

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA ALTERNATIVA
PARA O TESTE DE FRIO EM SEMENTE DE SOJA**

Bruno Guilherme Torres Licursi Vieira

Orientador: Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção e Tecnologia de Sementes).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNO GUILHERME TORRES LICURSI VIEIRA – Nasceu em Londrina, Paraná, em 29 de setembro de 1980, filho de Paulo Sergio Licursi Vieira e Sônia Maria Torres. Formou-se em Ciências Biológicas, em 2004, pelo Centro Universitário Filadélfia de Londrina (UNIFIL). De 2001 a 2004 durante a graduação, estagiou na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja, Londrina - PR, nas áreas de Produção, Tecnologia e Patologia de Sementes, Entomologia Agrícola e Biotecnologia Vegetal, onde trabalhou com qualidade física, bioquímica, fisiológica, genética e sanitária de semente, bem como o estudo da biologia de percevejos pragas da cultura da soja. Iniciou o mestrado, em março de 2005, em Agronomia, área de concentração em Produção e Tecnologia de Sementes, na Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal.

Aos meus pais, Paulo Sergio e Sônia Maria,
aos meus irmãos Ivan Henrique, Mariana,
Poliana e Maria Luiza e minha querida tia
Gisele, pessoas sempre presentes em todos
momentos de minha vida.

Ofereço!

Ao meu amado filho Eduardo, pelos
momentos não dedicados a ele.

Dedico, Amo você.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, fonte de inspiração permanente,
- Aos meus familiares Amauri, Joel, Teco, Nione e especialmente meu avô Ernane, pelo apoio e incentivo constante,
- Ao Dr. Francisco Carlos Krzyzanowski, pesquisador da Embrapa soja, por acreditar no meu trabalho ao longo destes anos, e principalmente pela amizade,
- Ao Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira, Fcav/Unesp, pelas valiosas orientações neste trabalho, pela disposição dedicada, e principalmente pela amizade,
- Ao Engº. Agrº. Reinaldo Chitolina Filho, pela concessão de apoio financeiro e infra-estrutura para execução deste trabalho,
- À minha namorada Roberta, por estar ao meu lado nos diversos momentos desta jornada,
- À Dona Cida e Sr. Jacob, pelo carinho e disposição em ajudar,
- À Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela excelência no ensino, um lugar para se guardar,
- A Cooperativa dos Agricultores da Região de Orândia (Carol), em especial ao Engº. Agrº. José André Pazeto, divisão de semente, pelo apoio financeiro no início desta jornada,

- À Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual não seria possível chegar até aqui,
- Aos funcionários dos laboratórios de tecnologia e de patologia de semente da Embrapa Soja Elisa, George, Vilma, Sonia e Antonio, pelos ensinamentos e amizade durante os anos de estágio,
- Aos pesquisadores da Embrapa Soja Dr. Ademir A. Henning, Dr. José de Barros França Neto, Dr. Nilton Pereira da Costa,
- Aos amigos da Entomologia Agrícola da Embrapa Soja Jovenil, Edson, Joacir, Fábio, Ivanilda, Jairo, Tetê, pessoas de bem,
- Às secretárias da diretoria da Unesp, Marta e Mônica, e do Depto. de Produção Vegetal, Marisa e Mariângela, pela disposição permanente em ajudar,
- Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da UNESP Lázaro José Ribeiro da Silva (Gabi) e Rubens Libório (Faro), pelo apoio durante a realização deste trabalho,
- Aos funcionários da Dedini Unidade de Sementes Alex, Alysson, Andréa, Antonio João, Daniel, Fran, Giuliano, Marcelo, Roni, Silvestrini e Tuti,
- Aos amigos de graduação, Aguida, Alan, Viviane, Débora, Fred, Wilmara, Rose, Fábio, Vanderlei, Rodolfo, Carol, Danuza, Tanara, Ana Paula,
- Aos amigos do curso de Pós-graduação: César, Cristian, Breno, Adriana (cretina), Fabiana de Simoni, Fabiana dos Santos, Daniela (Gaúcha) Dani

Sarti, Franco, Marcelo, Airton, Ronaldo, Danilo, Gustavo (Brutus), Gustavo (barrigada) Cláudia (portuga) Cleia, Magnólia, Peterson, Ana Paula Penariol, Josué, Adriana Wain, Thais Frigeri, Onã, Renata Stolf, Lizandra e todos demais, por terem tornado o convívio mais prazeroso durante estes anos.

SUMÁRIO

Página	
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Avaliação da qualidade da semente de soja.....	2
2.2 Efeito de baixas temperaturas sobre o processo de germinação.....	4
2.3 O uso do teste de frio na avaliação do vigor de semente.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Análise em laboratório.....	9
3.1.1. Determinação do teor de água (base úmida).....	9
3.1.2. Teste de germinação.....	10
3.1.2.1. Em papel germitest.....	10
3.1.2.2. Em areia.....	10
3.1.3. Teste de tetrazólio.....	10
3.1.4. Teste de condutividade elétrica (CE).....	11
3.1.5. Teste de envelhecimento acelerado (EA).....	11
3.1.6. Emergência de plântulas em campo.....	11
3.1.7. Análise patológica.....	12
3.1.8. Teste de frio.....	12
3.8.1 Em caixa com terra.....	12
3.8.2 Em rolo de papel com terra.....	13
3.8.3 Em rolo de papel sem terra.....	13
3.8.4 Procedimento alternativo.....	13
3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA ALTERNATIVA PARA O TESTE DE FRIO EM SEMENTE DE SOJA

RESUMO - O teste de frio tem sido usado principalmente na avaliação do vigor de semente de milho. Porém, seu uso para outras espécies como feijão, soja, algodão e ervilha têm aumentado em todo o mundo. O presente trabalho teve por objetivo adequar metodologia alternativa do teste de frio para avaliação do vigor de semente de soja por meio de uma fonte uniforme de tratamento térmico que é a coluna de água resfriada. Foram utilizados seis lotes comerciais da cultivar BRS – 133, com potenciais fisiológicos distintos. A qualidade fisiológica dos lotes de sementes foi avaliada por meio dos testes de: germinação em papel e areia, tetrazólio, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, emergência de plântulas em campo e sanidade e também determinado o teor de água dos mesmos. Para composição dos diferentes procedimentos do teste de frio foram utilizadas temperaturas de 10 e 15 °C, tempo de permanência no frio por cinco dias, tratamento químico da semente e quatro procedimentos: caixa com terra, rolo de papel com terra, rolo de papel sem terra e metodologia alternativa, rolo de papel sem terra sob água refrigerada. Os diferentes procedimentos para condução do teste frio apresentaram coeficientes de variação muito próximos, com destaque a metodologia rolo de papel com terra e procedimento alternativo, em média, com 94 e 93% de plântulas normais respectivamente e CV de 3,29 para ambos testes. Com base nos resultados, pode-se concluir que, na metodologia alternativa, os resultados foram satisfatórios para semente de soja, sendo consistentes com os obtidos com o uso do procedimento tradicionalmente empregado em laboratórios de análise de semente, podendo ambos ser utilizados.

Termos para Indexação: *Glycine max*, qualidade fisiológica, germinação, emergência, testes de vigor.

