes com diferentes níveis de vigor. O genótipo e o vigor estão entre os principais fatores que podem interferir na obtenção de informações seguras sobre os efeitos desse procedimento (MARCOS-FILHO, 2005).

Tabela 2 – Teor de água (TA), germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), envelhecimento acelerado com solução saturada de sal (EASS), índice de vigor (IV), uniformidade (U) e comprimento de plântulas (CP), de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7

Lotes	TA (%)	G (%)	PC (%)	EASS (%)	IV SVIS®	U SVIS®	CP (cm) SVIS®
4	7,2	95 A	45 B	58 A	356 A	815 A	4,1 A
5	7,0	89 A	68 A	76 A	392 A	827 A	5,2 A
6	7,3	91 A	65 A	60 A	391 A	797 A	5,5 A
7	7,0	86 A	56 AB	62 A	389 A	799 A	5,4 A
C.V. (%)	-	4,3	12,5	13,2	6,1	2,2	14,60

(*) Comparação de médias dentro de cada coluna (teste de Tukey, $p \leq 0.05$)

Figura 3 – Quantidade de malondialdeído - MDA (nmol/g massa fresca) de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7

2.3.2 Marcha de absorção de água pelas sementes

Os três lotes de sementes do cultivar AF-6, apresentaram velocidades de absorção de água semelhantes, com a protrusão da raiz primária ocorrendo a partir de 54 horas de embebição, período em que as sementes apresentavam aproximadamente 52,0% de teor de água (Tabela 3).

Tabela 3 - Teor de água (%) de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, expostos a diferentes períodos de embebição, a 25 °C

Período de embebição (horas)	Lotes		
	1	2	3
2	30,8	33,1	34,3
4	35,8	37,6	39,4
8	43,4	45,0	46,3
12	45,1	45,5	47,4
24	48,0	48,7	49,3
36	50,1	49,8	50,1
48	50,6	49,9	51,1
54	51,5*	50,6*	51,6*

(*) Início da emissão da raiz primária

Em sementes do cultivar AF-7 (Tabela 4), a emissão da raiz primária ocorreu sob teor de água levemente inferior (aproximadamente 49,0%), e sob período de embebição semelhante ao cultivar AF-6 (54 horas), à exceção do lote 4, em que a protrusão da raiz primária ocorreu apenas a partir de 60 horas de embebição. Vale lembrar que o lote 4 apresentou menor potencial fisiológico inicial (Tabela 2), confirmando as observações de Caseiro (2003), que constatou que lotes menos vigorosos tendem a exigir períodos de embebição mais longos para emissão da raiz primária.

Tabela 4 - Teor de água (%) de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, expostos a diferentes períodos de embebição, a 25 °C

Período de embebição	Lotes			
(horas)	4	5	6	7
2	33,2	33,1	34,7	34,2
4	38,5	39,6	40,4	38,2
8	42,0	43,7	43,6	41,9
12	45,1	46,0	46,1	44,4
24	47,0	47,0	47,5	46,3
36	47,1	47,8	47,8	47,2
48	47,4	48,1	48,1	47,8
54	47,5	48,2*	48,3*	47,9*
60	47,7*			

(*) Início da emissão da raiz primária

Portanto, para o condicionamento fisiológico de sementes de pimentão, foi selecionado o teor de água de 49% para os lotes de sementes do cultivar AF-6, e 47% para o cultivar AF-7. A escolha do período de condicionamento com base no teor de água final das sementes é imprescindível, pois as sementes podem apresentar padrão de absorção de água diferenciado, exigindo períodos de embebição diferentes para atingirem a fase III do processo de hidratação (BEWLEY; BLACK, 1994). Nesta fase, correspondente à protrusão da raiz primária, as sementes geralmente tornam-se intolerantes à desidratação, gerando, assim, insucesso na utilização da técnica de condicionamento.

2.3.3 Estudo do período de secagem de sementes condicionadas

As sementes condicionadas do cultivar AF-6, lote 1, submetidas à secagem, apresentavam em média 47,5% de teor de água. Após a secagem, atingiram média de 7,1 a 5,0% durante os períodos de 4 a 20 horas, respectivamente (Figura 4). Comportamento semelhante foi observado para as sementes do cultivar AF-7, lote 6, as quais atingiram em torno de 47,6% de teor de água no condicionamento e valores entre 7,7 e 5,3% após os períodos de secagem estudados (Figura 5).

Deste modo, os períodos de 6, 8, 12, 16, 18 e 20 horas de secagem permitiram que as sementes, de ambos cultivares, atingissem os teores de água mais favoráveis para o armazenamento posterior das sementes, que deve situar-se entre 5 e 7% (TOLEDO; MARCOS-FILHO, 1977).

O período de seis horas de secagem, foi então, empregado para os demais lotes de sementes (Tabela 5), e conferiu variação de apenas 0,4 ponto percentual entre os teores de água finais dos lotes do cultivar AF-6 e de 0,8 ponto percentual entre os do cultivar AF-7.

Para o armazenamento, é fundamental que as sementes apresentem teor de água inferior a um limite máximo, permitindo a preservação do potencial fisiológico. Por este motivo, a secagem prévia das sementes foi realizada após todos os tratamentos de condicionamento fisiológico relatados nessa pesquisa.

Figura 4 – Teores de água (%) de sementes de pimentão, lote 1, cultivar AF-6, após diferentes períodos de secagem, a 32 °C e 30% de UR

Figura 5 – Teores de água (%) de sementes de pimentão, lote 6, cultivar AF-7, após diferentes períodos de secagem, a 32 °C e 30% UR

Tabela 5 – Teor de água (TA) de lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, após seis horas de secagem, a 32 °C e 30% de umidade relativa do ar

Cultivar AF-6		Cultivar AF-7	
Lotes	TA (%)	Lotes	TA (%)
1	6,3	4	6,4
2	6,4	5	6,0
3	6,0	6	6,8
		7	6,5

2.3.4 Condicionamento com biorreguladores

Não foi observado efeito benéfico dos tratamentos sobre a percentagem de germinação das sementes do cultivar AF-6 (Tabela 6). Por outro lado, a velocidade de germinação, obtida mediante a primeira contagem do teste de germinação (Tabela 7), foi favorecida após o condicionamento fisiológico, mas isso ocorreu independente da utilização dos biorreguladores, uma vez que houve resposta semelhante para as sementes hidrocondicionadas.

No envelhecimento acelerado com solução saturada de sal - EASS (Tabela 8), semelhante à primeira contagem de germinação, sementes hidrocondicionadas também apresentaram comportamento similar às sementes condicionadas com os

bioreguladores, mas com efeitos menos expressivos para as sementes condicionadas com Stimulate®.

Tabela 6 – Germinação (%) de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA ₃
1	97 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa
2	95 Aa	96 Aa	99 Aa	97 Aa	98 Aa	99 Aa	94 Ba
3	97 Aa	98 Aa	96 Aa	99 Aa	100 Aa	99 Aa	96 ABA
C.V. (%)				1,8			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 7 – Primeira contagem de germinação (%) de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA ₃
1	83 Ab	97 Aa	96 Aa	99 Aa	98 Aa	98 Aa	99 Aa
2	87 Ab	96 Aa	96 Aa	97 Aa	98 Aa	99 Aa	94 Aa
3	75 Bb	98 Aa	94 Aa	99 Aa	99 Aa	98 Aa	97 Aa
C.V. (%)				2,7			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 8 – Valores médios de plântulas normais provenientes do teste de envelhecimento acelerado com solução saturada de sal - EASS (%) de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA ₃
1	87 Bb	98 Aa	90 Bb	96 Aa	98 Aa	98 Aa	98 Aa
2	94 Aa	98 Aa	97 Aa	97 Aa	96 Aa	96 Aa	96 Aa
3	89 ABb	97 Aa	92 ABb	99 Aa	95 Aa	99 Aa	96 Aa
C.V. (%)	3,3						

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Os efeitos do condicionamento com os diferentes biorreguladores foram melhor constatados a partir das informações geradas pelo sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas - SVIS® (Tabelas 9, 10 e 11): índice de vigor, uniformidade de desenvolvimento e comprimento de plântulas (hipocótilo/raiz).

Para o índice de vigor (Tabela 9), gerado pela combinação dos parâmetros de crescimento e uniformidade de desenvolvimento de plântulas, as sementes condicionadas com 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-10} M, apresentaram os maiores índices. Vale destacar que os efeitos de 24-EpiBL sobre o índice de vigor foram benéficos até mesmo para as sementes do lote 3, identificadas como potencial fisiológico inicial inferior (Tabela 1 e Figura 2).

Para a uniformidade de desenvolvimento das plântulas (Tabela 10), melhor resposta foi verificada para as sementes condicionadas com 24-EpiBL a 10^{-8} M. Com relação ao parâmetro comprimento das plântulas (Tabela 11), destacaram-se os tratamentos com 24-EpiBL a 10^{-8} e a 10^{-10} M, e GA₃.

A melhor resposta das sementes ao 24-EpiBL, pode está relacionado ao fato de que, BRs em paralelo com o GA₃ exercem efeito inibitório sobre o ABA, e sua sinalização é essencial para o sucesso da germinação (ZHANG; CAI; WANG, 2009; XI; YU, 2010; DIVI; KRISHNA, 2010). Leubner-Metzger (2001) relatou também que BRs interagem com GA₃ na indução da atividade da β -1,3-glucanase classe I (β GLU I) na região do endoperma micropilar das sementes, promovendo a ruptura mais precoce do endosperma durante a germinação.

