

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Crotalaria***  
***juncea* L.**

**Clíssia Barboza da Silva**  
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Janeiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Crotalaria***  
***juncea* L.**

**Clíssia Barboza da Silva**

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 Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2011

S586p Silva, Clíssia Barboza  
Potencial Fisiológico de sementes de *Crotalaria juncea* L. / Clíssia Barboza da Silva. -- Jaboticabal, 2011  
viii, 48 f. : il. : 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Roberval Daiton Vieira

Banca examinadora: Rinaldo Cesar de Paula, Claudio Cavariani  
Bibliografia

1. SVIS. 2. Tetrázólio. 3. Estresse hídrico. I. Título. II. Jaboticabal-  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.531:631.45

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



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

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Crotalaria juncea* L.

**AUTORA:** CLÍSSIA BARBOZA DA SILVA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ROBERVAL DAITON VIEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ROBERVAL DAITON VIEIRA

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. CLAUDIO CAVARIANI

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrícolas de Botucatu

Data da realização: 24 de janeiro de 2011.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**CLÍSSIA BARBOZA DA SILVA** – nascida em 26 de junho de 1985, na cidade de Maceió, Alagoas. Ingressou no curso de Agronomia em 2004, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em 12 de Fevereiro de 2009. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPEAL (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas), de agosto de 2006 a julho de 2007, e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), de agosto de 2007 a fevereiro de 2009, estagiando no Laboratório de Análise de Sementes na área de Produção e Tecnologia de Sementes, onde desenvolveu seu trabalho de graduação. Em 2006, estagiou no Arboretum de Alagoas, participando de atividades de produção de mudas e recuperação de áreas degradadas. De janeiro de 2006 a dezembro de 2008 exerceu atividade de Monitoria nas Disciplinas de Fisiologia Vegetal (janeiro a março de 2006), Zoologia Aplicada à Agronomia (junho de 2006 a fevereiro de 2007) e Fisiologia e Tecnologia de Sementes (março a dezembro de 2008). Em março de 2009 ingressou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira, sendo bolsista da CAPES de março a agosto de 2009, e bolsista da FAPESP, de setembro de 2009 a janeiro de 2011.

***“Todas as coisas foram feitas por ele, e sem ele nada do que foi  
feito se fez”.***  
***(João 1:3)***

A Deus,  
por estar sempre presente em minha vida, iluminando-me em todos os  
momentos, e por tudo que representa.

**Dedico**

Aos meus pais e família, que tanto amo,  
por acreditar sempre.

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença constante em minha vida e por ter tornado esse sonho real;

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Roberval Daiton Vieira, pelos valiosos ensinamentos, apoio, estímulo, amizade e pela tão agradável convivência;

À FAPESP e a CAPES, pelo auxílio de bolsa e viabilização da realização desta pesquisa;

À minha família por acreditarem sempre em minha capacidade;

À UNESP/FCAV pelo apoio institucional;

Às empresas Wolf Seeds do Brasil S.A., J.C. Maschietto Ltda, Piraí Ltda e Seprotect pelo fornecimento do lotes de sementes;

A todos os professores pelos ensinamentos e experiência compartilhada;

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Análise de Sementes pela ajuda na realização dos experimentos;

Aos colegas Bruno Vieira, Cláudia Denise, Gisele Batista, Giselle Feliciani, Juliana Faria, Magnólia Lopes, Mariana Rosa e Rafael Marani pela amizade, companheirismo, incentivo e pelos momentos de alegria compartilhados;

À minha querida tia Sônia, pela calorosa recepção e maravilhosa hospedagem durante estes dois anos;

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela ajuda na análise estatística;

Ao Prof. Dr. Julio Marcos Filho pela disponibilidade do Laboratório de Análise de Imagem da Esalq/USP para realização das análises automatizadas de imagens de plântulas;

Aos membros da banca, Prof. Dr. Claudio Cavariani e Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula pelas valiosas sugestões;

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.



## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1. Potencial fisiológico de sementes.....	2
2.2. Estresse hídrico.....	6
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
3.1. Teor de água das sementes.....	8
3.2. Germinação.....	8
3.3. Envelhecimento acelerado tradicional (EA).....	9
3.4. Envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS).....	9
3.5. Condutividade elétrica da solução de embebição.....	9
3.6. Teste de frio.....	10
3.7. Sistema automatizado de análise de imagens de plântulas (SVIS) ....	10
3.8. Tetrazólio.....	11
3.9. Emergência de plântulas em campo.....	12
3.10. Estresse hídrico.....	13
3.11. Análise estatística.....	13
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>14</b>
4.1. Avaliação do potencial fisiológico inicial das sementes.....	14
4.2. Teste de condutividade elétrica e sistema automatizado de análise de imagem de plântulas.....	15
4.3. Envelhecimento acelerado.....	19
4.4. Tetrazólio na avaliação da viabilidade e vigor das sementes.....	25
4.5. Estresse hídrico.....	31
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>

## POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Crotalaria juncea* L.

**RESUMO** – O desenvolvimento de procedimentos sensíveis para rápida obtenção de informações precisas sobre o potencial fisiológico de lotes de sementes é essencial para o desenvolvimento de programas de controle de qualidade pelas empresas produtoras das mesmas. Nesta pesquisa, foi avaliada a eficiência de diferentes testes de vigor na determinação do potencial fisiológico de sementes de crotalária e, o desempenho das mesmas sob condições de estresse hídrico. O estudo foi conduzido em duas etapas, sendo a primeira relativa à seleção de procedimentos adequados para a condução dos testes de condutividade elétrica, envelhecimento acelerado, tetrazólio e de um sistema automatizado de análise de imagem de plântulas (Seed Vigor Imaging System – SVIS). Na segunda etapa, as sementes foram submetidas a diferentes situações de disponibilidade hídrica, utilizando-se soluções aquosas de polietileno glicol (PEG 6000). Para tal, foram utilizados cinco lotes de sementes. Os testes de condutividade elétrica, envelhecimento acelerado com solução salina saturada e o uso do *software* SVIS em plântulas com três dias de idade podem detectar eficientemente diferenças de vigor entre lotes de sementes de crotalária. O desempenho fisiológico de sementes dessa espécie é fortemente afetado pelo estresse hídrico.

**Palavras-chave:** SVIS, condutividade elétrica, tetrazólio, estresse hídrico.

## PHYSIOLOGICAL POTENTIAL OF *Crotalaria juncea* L. SEEDS

**SUMMARY** – The development of sensitive procedures for quickly obtaining accurate information on the physiological potential of seed lots is essential for developing quality control programs by seed companies. In this research, were evaluated the efficiency of different vigor tests to determine the physiological potential of sunn-hemp seeds, and the performance of seeds under water stress. The study was conducted in two stages: the first consisted of the selection of appropriate procedures for the electrical conductivity, accelerated aging and tetrazolium tests, and of an automated system of seedling imaging analysis (Seed Vigor Imaging System – SVIS). In the second stage, the seeds were submitted to different water stress using aqueous solutions of polyethylene glycol (PEG 6000). The electrical conductivity, and accelerated aging with a saturated salt solution tests, and the SVIS on 3-day old seedlings can efficiently detect differences in vigor between sunn-hemp seed lots. The seeds physiological performance is strongly affected by water stress.