ADJUSTMENT OF ALTERNATIVE METHODOLOGY FOR THE COLD TEST IN SOYBEAN SEEDS

ABSTRACT - The cold test has been employed mainly for corn seeds. However, its use is steadily growing for crops seeds as cotton, soybean, common bean and pea. The present work was carried out with the objective to adjust an alternative method of the cold test for soybean seed vigor determination. Six commercial soybean seeds lots of cultivar BRS –133 of distinct physiological quality were used with and without seed treatment. The physiological quality of seeds lots were evaluated by, germination in paper towel and sand box, seedling field emergence, tetrazolium, accelerated aging, electrical conductivity and pathological test. Also the seed moisture content was determined. The temperature used were 10 and 15° C during five days. Four cold test procedures were evaluated: 1) plastic boxes with soil; 2) rolled paper towel with soil; 3) rolled paper towel without soil an 4) alternative procedure, using rolled paper towel without soil under cold water. All cold test procedure had close coefficient of variation (CV). The alternative procedure and the rolled paper towel with soil showed the best performance, with germination of 94 and 93% respectively and Cv of 3,29% for both tests. Based on the results the following conclusion can be drawn, the alternative methodology showed satisfactory results for soybean seed, yielding consistent results compared to the traditional procedure used.

Index Terms: *Glycine max*, physiological quality, germination, emergence, vigor tests.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos fatores que contribuíram para o avanço da produtividade da cultura da soja no Brasil, o uso de semente de alta qualidade teve papel significativo. Constitui-se num dos insumos mais importantes para a agricultura, além de ser o único veículo que leva ao agricultor todo potencial genético de uma cultivar com características superiores. Assim, a utilização de semente de alta qualidade é base para o sucesso de todas as outras operações, necessárias na lavoura para que se possa alcançar altos rendimentos.

A qualidade da semente é influenciada por vários fatores que podem ocorrer ainda no campo, durante a colheita, na secagem, no processamento, no armazenamento e na semeadura. Desse modo, empresas produtoras de semente vêm buscando novas tecnologias para garantir a produtividade e, principalmente, a qualidade do produto destinado ao agricultor. Dentre os diversos procedimentos empregados, a avaliação do vigor é um requisito muito importante e que deve estar contido no programa de controle de qualidade da empresa.

Assim, para avaliar o vigor tem-se como possibilidade o uso em laboratório de vários procedimentos, dentre eles o teste de frio. É um dos mais antigos e populares testes para avaliação do vigor de semente de milho e soja tanto em regiões de clima temperado como tropical ou sub-tropical.

A maior dificuldade com o teste de frio para sementes de soja é a falta de uniformidade em experimentos realizados com terra. A terra difere em umidade, pH, composição física de partícula, e patógenos, fatores que contribuem com resultados divergentes.

O objetivo deste trabalho foi o de comparar diferentes procedimentos para condução do teste de frio em semente de soja, com o procedimento alternativo do pré condicionamento em papel de germinação e o condicionamento em embalagem hermética sob água resfriada a 10 e 15^o C por cinco dias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTE DE SOJA

Semente de alta qualidade é fundamental para o estabelecimento de populações adequadas em campo. A qualidade de um lote de sementes é o somatório de todos atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários que resulta da interação de características que determinam o seu valor para semeadura (MARCOS FILHO, 1999; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

O sucesso da produção e da obtenção de altas produtividades na cultura da soja depende fortemente da utilização de semente de elevada qualidade. No entanto, por muitos anos, pesquisadores, tecnologistas, produtores de sementes e agricultores tomavam suas decisões com base nas informações fornecidas pelo teste de germinação (MARCOS FILHO et al., 1987).

Todavia, não satisfeitos com as informações fornecidas por este teste, realizado sob condições de ambiente controlado que geralmente conduzem à superestimativa de sua qualidade e embalados pelo crescente avanço da tecnologia na agricultura, em que a emergência, o crescimento e a maturação devem ser uniformes, para permitir a mecanização da colheita e dos tratos culturais, outros parâmetros da qualidade fisiológica da semente passaram ser investigado.

Desta forma, a pesquisa em tecnologia de semente vem concentrando esforços no sentido de elucidar os mais variados aspectos referentes ao componente fisiológico da qualidade, dentro do contexto, atenção especial tem sido dedicada ao teste de vigor (MARCOS FILHO, 2005).

Embora o conceito de vigor tenha sido estabelecido há alguns anos, nenhuma definição até hoje proposta foi universalmente aceita, portanto, de forma sintética, o objetivo básico do teste de vigor é, de identificar possíveis diferenças no potencial

fisiológico de lotes que apresentem poder germinativo semelhante (MARCOS FILHO et al., 1987).

O vigor da semente detecta as modificações deletérias mais sutis resultantes do avanço da deterioração, não revelados no teste de germinação. Por isso, o uso de semente de soja com vigor comprometido pode resultar na obtenção de populações de plantas inadequadas, o que resultará na redução da produtividade (FRANÇA NETO et al., 1994).

Portanto, para melhor compreensão do conceito de vigor de semente, deve-se conhecer o significado do processo de deterioração das mesmas. Deterioração pode ser resumida como sendo a perda da capacidade da semente em produzir plântula normal. A perda dessa capacidade é inevitável com o tempo, resultante de alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem na semente durante seu ciclo de vida, particularmente após a maturidade fisiológica (DELOUCHE, 1963).

Por outro lado, HAMPTON (2002) afirma que, se o termo qualidade define “grau, padrão ou símbolo de excelência”, a qualidade de semente deve ser conceituada como o padrão de excelência de um conjunto de características que determinam o potencial de desempenho da semente após a semeadura em campo ou durante o armazenamento.

Desse modo, a avaliação do vigor torna-se indispensável, devido aos diversos fatores que contribuem para deterioração da mesma tanto em campo como no armazém. É imprescindível a utilização de métodos capazes de oferecer resultados confiáveis.

Para tanto, recomenda-se sempre o uso de mais de um teste de vigor (VIEIRA et al., 1994). Por exemplo, o DIACOM (Diagnostico Completo da Qualidade da Semente de Soja), é um sistema que inclui mais de um procedimento, podendo-se ainda, inserir os teste de envelhecimento acelerado e de condutividade elétrica, como procedimentos adicionais (FRANÇA NETO & HENNING, 1992).

O DIACOM tem por finalidade avaliar o potencial de germinação de lotes de semente infectados ou não por *Phomopsis* spp.; *Fusarium semitectum* e outros fungos relacionados a semente de soja, fornecendo diagnóstico das possíveis causas de

problemas de baixa qualidade, evitando a reprovação de lotes de sementes de soja de boa qualidade, que seriam descartados se apenas o teste de germinação fosse utilizado. O procedimento envolve a utilização dos testes de tetrazólio, patologia de sementes (método papel de filtro), emergência em areia e teste de germinação. Esse método permite conhecer a viabilidade da semente sem interferências do processo de infecção causado por patógenos associados à mesma. (FRANÇA NETO & HENNING, 1992).

2.2 EFEITO DE BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE O PROCESSO DE GERMINAÇÃO

A qualidade de um lote de semente compreende uma série de características ou de atributos que determinam o seu valor para a semeadura, os quais são considerados como de natureza genética, física, fisiológica e sanitária. Destes, pode ser destacado o potencial fisiológico, diretamente responsável pelo desempenho das sementes em campo e armazenamento (RODO et al., 2000).

A crescente demanda de semente de soja de alto padrão tem exigido da indústria de semente um controle de qualidade mais preciso. Tal exigência poderá ser suprida pelo aperfeiçoamento de teste de vigor para espécie em produção.

O teste de germinação rotineiramente utilizado em laboratório de análise de semente para monitorar o potencial fisiológico de semente de soja, apresenta sérias limitações (FRANÇA NETO, 1994).