Fridman e Savaldi-Goldstein (2013) também destacaram que o melhor crescimento de plântulas após tratamento com BRs se deve em parte à sua participação no processo de expansão celular. Segundo os autores, BRs apresentam importante influência na atividade de XTH (xiloglucano endotransglicosidase-hidrolase), enzima responsável pelo afrouxamento da parede celular. A XTH age sobre cadeias de xiloglucano (mais importante polissacarídeo da hemicelulose), diminuindo assim, sua resistência e permitindo a expansão da célula (SUN et al., 2005).

Tabela 9 – Índice de vigor - SVIS[®] de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate[®] (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA ₃
1	420 ABd	459 Bcd	495 Ac	490 Ac	572 Aa	578 Aa	542 Ab
2	426 Ab	455 Bb	453 Ab	463 Ab	522 Ba	524 Ba	520 Aa
3	380 Bc	506 Aab	483 Ab	476 Ab	530 ABA	540 ABA	527 Aa
C.V. (%)				5,2			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 10 – Uniformidade de desenvolvimento de plântulas - SVIS[®] de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate[®] (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA ₃
1	795 Ab	763 Ab	796 Ab	779 Ab	827 Aa	774 Ab	766 Ab
2	820 Ab	803 Ab	793 Ab	761 Ab	849 Aa	782 Ab	780 Ab
3	745 Ab	821 Ab	843 Ab	782 Ab	880 Aa	763 Ab	782 Ab
C.V. (%)				4,6			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 11 – Comprimento de plântulas (cm) - SVIS® de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA ₃
1	6,6 Ac	8,3 ABb	9,3 Ab	8,7 Ab	12,2 Aa	12,5 Aa	11,3 Aa
2	6,5 Ab	7,8 Bb	7,8 Bb	7,5 Ab	10,6 Ba	10,4 Ba	10,3 Aa
3	5,7 Ad	9,4 Ab	8,3 ABc	7,6 Ad	10,7 Ba	11,2 ABa	10,6 Aab
C.V. (%)				8,3			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha (p ≤ 0,05)

Em sementes do cultivar AF-7, em geral, o condicionamento com 24-EpiBL para todas as concentrações estudadas, apresentou melhores resultados de germinação (Tabela 12), especialmente na concentração de 10^{-8} M. Sementes do lote 7 condicionadas com 24-EpiBL a 10^{-8} M, por exemplo, apresentaram germinação de 98% (lote 7), contra 86% para sementes não condicionadas, e 87% para sementes condicionadas apenas com água (hidrocondicionamento).

A primeira contagem de germinação (Tabela 13), também apresentou melhor resposta para as sementes condicionadas com 24-EpiBL. Já no EASS (Tabela 14), as diferentes técnicas de condicionamento favoreceram o desempenho das sementes, mas de maneira similar durante este teste.

Na análise computadorizada de imagens de plântulas realizadas pelo SVIS® de lotes de sementes do cultivar AF-7, maiores índices de vigor foram observados após o condicionamento com 24-EpiBL a 10^{-8} e 10^{-10} M, e com GA₃, à exceção apenas do lote 6, onde apenas os tratamentos de 24-EpiBL a 10^{-8} M e de GA₃ se destacaram (Tabela 15).

Para a uniformidade de desenvolvimento das plântulas (Tabela 16), semelhante aos resultados obtidos no cultivar AF-6, sementes condicionadas com 24-EpiBL a 10^{-8} M apresentaram melhor resposta. Maior comprimento de plântulas (Tabela 17), também foi constatado para as sementes condicionadas com 24-EpiBL a 10^{-8} M, porém com desempenho similar ao condicionamento pelo emprego de GA₃.

Portanto, o desenvolvimento de plântulas de pimentão obtidas à partir de sementes condicionadas com 24-EpiBL pode ser superior em relação àquelas submetidas ao mesmo tratamento em ausência do biorregulador.

Além do importante papel de 24-EpiBL na expansão celular, conforme relatado, a atividade desse biorregulador na divisão de células também é reconhecida; em trabalhos realizados por Fatkhutdinova et al. (2002), 24-EpiBL aumentou a taxa de mitoses de células meristemáticas de raízes de plântulas de trigo com efeitos semelhantes aos observados em plântulas tratadas com citocinina. Em *Arabidopsis* os efeitos de 24-EpiBL foram ainda mais marcantes, com capacidade de substituição da citocinina na manutenção da divisão celular (HU et al., 2000). Segundo Fridman e Savaldi-Goldstein (2013), devido sua função relevante no processo de diferenciação, tecidos vegetais jovens, como tecidos embrionários de sementes, são mais responsivos ao tratamento com BRs.

Tabela 12 – Germinação (%) de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA3
4	94 Aab	94 ABab	88 Bb	99 Aa	97 Aa	99 Aa	97 Aa
5	80 Ac	99 Aa	93 ABab	97 Aab	98 Aa	95 Aab	88 Bb
6	90 Aa	97 Aa	93 ABa	98 Aa	97 Aa	93 Aa	96 Aa
7	86 Ab	87 Bb	97 Aa	99 Aa	98 Aa	96 Aa	81 Bb
C.V. (%)				4,5			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 13 – Primeira contagem de germinação (%) de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA3
4	45 Bc	84 ABab	74 Ab	91 Aa	79 Aab	79 Aab	89 Aa
5	68 Ac	90 Aa	84 Ab	82 Ab	89 Aa	88 Aa	61 Bc
6	65 Ab	85 ABa	86 Aa	89 Aa	79 Aa	81 Aa	85 Aa
7	55 ABc	73 Bb	84 Aab	91 Aa	91 Aa	89 Aa	49 Bc
C.V. (%)				8,5			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 14 – Valores médios de plântulas normais provenientes do teste de envelhecimento acelerado com solução saturada de sal - EASS (%) de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA3
4	58 Bb	91 Aa	93 Aa	87 Ba	96 Aa	94 Aa	95 Aa
5	75 Ab	90 Aa	96 Aa	94 ABa	94 Aa	98 Aa	94 Aa
6	59 Bb	89 Aa	94 Aa	96 Aa	94 Aa	92 Aa	94 Aa
7	62 Bb	91 Aa	88 Aa	87 Ba	93 Aa	97 Aa	97 Aa
C.V. (%)				5,4			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 15 – Índice de vigor - SVIS® de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA3
4	355 Ac	420 Aab	437 Aab	397 Bb	446 Ca	452 Ba	464 Ba
5	392 Ac	413 Ac	410 Ac	427 ABb	500 Ba	473 Bab	487 Ba
6	391 Ac	446 Ab	447 Ab	454 Ab	534 ABa	477 Bb	534 Aa
7	389 Ac	438 Ab	418 Ab	434 ABb	557 Aa	545 Aa	551 Aa
C.V. (%)				5,2			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 16 – Uniformidade de desenvolvimento de plântulas - SVIS® de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA3
4	814 Ab	774 Abc	774 Abc	759 Ac	868 Aa	762 Ac	755 Ac
5	827 Ab	768 Ac	741 Ad	791 Abc	860 Aa	781 Abc	740 Ad
6	796 Abc	803 Ab	795 Abc	730 Ad	859 Aa	741 Acd	752 Ac
7	799 Ab	799 Ab	781 Ac	786 Ac	834 Aa	758 Acd	721 Ad
C.V. (%)				4,2			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 17 – Comprimento de plântulas (cm) - SVIS® de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle), hidrocondicionados, condicionados com Stimulate® (10 mL/100 mL de água), 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10} M e GA₃ (100 µM)

LOTES	CONT	HIDRO	STIM	EP10 ⁻⁶	EP10 ⁻⁸	EP10 ⁻¹⁰	GA3
4	4,0 Bc	6,8 Ab	7,4 Aab	4,9 Bc	7,9 Cab	8,0 Bab	8,6 Ba
5	5,2 ABc	6,6 Ab	6,8 Ab	6,1 ABbc	9,4 Ba	8,6 Ba	9,6 Ba
6	5,5 Ad	7,4 Ac	7,5 Ac	7,1 Ac	11,4 Aa	9,2 Bb	11,1 Aa
7	5,4 Ac	7,2 Ab	6,7 Abc	6,6 Abc	11,6 Aa	11,5 Aa	12,1 Aa
C.V. (%)				8,5			

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

2.2.4.1 Atividade enzimática

A análise do padrão enzimático de esterase - EST (Figura 6) no cultivar AF-6, lotes 1, 2 e 3, revelou maior atividade enzimática para o tratamento com 24-EpiBL a 10^{-8} M (lote 3, coluna 5). Este fato foi observado apenas em sementes do lote 3, identificado com menor potencial fisiológico inicial. Um dos sintomas da deterioração das sementes, é a redução na atividade enzimática, devido a ação de radicais livres altamente reativos produzidos pelas reações de peroxidação (CARVALHO, 1994),

havendo assim, menor suprimento de nutrientes e disponibilidade de energia para a semente em germinação (MARCOS-FILHO, 2005). Neste trabalho, contudo, o condicionamento com 24-EpiBL reforçou a atividade da enzima EST de sementes de menor potencial, corroborando com Mitchell e Gregory (1972), que afirmou que tratamentos com BRs podem intensificar a atividade de enzimas que hidrolisam substâncias de reservas. A EST catalisa a hidrólise de vários tipos de ésteres, desempenhando papel chave no metabolismo de lipídios e no fornecimento de energia (SUBRAMANI et al., 2011).

Em sementes do cultivar AF-7, lotes 4, 5, 6 e 7, não foram verificadas mudanças na atividade desta enzima, independentemente do tipo de condicionamento e lote de sementes, tendo a intensidade das bandas durante a corrida eletroforéticas sido semelhantes entre os tratamentos.