**Keywords:** SVIS, electrical conductivity, tetrazolium, water stress.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Crotalaria juncea* L. é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, e que tem sido utilizada como cultura de verão para adubação verde, com boa adaptação à seca, sendo cultivada em várias regiões do mundo, particularmente face ao seu elevado potencial de fixação de nitrogênio (WANG et al., 2009). Além de proteger o solo contra a erosão, reduzir a compactação do mesmo, promover elevada reciclagem de nutrientes, supressão de patógenos, plantas daninhas e nematóides, fornece fibras de alta qualidade para a fabricação de papéis especiais.

Apesar da importância e do crescente uso desta leguminosa, poucos relatos existem com relação à germinação e vigor de suas sementes; embora sabe-se que a avaliação do potencial fisiológico representa fator essencial para garantir o estabelecimento de qualquer cultura multiplicada por sementes. Para tanto, as informações sobre germinação sob condições ótimas (ISTA, 2009) devem ser complementadas pelas provenientes de um ou mais testes de vigor.

O vigor pode ser refletido por várias características, tais como velocidade de germinação, uniformidade de emergência, crescimento de plântulas, resistência a frio, à temperaturas e umidade elevadas, ao déficit hídrico, à substâncias tóxicas, além de outros (CARVALHO, 1994). Deste modo, torna-se difícil o desenvolvimento de um teste que indique, com razoável precisão, o comportamento das sementes expressando características tão distintas entre si.

Neste sentido, o estresse hídrico pode ser um método alternativo promissor na avaliação do potencial fisiológico de sementes, uma vez que lotes de sementes de alto vigor, normalmente, apresentam melhor desempenho do que aqueles de menor vigor quando submetidos a ambiente com estresse.

Baseado nestes fatos, este estudo objetivou identificar testes eficientes para avaliação do potencial fisiológico de sementes de crotalária e, verificar o desempenho das mesmas sob condições de estresse hídrico, visando correlacionar com informações geradas pelos testes de vigor.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A *Crotalaria juncea* L., família Fabaceae, é uma leguminosa forrageira originária da Índia (MONEGAT, 1991), conhecida popularmente como crotalária, guizo-de-cascavel ou chocalho-de-cascavel, pelo fato de seus frutos quando tocados apresentarem som semelhante ao de chocalho.

A crotalária tem sido apontada como leguminosa com alto potencial para a adubação verde, em sistemas de rotação ou em consórcio, com efeitos consideráveis na produtividade de culturas de grande expressão econômica como cana-de-açúcar (DUARTE-JUNIOR & COELHO, 2008; AMBROSANO et al., 2005), milho (SILVA et al., 2009; FOSU et al., 2004), trigo (LANGE et al., 2009), arroz (JESUS et al., 2007), café (PAULO et al., 2006) e algodão (BAUER et al., 2009); proporciona viabilidade econômica e sustentabilidade aos sistemas de produção, por reduzir a necessidade da aplicação de nitrogênio sintético.

A utilização da crotalária na adubação verde tem crescido consideravelmente pela sua eficiência no controle de populações de nematóides (MORAES, et al., 2006; GARRIDO et al., 2008), na supressão de plantas daninhas (MONQUERO et al., 2009; ADLER & CHASE, 2007; FONTANÉTTI, et al., 2004; SEVERINO & CHRISTOFFOLETI, 2004; TEIXEIRA et al., 2004), por reduzir os custos de produção pela diminuição da aplicação de agroquímicos e contribuir para o sistema de cultivo orgânico e sustentabilidade dos agroecossistemas.

Seu sistema radicular profundo, ramificado e vigoroso é capaz de romper camadas compactadas do solo, promover elevada reciclagem de nutrientes e aumentar a infiltração de água no solo (CARVALHO et al., 2002). Além disso, por apresentar fibras de alta qualidade, tem sido também utilizada na fabricação de papéis especiais.

### 2.1. Potencial fisiológico de sementes

O emprego de sementes de alto potencial fisiológico é de extrema importância nos sistemas de produção agrícola. Em sistemas de rotação ou em consórcio com várias culturas, por exemplo, para garantir a viabilidade econômica e a sustentabilidade dos sistemas de produção orgânica pela adubação verde, o uso de sementes vigorosas representa importante estratégia para os agricultores, por refletir no estabelecimento uniforme e satisfatório das plantas em campo.

O teste de germinação tem sido internacionalmente aceito na estimativa do potencial fisiológico de sementes (ISTA, 2009). Porém, suas limitações são reconhecidas, por fornecer informações, apenas, sobre o desempenho das sementes em condições favoráveis, raramente encontradas no campo (MARCOS-FILHO, 2005). Todavia, os testes de vigor podem ser capazes de estimar a capacidade das sementes produzirem plântulas normais sob ampla faixa de condições ambientais.

Vários testes têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados para avaliação do potencial fisiológico de sementes, no sentido de identificar possíveis diferenças de vigor entre lotes que apresentem percentagens de germinação semelhantes. Vale ressaltar que a avaliação do potencial fisiológico de sementes, além de garantir qualidade aos produtores, comerciantes e agricultores, permite, ainda, a redução de riscos provenientes da aquisição de material de qualidade desconhecida e o pagamento de preços irrealistas.

Para sementes de crotalária, nenhuma técnica que possa estimar o desempenho de lotes de sementes em condições sub-ótimas encontra-se disponível e sabe-se que, durante o processo de produção, diferenças inerentes ao potencial fisiológico entre lotes de sementes vêm tornando-se realidade frequente, com aumentos consideráveis nos custos de produção agrícola. Deste modo, o desenvolvimento de métodos padronizados que forneçam dados precisos e confiáveis para avaliação do vigor de sementes é fundamental.

Os testes de vigor, de uso cada vez mais rotineiro pela indústria de sementes, constituem-se em instrumento imprescindível na determinação do potencial fisiológico de sementes. As empresas produtoras e as instituições

oficiais têm incluído esses testes em programas internos de controle de qualidade para garantia do potencial fisiológico das sementes destinadas à comercialização (MARCOS-FILHO, 2005).

De acordo com DELOUCHE (2004), o vigor está diretamente relacionado à taxa de deterioração da semente que, à medida que esta avança diminui a resistência ou tolerância da mesma aos estresses ambientais e reduz a emergência de plântulas em campo.

VIEIRA et al. (1994) destacaram a importância da utilização de vários testes para avaliação do vigor das sementes, uma vez que estas podem mostrar reações variáveis diante da exposição às diferentes situações específicas de cada teste.