No que diz respeito a germinação, a semente de soja é relativamente exigente quanto às condições de umidade, por ser rica em óleo e proteína, traz, muitas vezes, sérios problemas à germinação de semente da espécie, não devendo ser semeada em solos secos, pois nesta condição ocorre uma maior evapotranspiração onde a semente atinge apenas 40% do teor de água, proporcionando a exsudação de materiais orgânicos e por conseguinte o ataque de fungos do solo, inclusive *aspergillus*. Acredita-se que os problemas são mais sérios no Brasil, país tropical, do que nos EUA e

Argentina, países de clima temperado, onde embora se tem alta umidade, tem-se ao mesmo tempo temperatura mais amena (VIEIRA et al., 1982).

A germinação é um processo que, como todos os outros biológicos, consome energia. A energia utilizada na germinação é proveniente da degradação de substâncias de reserva da própria semente, utilizando-se o oxigênio para “queimar” esses produtos. Em outras palavras, a germinação faz uso da energia proveniente da respiração, e como uma semente, por mais baixo que seja seu teor de água, nunca deixa de respirar, poder-se-ia, então, dizer que o processo maturação/germinação é ininterrupto; o que ocorre entre essas duas etapas aparentemente distintas é apenas uma redução da intensidade do fenômeno a tal ponto que parece nada estar ocorrendo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Variações nas condições ambientais, em função da disponibilidade de água, temperatura e oxigênio são essenciais e exercem influência acentuada sobre a germinação, bem como na manifestação do potencial fisiológico da semente e, portanto, se a semeadura for realizada em condições ambientais desfavoráveis, a emergência de plântulas normais pode ser inferior à determinada em laboratório (MARCOS FILHO, 2005).

Dos fatores ambientais acima citados, a temperatura constitui-se num dos quesitos mais importantes na germinação de sementes de qualquer espécie. A temperatura influencia a germinação tanto por agir sobre a velocidade de absorção de água, como também sobre as reações bioquímicas que determinam todo processo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Semente de diferentes espécies apresentam comportamentos variáveis em função da temperatura, o que pode fornecer informações de interesse biológico e ecológico (LABOURIAU, 1983). Dentro da faixa de temperatura em que as sementes de uma espécie germinam, há uma temperatura ótima, denominada como aquela em que ocorre o máximo de germinação em menor intervalo de tempo. Temperaturas mínima e máxima são aquelas em que a germinação é zero (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989; BORGES & RENA, 1993).

Os efeitos negativos causados por baixas temperaturas durante o período de embebição da semente sobre a germinação, e subsequente crescimento e desenvolvimento da plântula e da planta, são conhecidos como injúrias por resfriamento (POPINIGIS, 1985).

A emergência das plântulas é diminuída e o seu período prolongado devido a baixa temperatura do solo em algumas regiões. Além disso, os efeitos tornam-se aditivos, sendo a velocidade de crescimento reduzida proporcionalmente ao número de dias de resfriamento (CHRISTIANSEN, 1967).

Durante a embebição a baixa temperatura, pode ocorrer lixiviação de materiais orgânicos, possivelmente nucleotídeos, o que irá influenciar dos microrganismos do solo, deteriorando a semente. O vigor e a cobertura protetora exercem controle sobre o efeito de baixas temperaturas nas plântulas (POLLOCK & TOOLE, 1966).

Contudo, a elevação da temperatura provoca redução da viscosidade e aumento da energia cinética da água, beneficiando a embebição e a velocidade das reações componentes do metabolismo (MARCOS FILHO, 2005).

2.3 USO DO TESTE DE FRIO NA AVALIAÇÃO DO VIGOR DE SEMENTE

Várias técnicas para análise de semente, conhecida como testes de vigor foram desenvolvidas, fornecendo informações próximas ao desempenho em campo. O teste de vigor habilita o produtor e usuário de semente a determinar e comparar o vigor de diferentes lotes antes que sejam comercializados (McDONALD, 1988), fornecendo inclusive, informações para fins de semeadura.

Portanto, diversos segmentos do setor de produção de semente de grandes culturas têm demonstrado grande interesse na utilização de testes de vigor que avalie adequada e seguramente a qualidade fisiológica da semente. Assim, testes que forneçam resultados confiáveis merecem cada vez mais atenção por parte dos pesquisadores.

O teste de frio é um dos mais antigos e populares testes para avaliação do vigor de semente. Foi desenvolvido, inicialmente, para avaliar o potencial fisiológico de semente de milho, procurando simular condições desfavoráveis (excesso de água, baixas temperaturas e presença de fungos do solo) que ocorrem, com freqüência, durante a época de semeadura na área denominada Cinturão do Milho, nos EUA (CÍCERO & VIEIRA, 1994). Muitos autores têm relatado que a atividade dos microrganismos de solo é um parâmetro crítico do teste de frio, sendo que entre 6 e 10° C os patógenos podem ter sua virulência inativada, fato esse, observado em arroz irrigado (NIJENSTEIN, 1985).

Os fungos reduzem o vigor da plântula em temperaturas menores, sendo que a mesma tem efeito marcante sobre a severidade da doença, e, este efeito varia com o tipo de fungo. Há um aumento na severidade das doenças de raiz, fazendo decrescer a sobrevivência de plântulas. Em trevo subterrâneo, podridão radicular ocorre entre 10 e 15° C e o principal patógeno envolvido é o *Pythium* (WONG et al., 1984), sendo que o mesmo verifica-se para diferentes espécies cultivadas em condições de baixa temperatura (KAISER & HANNAN, 1983; NIJENSTEIN, 1985).

A eficiência do teste de frio foi comprovada experimentalmente por diversos pesquisadores e foi sugerido seu uso na seleção de linhagens de milho antes do período de semeadura, dado sua sensibilidade em prognosticar o desempenho das sementes em campo. Esse teste tem sido utilizado com sucesso, também, para diferenciar níveis de vigor relacionados com a forma, peso, tamanho e tratamento de sementes (MARCOS FILHO et al., 1977; SILVA & MARCOS FILHO, 1979).

No Brasil, tem sido utilizado por empresas produtoras de semente, principalmente nos estados do sul e sudeste, onde lavouras de algodão, milho e soja podem ser semeadas entre o início do mês de setembro e meados de outubro. Nessa época, é comum a queda acentuada de temperatura e, dependendo do nível de vigor dos lotes de sementes, podem ser verificados sérios problemas na emergência das plântulas em campo (KRZYZANOWSKI et al., 1991).

O Comitê de Vigor da Association of Official Seed Analysts (AOSA, 2002) descreve procedimentos para a condução do teste nos EUA; no entanto, o mesmo não

tem sido padronizado entre diferentes laboratórios de empresas privadas, que geralmente conduzem suas próprias versões do teste.

Algumas variações com relação a metodologia do teste foram propostas, no sentido de facilitar a sua execução, como o método desenvolvido por HOPE (1955) e CRUSIER (1957), citados por FIALA (1981), que consiste na utilização de rolos de papel de germinação com terra, reduzindo a quantidade de terra e o espaço necessário, esse último, fator limitante para alguns laboratórios. LOEFFLER et al. (1985), procurando manter os princípios básicos do teste de frio sugeriram a utilização de rolos de papel de germinação sem terra, posteriormente mais conhecido como teste de frio sem terra. Segundo os autores, esse método apresentou sensibilidade suficiente para detectar efeitos de danos causados pela secagem em sementes de milho, além de proporcionar maior reprodutibilidade de resultados, devido à simplicidade do método, quando comparado ao anterior.