Figura 6 – Padrão enzimático de esterase - EST após PAGE não desnaturante de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente. 1. sementes não condicionadas; 2. sementes hidrocondicionadas; 3. sementes condicionadas com Stimulate®; 4. sementes condicionadas com 24-EpiBL na concentração de 10^{-6} ; 5. 10^{-8} ; 6. 10^{-10} M; 7. sementes condicionadas com GA_3 . As setas indicam maior atividade enzimática

Não foram constatadas alterações nos padrões isoenzimáticos de malato desidrogenase - MDH, das sementes submetidas aos diferentes tratamentos (Figura 7), onde a intensidade das bandas foi semelhante entre os tratamentos; não houve portanto, influência das diversas técnicas sobre a atividade desta enzima. Possivelmente, os lotes de sementes não apresentavam nível de deterioração suficientemente avançado para afetar a atividade de MDH, uma vez que maior deterioração representa menor atividade enzimática.

De acordo com Marcos-Filho (2005), a redução na atividade de MDH causa sérios prejuízos à respiração, pois esta enzima desempenha papel essencial no ciclo de Krebs, catalisando a conversão do malato à oxaloacetato, participando de reações fundamentais na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais para o funcionamento das células. Como consequência da menor atividade de MDH, ocorre comprometimento de mobilização de reservas e o metabolismo de síntese, com decréscimo na síntese de polissacarídeos, lipídios, proteínas, e ácidos nucleicos.

Figura 7 – Padrão enzimático de malato desidrogenase - MDH após PAGE não desnaturante de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente. 1. sementes não condicionadas; 2. sementes hidrocondicionadas; 3. sementes condicionadas com Stimulate®; 4. sementes condicionadas com 24-EpiBL na concentração de 10^{-6} ; 5. 10^{-8} ; 6. 10^{-10} M; 7. sementes condicionadas com GA_3 . As setas indicam maior atividade enzimática

Para a enzima antioxidante superóxido dismutase - SOD (Figura 8), o condicionamento com 24-EpiBL a 10^{-8} M (coluna 5) promoveu aumento na atividade enzimática de todos os lotes de sementes do cultivar AF-6, identificado pela maior intensidade das bandas neste tratamento, demonstrando, assim, possível papel regulador de 24-EpiBL na atividade de SOD. Para os lotes do cultivar AF-7, maior atividade de SOD foi verificada apenas para sementes do lote 5, condicionadas com 24-EpiBL nas concentrações de 10^{-6} (coluna 4) e 10^{-8} M (coluna 5).

Figura 8 – Padrão enzimático de superóxido dismutase - SOD após PAGE não desnaturante de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente. 1. sementes não condicionadas; 2. sementes hidrocondicionadas; 3. sementes condicionadas com Stimulate®; 4. sementes condicionadas com 24-EpiBL na concentração de 10^{-6} ; 5. 10^{-8} ; 6. 10^{-10} M; 7. sementes condicionadas com GA₃. As setas indicam maior atividade enzimática

Maior atividade antioxidante enzimática, é fundamental no processo de germinação e desenvolvimento do eixo embrionário, pois permite a eliminação de óxidos e peróxidos tóxicos, que provocam lesões químicas na célula. A concentração de óxidos e peróxidos é diretamente proporcional à taxa de respiração das sementes, pois a cadeia respiratória mitocondrial é uma das principais fontes de

EROs (NOCTOR; DE PAEPE; FOYER, 2007); vazamentos de elétrons de cadeia de transporte geram O_2^- (óxido) e, posteriormente H_2O_2 (peróxido) por dismutação do O_2 .

Uma vez que a germinação está fortemente associada com o aumento da atividade respiratória, a produção de EROs aumenta continuamente durante este processo, provocando danos em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (BECKMAN; AMES, 1997; BRAY; WEST, 2005). Em consequência, ocorre o comprometimento do código genético do embrião e de compostos essenciais de armazenamento para a conclusão da germinação (KRANNER; COLVILLE, 2011). Portanto, sementes com atividade de desintoxicação mais elevada, tendem a favorecer o desenvolvimento do eixo embrionário, permitindo o estabelecimento mais rápido de plântulas (BAILLY, 2004).

Segundo observações de Bailly et al. (2002); Chen e Arora (2011), a protrusão da raiz primária ocorre no momento em que o conteúdo de EROs atinge um nível estacionário, deste modo, a eficiente atividade antioxidante de enzimas é imprescindível para o sucesso da germinação.

O condicionamento com o biorregulador 24-EpiBL na concentração intermediária (10^{-8} M), foi portanto, identificado por afetar mais expressivamente o desempenho fisiológico das sementes de pimentão, com benefícios constatados especialmente em relação ao índice de vigor, comprimento, uniformidade de desenvolvimento das plântulas e atividade da enzima antioxidante SOD e da enzima hidrolítica EST. Assim, procurou-se investigar, deste modo, possíveis interferências deste tratamento sobre o crescimento radicular de plantas, testar sua eficiência na aplicação a um sistema de condicionamento comercial (condicionamento em tambor), e avaliar o comportamento das sementes durante o armazenamento, aspecto essencial para a comercialização das sementes.

2.3.5 Crescimento radicular de plantas em rizotrons

Nesta etapa, os efeitos do condicionamento com 24-EpiBL a 10^{-8} M foram verificados comparando-se plantas provenientes de sementes tratadas e não tratadas. Raízes provenientes de sementes condicionadas com 24-EpiBL, apresentaram-se visualmente mais vigorosas em relação ao controle, conforme observado na Figura 9.

Figura 9 – Aspecto visual de raízes de plantas de pimentão em rizotrons provenientes de sementes do lote 7 (Cultivar AF-7) não condicionadas - controle (A) e condicionadas com 24-EpiBL a 10^{-8} M (B)

O crescimento inicial da raiz principal das plantas de ambos os cultivares, e para todos os lotes estudados também foi afetado substancialmente (Figuras 10 e 11). Porém, o comprimento total da raiz primária das plantas aos 25 dias após a semeadura, obtidas a partir de sementes condicionadas com 24-EpiBL, foi semelhante às plantas provenientes de sementes não condicionadas (Tabela 18), não demonstrando, portanto, efeitos marcantes de 24-EpiBL sobre o comprimento final da raiz primária.

Figura 10 – Comprimento inicial da raiz principal (cm) de plantas de pimentão em rizotrons provenientes de três lotes de sementes, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M, no primeiro, segundo e terceiro dia após a semeadura, cultivar AF-6

Figura 11 – Comprimento inicial da raiz principal (cm) de plantas de pimentão em rizotrons provenientes de quatro lotes de sementes, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M, no primeiro, segundo e terceiro dia após a semeadura, cultivar AF-7

Tabela 18 – Comprimento total da raiz principal (cm) de plantas provenientes de três e quatro lotes de sementes de pimentão em rizotrons, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL na concentração de 10^{-8} M, 25 dias após a semeadura

Cultivar AF-6			Cultivar AF-7		
LOTES	CONT	24-EpiBL	LOTES	CONT	24-EpiBL
1	22,1 A	23,8 A	4	22,8 A	24,9 A
2	22,4 A	22,1 A	5	23,9 A	22,8 A
3	20,0 A	20,9 A	6	25,2 A	24,8 A
			7	21,1 A	26,1 A
C.V. (%)	5,5			6,2	

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

2.3.6 Condicionamento fisiológico em tambor

O desempenho germinativo das sementes avaliado pelo teste de germinação está representado na Tabela 19. Para o cultivar AF-6, houve diferença estatística entre a germinação de sementes condicionadas com 24-EpiBL (10^{-8} M), condicionadas apenas com água (método tradicional) e sementes não condicionadas, com resposta superior para o condicionamento com 24-EpiBL, lote 1. Para o cultivar AF-7, não houve diferenças entre os tratamentos, independentemente da presença ou ausência do biorregulador.

Durante a primeira contagem de germinação (Tabela 20), sementes dos lotes 1 e 3 (cultivar AF-6), e sementes do lote 6 (cultivar AF-7) apresentaram maior percentagem de plântulas normais após o condicionamento em tambor com 24-EpiBL. O lote 6, por exemplo, havia apresentado média de 72% antes do condicionamento, e 90% após o condicionamento em tambor tradicional, ao passo que, com a inclusão de 24-EpiBL no sistema, os valores passaram a atingir média de 96%. O IVG (Tabela 21) também demonstrou melhor desempenho das sementes após a adição de 24-EpiBL na solução de embebição, mas com efeitos significativos apenas para as sementes do cultivar AF-7 (lotes 4, 5 e 7).