O teste de condutividade elétrica tem sido amplamente aceito e utilizado (PANOBIANCO & VIEIRA, 2007; VANZOLINI & NAKAGAWA, 2005), sendo capaz de estimar rapidamente o potencial de desempenho de sementes em campo, mediante a determinação da taxa de lixiviação de solutos das sementes em água, como aminoácidos e íons inorgânicos, refletindo o grau de deterioração das membranas celulares (POWELL, 1986; PANOBIANCO & VIEIRA, 2007; PANOBIANCO et al., 2007; VIEIRA et al., 2008).

O teste de envelhecimento acelerado baseia-se no princípio de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente pela exposição destas à temperatura e umidade relativa do ar elevadas, sendo estes os fatores ambientais mais relacionados à deterioração das mesmas. Desse modo, lotes de sementes com alto vigor manterão sua germinação após serem submetidos ao estresse, enquanto os de baixo vigor terão sua germinação reduzida (AOSA, 2009). É capaz de estimar eficientemente o vigor de sementes de soja (DUTRA & VIEIRA, 2004), amendoim (ROSSETTO, et al., 2004), cornichão (ARTOLA & CARILLLO CASTAÑEDA, 2005a), lentilha (MAKKAWI & GASTEL, 2007) e feijão (DUTRA & TEÓFILO, 2007). Além disso, este teste demonstra correlação positiva com o potencial de armazenamento de sementes.

Em 2001, o teste de envelhecimento acelerado foi aprovado oficialmente como um teste de vigor para sementes de soja nas Regras Internacionais para Análise de Sementes (ISTA, 2001).

O princípio do teste de frio é a exposição das sementes à baixa temperatura, alta umidade do solo (normalmente 70% de saturação) e presença de agentes patogênicos, seguido por um período de crescimento de plântulas sob temperaturas entre 25 e 30 °C (LOEFFLER et al., 1985). Para garantir a presença de patógenos no substrato, o solo deve ser proveniente de campo já cultivado com a espécie. Pode ser utilizado com sucesso em sementes de milho (CASEIRO & MARCOS-FILHO, 2002), trigo (FANAN et al., 2006) e soja (CARVALHO et al., 2000).

O emprego de testes rápidos na avaliação do potencial fisiológico de sementes constitui ferramenta imprescindível, uma vez que proporciona agilidade nas tomadas de decisões no manejo de lotes de sementes nas etapas de pré e pós-colheita. Dentre estes testes destaca-se o teste de tetrazólio, que permite avaliar a viabilidade e o vigor de lotes de sementes baseando-se na atividade das enzimas desidrogenases envolvidas na respiração (AOSA, 2009).

Durante o teste de tetrazólio as sementes permanecem em contato com uma solução incolor de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, a qual é reduzida pelas enzimas desidrogenases, causando alterações na coloração dos tecidos vivos da semente (FRANÇA-NETO et al., 1998). Em sementes vigorosas a solução de tetrazólio tende a reagir mais lentamente nos tecidos, desenvolvendo coloração mais suave em relação às sementes deterioradas. Por outro lado, tecidos mortos, onde não há atividade dessas enzimas, os embriões mantêm-se na sua cor natural (DELOUCHE et al., 1976).

Dentre as espécies documentadas na literatura em que o teste de tetrazólio tem demonstrado eficiência na avaliação da viabilidade e vigor de sementes destaca-se a soja (FRANÇA-NETO et al., 1998), a mamona (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2010), o pepino (LIMA et al., 2010), a cunhã (DEMINICIS et al., 2009), o milho (ARAÚJO et al., 2000), o tomate (SANTOS et al., 2007), o café (VIEIRA et



al., 1998), o algodão (VIEIRA et al., 1999) e o amendoim (BITTENCOURT & VIEIRA, 1997; BITTENCOURT, 1999).

Para obtenção de informações adicionais sobre o potencial fisiológico de sementes, técnicas automatizadas têm sido aperfeiçoadas; dentre estas, destaca-se o sistema automatizado de análise de imagem de plântulas (Seed Vigor Imaging System – SVIS) desenvolvido por SAKO et al. (2001), que permite a obtenção de resultados consistentes sobre o índice de vigor, uniformidade e crescimento de plântulas, como constatado por HOFFMASTER et al. (2003) e MARCOS-FILHO et al. (2009) em sementes de soja e MARCOS-FILHO et al. (2006) em sementes de melão.

O SVIS permite, rapidamente, a obtenção de imagens digitais de plântulas e, baseado no comprimento do hipocótilo e da raiz primária, fornece informações precisas de parâmetros associados com o vigor das sementes. Além da rapidez, uma vantagem adicional desta tecnologia é a maior viabilidade econômica em relação aos testes de vigor tradicionais, estando os custos concentrados apenas no investimento inicial, sendo economicamente reproduzível pelo baixo custo de execução.

## **2.2. Estresse hídrico**

O estresse hídrico, cujo método fundamenta-se no princípio de que sementes mais vigorosas podem tolerar condições mais severas de déficit hídrico, tem mostrado-se confiável e com resultados muito semelhantes ao desempenho das sementes em campo.

A disponibilidade de água é o fator ambiental mais importante na fase de germinação das sementes, pois a água está envolvida, direta ou indiretamente, em todas as demais etapas do metabolismo subsequente, seja nas reações enzimáticas, na solubilização de solutos e transporte de metabólitos e na digestão hidrolítica de proteínas, carboidratos e lipídios dos tecidos de reserva da semente, culminando com a emergência e desenvolvimento da plântula (CARVALHO &

NAKAGAWA, 2000). A redução progressiva do potencial hídrico do substrato provoca decréscimo na percentagem de germinação e emergência de plântulas (CUSTÓDIO et al., 2009).

Deste modo, o estresse hídrico pode ser adotado como complemento às informações geradas por outros testes de vigor, conferindo maior segurança às empresas quanto ao destino dos lotes na etapa de comercialização. Além disso, não exige equipamentos sofisticados e não apresenta dificuldades consideráveis para sua padronização. A eficiência do estresse hídrico na avaliação do potencial fisiológico das sementes foi comprovada por alguns pesquisadores estudando diversas espécies, dentre os quais podem-se destacar MORAES & MENEZES (2003) e SILVA et al. (2006) em sementes de soja.

Na simulação do estresse hídrico, diversos compostos químicos têm sido utilizados, dentre eles o polietilenoglicol 6000, que tem sido utilizado com sucesso em trabalhos de pesquisa, pela dificuldade em penetrar as células vegetais, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu alto peso molecular (HASEGAWA et al., 1984). Diferentemente, as soluções de sacarose ou manitol, podem causar problemas de fitotoxicidade decorrente da entrada destes produtos nas sementes. Contudo, não foram encontradas na literatura disponível, informações sobre o emprego do polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) na avaliação do potencial fisiológico de sementes de *Crotalaria juncea* L.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no período de junho de 2009 a julho de 2010, no Laboratório de Análise de Sementes da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, SP e no Laboratório de Análise de Imagem da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados cinco lotes de sementes de crotalária, colhidas na safra 2007/2008. Para o teste de envelhecimento acelerado tradicional e modificado, além dos cinco lotes de sementes colhidos na safra 2007/2008, foram utilizados sete lotes pertencentes à safra 2008/2009 e de cinco lotes da safra 2009/2010.