Todavia, diversas espécies são avaliadas pelos diferentes procedimentos existentes do teste de frio, entre elas milho (MOLINA et al., 1987; CASEIRO & MARCOS FILHO, 2000 e 2002); trigo (FANAN et al., 2006); maxixe (TORRES et al., 1999); feijão (MIGUEL & CÍCERO, 1999a) soja (RICE, 1960; JOHNSON & WAX, 1978; TAO, 1978; VIEIRA et al., 1992; MIGUEL & CÍCERO, 1999b; CARVALHO et al., 2000); pimentão (FERNANDES et al., 1999); arroz (CAMPOS, 1998); algodão (KRZYZANOWSKI, 1980; MIGUEL et al., 2001).

Assim o teste de frio visa a avaliação dos efeitos da combinação de baixa temperatura, ação de microrganismos e alta umidade do substrato, identificando diferenças no potencial fisiológico de amostras de lotes de semente (CASEIRO & MARCOS FILHO, 2000 e 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP e no Laboratório de Análise de Sementes da Empresa Dedini Unidade de Sementes (DUS) em Aguaí, SP, durante a safra 2005/06.

3.1. Análise em laboratório

Foram utilizados seis lotes comerciais de semente de soja, cultivar BRS – 133, com potencial fisiológico distinto. Para determinação do potencial fisiológico, os lotes foram submetidos ao DIACOM (diagnóstico completo da qualidade da semente de soja) (FRANÇA NETO & HENNING, 1992), onde estão inclusos os testes de tetrazólio, de germinação, emergência de plântulas em areia e patologia de sementes.

Para melhor caracterização, foram também, utilizados os teste de condutividade elétrica (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999), de envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 1999), de emergência de plântulas no campo (NAKAGAWA, 1999), além da determinação do teor de água inicial da semente (BRASIL, 1992).

Durante as avaliações, as sementes foram armazenadas em câmara fria e seca (10° C e umidade relativa do ar de 50-60%), para preservação do potencial fisiológico durante a realização do teste.

3.1.1. Determinação do teor de água (base úmida)

O teor de água das sementes foi determinado pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ$ C, por 24 horas e os dados expressos em porcentagem (BRASIL, 1992).

3.1.2. Teste de germinação

3.1.2.1. Em papel germitest

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, utilizando-se como substrato papel de germinação, tipo germitest, umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes seu peso seco e colocados em germinador previamente regulado a 25° C (BRASIL, 1992). A avaliação das plântulas normais foi realizada com uma única contagem no quinto dia após semeadura (BRASIL, 1992).

3.1.2.2. Em areia

O teste de emergência de plântulas em areia foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, utilizando-se como substrato areia de rio umedecida com água até 60% da sua capacidade de retenção. Foram mantidos em temperatura ambiente, 25 - 30° C (BRASIL, 1992). A avaliação das plântulas normais foi realizada com uma única contagem no quinto dia após semeadura.

3.1.3. Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio foi conduzido em duas sub-amostras de 50 sementes para cada tratamento, pré-condicionadas em papel de germinação, tipo germitest, umedecidos e mantido nestas condições por 16 horas a 25° C. Posteriormente, as sementes foram transferidas para copos plásticos (capacidade 50 mL) com solução de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% e mantidas em câmara

escura por até três horas a 40° C. Decorrido este período, as sementes foram lavadas em água corrente e logo em seguida, avaliadas de forma individual com corte longitudinal ao eixo embrionário (FRANÇA NETO et al, 1999).

3.1.4. Teste de condutividade elétrica

Utilizou-se o método de condutividade elétrica de massa, com quatro repetições de 50 sementes puras para cada lote. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em copos plásticos (capacidade de 200 mL), contendo 75 mL de água destilada e desionizada, durante 24 horas a 25° C. Decorrido o período de exposição, a condutividade elétrica da solução de embebição foi determinada em condutímetro DIGIMED - DM 31 e os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999).

3.1.5. Teste de envelhecimento acelerado

Foram utilizados 42g de sementes, distribuídas em camada única sobre a tela de inox, no interior de caixa plásticas de germinação mantidas à temperatura de 42° C e umidade relativa do ar de aproximadamente 100% por 48 horas (AOSA, 2002; MARCOS FILHO, 1999).

3.1.6. Emergência de plântulas em campo

Para o teste de emergência de plântulas em campo, foram utilizados quatro repetições de 50 sementes por lote. Antes da semeadura, foi efetuado o tratamento das mesmas com Derosal Plus® (CARBENDAZIM + THIRAM) na proporção de 2,5 mL do produto comercial, mais 2,5 mL de água para cada quilo de semente (HENNING, 2004).

As sementes foram semeadas no espaçamento 0,45 m entre linhas, profundidade de 3 a 4 cm. A avaliação foi realizada no 10º dia após semeadura.

3.1.7. Análise patológica

Foi utilizado o método do papel - de filtro sem congelamento (Blotter) com 10 repetições de 10 sementes para cada tratamento, utilizando – se como substrato papel filtro (80g/m²) em caixas plásticas de germinação (10 x 10 x 3,5) mantidas por sete dias a 20° C sob luz branca. A avaliação foi realizada individualmente em cada semente no sétimo dia após semeadura (NEEGAARD, 1977).

3.1.8. Teste de frio

Em todas as versões do teste de frio avaliadas utilizou-se semente tratada e não tratadas. O fungicida empregado foi o Derosal Plus® (CARBENDAZIN + THIRAM).

3.1.8.1. Em caixa com terra

Foram semeadas quatro repetições de 50 sementes com e sem tratamento fungicida (Derosal Plus®) para cada lote em caixas plásticas (30 x 20 x 10 cm). Foi utilizado como substrato duas partes de terra e uma de areia umedecida com água até atingir 60% da sua capacidade de retenção e mantidas à temperatura de 10 e 15º C, durante cinco dias. Decorrido o período, as caixas permaneceram à temperatura ambiente (25 - 30° C) por cinco dias (CICERO & VIEIRA,1994). A avaliação das

plântulas normais foi realizada com uma única contagem no quinto dia após transferência para temperatura ambiente (BRASIL, 1992).

3.1.8.2. Em rolo de papel com terra

Foram semeadas quatro repetições de 50 sementes com e sem tratamento fungicida (Derosal Plus®) utilizando-se como substrato papel de germinação, tipo germitest, umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes seu peso seco. Sobre elas foram distribuídos 60 mL mistura terra/areia. Os rolos foram envolvidos em embalagens de polipropileno na posição vertical dentro de recipientes plásticos e mantidos em câmara fria nas temperaturas de 10 e 15° C por cinco dias (BARROS et al.; 1999). Decorrido o período, os rolos foram transferidos para germinadores a 25° C (BRASIL, 1992). A avaliação das plântulas normais foi realizada com uma única contagem no quinto dia após transferência para temperatura ambiente (BRASIL, 1992).

3.1.8.3. Em rolo de papel sem terra

Foram semeadas quatro repetições de 50 sementes com e sem tratamento de fungicida (Derosal Plus®) utilizando-se como substrato papel de germinação, tipo germitest, umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes seu peso seco. Os rolos foram envolvidos em embalagens de polipropileno na posição vertical dentro de recipientes plásticos e mantidos em câmara fria às temperaturas de 10 e 15° C por cinco dias. Decorrido esse período, os rolos foram transferidos para germinadores a 25° C (LOEFFLER et al., 1985). A avaliação das plântulas normais foi realizada com uma única contagem no quinto dia após transferência para temperatura ambiente (BRASIL, 1992).