Tabela 19 – Germinação (%) de lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, não condicionados (controle) e após o condicionamento fisiológico em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento) e pelo uso de 24-EpiBL a 10^{-8} M

Cultivar AF-6				Cultivar AF-7			
LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL	LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL
1	97 Ab	98 Aab	100 Aa	4	98 Aa	98 Aa	98 Aa
2	99 Aa	99 Aa	100 Aa	5	98 Aa	98 Aa	99 Aa
3	98 Aa	99 Aa	100 Aa	6	95 Ab	98 Aa	99 Aa
				7	96 Ab	99 Aa	99 Aa
C.V. (%)		0,7				1,8	

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 20 – Primeira contagem de germinação (%) de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e após o condicionamento fisiológico em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento) e pelo uso de 24-EpiBL a 10^{-8} M

Cultivar AF-6				Cultivar AF-7			
LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL	LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL
1	96 Ab	97 Ab	99 Aa	4	77 BCb	95 Aa	96 Aa
2	97 Aa	99 Aa	99 Aa	5	87 Aa	90 Aa	92 Aa
3	96 Ab	99 Aab	100 Aa	6	72 Cc	90 Ab	96 Aa
				7	86 ABb	96 Aa	99 Aa
C.V. (%)		1,2				6,1	

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 21 – IVG (obtido pelo método de MAGUIRE, 1962) de de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e após o condicionamento fisiológico em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento) e pelo uso de 24-EpiBL a 10^{-8} M

Cultivar AF-6				Cultivar AF-7			
LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL	LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL
1	8,1 Ab	9,7 Aa	9,9 Aa	4	6,7 Bc	7,7 Ab	8,0 Aa
2	8,0 Ab	9,8 Aa	9,9 Aa	5	7,1 Ac	7,7 Ab	7,9 Aa
3	8,1 Ab	9,9 Aa	9,9 Aa	6	6,8 Bb	7,5 Aa	7,6 Aa
				7	7,2 Ac	7,6 Ab	7,9 Aa
C.V. (%)		1,5				3,0	

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Efeitos positivos do condicionamento em tambor com 24-EpiBL foram refletidos, ainda, sobre o índice de vigor, comprimento e uniformidade de desenvolvimento das plântulas gerados pelo SVIS[®] (Tabelas 22, 23, e 24). Os índices de vigor e o comprimento das plântulas provenientes de sementes do lote do cultivar AF-6 foram mais afetadas que as do cultivar AF-7. Em sementes do lote 2, por exemplo, os índices de vigor foram de 329, 419 e 506, para sementes não condicionadas, condicionadas em tambor sem adição de 24-EpiBL e condicionadas em tambor com 24-EpiBL, respectivamente (Tabela 22).

O comprimento das plântulas do lote 2, chegou a atingir média de 9,0 cm após o condicionamento com 24-EpiBL, contra 3,8 e 5,8 cm provenientes de sementes não condicionadas ou condicionadas pelo uso apenas de água, respectivamente (Tabela 23). Plântulas do lote 2, obtidas a partir de sementes condicionadas em tambor com 24-EpiBL (c), condicionadas em ausência de 24-EpiBL (b) e não condicionadas (a) estão apresentadas na Figura 12. Para o parâmetro uniformidade de desenvolvimento das plântulas, melhores resultados foram verificados para os lotes de sementes 3 (cultivar AF-6), 5, 6 e 7 (cultivar AF-7) sob condicionamento em tambor com a adição de 24-EpiBL (Tabela 24).

Tabela 22 – Índice de vigor - SVIS[®] de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e após o condicionamento fisiológico em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento) e pelo uso de 24-EpiBL a 10^{-8} M

Cultivar AF-6				Cultivar AF-7			
LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL	LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL
1	395 Ac	447 Ab	510 Aa	4	414 Bb	430 Ba	438 Ba
2	329 Bc	419 Bb	506 Aa	5	464 Ab	476 Ab	495 Aa
3	375 ABc	434 ABb	507 Aa	6	428 Bb	411 Bb	483 Aa
				7	421 Ba	414 Ba	429 Ba
C.V. (%)		7,4				6,2	

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Tabela 23 – Comprimento de plântulas (cm) - SVIS[®] de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e após o condicionamento fisiológico em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento) e pelo uso de 24-EpiBL a 10^{-8} M

Cultivar AF-6				Cultivar AF-7			
LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL	LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL
1	6,6 Ac	7,6 Ab	9,6 Aa	4	6,6 ABa	7,1 Aa	7,0 ABa
2	3,8 Bc	5,8 Bb	9,0 Aa	5	7,5 Aa	7,8 Aa	8,2 Aa
3	6,2 Ac	8,6 Ab	10,1 Aa	6	5,9 ABb	7,5 Aa	7,8 Aa
				7	5,3 Bb	5,8 Bab	6,7 Ba
C.V. (%)		10,7				9,2	

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Figura 12 – Plântulas de pimentão com seis dias de idade, cultivar AF-6, lote 2. (a) Sem condicionamento - controle; (b) Condicionamento em tambor pelo procedimento tradicional (hidrocondicionamento); (c) Condicionamento em tambor utilizando 24-EpiBL a 10^{-8} M

Tabela 24 – Uniformidade de desenvolvimento de plântulas - SVIS[®] de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e após o condicionamento fisiológico em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento) e pelo uso de 24-EpiBL a 10^{-8} M

Cultivar AF-6				Cultivar AF-7			
LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL	LOTES	CONT	TRAD	24-EpiBL
1	707 Ab	797 Aab	820 Aa	4	725 Ab	789 Aa	790 Aa
2	742 Ab	862 Aa	859 Aa	5	790 Ab	743 Ab	866 Aa
3	686 Bb	658 Bb	759 Ba	6	735 Ab	738 Ab	820 Aa
				7	788 Ab	751 Ab	841 Aa
C.V. (%)		8,2				6,1	

Letras maiúsculas: comparação entre médias dentro de cada coluna; letras minúsculas: comparação entre médias dentro de cada linha ($p \leq 0,05$)

Os padrões de atividade das enzimas SOD, POX e CAT também variaram em resposta ao condicionamento em tambor com 24-EpiBL (Figuras 13, 14 e 15). Cinco dos sete lotes de sementes (1, 2 e 3, cultivar AF-6; 4 e 7, cultivar AF-7) mostraram maior atividade de POX (Figura 13) utilizando 24-EpiBL (coluna c) em relação ao condicionamento tradicional (coluna b) e às sementes não condicionadas (coluna a).

A atividade oxidativa de SOD (Figura 14) também foi reforçada após o condicionamento em tambor com 24-EpiBL, porém de maneira similar ao condicionamento utilizando apenas água, à exceção do lote 5 (cultivar AF-7) onde houve maior intensidade de bandas para o tratamento com 24-EpiBL. Sementes

condicionadas com 24-EpiBL, em geral, também apresentaram melhor atividade de CAT (Figura 15), relevada pela maior intensidade de bandas comparada aos demais tratamentos.

Figura 13. Padrão enzimático de peroxidase - POX após PAGE não desnaturante de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente. (a) Sementes não condicionadas – controle; (b) condicionamento em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento); (c) condicionamento em tambor pela adição de 24-EpiBL a 10^{-8} M.

Figura 14. Padrão enzimático de superóxido dismutase - SOD após PAGE não desnaturante de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente. (a) Sementes não condicionadas – controle; (b) condicionamento em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento); (c) condicionamento em tambor pela adição de 24-EpiBL a 10^{-8} M.

Figura 15. Padrão enzimático de catalase - CAT após PAGE não desnaturante de três e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente. (a) Sementes não condicionadas – controle; (b) condicionamento em tambor pelo método tradicional (hidrocondicionamento); (c) condicionamento em tambor pela adição de 24-EpiBL a 10^{-8} M.

2.3.7 Comportamento de sementes armazenadas

O desempenho germinativo dos lotes de sementes pertencentes ao cultivar AF-6 foi mantido em todas as épocas de avaliação (0, 3, 6, 9 e 12 meses), independentemente do tratamento (condicionamento com 24-EpiBL a 10^{-8} M ou ausência de condicionamento), conforme mostra a Figura 16A. No entanto, sementes previamente condicionadas com 24-EpiBL apresentaram germinação superior. Na primeira contagem de germinação (Figura 16B), por outro lado, diferenças mais contrastantes foram encontradas, com maior percentagem de plântulas normais para sementes condicionadas com 24-EpiBL.

A Figura 17 apresenta o comportamento dos lotes de sementes condicionados com 24-EpiBL e sem condicionamento durante o envelhecimento acelerado com solução saturada de sal, após o armazenamento. Mais uma vez, valores superiores foram verificados para as sementes condicionadas com 24-EpiBL, com efeitos mais marcantes em sementes do lote 1.

Efeitos positivos do condicionamento com 24-EpiBL também foram constatados sobre os índices de vigor das sementes (SVIS[®]) (Figura 18). Em sementes do lote 3 (identificado com menor potencial fisiológico inicial), os índices de vigor das sementes condicionadas com 24-EpiBL, foram similares em todas as épocas de avaliação. Em sementes dos lotes 1 e 2, contudo, a partir da segunda (aos três meses) e quarta época (aos nove meses), respectivamente, os efeitos de 24-EpiBL foram menos expressivos. Vale destacar, porém, que embora tenha sido observado menor efeito do condicionamento com 24-EpiBL sobre os índices de vigor das sementes dos lotes 1 e 2, ainda assim, estas sementes mantiveram valores superiores aos verificados para as sementes não condicionadas, exceto para a última época de avaliação de sementes do lote 2, que apresentaram comportamento semelhante ao controle.

Figura 16 – Germinação (%) - A e primeira contagem de germinação (%) - B de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 17 – Valores médios de plântulas normais provenientes do teste de envelhecimento acelerado com solução saturada de sal - EASS (%) de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 18 – Índice de vigor - SVIS® de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

O tratamento com 24-EpiBL, ainda, proporcionou maior uniformidade de desenvolvimento de plântulas (SVIS®) (Figura 19), com destaque para o lote 3, com índices substancialmente superiores ao controle. Todos os lotes de sementes apresentaram comportamento semelhante durante as cinco épocas de avaliação,

não tendo sido verificada perda de potencial ao longo das avaliações, conforme mostra a Figura 20 para as sementes do lote 3.