Os lotes de sementes de crotalária foram cedidos pelas empresas comerciais Wolf Seeds do Brasil S.A., J.C. Maschietto Ltda, Piraí Ltda e Seprotect. As sementes foram homogeneizadas e separadas visando obtenção da porção semente pura. Em todo o período experimental as sementes foram mantidas em embalagens de papel multifoliado, sob câmara fria regulada a 10 °C e 60% de umidade relativa do ar.

#### **3.1. Teor de água das sementes**

Foi determinado utilizando-se o método de estufa, a  $105 \pm 3$  °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas subamostras de 50 sementes para cada lote. Os resultados foram expressos em percentagem.

#### **3.2. Germinação**

Quatro repetições de 50 sementes por lote foram distribuídas entre areia, contida em caixas de plástico (28,5 x 18,5 x 10,0 cm), mantidas a 20-30 °C e fotoperíodo de oito horas. Quatro dias após a semeadura foi realizada a primeira

contagem de germinação e, aos 10 dias, a avaliação final, computando-se a percentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

### **3.3. Envelhecimento acelerado tradicional (EA)**

Cerca de 18 g de sementes por lote foram distribuídas em camada única sobre tela de aço inox acoplada no interior de caixas de plástico transparentes (11 x 11 x 3,5 cm), contendo 40 mL de água desionizada para obtenção de aproximadamente 100% de umidade relativa do ar (MARCOS-FILHO, 2005). As caixas foram tampadas e mantidas em câmara de envelhecimento jaquetada de água, a 41 °C durante 48, 72 e 96 horas. Quatro repetições de 50 sementes por lote foram colocadas para germinar de forma semelhante ao descrito anteriormente para o teste de germinação, sendo a avaliação realizada aos quatro dias após a semeadura. Foi computada a percentagem de plântulas normais de acordo com os critérios adotados no teste padrão de germinação.

### **3.4. Envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS)**

Conduzido de forma semelhante à descrita para o procedimento tradicional, substituindo os 40 mL de água desionizada por igual quantidade de solução saturada de NaCl (40 g/100 mL de água), estabelecendo ambiente com aproximadamente 76% de umidade relativa do ar (JIANHUA & McDONALD, 1996).

### **3.5. Condutividade elétrica da solução de embebição**

Foi determinado pelo método de massa, com quatro repetições de 50 sementes para cada lote. As sementes foram pesadas (0,01 g) e colocadas em copos de plástico (200 mL) contendo 75 mL de água desionizada. Os recipientes foram cobertos com película aderente e mantidos a 25 °C durante 1, 2, 4, 8 e 16

horas, a fim de estabelecer o período mais adequado para a classificação de lotes com diferentes níveis de vigor. A condutividade elétrica da solução foi determinada utilizando condutivímetro DIGIMED DM-32 e os resultados foram expressos em relação ao peso das sementes ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (KRZYZANOWSKI & VIEIRA, 1999; MARCOS FILHO & VIEIRA, 2009).

### **3.6. Teste de frio**

Foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por lote, utilizando-se mistura de terra e areia (2:1), contida em caixas de plástico (28,5 x 18,5 x 10,0 cm). As caixas foram tampadas para minimizar a perda de água e mantidas em câmara fria a 10 °C, durante sete dias. Após este período, as caixas foram destampadas e transferidas para ambiente com temperatura de 25 °C, onde permaneceram por cinco dias (BARROS et al., 1999). Os resultados foram expressos em percentagem de plântulas normais.

### **3.7. Sistema automatizado de análise de imagens de plântulas (SVIS)**

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada lote. As sementes foram distribuídas sobre duas fileiras horizontais situadas no terço superior de folhas de papel toalha previamente umedecidas, posicionadas de maneira que a raiz primária pudesse crescer voltada para baixo. Em seguida formaram-se rolos que foram transferidos para câmara de germinação regulada a 20-30 °C e fotoperíodo de oito horas, mantidos durante três e quatro 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 (MARCOS-FILHO et al., 2009). As imagens das plântulas foram digitalizadas e, em seguida, analisadas pelo *software* SVIS, sendo computados dados referentes ao índice de vigor,

crescimento e uniformidade das plântulas. O índice de vigor foi gerado pela combinação dos parâmetros crescimento (contribuição de 70%) e uniformidade de crescimento de plântulas (contribuição de 30%), além do comprimento máximo possível de plântulas de crotalária aos três e quatro dias após a semeadura (3,5 e 4,5 polegadas, respectivamente). Os resultados foram expressos pela média dos valores obtidos em cada lote de sementes.

### **3.8. Tetrazólio**

Duas repetições de 50 sementes foram pré-condicionadas entre papel de germinação umedecido, a 25 °C, durante 16 horas, para amolecimento do tegumento e ativação do sistema enzimático, resultando em coloração mais nítida (VIEIRA & VON PINHO, 1999). O pré-umedecimento das sementes por 18 horas recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) não se mostrou adequado, uma vez que este período desencadeou em protrusão da raiz primária e resultados inconsistentes.

Para a coloração, foram estudados os seguintes preparos das sementes: A – remoção do tegumento, com auxílio de lâmina e pinça de ponta fina; B – corte lateral-longitudinal sem a remoção do tegumento, expondo o eixo embrionário; C – corte longitudinal na região distal ao eixo embrionário, no sentido da espessura da semente através do embrião; D – corte transversal na região distal ao eixo embrionário, no sentido da largura da semente, através do embrião.



Figura 1. Métodos de preparo de sementes de crotalária: (a) remoção do tegumento; (b) corte lateral-longitudinal sem a remoção do tegumento; (c) corte longitudinal na região distal ao eixo embrionário, no sentido da espessura da semente através do embrião; (d) corte transversal na região distal ao eixo embrionário, no sentido da largura da semente, através do embrião.

O teste foi conduzido com solução do sal 2,3,5 cloreto trifênil tetrazólio na concentração de 0,075%, por 120 minutos, a 40 °C (FRANÇA NETO et al., 1998) usado para semente de soja.. Após o período de coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e analisadas sob microscópio estereoscópico.

Dentre as metodologias testadas para o preparo das sementes, empregou-se aquela que proporcionou maior uniformidade de coloração. Foram analisadas alterações nos tecidos das sementes que possibilitassem a classificação das sementes quanto à viabilidade e vigor. A classificação foi baseada nos parâmetros estabelecidos por FRANÇA NETO et al. (1998) em sementes de soja. Deste modo, as sementes foram separadas em três classes, similar ao que foi feito por Bittencourt (1999) para sementes de amendoim: Classe 1: viáveis e vigorosas; Classe 2: viáveis e não vigorosas; Classe 3: não viáveis.

### 3.9. Emergência de plântulas em campo

Quatro subamostras de 50 sementes por lote foram dispostas em canteiros no campo, em linhas de 1,5 m de comprimento e espaçamento de 0,25 m entre si. A avaliação foi efetuada aos 10 dias após a semeadura, e os resultados foram expressos em percentagem de plântulas emersas (NAKAGAWA, 1994).