3.1.8.4. Procedimento alternativo

Em função das dificuldades para padronização da metodologia tradicional (caixa com terra), onde o substrato utilizado pode apresentar diferenças na umidade, pH, composição de partícula e, patógenos, tornando-se fatores contribuintes com resultados divergentes, torna-se importante a busca de procedimentos alternativos.

Para tanto, foi adaptado o protótipo de equipamento, com a função de criar condições estressantes de alta umidade do substrato e baixa temperatura. Foi utilizado como substrato papel para germinação (Papel germitest) sem terra, considerada por alguns autores fator limitante (HOPPE, 1956; CROSSIER, 1957; LOEFFLER et al., 1985; CASEIRO & MARCOS FILHO, 2002).

Na adaptação e desenvolvimento do equipamento, foram utilizados:

- Banho termostático Tecnal TE – 184;
- Caixa de isopor 54 x 33 x 28 capacidade 50 L;
- Mangueiras de silicone transparente de 2 mm;
- Registro de 1/2" com sistema de fechamento rápido;
- Bomba submersa (Chosen cx 300) capacidade 1000 L/h;
- Termômetros de mercúrio de 0° C a 100° C;
- Armação de aço inox com quatro repartições;
- Anilhas de 20 Kg (ferro fundido);
- Nobreak;
- Redutores 3/4" para 1/2";
- Seladora de embalagens;
- Embalagens plásticas de xx micras

A primeira etapa realizada foi a instalação dos redutores de água de 3/4" para 1/2", bem como a instalação da bomba submersa na parte frontal inferior (interior) da caixa de isopor (Figuras 1 e 2).

Na segunda etapa foi realizada a conexão entre o banho termostático (Figura 3) e caixa de isopor pelas mangueiras de silicone. Foi necessário também, a instalação de registro de 1/2", para controlar o fluxo de água entre a máquina e a caixa de isopor (Figura 4 e 5)".

Na terceira etapa, a metodologia alternativa do teste de frio foi conduzida, utilizando-se quatro repetições de 50 sementes com e sem tratamento fungicida (Derosal Plus®), em papel de germinação tipo germitest, umedecidos com 2,5 vezes seu peso seco. Cada repetição foi acondicionada em embalagem de polipropileno devidamente selada e colocadas dentro das repartições da armação de aço inox mantidas em água resfriada a 10 e 15° C por cinco dias (Figura 6). Decorrido período, os rolos foram mantidos em germinadores a 25° C (BRASIL, 1992). A avaliação foi realizada no 5° dia após transferência.



Figura 1. Instalação dos redutores de 3/4" para 1/2" na porção inferior frontal caixa de isopor.



Figura 2. Instalação da bomba submersa no interior e inferior a caixa de isopor.



Figura 3. Banho termostático Tecnal, modelo Te-184.



Figura 4. Conexão da caixa de isopor com banho termostatizado Tecnal, modelo Te-184 por meio de mangueiras de silicone.

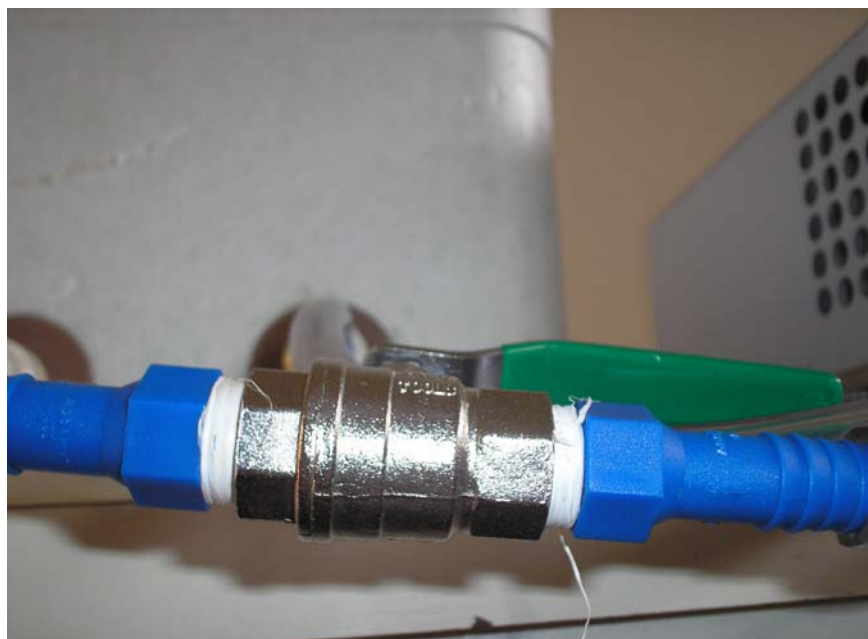


Figura 5. Registro de 1/2" utilizado para controle do fluxo de água entre o banho termostatizado Tecnal, modelo Te-184 e caixa de isopor.



Figura 6. Armação de aço inox com quatro repartições utilizada na acomodação das embalagens seladas.

3.2. Análise estatística

O experimento foi conduzido em esquema fatorial $2 \times 2 \times 4 \times 6$ (temperaturas, tratamento químico, metodologias e lotes) em blocos casualizados, com quatro repetições, para os diferentes procedimentos do teste de frio.

Os dados referentes a qualidade fisiológica dos lotes foram analisados em DIC (Delineamento inteiramente casualizado), com significância testada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de laboratório e de campo foram submetidos à análise de correlação simples, com sua significância testada pela comparação de médias a 5% de probabilidade, com vistas a selecionar a melhor combinação de temperatura e substrato que melhor evidenciasse os diferentes níveis de qualidade e apresentasse maior correlação com emergência de plântulas em campo.

Na execução das análises estatísticas foi utilizado o programa computacional ASSISTAT - Assistência Estatística (Silva & Azevedo, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação do teor de água das sementes ficou dentro dos padrões aceitos e indicado na literatura, ou seja, inferior a três pontos percentuais (MARCOS FILHO, 1999). Fato imprescindível para execução dos testes, bem como para padronização das avaliações e obtenção de resultados consistentes para um teste de vigor (LOEFFLER et al., 1988).

Os seis lotes utilizados no presente estudo apresentaram níveis distintos no teste de germinação (Tabela 1), entretanto, sem diferença significativa entre eles, mas acima do padrão mínimo de 80% exigido para comercialização (BRASIL, 2004).

Analisando os resultados da Tabela 1, observa-se que no teste de germinação em areia, os lotes 5 e 6 foram fisiologicamente inferiores aos demais, mas dentro do padrão de comercialização. Nos testes de vigor: EC, EA e TZ 1-3 não se observou diferenças estatísticas significativas entre os lotes avaliados.

Ainda na Tabela 1, nota-se que o lote 3 apresentou condutividade elétrica 25 unidades de μS mais elevada que o lote 4. Tal fato ocorreu devido a grande porcentagem de dano mecânico detectado no teste de tetrazólio nível 6-8 (Tabela 2). A semente de soja é muito sensível ao dano mecânico, uma vez que as partes vitais do eixo embrionário (radícula, hipocótilo e plúmula) estão situadas sob um tegumento pouco espesso, que praticamente não lhe oferece proteção (FRANÇA NETO & HENNING, 1984).

O dano mecânico é apontado, por muitos pesquisadores (QUEIROZ et al., 1978; FRANÇA NETO & POTTS, 1979; COSTA et al., 1979), como dos mais sérios problemas da produção de semente de soja, principalmente durante a colheita e armazenamento. A injúria mecânica é conseqüência, na sua maior parte, da mecanização das atividades agrícolas, de sorte que é um problema praticamente inevitável (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Contudo, deve-se monitorar os lotes armazenados com níveis elevados com este tipo de dano, o armazenamento inadequado (temperatura e umidade relativa do ar

elevada) poderá intensificar o processo de deterioração, devido facilitar a troca de umidade em decorrência da falência da capacidade regulatória do tegumento no processo de equilíbrio higroscópico, podendo resultar em severas reduções de germinação e vigor, principalmente nos meses finais de armazenamento (FRANÇA NETO et al., 1999).