O comprimento de plântulas (SVIS[®]) (Figura 21), também demonstrou melhor desempenho para os lotes de sementes condicionados com 24-EpiBL, e novamente, sementes do lote 3 foram mais responsivas ao tratamento, com diferenças mais acentuadas entre os tratamentos, além de não apresentarem mudanças ao longo das avaliações. Já em sementes dos lotes 1 e 2, a resposta positiva do condicionamento com 24-EpiBL foi reduzida ao longo do tempo, porém este tratamento ainda se manteve superior, assemelhando às sementes não condicionadas apenas na última etapa do armazenamento (dozes meses).

Para os lotes de sementes pertencentes ao cultivar AF-7, o condicionamento com 24-EpiBL também apresentou melhor resposta de desempenho das sementes. A germinação (Figura 22A) foi favorecida, e manteve-se estável durante as diferentes épocas de avaliação. Na primeira contagem de germinação (Figura 22B), o baixo desempenho das sementes demonstrado antes do condicionamento, foi superado pelo condicionamento com 24-EpiBL e isso foi constatado também para todas as épocas de avaliação estudadas.

O envelhecimento acelerado com solução saturada de sal (Figura 23) também indicou maior potencial de armazenamento para as sementes condicionadas com 24-EpiBL. Independentemente do lote, o potencial fisiológico inicial das sementes foi mantido durante todas as épocas de avaliação, enquanto que, sementes não condicionadas, apenas sementes do lote 7 manteve seu potencial fisiológico inicial; os lotes de sementes 4 e 6 foram os mais afetados pelos efeitos negativos do armazenamento.

Os índices de vigor (SVIS[®]) (Figura 24), também foram superiores após o condicionamento com 24-EpiBL. Em sementes condicionadas do lote 4, isso foi observado ao longo de todo o período de armazenamento; os lotes remanescentes apresentaram valores próximos aos obtidos para as sementes não condicionadas durante as últimas épocas de avaliação.

Figura 19 – Uniformidade de desenvolvimento de plântulas - SVIS[®] de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 20 – Imagens de plântulas de pimentão obtidas por meio do SVIS[®], lote 3 - cultivar AF-6, provenientes de sementes não condicionadas (controle) e condicionadas com 24-EpiBL a 10^{-8} M, antes de serem armazenadas (0 m) e após armazenamento de 12 meses (12 m)

Figura 21 – Comprimento de plântulas (cm) - SVIS® de três lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-6, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 22 – Germinação (%) - A e primeira contagem de germinação (%) - B de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 23 – Valores médios de plântulas normais provenientes do teste de envelhecimento acelerado com solução saturada de sal - EASS (%) de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 24 – Índice de vigor - SVIS® de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

A uniformidade de desenvolvimento das plântulas (Figura 25), destacou o tratamento com 24-EpiBL em todas as épocas para todos os lotes. Apenas em sementes do lote 5, durante a última época, os dois tratamentos apresentaram comportamento similares.

O comprimento das plântulas (SVIS[®]) (Figura 26), mais uma vez, revelou melhores resultados para as sementes condicionadas com 24-EpiBL, com destaque para as sementes do lote 4, onde novamente, os valores foram mantidos ao longo do armazenamento. Menores efeitos do condicionamento com 24-EpiBL sobre o comprimento de plântulas, após o armazenamento, foram verificados para sementes dos lotes 5 e 7, que assemelharam-se ao controle aos nove meses, para as sementes do lote 5, e aos doze meses para as sementes do lote 7.

Para a atividade enzimática, sementes não condicionadas (controle) do cultivar AF-6 apresentaram redução na atividade de EST aos 9 meses de armazenamento, fato não observado em sementes do cultivar AF-7 (Figura 27). A menor atividade enzimática de EST em sementes do cultivar AF-6, pode ser verificada pela menor intensidade de bandas em relação às observadas para o período de 6 meses, por exemplo. Já no condicionamento com 24-EpiBL, a atividade de EST foi mantida durante o armazenamento, independente do cultivar, verificada pela semelhança de intensidade de bandas entre os meses de avaliação.

Com relação à enzima MDH, independentemente da realização ou não do condicionamento, não houve mudanças na atividade desta enzima ao longo do armazenamento, constatada também, pela mesma intensidade de bandas dentro do gel (Figura 28). O padrão enzimático de SOD (Figura 29), por sua vez, revelou menor atividade antioxidante em sementes não condicionadas do cultivar AF-7, verificado para as sementes dos lotes 5 e 6 aos 9 meses de armazenamento.

Mas, em sementes condicionadas com 24-EpiBL, não foi verificado alteração nos padrões de SOD para nenhum dos lotes. A atividade induzida de SOD pelo 24-EpiBL (10^{-8} M) verificada antes do armazenamento (período zero) (Figura 29) e também no início desse estudo (Figura 8), foi mantida ao longo de todo o armazenamento.

Figura 25 – Uniformidade de desenvolvimento de plântulas - SVIS[®] de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 26 – Comprimento de plântulas (cm) - SVIS[®] de quatro lotes de sementes de pimentão, cultivar AF-7, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M em cinco épocas de avaliação durante o período de armazenamento de 12 meses

Figura 27 – Padrão enzimático de esterase - EST após PAGE não desnaturante de três lotes e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M, submetidos a 0, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento. As setas comparam a intensidade de bandas

Figura 28 – Padrão enzimático de malato desidrogenase - MDH após PAGE não desnaturante de três lotes e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M, submetidos a 0, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento

Figura 29 – Padrão enzimático de superóxido dismutase - SOD após PAGE não desnaturante de três lotes e quatro lotes de sementes de pimentão, cultivares AF-6 e AF-7, respectivamente, não condicionados (controle) e condicionados com 24-EpiBL a 10^{-8} M, submetidos a 0, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento. As setas comparam a intensidade de bandas

A maior atividade da enzima SOD em sementes condicionadas com 24-EpiBL, pode ter favorecido, em parte, o desempenho das sementes durante o armazenamento. Conforme relatado, a SOD é a enzima antioxidante de primeira linha de defesa contra EROs, e é considerada potencialmente importante na indução de resistência das sementes ao armazenamento, por controlar os níveis de peroxidação de lipídios das membranas provocadas por esses compostos deletérios (CHAITANYA; NAITHANI, 1994).

Durante o armazenamento, sementes deterioram-se devido principalmente a peroxidação de lipídios e às modificações oxidativas de proteínas (AL-MASKRI et al., 2002). A peroxidação de lipídios provoca desintegração das membranas (INAYAT-UR-RAHMAN et al., 2013), e as modificações oxidativas de proteínas resulta na inativação de enzimas antioxidantes, dentre outras (TERSKIKH et al., 2008).

De acordo com Geol e Sheran (2003); Pukacka e Rajajczak (2005), a ativação de enzimas antioxidantes que limpam as EROs, reduzem o nível de peroxidação de lipídios da membrana, controlando, assim, a deterioração das sementes durante o armazenamento.

Por outro lado, a inativação de enzimas antioxidantes provoca maior peroxidação de lipídios, e compromete as funções biológicas da membrana (INAYAT-UR-RAHMAN et al., 2013), e as membranas celulares são essenciais na regulação do transporte de materiais para dentro e fora da célula, desempenhando um papel chave na manutenção do vigor e viabilidade das sementes (AL-MASKRI et al., 2003).

3 CONCLUSÕES

- Sementes de pimentão condicionadas pela adição de 24-epibrassinolídeo a 10^{-8} M apresentam maior velocidade de germinação, atividade de enzimas antioxidantes e hidrolíticas, além de maior crescimento e uniformidade de desenvolvimento de plântulas;
- O condicionamento fisiológico com 24-epibrassinolídeo é vantajoso durante o armazenamento de sementes de pimentão;
- A inclusão de 24-epibrassinolídeo no sistema de condicionamento fisiológico em tambor é eficiente para o tratamento comercial de sementes de pimentão.

REFERÊNCIAS

- ABBA, E.J.; LOVATO, A. Effect of seed storage temperature and relative humidity on maize (*Zea mays* L.) seed viability and vigour. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 101–114, 1999.
- AGAMI, R.A. Alleviating the adverse effects of NaCl stress in maize seedlings by pretreating seeds with salicylic acid and 24-epibrassinolide. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 88, n. 1, p. 171-177, 2013.
- AHAMMED, G.J.; GAO, C.J.; OGWENO, J.O.; ZHOU, Y.H.; XIA, X.J.; MAO, W.H.; SHI, K.; YU, J.Q. Brassinosteroids induce plant tolerance against phenanthrene by enhancing degradation and detoxification in *Solanum lycopersicum* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 80, n. 1, p. 28–36, 2012a.
- AHAMMED, G.J.; ZHANG, S.; SHI, K.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Brassinosteroid improves seed germination and early development of tomato seedling under phenanthrene stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 68, n. 1, p. 87-96, 2012b.
- AHAMMED, G.J.; CHOUDHARY, S.P.; CHEN, S.; XIA, X.; SHI, K.; ZHOU, Y.; YU, J. Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene-cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 199-213, 2013.
- ALBUQUERQUE, K.S.; GUIMARÃES, R.M.; GOMES, L.A.A.; VIEIRA, A.R.; JÁCOME, M.F. Condicionamento osmótico e giberelina na qualidade fisiológica de sementes de pimentão colhidas em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 100-109, 2009.
- ALBUQUERQUE, K.A.D.; OLIVEIRA, J.A.; SILVA, P.A.; VEIGA, A.D.; CARVALHO, B.O.; ALVIM, P.O. Armazenamento e qualidade de sementes de tomate enriquecidas com micronutrientes e reguladores de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 20-28, 2010.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 627p.
- ALI, B.; HAYAT, S.; FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A. 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 9, p. 1387-1392, 2008.
- ALLEONI, B.; BOSQUEIRO, M.; ROSSI, M. Efeito dos reguladores vegetais de Stimulate® no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 6, n. 1, p. 23-35, 2000.