### **3.10. Estresse hídrico**

Para o teste de estresse hídrico, as sementes foram inicialmente tratadas com mistura de carbendazin ( $150\text{g.L}^{-1}$ ) + thiram ( $350\text{ g.L}^{-1}$ ) na dose de 200 mL/100 kg de sementes. Os experimentos foram conduzidos em duas etapas, em que a primeira consistiu em submeter as sementes a seis situações de disponibilidade hídrica, utilizando-se os potenciais de 0,0; -0,2; -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa obtidos em soluções aquosas de polietileno glicol (PEG 6.000), a fim de estabelecer um nível de potencial osmótico padrão que permitisse identificar sementes com alto índice de vigor. Os cálculos, das quantidades do soluto, foram obtidos com base na equação sugerida por VILLELA et al. (1991).

Na segunda etapa, as sementes pertencentes aos cinco lotes da safra 2007/2008, foram submetidas ao melhor nível de potencial osmótico estabelecido no experimento anterior. O teste consistiu de quatro subamostras de 50 sementes, distribuídas entre papel umedecido, acondicionadas a 25°C. Foram avaliadas as seguintes variáveis: percentagem de germinação (primeira contagem e contagem final), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento de plântulas e biomassa seca das plântulas.

### **3.11. Análise estatística**

Para análise estatística, os dados obtidos em cada teste foram analisados separadamente por meio da análise de variância, de acordo com o delineamento inteiramente casualizado. Para contraste entre médias foi utilizado o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação do potencial fisiológico Inicial das sementes

Os teores de água iniciais dos lotes variaram de 9,3 a 10,5% e, percentagens de germinação superiores à mínima para a comercialização de sementes de crotalária, que no Brasil é de 60% (BRASIL, 2008) (Tabela 1), foram apresentadas por todos os lotes, revelando capacidade germinativa satisfatória dos mesmos sob condições ambientais favoráveis. O teste de germinação e a primeira contagem foram similares quanto à diferenciação qualitativa dos lotes, com a primeira contagem (4 dias) variando entre 69 e 82% e a germinação (10 dias) entre 82 e 93%, ambos detectaram desempenho inferior do lote 5 em relação aos lotes 1 e 4 ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1). O teste de frio e a emergência de plântulas em campo não acusaram diferenças de vigor entre os lotes de sementes.

Tabela 1. Teor de água (TA), germinação (G) e vigor avaliado pela primeira contagem de germinação (PC), teste de frio (TF) e emergência de plântulas em campo (EC) de cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008.

Lotes	TA	G	PC	TF	EC
	%.....				
1	9,9	93 a	82 a	83 a	85 a
2	9,4	90 ab	79 ab	84 a	84 a
3	10,5	89 ab	74 ab	81 a	78 a
4	9,3	93 a	80 a	84 a	89 a
5	10,1	82 b	69 b	81 a	74 a
C.V. (%)	-	4,5	6,2	8,0	8,8

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

#### 4.2. Teste de condutividade elétrica e sistema automatizado de análise de imagem de plântulas

Os parâmetros de vigor revelados pelo SVIS (Tabela 2), ou seja, o índice de vigor, a uniformidade e o crescimento das plântulas, indicaram consistência de resultados quando determinados em plântulas com três dias de idade; maiores índices de vigor, crescimento da raiz primária/hipocótilo e uniformidade do crescimento foram apresentados por sementes dos lotes 2, 3 e 4 e, o lote 5 o pior desempenho (Figura 2).

Na análise automatizada das imagens das plântulas pelo SVIS aos quatro dias de idade das plântulas (Tabela 2), verificou-se heterogeneidade dos resultados, evidenciado pelo aumento no coeficiente de variação para os parâmetros índice de vigor e crescimento das plântulas, dificultando a identificação de diferenças entre lotes de sementes; nessa situação, foi destacado, apenas, o lote 5 como o de pior potencial, de acordo com os parâmetros índice de vigor e comprimento de plântulas.

Tabela 2. Índice de vigor, uniformidade de crescimento e comprimento de plântulas (mm) de cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008, aos três e quatro dias obtidos pelo sistema automatizado de avaliação do vigor de sementes (SVIS).

Lotes	Índice vigor (3 dias)	Uniform. Cresc. (3 dias)	Comp. plântulas (3 dias)	Índice vigor (4 dias)	Uniform. Cresc. (4 dias)	Comp. Plântulas (4 dias)
1	577 bc	814 b	19 bc	637 ab	867 a	21 ab
2	706 ab	830 ab	26 ab	754 ab	844 a	28 ab
3	792 a	894 a	30 a	770 a	840 a	29 ab
4	706 ab	857 ab	25 abc	775 a	867 a	29 a
5	554 c	797 b	18 c	546 b	849 a	18 b
C.V. (%)	9,2	4,2	14,9	13,7	3,3	20,9

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



Figura 2. Imagens digitais de plântulas de crotalária, safra 2007/2008, três dias após a semeadura, provenientes de uma repetição de lotes de alto e baixo vigor, lotes 3 (A) e 5 (B), respectivamente, analisadas pelo sistema automatizado de avaliação do vigor de sementes (SVIS).

No teste de condutividade elétrica as leituras da taxa de lixiviação de solutos na solução de embebição variaram entre 11,7 e 141,7  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  (Tabela 3), entre 1

e 16 horas de embebição, respectivamente; a distinção clara do potencial fisiológico dos lotes de sementes ocorreu após 1 hora de embebição, de maneira semelhante aos resultados do SVIS, em plântulas com três dias de idade, com os lotes 2, 3 e 4 como de vigor superior e, o lote 5 como de vigor inferior. Todavia, os resultados de períodos de embebição de 4 e 8 horas foram mais uniformes, com coeficientes de variação relativamente inferiores.

Tabela 3. Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008, em função do período de embebição, em 75 mL de água desionizada, a 25 °C.

Lotes	Condutividade elétrica				
	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h
1	18,4 bc	28,7 bc	51,7 bc	92,3 bc	122,5 a
2	13,4 a	20,1 a	43,0 ab	80,1 a	112,4 a
3	11,7 a	17,9 a	40,0 a	82,7 ab	115,8 a
4	15,3 ab	23,1 ab	45,1 ab	83,6 ab	117,1 a
5	21,3 c	32,7 c	59,3 c	101,1 c	141,7 b
C.V. (%)	14,7	12,9	6,3	5,6	5,0

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

A menor capacidade de reorganização das membranas celulares durante o processo de hidratação, bem como a dificuldade no reparo de danos às membranas devido à rápida absorção de água, demonstraram estreita relação com os parâmetros de vigor analisados pelo SVIS, uma vez que houve tendência de menor índice de vigor, comprimento e uniformidade do crescimento das plântulas ocorrer em lotes com maiores valores de condutividade elétrica (Tabelas 2 e 3). Assim, considerando uma hora de embebição, a concentração de lixiviados de  $11,7 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  (lote 3) (Tabela 3) refletiu em índice de vigor de 792 e uniformidade e comprimento de plântulas de 894 e 30 mm, respectivamente, aos três dias de idade (Tabela 2), ao passo que a perda de solutos de  $21,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  (lote 5) (Tabela 3), culminou em

índice de vigor de 554, uniformidade de crescimento de 797 e plântulas de 18 mm de comprimento (Tabela 2).