Tabela 1. Teor de água (TA) germinação em papel (GP), germinação em areia (GE), emergência de plântulas em campo (EC) e testes de envelhecimento acelerado (E.A), tetrazólio (TZ, vigor e viabilidade) e de condutividade elétrica (CE) de seis lotes comerciais de semente de soja, cultivar BRS – 133.

Lotes	T.A	GP	GE	EC	EA	TZ 1-3	TZ. 1-5	CE
1	10,3	90 a	94 a	89 a	94 a	88 a	92 a	81 d
2	10,2	93 a	93 a	95 a	92 a	85 a	91 a	86 cd
3	9,7	94 a	93 a	92 a	90 a	82 a	89 a	*112 a
4	9,7	93 a	94 a	89 a	94 a	88 a	93 a	87 cd
5	9,8	86 a	85 b	88 a	88 a	90 a	93 a	99 b
6	9,4	87 a	83 b	89 a	87 a	87 a	89 a	92 bc
CV%		5,3	3,4	5,5	4,5	5,4	3,8	4,0
DMS		10,8	6,9	11,1	9,1	10,4	7,6	8,4
F		2,1	9,8	1,1	2,1	1,5	1,1	35,7

* Lote apresentando 10% de dano mecânico nível 6-8 no teste de tetrazólio

Tabela 2. Porcentagem de danos mecânicos (DM), por umidade (DU) e causados por percevejos (DP) em seis lotes comerciais de semente de soja cultivar BRS – 133, avaliado pelo teste de tetrazólio.

Lotes	DM		DU		DP	
	1 - 8	6 - 8	1 - 8	6 - 8	1 - 8	6 - 8
	-----%-----					
1	14	5	93	0	20	4
2	11	6	91	0	11	4
3	20	10	100	0	10	2
4	9	5	97	0	19	1
5	14	6	96	0	11	2
6	13	10	97	0	11	2

Por outro lado, os resultados obtidos pelo teste de sanidade (Tabela 3) indicaram a ocorrência de alguns patógenos nas sementes de soja, como *Penicillium* spp, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium semitectum*. Entretanto, não foram observadas na literatura, especificações quanto aos valores mínimo e máximo para os patógenos supra citados. Deve-se ressaltar que a atividade microbiana afeta o início do estabelecimento da cultura, principalmente em condições de baixa temperatura e alta umidade do solo (CÍCIERO & VIEIRA, 1994).

A associação entre semente e microrganismos patogênicos é estabelecida durante seu desenvolvimento vegetativo ou processo reprodutivo. O transporte de patógenos e a transmissão de doenças pela semente são verificados em praticamente todas espécies multiplicadas por sementes; vários desses patógenos são prejudiciais à germinação (NEEGAARD, 1977). Todavia, em baixas temperaturas, ocorre atraso na germinação e as sementes tornam-se suscetíveis a ataques por esses microrganismos (ISELY, 1950).

Tabela 3. Avaliação da qualidade sanitária de seis lotes comerciais de semente de soja cultivar BRS – 133, pelo método do papel filtro.

Lotes	<i>Penicillium</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium</i>
	-----%-----		
1	6	10	3
2	1	5	10
3	2	3	10
4	3	3	8
5	0	6	15
6	1	1	11

Na Tabela 4, observou-se que os lotes de 1 a 4 diferiram significativamente pelas metodologias usadas sendo, os lotes 5 e 6 de qualidade fisiológica inferior aos demais.

Observou-se também que os resultados de plântulas normais, obtidos nas diferentes metodologias, encontram-se na faixa de 88,3% a 96,3%. Esses valores estão de acordo com GRABE (1976), quando salienta que os lotes de qualidade adequada devem apresentar, no mínimo, 70% a 85% de plântulas normais como resultado do teste de frio. Os lotes avaliados apresentaram também desempenho superior no teste de emergência em campo, com médias entre 88% e 95% de plântulas normais (Tabela 1).

Ainda, na Tabela 4, com relação aos procedimentos utilizados para condução do teste de frio, a classificação dos lotes foi considerada consistente, pois verifica-se que as metodologias apresentaram de modo geral resultados semelhantes, os quais acusaram desempenho inferior para os lotes 5 e 6 não revelando diferença significativa entre eles. No teste de frio alternativo (ALTER), caixa com terra (CT) e rolo de papel sem terra (RPST), o lote 3 não apresentou diferença significativa com os lotes 5 e 6. no entanto, ao relacionar os resultados com o teste de emergência das plântulas em

campo, verificou-se desempenho semelhante tanto para o lote 3, quanto os lote 5 e 6. Isso indica o lote 3, como intermediário e os lotes 1, 2 e 4 como superiores.

De maneira geral, para todos os testes realizados, os coeficientes de variação obtidos foram relativamente baixos e aceitáveis para testes conduzidos em laboratório.

Tabela 4. Resultados do teste de frio obtido segundo diferentes procedimentos: Caixa com terra (CT), Rolo de papel com terra (RPT), Rolo de papel sem terra (RPST) e Procedimento alternativo (ALTER.) de seis lotes comerciais de sementes de soja cultivar BRS – 133.

Lotes	CT	RPT	RPST	ALTER.
1	92 ab	95 a	93 ab	93 b
2	92 a	96 a	93 ab	95 ab
3	91 abc	96 a	92 abc	92 bc
4	93 a	95 a	95 a	96 a
5	88 c	91 b	89 c	89 c
6	88 bc	91 b	90 bc	90 c
CV%	3,9	3,3	4,3	3,3
DMS	3,7	3,2	4,1	3,2
F	6,1	8,2	5,5	13,0

⁽¹⁾ Média seguida pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados mais expressivos foram obtidos com o teste de frio utilizando rolo de papel com terra. Porém, MIGUEL & CICERO (1999a); CARVALHO et al. (2000), trabalhando com semente soja e MIGUEL et al (2001) trabalhando com semente de algodão, verificaram que a metodologia rolo de papel sem terra proporcionou maiores valores. Nesse caso, não existe a microbiota do solo, o que facilita a padronização da metodologia e a uniformidade dos resultados obtidos (BURRIS & NAVRATIL, 1979).

Considerando o conjunto de testes de vigor utilizados para a avaliação do potencial fisiológico dos seis lotes comerciais da cultivar Brs-133, verifica-se que o teste alternativo (ALTER) apresentou a mesma consistência de resultados observados para os demais testes, notou-se ainda, que o coeficiente de variação entre as metodologias são muito próximos.

Já o teste de frio envolvendo caixas plásticas tendo como substrato a misturas terra + areia (2:1), apresentou os menores índices de plântulas normais em relação as demais variações do teste de frio e, como citado anteriormente, os lotes 5 e 6 destacando-se inferiormente dos demais lotes. Resultados semelhantes foram obtidos com sementes de soja (MIGUEL & CICERO, 1999b) e sementes de algodão (MIGUEL et al., 2001), onde independente do tempo e temperatura de exposição o teste de frio envolvendo esse tipo de substrato proporcionou maiores reduções na porcentagem de plântulas normais, pois períodos de frio mais prolongado promovem maior exsudação de açúcares essenciais ao desenvolvimento (WASSINK & HOEFMAN, 1992).