AL-MASKRI, A.; KHAN, M.M.; AL-MANTHERIAND, O.; AL-HABSI, K. Effect of accelerated aging on lipid peroxidation, leakage and seedling vigor (RGR) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 39, n. 4, p. 330-337, 2002.

AL-MASKRI, A.Y.; KHAN, M.M.; KHAN, I.A.; AL-HABSI, K. Effect of accelerated ageing on viability, vigor, lipid peroxidation and leakage in carrot (*Daucus carota* L.) seeds. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 5, n. 4, p. 580-584, 2003.

AMOOAGHAIE, R.; NIKZAD, K.; SHAREGHI, B. The effect of priming on emergence and biochemical changes of tomato seeds under suboptimal temperatures. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 508-512, 2010.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 373-399, 2004.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt stress using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 1, p. 84-93, 2009.

ASHRAF, M.; BRAY, C.M. DNA synthesis in osmoprimed leek (*Allium porrum* L.) seeds and evidence for repair and replication. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 1, p. 15-23, 1993.

ARIF, M.; JAN, M.T.; MIAN, I.A.; KHAN, S.A.; HOLLINGTON, P.; HARRIS, D. Evaluating the impact of osmopriming varying with polyethylene glycol concentrations and durations on soybean. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 16, n. 2, p. 359-364, 2014.

ARUN, K.; UMA, S.; SARASWATHI, M.S.; BACKIYARANI, S.; DUBAI, P. Effects of whole seed priming on the in vitro germination of hybrid banana embryos (*Musa* spp.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 41, n. 3, p. 439-451, 2013.

ASGHARIPOUR, M.R.; RAFIEI, M. The effects of osmo-priming on tomato seed germination. **Advances in Environmental Biology**, Amman, v. 5, n. 9, p. 2866-2869, 2011.

BAJGUZ, A.; HAYAT, S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, n. 1, p. 1-8, 2009.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

BAILLY, C.; BOGATEK-LESZCZYNSKA, R.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. **Seed Science Research**, Wallingford, v.12, n. 1, p. 47-55, 2002.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. Oxidants, antioxidants, and aging. In: SCANDALIOS, J.G. (Ed.). **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. chap. 8, p. 201-246.

BENNETT, A.J.; WHIPPS, J.M. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 83-89, 2008.

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

BHANUPRAKASH, K.; YOGEESEA, H.S.; VASUGI, C.; ARUN, M.N.; NAIK, L.B. Effect of pre-soaking treatments and temperature on seed germination of guava (*Psidium guajava* L.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 36, n. 3, p. 792-794, 2008.

BHARGAVA, B.; GUPTA, Y.C.; DHIMAN, S.R.; SHARMA, P. Effect of seed priming on germination, growth and flowering of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.). **National Academy Science Letters**, Allahabad, v. 38, n. 1, p. 81-85, 2015.

BLAT, S.F.; BRAZ, L.T.; ARRUDA, A.S. Avaliação de híbridos duplos de pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, 350-354, 2007.

BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. **Peppers: Vegetable and Spice Capsicums: Crop Production Science in Horticulture**. New Mexico State University: CABI, 2012. 248p.

BOWLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-259, 1976.

BRADFORD, K.J.; STEINER, J.J.; TRAWATHA, S.E. Seed priming influence on germination and emergence of pepper seed lots. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 718-721, 1990.

BRADFORD, K.J.; CHEN, F.; COOLEY, M.B.; DAHAL, P.; DOWNIE, B.; FUKUNAGA, K.K.; GEE, O.H.; GURUSINGHE, S.; MELLA, R.A.; MONOGAKI, H.; WU, C.T.; YANG, H.; YIM, K.O. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: BLACK, M.; BRADFORD, K.J.; VÁZQUEZ-RAMOS, J. (Ed.). **Seed Biology: Advances and Applications**. New York: CAB International, 2000. chap. 22, p. 231-251.

BRANCALION, P.H.S.; TAY, D.; NOVENBRE, A.D.L.C.; RODRIGUES, R.R.; MARCOS-FILHO, J. Priming of pioneer tree *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) seeds evaluated by an automated computer image analysis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 274-279, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa MAPA n. 09, de 02 de junho de 2005.** (*Estabelece os padrões de identidade e qualidade para a produção e a comercialização de sementes de espécies olerícolas, condimentares, medicinais e aromáticas*). Disponível em: <http://members.wto.org/crnattachments/2011/sps/BRA/11_1061_00_x.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRAY, C.M.; WEST, C.E. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. **New Phytologist**, Cambridge, v. 168, n 3, p. 511-528, 2005.

BREWSTER, J.L. **Onions and other vegetable alliums.** 2nd .ed. Wallingford: CABI, 2008. 454p.

CANESIN, A.; MARTINS, J.M.D.T.; SCALON, S.P.Q.; MASETTO, T.E. Bioestimulante no vigor de sementes e plântulas de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 2, p. 309-315, 2012.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 383, n. 1/2, p. 3-41, 2014.

CARVALHO, N.M. O conceito de vigor de sementes. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (ed.). **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal, Funep. P. 1-30, 1994.

CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; PINHO, V.E.R. Técnicas moleculares em sementes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 4-44. 2000.

CASEIRO, R.F. **Métodos para condicionamento fisiológico de sementes de cebola e influência da secagem e armazenamento.** 2003. 109p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CASEIRO, R.; BENNETT, M.A.; MARCOS-FILHO, J. Comparison of three priming techniques for onion seed lots differing in initial seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 32, n. 2, p. 365-375, 2004.

CASTRO, P.R.C.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical.** Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132p.

CASTRO, P.R.C.; GONÇALVES, M.B.; DEMÉTRIO, C.G.B. Efeito de reguladores vegetais na germinação de sementes. **Anais da Esalq**, Piracicaba, v. 2, n. 1, p. 449-468, 1985.

CATO, S.C. **Ação de bioestimulante nas culturas do amendoimzeiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas**. 2006. 73p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CHAITANYA, K.S.K.; NAITHANI, S.C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. f. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 623-627, 1994.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Limerick, v. 180, n.2, p. 212-220, 2011.

_____. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 94, n. 1, p. 33-45, 2013.

CHEN, F.; NONOGAKI, H.; BRADFORD, K.J. A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 367, p. 215-223, 2002.

CHEN, K.; FESSEHAIE, A.; ARORA, R. Dehydrin metabolism is altered during seed osmopriming and subsequent germination under chilling and desiccation in *Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale: Possible role in stress tolerance. **Plant Science**, Limerick, v. 183, n. 1, p. 27-36, 2012.

CHOE, S.; TANAKA, A.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; ROSS, A.S.; TAX, F.E.; YOSHIDA, S.; FELDMANN, K.A. Lesions in the sterol Δ^7 reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 431-443, 2000.

CHOUDHARY, S.P.; KANWAR, M.; BHARDWAJ, R.; GUPTA, B.D.; GUPTA, R.K. Epibrassinolide ameliorates Cr (VI) stress via influencing the levels of indole-3-acetic acid, abscisic acid, polyamines and antioxidant system of radish seedlings. **Chemosphere**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 592-600, 2011.

CUI, J.X.; ZHOU, Y.H.; DING, J.G.; XIA, X.J.; SHI, K.; CHEN, S.C.; ASAMI, T.; CHEN, Z.; YU, J.Q. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, v. 34, n. 2, p. 347-358, 2011.

DEARMAN, J.; BROCKLEHURST, P.A.; DREW, R.L.K. Effects of osmotic priming and ageing on onion seed germination. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 108, n. 3, p. 639-648, 2008.

DEMIR, I.; OCKCU, G. Aerated hydration treatment for improved germination and seedling growth in aubergine (*Solanum melongena*) and pepper (*Capsicum annuum*). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 144, n. 1, p.121-123, 2004.

DIAS, M.A.N.; MONDO, V.H.V.; CICERO, S.M. Recent approaches for bell pepper seed vigor testing. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 4, p. 483-487, 2014.

DINIZ, K.A. **Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de espécies olerícolas pela técnica de peliculização**. 2005. 83p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

DIVI, U.K.; KRISHNA, P. Overexpression of the brassinosteroid biosynthetic gene AtDWF4 in Arabidopsis seeds overcomes abscisic acid-induced inhibition of germination and increases cold tolerance in transgenic seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 4, p. 385-393, 2010.

EISVAND, H.R.; TAVAKKOL-AFSHARI, R.; SHARIFZADEH, F.; MADDAAH AREFI, H.; HESAMZADEH HEJAZI, S.M. Effects of hormonal priming and drought stress on activity and isozyme profiles of antioxidant enzymes in deteriorated seed of tall wheatgrass (*Agropyron elongatum* Host). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 2, p. 280-297, 2010.

ELKOCA, E.; HALILOGLU, K.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S. Hydro- and osmopriming improve chickpea germination. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, Copenhagen, v. 57, n. 3, p. 193-200, 2007.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; MAZUY, C.; CORBINEAU, F.; BAILLY, C. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 14, p.5003-5011, 2011.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=475>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

ENTESARI, M.; SHARIFZADEH, F.; AHMADZADEH, M.; FARHANGFAR, M. Seed biopriming with *Trichoderma* species and *Pseudomonas* fluorescent on growth parameters, enzymes activity and nutritional status of soybean. **International Journal of Agronomy and Plant Production**, London, v. 4, n. 4, p. 610-619, 2013.