Portanto, foi constatada relação entre a quantidade de lixiviados perdidos pela semente e o potencial de crescimento das plântulas avaliado pelo SVIS. Esses resultados confirmam a hipótese de HEYDECKER (1972) e DELOUCHE & BASKIN (1973), segundo a qual a degeneração das membranas e a redução no desenvolvimento das plântulas estão fortemente interligadas durante o processo de deterioração das sementes.

A eficiência do *software* SVIS para avaliação do vigor de sementes tem sido relatada em sementes de diversas espécies, como alface (SAKO et al., 2001 e PEÑALOZA et al., 2005), soja (HOFFMASTER et al., 2003 e MARCOS-FILHO, 2009) e melão (MARCOS-FILHO et al., 2006). HOFFMASTER et al. (2003) e MARCOS-FILHO et al. (2009), também demonstraram potencial deste *software* na avaliação do vigor de sementes de soja utilizando plântulas com três dias de idade.

O teste de condutividade elétrica tem sido padronizado para outras sementes de leguminosas (VIEIRA et al., 2004; ARTOLA & CARRILLO-CASTAÑEDA, 2005b; MUASYA et al., 2006). Em sementes de crotalária, NAKAGAWA et al. (2003) propuseram 24 horas como período de embebição, a 20 °C, na avaliação do vigor de lotes de sementes. Nesta pesquisa, o período de 1 hora de embebição das sementes em água, a 25 °C, foi suficiente para estratificação dos lotes em níveis de vigor, com resultados consistentes e reproduzíveis, ao passo que, a embebição por 16 horas desencadeou em protrusão da raiz primária, influenciando diretamente na taxa de lixiviação de exsudatos (Tabela 3). Entretanto, quando a lixiviação dos exsudatos na solução de embebição foi determinada com 4 ou 8 horas, houve maior estabilidade de lixiviados e conseqüente redução no coeficiente de variação.

Portanto, avaliação do potencial fisiológico de sementes de crotalária pode ser executada de forma precisa pelas leituras de condutividade elétrica da solução de embebição, bem como pela utilização do *software* SVIS. Este *software*, associado ao teste de condutividade elétrica pode ser incluído em programas de controle de qualidade para auxiliar a tomada de decisões em diferentes etapas de

produção e da utilização de sementes de crotalária, fornecendo informações valiosas sobre o grau de deterioração, potencial de crescimento inicial e uniformidade de emergência de plântulas, componentes essenciais no sucesso do estabelecimento das plantas em campo.

### **4.3. Envelhecimento acelerado**

As percentagens de plântulas normais no teste de germinação, das três safras agrícolas, variaram de 82 a 95% (Tabela 4), superiores à estabelecida para a comercialização de sementes de crotalária (BRASIL, 2008), indicando alto potencial dos lotes para germinarem e proporcionar alta densidade de plântulas sob condições de campo favoráveis, os quais foram estatisticamente semelhantes entre si, indicando apenas inferioridade do lote 5 da safra 2007/2008.

A pequena variação entre os teores de água iniciais dos lotes da safra 2007/2008, de 9,3 a 10,5% (Tabela 1), como relatado anteriormente, conferiu segurança às confrontações fisiológicas decorrentes dos testes, considerando-se que a uniformidade desta característica é imprescindível ao alcance de resultados consistentes (TORRES & MARCOS FILHO, 2001). Além disso, as medidas de lixiviação de solutos no teste de condutividade elétrica permitiram o ranqueamento consistente dos lotes de sementes, destacando os 2, 3 e 4 como de vigor superior ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 3). Para a obtenção de informações adicionais, as sementes foram envelhecidas durante 48, 72 e 96 horas, com e sem o uso de solução saturada de sal (tradicional – EA e com solução salina – EASS).

As condições de estresse proporcionadas pelo EA tradicional (alta temperatura e umidade relativa do ar) e o menor tamanho das sementes de crotalária, determinaram elevados teores de água (Tabela 5) e, como consequência, acentuado grau de deterioração (Tabela 6). Os resultados do presente estudo são consistentes com as observações de ARTOLA & CARILLO CASTAÑEDA (2005a), em sementes da leguminosa forrageira cornichão, de que a exposição das sementes a 41 °C e umidade relativa do ar de 95% reduzem

drasticamente o vigor das mesmas. Assim, pode haver, nessas condições, limitações à avaliação do vigor de sementes.

Tabela 4. Germinação inicial de lotes de sementes de crotalária, safras 2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010.

Lote	Germinação		
	Safra 2007/2008	Safra 2008/2009	Safra 2009/2010
	.....%.....		
1	93 a	89 a	95 a
2	90 ab	89 a	87 a
3	89 ab	87 a	91 a
4	93 a	79 a	90 a
5	82 b	92 a	92 a
6	-	88 a	-
7	-	88 a	-
C.V. (%)	4,5	6,5	5,1

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

Após a exposição das sementes ao EASS, verificaram-se teores de água acentuadamente inferiores (Tabela 5). Contudo, dentre os períodos estudados, apenas o período de envelhecimento de 96 horas acusou diferenças de vigor entre os lotes de sementes (Tabela 6), com inferioridade do lote 3, além de confirmar o potencial fisiológico inferior do lote 5; os períodos de 48 e 72 horas não foram considerados apropriados para o EASS em sementes de crotalária.

Durante o teste de envelhecimento acelerado, variações na absorção de água pelas sementes podem desencadear grande impacto na fisiologia celular, resultando em deterioração diferenciada e, conseqüentemente, resultados desuniformes, com redução da eficácia deste teste (AOSA, 2009). Neste trabalho, os teores de água após o EASS durante 96 horas variaram entre 12,4 e 14,3% (Tabela 5) e, apesar da pequena variação (1,9 pontos percentuais), maiores graus

de deterioração foram verificados em lotes de sementes com teores de água mais elevados, 14,3 e 13,8%, lotes 3 e 5, respectivamente, contrastando com os resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica (Tabela 3) que indicou maior vigor ao lote 3.

Tabela 5. Teor de água de cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008, após o teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com o uso de solução saturada de NaCl (EASS), em três períodos de envelhecimento, a 41 °C.

Lote	EA			EASS		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
	..... %.....					
1	36,2	40,0	43,9	12,5	13,3	12,4
2	37,3	39,1	42,9	13,2	12,9	13,3
3	36,4	40,9	43,7	13,9	14,2	14,3
4	35,4	41,1	43,4	13,5	12,9	12,9
5	36,4	41,1	44,1	13,5	14,3	13,8

Tabela 6. Vigor de cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008, avaliado pelo teste de envelhecimento acelerado tradicional (EA) e com o uso de solução saturada de NaCl (EASS), em três períodos de envelhecimento, a 41 °C.