Estudos realizados por diversos pesquisadores (LOEFFLER et al., 1985; MOLINA et al., 1987; MEDINA & MARCOS FILHO, 1990) indicaram que o procedimento do teste de frio tradicional (caixa com terra) apesar de ser o mais severo, por oferecer condições mais estressantes, foi o mais sensível para separar lotes de sementes de milho com diferentes níveis de vigor, quando comparado a outros métodos.

Os resultados do teste de frio que utilizaram terra como substrato estão sujeitos a variação com o passar do tempo, por causa da inconstante atividade de microrganismos entre substratos de mesma ou de diferentes áreas (LOEFFLER et al., 1985). HOOKS & ZUBER (1963) informaram resultados variáveis quando terra foi obtida de diferentes fontes, dias e ano de coleta. Os autores sugeriram ainda que, fossem usados no teste de frio terra proveniente de mesmo local.

Contudo, BURRIS & NAVRATIL (1979) obtiveram correlações positivas com emergência de plântulas em campo utilizando terra esterilizada e não esterilizada como substrato.

De modo geral, a pesquisa tem procurado apontar soluções convenientes para o aperfeiçoamento do teste de frio, como a utilização do papel toalha com terra (HOPPE,

1956; CROSSIER, 1957) e rolo de papel sem terra (LOEFFLER et al., 1985), reduzindo a quantidade de substrato e espaço necessário, que muitas vezes tornam-se fatores limitantes para os laboratórios de análise de semente (HOPPE, 1956; CROSSIER, 1957; LOEFFLER et al., 1985; CASEIRO & MARCOS FILHO, 2002).

Os dados referentes a análise de correlação simples, calculadas entre a metodologia alternativa, procedimento tradicional (caixa com terra) e os testes de avaliação da qualidade fisiológica (Tabela 5), mostraram poucas correlações significativas e com r abaixo de 0,70, exceto a metodologia alternativa a 15° C X germinação em areia, apresentando correlação positiva e significativa com r de 0,81.

O teste de condutividade elétrica apresentou correlação negativa e significativa com a metodologia alternativa do teste de frio a 10° C. Entretanto, o teste de germinação em areia, apresentou correlação positiva e significativa com a metodologia alternativa do teste de frio a 10° C.

O teste de germinação em areia correlaciona-se bem com emergência de plântulas em campo se a porcentagem média de emergência é alta, entretanto, um teste de vigor apresenta melhores correlações se a porcentagem média emergência de plântulas for baixa. Contudo, são necessários experimentos adicionais para determinar qual teste correlaciona-se melhor sob condições adversas de campo (BEKENDAM et al., 1987).

Observou-se também, correlação positiva e significativa entre a metodologia alternativa do teste de frio a 15° C com a metodologia tradicional, caixa plástica com terra a 10° C, com teste de envelhecimento acelerado, germinação em areia e germinação em papel.

Para algumas espécies, a correlação entre emergência de plântulas em campo e teste de germinação é inferior, especialmente sob condições adversas de campo (PERRY, 1978). Nestes casos, um teste de vigor deveria proporcionar uma melhor estimativa de emergência de plântulas em campo.

Estes resultados confirmam as afirmações de MARCOS FILHO et al (1987), segundo esses autores a correlação significativa indica apenas tendência de variação semelhante entre dois parâmetros; não significando, porém que haja correspondente

precisão de estimativa da qualidade fisiológica do lote, podendo este procedimento provocar obtenção de informações incompletas ou incorretas.

Tabela 5. Análise de correlação simples (r) entre o método alternativo do teste de frio (ALTER.), Caixa com terra (CT) e principais testes fisiológicos: germinação em papel (GP), germinação em areia (GA) emergência campo (EC), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), tetrazólio (TZ 1-3) de seis lotes comerciais de sementes de soja cultivar BRS – 133, nas temperaturas de 10 e 15° C.

VARIÁVEIS.	Coefficiente de correlação (r)	Significância
ALTER. 10° C X CT 10° C	0,37	ns
ALTER. 10° C X EC	0,30	ns
ALTER. 10° C X EA	0,19	ns
ALTER. 10° C X TZ	-0,15	ns
ALTER. 10° C X CE	-0,56	**
ALTER. 10° C X GA	0,44	*
ALTER. 10° C X GP	0,15	ns
ALTER. 15° C X CT 10° C	0,62	**
ALTER. 15° C X EC	0,22	ns
ALTER. 15° C X EA	0,61	**
ALTER. 15° C X TZ	-0,17	ns
ALTER. 15° C X CE	-0,21	ns
ALTER. 15° C X GA	0,81	**
ALTER. 15° C X GP	0,46	*

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade; * Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns - Não significativo.

5. CONCLUSÃO

A interpretação dos resultados obtidos nesta pesquisa permitiu concluir que, a metodologia alternativa, usando como substrato papel de germinação sem adição de mistura terra e areia (2:1) e água refrigerada em banho termostaticado a 10° C e 15° C, apresentou resultados satisfatórios para semente de soja, produzindo resultados consistentes como os obtidos com o uso dos procedimentos tradicionalmente empregados em laboratórios de análise de semente.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln: AOSA, 2002. 105p. (Contribution, 32).

BARROS, S.R.B.; DIAS, M.C.L.L.; CICERO, S.M.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de frio. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap 5, p.1–15.

BEKENDAM, J.; KRAAK, H.L.; VOS, J. Studies on field emergence and vigour of onion, sugar beet, flax and maize seed. **Acta Horticulture**, v. 215, p. 83-94, 1987.

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. **Germinação de sementes**. In: AGUIAR, I.B.; PIÑARODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.). Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 1993. p. 83-135.

BURRIS, J.S.; NAVRATIL, R.J. Relationship between laboratory cold test methods and field emergency in maize inbreds. **Agronomy Journal**, Madison, v.71, n.6, p.985-988, 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas para produção, comercialização e utilização de sementes**; Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004/. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento, Brasília: MAPA/SNPC, 2004.

CAMPOS, V.C. **Metodologia do teste de frio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de arroz irrigado**. Pelotas, 1998. 63 f. Tese de doutorado em

Agronomia, (Ciência e Tecnologia de Sementes), Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

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

CARVALHO, M.A.C.; LAZARINI, E.; SÁ, M.E.; OLIVEIRA, A.L. Variações na metodologia do teste de frio para avaliação do vigor em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v. 22, n. 1, p. 74-80, 2000.

CASEIRO, R. F.; MARCOS FILHO, J. Métodos alternativos do teste de frio para avaliação do vigor de sementes de milho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.3, p.459-466, 2000.

CASEIRO, R. F.; MARCOS FILHO, J. Procedimentos para condução do teste de frio em sementes de milho: pré resfriamento e distribuição do substrato no interior da câmara fria. **Revista Brasileira de Sementes** vol.24, n.2, p. 6-11, 2002.

CÍCERO, S.M. VIEIRA, R.D; TESTE DE FRIO. IN: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151-164.

COSTA, N.P.; MESQUITA, C.M.; HENNING, A.A. Avaliação das perdas e qualidade de semente na colheita mecânica de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.1, n. 3, p.49-58, 1979.

CHRISTIANSEN, N.M. Periods of sensitivity to chilling in germination cotton. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 42, n. 431-433, 1967.

CROSIER, W.F. Fungi involved and methods of conducting cold tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v.47, p.185-190, 1957.

DELOUCHE, J.C. Seed deterioration. **Seed World**, v.92, n. 4, p. 14-15, 1963.