FARIDUDDIN, Q.; HASAN, S.A.; ALI, B.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Effect of modes of application of 28-homobrassinolide on mung bean. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 32, n. 1, p. 17-21, 2008.

FAROOQ, M.; BASRA, S.M.A.; WAHID, A.; KHALIQ, A.; KOBAYASHI, N. Rice seed invigoration: A Review. In: LICHTFOUSE, E. (Ed.). **Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants: Sustainable Agriculture Reviews**. Dordrecht: Springer. 2009. chap. 9, p. 137-175.

FATKHUTDINOVA, R.A.; SHAKIROVA, F.M.; CHEMERIS, A.V.; SABIRZHANOV, B.E.; VAKHITOV, V.A. NOR Activity in wheat species with different ploidy levels treated with phytohormones. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 38, n. 11, p. 1335-1338, 2002.

FRIDMAN, Y.; SAVALDI-GOLDSTEIN, S. Brassinosteroids in growth control: How, when and where. **Plant Science**, Limerick, v. 209, n. 1, p. 24-31, 2013.

FUKUTA, N.; FUKUZONO, K.; KAWAIDE, H.; ABE, H.; NAKAYAMA, M. Physical restriction of pods causes seed size reduction of a brassinosteroid-deficient faba bean (*Vicia faba*). **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 1, p. 65-69, 2006.

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

GEOL, A.; SHEORAN, I.S. Lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 3, p. 429-434, 2003.

HAMEED, A.; SHEIKH, M.A.; HAMEED, A.; FAROOQ, T.; BASRA, S.M.A.; JAMIL, A. Chitosan priming enhances the seed germination, antioxidants, hydrolytic enzymes, soluble proteins and sugars in wheat seeds. **Agrochimica**, Pisa, v. 57, n. 2, p. 97-110, 2013.

HAMILL D.E.; BREWBAKER, J.L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. IV. The peroxidase isoenzymes of maize (*Zea mays*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 945-958, 1969.

HAYAT, S.; AHMAD, A. 28-homobrassinolide induced changes favoured germinability of wheat grains. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 29, n. 1-2, p. 55-62, 2003.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HNILICKA, F.; HNILICKOVA, H.; MARTINKOVA, J.; BLAHA, L. The influence of drought and the application of 24-epibrassinolide on the formation of dry matter and yield in wheat. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 35, n. 2, p. 457-460, 2007.

HNILICKA, F.; HNILICKOVA, H.; MARTINKOVA, J.; BLAHA, L.; KADLEC, P. Impact of 24-epibrassinolide on chemical structure and energy content in wheat grain. **Vagos**, Raudondvaris, v. 83, n. 36, p. 17-22, 2009.

HU, Y.; BAO, F.; LI, J. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct *CycD3*-induction pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 693-701, 2000.

INAYAT-UR-RAHMAN; ALI, N.; RAB, A.; SHAH, Z. Role of pre storage seed priming in controlling seed deterioration during storage. **Sarhad Journal of Agriculture**, Peshawar, v. 29, n. 3, p. 379-386, 2013.

JANECZKO, A.; BIESAGA-KOSCIELNIAK, J.; DZIURKA, M. 24-Epibrassinolide modifies seed composition in soybean, oilseed rape and wheat. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 37, n. 3, p. 625-639, 2009.

JANN, R.C.; AMEN, R.D. What is germination? In: KHAN, A.A. **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. Amsterdam: North Holland, 1977. chap.2, p. 7-28.

JIANG, Y.P.; CHENG, F.; ZHOU, Y.H.; XIA, X.J.; SHI, K.; YU, J.K. Interactive effects of CO₂ enrichment and brassinosteroid on CO₂ assimilation and photosynthetic electron transport in *Cucumis sativus*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 75, n. 1, p. 98-106, 2012.

JIANG, W.B.; HUANG, H.Y.; HU, Y.W.; ZHU, S.W.; WANG, Z.Y.; LIN, W.H. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 162, n. 4, p. 1965-1977, 2013.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging for small-seed crops. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1996.

JOSÉ, S.C.B.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; RODRIGUES, R. Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de pimentão submetidas ao osmocondicionamento, utilizando diferentes agentes osmóticos e meios de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 217-223, 1999.

KIKUTI, A.L.P.; MARCOS-FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 240-245, 2009.

_____. Seed vigor tests for lettuce seeds. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 44-50, 2012.

_____. Seedling imaging analysis and traditional tests to assess okra seed vigor. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 443-448, 2013.

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.

KRANNER I.; COLVILLE L.E. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 72, n. 1, p. 93-105, 2011.

KRANNER, I.; BECKETT, R.P.; WORNIK, S.; ZORN, M.; PFEIFHOFER, H.W. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 13-24, 2002.

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

KUMAR, M.; SIRHINDI, G.; BHARDWAJ, R.; KUMAR, S.; JAIN, G. Effect of exogenous H₂O₂ on antioxidant enzymes of *Brassica juncea* L. seedlings in relation to 24-epibrassinolide under chilling stress. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, v. 47, n. 6, p. 378-382, 2010.

LAKSHMANAN, V.; BERKE, T.G. Lack of primary seed dormancy in pepper (*Capsicum* spp.). **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Turin, v. 17, n. 1, p. 72-75, 1998.

LEUBNER-METZGER, G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 5, p. 758-763, 2001.

_____. Brassinosteroids promote seed germination. In: HAYAT, S.; AHMAD, A. (Ed.). **Brassinosteroids: Bioactivity and crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic. 2003. chap. 5, p. 119-128.

LI, J.; YIN, L.Y.; JONGSMAC, M.A.; WANG, C.Y. Effects of light, hydropriming and abiotic stress on seed germination, and shoot and root growth of pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 1543-1549, 2011.

LIMA, L.B.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de pepino e germinação sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 138-147, 2010.

LIN, J.M.; SUNG, J.M. Pre-sowing treatments for improving emergence of bitter gourd seedlings under optimal and sub-optimal temperatures. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 29, n. 1, p. 39-50, 2001.

LJUNG, K.; STIN, O.; LIOUSSANNE, A.; LIOUSSANNE, L.; SANDBERG, G. Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in scots pine seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 125, n. 1, p. 464-475, 2001.

LUO, Y.; XIE, W.; LUO, F. Effect of several germination treatments on phosphates activities and degradation of phytate in faba bean (*Vicia faba* L.) and azuki bean (*Vigna angularis* L.). **Journal of Food Science**, Malden, v. 77, n. 10, p. 1023-1029, 2012.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 380, n. 1-2, p. 50-58, 2007.

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

MAHMOUDI, H.; MASSOUD, R.B.; BAATOUR, O.; TARCHOUNE, I.; SALAH, I.B.; NASRI, N.; ABIDI, W.; KADDOUR, R.; HANNOUFA, A.; LACHAAL, M.; OUEGHY, Z. Influence of different seed priming methods for improving salt stress tolerance in lettuce plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 35, n. 12, p. 1910-1922, 2012.

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

MARCOS-FILHO J; KIKUTI ALP. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor e desempenho das plantas em campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 165-169, 2008.

MARCOS-FILHO, J.; KIKUTI, A.L.P.; LIMA, L.B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo a análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 102-112, 2009.

MARCOS-FILHO, J.; BENNETT, M.A.; MCDONALD, M.B.; EVANS, A.F.; GRASSBAUGH, E.M. Assessment of melon seed vigour by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 34, n. 2, p. 485-497, 2006.

MARKET, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 45, n. 5, p. 753-63, 1959.

McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MITCHELL, J.W.; GREGORY, L.E. Enhancement of overall plant growth, a new response to brassins. **Nature New Biology**, London, v. 239, n. 95, p. 253-254, 1972.

NAGATA, N.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S. Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants (*Lepidium sativum*). **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 9, p. 1006-1011, 2001.

NASCIMENTO, W.M.; DIAS, D.C.F.S.; FREITAS, R.A. Produção de sementes de pimentas. **Informe agropecuário: cultivo da pimenta**, Belo Horizonte, v. 27, n. 235, p. 30-39, 2006.

NASCIMENTO, W.M.; SILVA, J.B.C.; SANTOS, P.E.C.; CARMONA, R. Germinação de sementes de cenoura osmoticamente condicionadas e peletizadas com diversos ingredientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 12-16, 2009.

NOCTOR, G.; DE PAEPE R.; FOYER C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 125-134, 2007.

NOMURA, T.; UENO, M.; YAMADA, Y.; TAKATSUTO, S.; TAKEUCHI, Y.; YOKOTA, T. Roles of brassinosteroids and related mRNAs in pea seed growth and germination. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 143, n. 4, p. 1680-1688, 2007.

NOMURA, T.; JAGER, C.E.; KITASAKA, Y.; TAKEUCHI, K.; FUKAMI, M.; YONEYAMA, K.; MATSUSHITA, Y.; NYUNOYA, H.; TAKATSUTO, S.; FUJIOKA, S.; SMITH, J.J.; KERCKHOFFS, L.H.; REID, J.B.; YOKOTA, T. Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid 5 α -reductase causes dwarfism in the *lk* mutant of pea. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 2220-2229, 2004.

PANDITA, V.K.; ANAND, A.; NAGARAJAN, S. Enhancement of seed germination in hot pepper following presowing treatments. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 35, n. 2, p. 282-290, 2007.

PANDITA, V.K.; ANAND, A.; NAGARAJAN, S.; SETH, R.; SINHA, S.N. Solid matrix priming improves seed emergence and crop performance in okra. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 3, p. 665-674, 2010.

PANOBIANCO, M.; MARCOS-FILHO, J. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 306-310, 1998.