Lote	EA			EASS		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
	..... %.....					
1	71 a	37 b	3 b	81 a	82 a	91 a
2	69 a	36 b	6 b	87 a	80 a	87 ab
3	53 b	43 ab	55 a	76 a	76 a	70 c
4	65 ab	31 b	6 b	81 a	86 a	84 ab
5	61 ab	57 a	56 a	77 a	80 a	79 bc
C.V. (%)	10,7	18,7	20,7	9,0	7,2	5,2

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



Portanto, o vigor inferior apresentado pelo lote 3 quando do EASS por 96 horas, não constatado pela taxa de lixiviação de exsudatos no teste de condutividade elétrica, pode estar associado à maior absorção de água por estas sementes durante o período de envelhecimento, que acelerou seu processo contínuo de deterioração, permitindo que sementes de menor vigor apresentassem melhor desempenho e, um estande de plântulas mais satisfatório durante o teste, com resultados inconsistentes.

Deste modo, visando à obtenção de informações mais precisas, amostras de sementes de crotalaria das safras 2008/2009 e 2009/2010 também tiveram seu vigor avaliado pelo EASS após 96 horas, sendo verificada sua repetibilidade em conjunto com outros testes de vigor. Assim, para as sementes produzidas nestas safras, verificou-se maior uniformidade no processo de absorção durante o envelhecimento que os observados para as sementes obtidas na safra 2007/2008, sendo as variações de 1,4 pontos percentuais, para a safra 2008/2009, e de 1,5 pontos percentuais, para a safra 2009/2010 (Tabela 7). Vale ressaltar que o teor de água das sementes, antes ou durante o envelhecimento acelerado, é identificado como um dos principais fatores que causam variabilidade no teste de envelhecimento acelerado (TOMES et al., 1988).

Tabela 7. Teor de água (%) de sementes de crotalaria, safras 2008/2009 e 2009/2010, após o teste de envelhecimento acelerado com o uso de solução saturada de NaCl (EASS) durante 96 horas, a 41 °C.

Lote	Safra 2008/2009	Safra 2009/2010
1	13,7	12,8
2	12,8	14,3
3	13,6	14,1
4	14,0	13,4
5	13,8	13,7
6	14,2	-
7	14,0	-

As sementes de crotalária, das safras 2008/2009 e 2009/2010, também foram submetidas a diversos testes de vigor (Tabela 8) e, assim, verificado a possibilidade da utilização do EASS durante 96 horas como um método promissor para avaliação do potencial fisiológico das sementes.

Os teores de água iniciais dos lotes de sementes produzidos na safra 2008/2009 foram uniformes entre si e, não foi possível detectar diferenças significativas de vigor entre eles pela primeira contagem de germinação, teste de frio e emergência das plântulas em campo. Todavia, a condutividade elétrica da solução de embebição indicou desempenho diferenciado dos lotes, destacando-se os lotes de superior, lote 2, e inferior vigor, lote 4 (Tabela 8).

Para as sementes da safra 2009/2010, que também demonstrou uniformidade no teor de água inicial dos lotes, observou-se diferenças mais acentuadas no vigor dos mesmos, com baixa sensibilidade apenas para a primeira contagem de germinação, enquanto que, o teste de condutividade elétrica forneceu a melhor estratificação dos mesmos em níveis de vigor, onde o lote 2 mostrou um nível de deterioração significativamente maior em relação aos demais, e o lote 1 o maior vigor (Tabela 8).

Nas safras 2008/2009 e 2009/2010, o EASS durante 96 horas demonstrou potencial para classificar os lotes de sementes em relação ao vigor (Tabela 9). Na safra 2008/2009, o vigor após o EASS variou de 77 a 91%, indicando o lote 2 como o mais vigoroso, e o lote 4 de menor vigor, com resultados semelhantes aos obtidos nas leituras de lixiviação de solutos durante o teste de condutividade elétrica (Tabela 8). Para a safra 2009/2010, o EASS produziu valores de vigor entre 64 e 86%, onde o lote 1 apresentou o melhor vigor e o lote 2 o pior vigor, concordando com os resultados obtidos pelo teste de condutividade elétrica (Tabela 8), apesar do EASS ter identificado diferenças de vigor mais contrastantes entre os lotes.

Tabela 8. Teor de água inicial (TA) e vigor de sete lotes de sementes de crotalaria colhidas nas safras 2008/2009 e, de cinco lotes da safra 2009/2010, avaliado pela primeira contagem de germinação (PC), teste de frio (TF), condutividade elétrica com 4 horas de embebição (CE/4 h) em 75 mL, a 25 °C e emergência de plântulas em campo (EC).

<b>Safra 2008/2009</b>					
Lote	TA (%)	PC (%)	TF (%)	CE/4 h ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	EC (%)
1	10,9	87 a	83 a	81,8 ab	82 a
2	10,3	85 a	87 a	60,6 a	91 a
3	10,0	84 a	82 a	73,7 ab	81 a
4	10,6	78 a	77 a	82,7 b	81 a
5	9,6	86 a	80 a	73,5 ab	89 a
6	10,8	84 a	80 a	74,9 ab	85 a
7	11,2	83 a	88 a	68,4 ab	84 a
C.V. (%)	-	6,7	6,9	9,3	5,8
<b>Safra 2009/2010</b>					
Lote	TA (%)	PC (%)	TF (%)	CE/4h ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )	EC (%)
1	10,9	84 a	84 a	57,8 a	91 a
2	11,9	84 a	72 b	82,1 c	70 b
3	11,7	87 a	77 ab	73,2 bc	76 b
4	11,6	90 a	80 ab	63,7 ab	72 b
5	11,8	92 a	75 b	68,0 abc	75 b
C.V. (%)	-	5,1	5,1	9,8	6,0

(\*) Comparação de médias dentro de cada coluna (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ )

Assim, observou-se que, apesar das sementes da safra 2007/2008 terem apresentado variação inferior a 2,0 pontos percentuais nos teores de água após o envelhecimento (Tabela 5), portanto, abaixo do limite máximo recomendado para o teste de envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 2005), constatou-se que,

valores muito próximos do máximo, condicionaram variação na velocidade de umedecimento durante o envelhecimento de sementes de crotalária e provocaram diferenças na intensidade de deterioração, comprometendo os resultados do EASS (Tabela 6).

Tabela 9. Vigor de sete lotes de sementes de crotalária colhidos na safra 2008/2009 e de cinco lotes de sementes da safra 2009/2010 após 96 horas de envelhecimento acelerado com o uso de solução saturada de NaCl (EASS), a 41 °C.

Lote	Safra 2008/2009	Safra 2009/2010
..... % .....		
1	84 ab	86 a
2	91 a	64 d
3	82 ab	66 cd
4	77 b	82 ab
5	87 ab	75 bc
6	88 ab	-
7	82 ab	-
C.V. (%)	5,6	6,7

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

Deste modo, para sementes de crotalária, a variação no teor de água das sementes após o EASS deve ter menor variação. De acordo com HAMPTON & TEKRONY (1995), uma alternativa para reduzir o efeito do teor de água das sementes após o envelhecimento acelerado é reduzir a variação no teor de água inicial das sementes.