FANAN, S.; MEDINA, P.F.; LIMA, T.C.; MARCOS FILHO, J. Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. **Revista Brasileira de Sementes** vol.28, n.2, p. 152-158, 2006.

FERNANDES, H.S.; NEDEL, J.L.; GALLI, J. Uso de testes de vigor de sementes na detecção de variabilidade genética intracultivar em pimentão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.9, p.1699-1703, set. 1999.

FIALA, F. Cold test. In: PERRY, D.A., (Ed.) **Handbook of vigour test methods**. Zurich, International Seed Testing Association, p. 28-36, 1981.

FRANÇA NETO, J.B. O teste de tetrazólio em sementes de soja. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 87-102.

FRANÇA NETO, J.B.; POTTS, H.C. Efeitos da colheita mecânica e da secagem artificial sobre a qualidade da semente dura em soja. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v. 1, n. 2, p. 64-77, 1979.

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA – CNPSo, 1984. 39p. (Circular Técnica, 9).

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **DIACOM**: diagnostico completo da qualidade da semente de soja. Embrapa-CNPSo, Londrina, 1992. 22 p. (Embrapa-CNPSo, circular técnica, 10).

FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A.; KRZYZANOWSKI, F.C. Seed production and technology for the tropics. In: EMBRAPA-CNPSO. (Ed.) **Tropical soybean: improvement and production**. Rome: FAO, 1994. p.217-240.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.cap. 8, p. 5-28.

GRABE, D.F. Measurement of seed vigor. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v.1, n.2, p.18-31, 1976.

HAMPTON, J.G. What is seed quality? **Seed Science and Technology**, v.30, n. 1, p. 1-10, 2002.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes: Noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51 p. (Documentos, 235)

HOOKS, J.A.; ZUBER, M.S. Effects of soil and soil moisture levels on cold test germination of corn. **Agronomy Journal**, v. 55, p. 453-455, 1963.

HOPPE, P.E. Correlation between corn germination in laboratory cold tests and stands in the field. **Plant Disease Reporter**, v.40, p.887-889, 1956.

ISELY, D. The cold test for corn. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 16, p. 299-311, 1950.

JOHNSON, R.R.; WAX, L.M. Relationship of soybean germination and vigor test to field performance. **Agronomy Journal**, v. 70, n. 2, 273-278, 1978

KAISER, W.J.; HANNAN, R.M. Etiology and control of seed decay and preemergence damping-off of chickpea by *Pythium ultimum*. **Plant Disease**, v. 67, p. 77-81, 1983.

KRZYZANOWSKI, F.C. **Factors affecting the germination and emergence of cotton seed**. Mississippi State, 1980. 106p. Tese (Ph.D) - Mississippi State University.

KRZYZANOWSKI, F.C; FRANÇA NETO, J.B. Testes de vigor em sementes. In: Encontro sobre avanços em tecnologia de sementes, Pelotas: FAEM/UFPEL. 10 a 12/jul./1991. 5 p. (Mimiografado).

LABOURIAU, L.G. **A germinação de sementes**. Washington: OEA, 1983. 174p.

LOEFFLER, N.L.; MEIER, J.L.; BURRIS, J.S. Comparison of two cold test procedures for use in maize-drying studies. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.13, n.3, p.653-658, 1985.

LOEFFLER, T. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v. 12, n. 1, p. 37-53, 1988.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-1,21.

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

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, A.E. da; CICERO, S.M.; GONÇALVES, C.A.R. Efeitos do tamanho da semente sobre a germinação, o vigor e a produção do milho (*Zea mays* L.). **Anais da ESALQ**, 34:327-37, 1977.

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

McDONALD, M.B. Challenges in seed technology. In: SEED TECHNOLOGY CONFERENCE, 10, Ames, 1988. **Proceedings**. Ames: Iowa State University, 1988. p.11-31.

MEDINA, P.F.; MARCOS FILHO, J. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays* L.). **Anais da ESALQ**, v.47, p.47-70, 1990.

MIGUEL, M.H.; CARVALHO, M.V.; BECKERT, O.P.; MARCOS FILHO, J. Teste de frio na avaliação do potencial fisiológico de sementes de algodão. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.4, p. 741-746, out./dez. 2001.

MIGUEL, M.H.; CÍCERO, S.M. Teste de frio na avaliação do vigor de sementes de feijão. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.4, p.1233-1243, out./dez. 1999a. Suplemento.

MIGUEL, M.H.; CÍCERO, S.M. Teste de frio na avaliação do vigor de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v. 21, n. 2, p. 35-42, 1999b.

MOLINA, J.C.; IRIGON, D.L.; ZONTA, E.P. Comparação entre metodologias do teste de frio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho (*zea mays* l.). **Revista Brasileira de Sementes** vol.9, n.3, p. 77-85, 1987.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p. 1–24.

NEEGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Mac Millan Press, 1977. 1187p.

NIJENSTEIN, J.H. Effects of some factors influencing cold test germination of maize. **Seed Science and Technology**, v. 14, p. 313-326, 1985.

PERRY, D.A. Report of the vigour test committee, 1974-1977. **Seed Science and Technology**, v. 6, p. 159-181, 1978.

POLLOCK, B.M., TOOLE, V.K. Imbibition period as the critical temperature sensitive stage in germination of lima bean seeds. **Plant Physiology**, v. 41, p. 221-229, 1966.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. Brasília: AGIPLAN, 195. 29P.

QUEIROZ, E.F.; NEUMAIER, N.; TORRES, E.; TERAZAWA, P.; PALHANO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; BIANCHETTI, A.; YAMASHITA, J. **Recomendações técnicas para a colheita da soja**. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 1978, 32p.

RICE, W.N. Development of the cold test for seed evaluation. **Proceeding of Official Seed Analysts**, v. 50, n. 1, p. 118-123, 1960.

RODO, A.B.; PANOBIANCO, B.; MARCOS FILHO, J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 289-292, abr./jun. 2000.

SILVA, F.A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**,

4, Orlando-FL-USA: **Anais**. Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

SILVA, W.R.; MARCOS FILHO, J. Efeitos do peso e do tamanho das sementes de milho sobre a germinação e vigor em laboratório. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 1, n. 1, p. 39-52, 1979.

TAO, J.K. The 1978 referee test for soybean and corn. **AOSA Newsletter**, v. 35, n. 4, p. 43-66, 1978.

TORRES, S.B.; SILVA, M.A.S.; CARVALHO, I.M.S.; QUEIROZ, M.A. Correlação entre testes de vigor em sementes de maxixe. **Pesquisa agropecuária. brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.1075-1080, jun. 1999.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 31-48.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.4, p. 1–26.

VIEIRA, R.D.; SEDIYAMA, T.; SILVA, R.F.; SEDIYAMA, C.S.; THIÈBAUT, J.T.L.; XIMENES, P.A. Estudo da qualidade fisiológica de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultivar UFV-1, em quinze épocas de colheita. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1981, Brasília. **Anais...** Londrina: Embrapa-CNPSO, 1982. v.1, p.633-644.

VIEIRA, R.D.; TEKRONI, D.M.; EGLI, D.B. Effect of drought and defoliation stress in the field soybean seed germination and vigor. **Crop Science**, v.32, 471-475, 1992.

WASSINK, H.; HOEFMAN, R. De factor van de ligging. **Boerdery**, v. 77, n. 25, p. 27, 1992.

WONG, D.H.; BARBETTI, M.J.; SIVASITHAMPARAM, K. Effects of soil temperature and moisture on the pathogenicity of fungi associated with root rot of subterranean clover. **Australian journal Agricultural Research**, v. 35, p. 675-684, 1984.