PAPASTYLIANOU, P.T.; KARAMANOS, A.J. Effect of osmopriming treatments with mannitol on cottonseed germination performance under suboptimal conditions. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 40, v. 2, p. 248-258, 2012.

PERGO E.M.; ISHII-IWAMOTO E.L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 37, n. 5, p. 500-513, 2011.

PILL, W.G.; KILIAN, E.A. Germination and emergence of parsley in response to osmotic or matric seed priming and treatment with gibberellin. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 5, p. 907-909, 2000.

PRADHAN, S.K.; GUPTA, R.C.; KUMAR, M. Effect of 24-Epibrassinolide on lipid peroxidation and proline in three Brassica species under temperature stress. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Rkutsk, v. 9, n. 3, p. 376-384, 2013.

PRADO-NETO, M.; DANTAS, A.C.V.L.; VIEIRA, E.L.; ALMEIDA, V.O. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador e estimulante vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 693-698, 2007.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 8, p. 873-85, 2005.

RADY, M.M. Effect of 24-epibrassinolide on growth, yield, antioxidant system and cadmium content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants under salinity and cadmium stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 232-237, 2011.

RAI, A.K.; BASU, A.K. Pre-sowing seed bio-priming in okra: response for seed production. **The Bioscan**, Ranchi, v. 9, n. 2, p. 643-647, 2014.

RAHMAN, I.U.; ALI, N.; RAB, A.; SHAH, Z. Seed deterioration during storage. **Sarhad Journal of Agriculture**, Peshawar, v. 29, n. 3, p.379-386, 2013.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.L.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, n. 1, p. 507-533, 2012.

REIS, R.G.E.; GUIMARÃES, R.M.; PEREIRA, D.S.; CASTRO, M.B.; VIEIRA, A.R.; CARVALHO, M.L.M. Qualidade fisiológica de sementes de berinjela osmocondicionadas submetidas à secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 11, p. 1507-1516, 2013.

ROWSE, H.R. (United Kingdom). **Methods of priming seeds US 5119589A**. 24 maio. 1991. 9 jun. 1992.

_____. Drum priming: a non-osmotic method of priming seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 24, n. 2, p. 281-294, 1996.

SANTOS, C.R.S. **Stimulate® na germinação de sementes, vigor de plântulas e no crescimento inicial de soja**. 2009. 44p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.

SAKO, Y.; MCDONALD, M.B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A.F.; BENNETT, M.A. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 29, n. 3, p. 625-636, 2001.

SCANDÁLIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, New York, v. 3, n. 1, p. 37-79, 1969.

_____. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.

SCHWEMBER, A.R.; BRADFORD, K.J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 15, p. 4423-4436, 2010.

SCHWITZGUÉBEL, J.P.; PAGE, V.; MARTINS-DIAS, S.; DAVIES, L.C.; VASILYEVA, G.; STRIJAKOVA, E. Using plants to remove foreign compounds from contaminated water and soil. In: SCHRODER, P.; COLLINS, C.D. (Ed.). **Organic Xenobiotics and plants: from mode of action to ecophysiology** (Plant Ecophysiology). Dordrecht: Springer. 2011, chap. 3, p. 149-189.

SHARMA, P.; BHARDWAJ, R. Effect of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth and heavy metal uptake in *Brassica Juncea* L. **General and Applied Plant Physiology**, Sofia, v. 33, n. 1/2, p. 59-73, 2007.

SILVA, V.N.; CICERO, S.M. Seedling imaging analyse to evaluate eggplant seed physiological potential. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, v. 2, p. 145-151, 2014a.

_____. Image seedling analysis to evaluate tomato seed physiological potential. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, v. 2, p. 327-334, 2014b.

SIMON, E.W. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytologist**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 377-420, 1974.

SINGH, P.K.; PANDITA, V.K.; TOMAR, B.S., SETH, R. Germination and field emergence in osmotic and solid matrix priming in onion (*Allium cepa*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 84, n. 12, p. 1561-1564, 2014.

SLIWINSKA, E.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 12, p. 3587-3594, 2009.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 27-58, 1993.

SPINOLA, M.C.M.; CICERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

SRINIVASAN, K.; JAIN, S.K.; SAXENA, S.; RADHAMANI, J.; UPRETY, M. Seed priming and fortification. **Seed Research**, New Delhi, v. 37, n. 1-2, p. 1-13, 2009.

STOLLER DO BRASIL. **Stimulate® Mo em hortaliças**. Cosmópolis: Divisão Arbore, 1998. (Informativo técnico).

SUBRAMANI, T.; MANJUNATH, K.C.; CHANDRASHEKHARAI, K.S.; SWAMY, N.R.; MURTHY, K.R.S. Variations in the esterase activity during the germination period of *Jatropha curcas* seeds. **Journal of Phytology**, Noida, v. 3, n. 11, p. 1-3, 2011.

SUN, Y.; VEERABOMMA, S.; ABDEL-MAGEED, H.A.; FOKAR, M.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S.; ALLEN, R.D. Brassinosteroid regulates fiber development on cultured cotton ovules. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 8, p. 1384-1391, 2005.

TANAKA, K.; NAKAMURA, Y.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S.; MATSUO, T.; OKAMOTO, S. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, n. 3, p. 259-271, 2003.

TERSKIKH, V. V.; ZENG, Y.; FEURTADO, A.; GIBLIN, M.; ABRAMS, S. R.; KERMODE, A. R. Deterioration of western redcedar (*Thuja plicata* Donn ex D. Don) seeds: protein oxidation and in vivo NMR monitoring of storage oils. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 765-777, 2008.

TOLEDO, F.F.; MARCOS-FILHO, J. **Manual das sementes**: tecnologia da produção. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224 p.

TZORTZAKIS, N.G. Effect of pre-sowing treatment on seed germination and seedling vigour in endive and chicory. **Horticultural Science**, Praha, v. 36, n. 3, p. 117-125, 2009.

VAN AKEN, B.; CORREA, P.A.; SCHNOOR, J.L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 44, n. 8, p. 2767-2776, 2009.

VARIER, A.; VARI, A.K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, Bangalore, v. 99, n. 4, p. 450-456, 2010.

VEGVARI, G.; VIDEKI, E. Plant hormones, plant growth regulators. **Orvosi Hetilap**, Budapest, v. 155, n. 26, p. 1011-1018, 2014.

VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 222-228, 2001.

WANG, M.; JIANG, W.; YU, H. Effects of exogenous epibrassinolide on photosynthetic characteristics in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seedlings under weak light stress. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 6, p. 3642-3645, 2010.

WARREN, J.E.; BENNETT, M.A. Seed Hydration using the drum priming system. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1220-1221, 1997.

WATERWORTH, W.M.; DRURY, G.E.; BRAY, C.M.; WEST, C.E. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. **New Phytologist**, Cambridge, v. 192, n. 4, p. 805-822, 2011.

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

WEST, CE. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 848-860, 2010.

WOODBURY, W.; SPENCER, A.K.; STAHMANN, M.A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, n. 1, p. 301-305, 1971.

WU, X.; YAO, X.; CHEN, J.; ZHU, Z.; ZHANG, H.; ZHA, D. Brassinosteroids protect photosynthesis and antioxidant system of eggplant seedlings from high-temperature stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 36, n. 2, p. 251-261, 2014.

WU, C.Y.; TRIEU, A.; RADHAKRISHNAN, P.; KWOK, S.F.; HARRIS, S.; ZHANG, K.; WANG, J.; WAN, J.; ZHAI, H.; TAKATSUTO, S.; MATSUMOTO, S.; FUJIOKA, S.; FELDMANN, K.A.; PENNELL, R.I. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 8, p. 1-16, 2008.

XI, W.; YU, H. *MOTHER OF FT and TFL1* regulates seed germination and fertility relevant to the brassinosteroid signaling pathway. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, n. 10, p. 1315-1317, 2010.

XU, L.; FUJIMURA, K.; McDONALD, M.B. Automatic separation of overlapping seedlings by network optimization. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 35, n. 2, p. 337-350, 2007.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T.P. Distinct cell specific expression patterns of early and late gibberellins biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination. **Plant Journal**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 443-453, 2001.

YARI, L.; AGHAALIKANI, M.; KHAZAEI, F. Effect of seed priming duration and temperature on seed germination behavior of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Agricultural and Biological Science**, Ipswich, MA, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2010.

YOPP, J.H.; COLCLASURE, G.C.; MANDAVA, N. Effects of brassin-complex on auxin and gibberellin mediated events in the morphogenesis of the etiolated bean hypocotyl. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 3, p. 247-254, 1979.

YU, J.Q.; HUANG, L.F.; HU, W.H.; ZHOU, Y.H.; MAO, W.H.; YE, S.F.; NOGUÉS, S. A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 399, p. 1135-1143, 2004.

YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A. 24-Epibrassinolide modulates growth, nodulation, antioxidant system, and osmolyte in tolerant and sensitive varieties of *Vigna radiata* under different levels of nickel: A shotgun approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 57, n. 1, p. 143-153, 2012.

ZHANG, S.; CAI, Z.; WANG, X. The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 11, p. 4543-4548, 2009.

ZHANG, S.; HU, J.; ZHANG, Y.; XIE, X.J.; ALLEN KNAPP. Seed priming with brassinolide improves lucerne (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth in relation to physiological changes under salinity stress. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 58, n. 8, p. 811-815, 2007.

ZHANG, Y.P.; HE, J.; YANG, S.J.; CHEN, Y.Y. Exogenous 24-epibrassinolide ameliorates high temperature-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Cucumis melo*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 58, n. 2, p. 311-318, 2014.