#### 4.4. Tetrazólio na avaliação da viabilidade e vigor das sementes

Os procedimentos conduzidos no preparo das sementes para o teste de tetrazólio permitiram coloração uniforme de todo o embrião apenas quando

removido o tegumento (Figura 3, tratamento A) ou corte lateral-longitudinal sem a remoção do tegumento (Figura 3, tratamento B). Entretanto, foram encontradas dificuldades durante o corte lateral-longitudinal das sementes, o que resultou em embriões danificados, além de grande quebra de estruturas durante o processo de coloração, dificultando a identificação de injúrias pré-existentes e, inviabilizando o teste.

Portanto, embora a remoção do tegumento seja uma operação relativamente delicada e trabalhosa, o teste de tetrazólio em sementes de crotalária deve ser conduzido com o referido tecido de cobertura removido, para possibilitar correta avaliação das estruturas embrionárias. A necessidade de remoção do tegumento para que a coloração dos tecidos das sementes ocorra uniformemente também foi relatada em sementes de leucena (COSTA & SANTOS, 2010) e amendoim (BITTENCOURT & VIEIRA, 1999).

Diferentemente do recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), o corte longitudinal e transversal através do tegumento na extremidade distal não permitiu coloração adequada dos tecidos embrionários, dificultando a avaliação da viabilidade e vigor das sementes pelo teste de tetrazólio (Figura 3, tratamentos C e D). Os resultados observados neste estudo indicaram que o corte longitudinal ou transversal na região distal ao eixo embrionário, como parte do preparo das sementes, dificultou a difusão uniforme da solução de tetrazólio em todo o embrião, com coloração apenas em áreas próximas ao corte, ou seja, que estiveram em contato direto com a solução, não atingindo, portanto, o eixo embrionário, impossibilitando, desta forma, interpretação correta do teste e tornando o método ineficiente, uma vez que, o eixo embrionário constitui a principal estrutura na determinação da viabilidade e vigor.



Figura 3. Embriões de crotalária após imersão em tetrazólio, preparadas mediante (a) remoção do tegumento; (b) corte lateral-longitudinal sem a remoção do tegumento; (c) corte longitudinal na região distal ao eixo embrionário, no sentido da espessura da semente através do embrião; (d) corte transversal na região distal ao eixo embrionário, no sentido da largura da semente, através do embrião.

Na avaliação da viabilidade e vigor das sementes, estabeleceram-se classes, utilizando-se como critérios a intensidade e extensão da coloração, localização e profundidade de danos. Deste modo, as sementes foram classificadas em três classes, sendo as sementes pertencentes às classes 1 e 2 consideradas viáveis e as da classe 3 inviáveis.

As sementes da classe 1 foram qualificadas como viáveis e vigorosas (Figura 4), com tecidos embrionários de aspecto normal, ou com algumas ranhuras superficiais, de coloração rosa claro em toda a extensão do embrião, tecidos de consistência firme e aspecto brilhante. De acordo com MOORE (1985), tecidos vigorosos tendem a colorir gradualmente e uniformemente e representa indicativo positivo da atividade respiratória normal nas mitocôndrias a nível celular.

Foram incluídas na classe 2 sementes de crotalária viáveis e não-vigorosas (Figura 5), apresentando tecidos com sintomas de deterioração ou com pequenas áreas sem atividade metabólica, sem alcançar, entretanto, o eixo vital do embrião e nem a região vascular. Estão incluídas nesta classe, sementes com embriões coloridos intensamente (tecidos em deterioração), tecidos com pequenas manchas de cor branca ou amarela e embriões com menos da metade da extensão dos cotilédones não coloridos.



Figura 4. Sementes viáveis e vigorosas de crotalaria (Classe 1). Embriões perfeitos, ou com algumas ranhuras superficiais, com coloração rosa claro em toda a extensão do embrião, tecidos firmes e brilhantes.



Figura 5. Sementes viáveis não-vigorosas de crotalaria (Classe 2). Embriões de coloração vermelho-intenso, manchas de cor branca ou amarela não atingindo o eixo embrionário e nem a região vascular, menos da metade da extensão dos cotilédones não coloridos.

Segundo MOORE (1973), a coloração intensa observada durante o teste de tetrazólio se deve à rápida difusão da solução através das membranas danificadas dos tecidos das sementes, enquanto que áreas não coloridas indicam ausência de redução do sal de tetrazólio e, portanto, presença de tecidos mortos.

Na classe 3, correspondente às sementes consideradas inviáveis (Figura 6), foram enquadradas aquelas com áreas vitais descoloridas ou extensas lesões em estruturas embrionárias essenciais. Nesta categoria estão incluídas sementes com embriões possuindo manchas de cor branca ou amarela (sintomas de necrose) atingindo o eixo embrionário ou a região de ligação dos cotilédones com o eixo embrionário (região vascular), ou ainda, atingindo mais da metade do tecido cotiledonar, implicando em comprometimento total da germinabilidade das sementes.

A interpretação do teste de tetrazólio utilizando três classes de viabilidade e vigor, também foi empregada para sementes de mamona (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2010), pepino (LIMA et al., 2010) e amendoim (BITTENCOURT & VIEIRA, 1999).

Na avaliação da viabilidade e vigor dos cinco lotes de sementes de crotalária da safra 2007/2008 (Tabela 10), o teste de tetrazólio indicou superioridade dos lotes 1, 2, 3 e 4 em relação ao lote 5; a viabilidade variou entre 91 e 97% e o vigor entre 72 e 87%, classificando novamente o lote 5 de padrão de qualidade inferior.

O teste de tetrazólio, por se tratar de um método rápido e preciso na avaliação da viabilidade e vigor de sementes, tem sido padronizado para sementes de diversas espécies, como leucena (COSTA & SANTOS, 2010), Danti (GUPTA et al., 2010), cunhã (DEMINICIS et al., 2009), nitraria (ZENG & WANG, 2009), aveia preta (SOUZA et al., 2009) e tomate (SANTOS et al., 2007).





Figura 6. Sementes inviáveis de crotalária (Classe 3). Embriões com manchas de cor branca ou amarela atingindo o eixo embrionário ou a região vascular, mais que a metade da extensão dos cotilédones não coloridos.

Tabela 10. Viabilidade e vigor de cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008, avaliados pelo teste de tetrazólio.

Lote	Viabilidade	Vigor
	..... % .....	
1	97 a	81 ab
2	94 ab	87 a
3	95 ab	84 ab
4	96 a	86 ab
5	91 b	72 b
C.V. (%)	1,2	4,5

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

#### 4.5. Estresse hídrico

A germinação dos cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008 foi afetada negativamente pelos diferentes potenciais osmóticos das soluções de PEG 6000 (Tabela 11). O incremento das concentrações deste soluto controlou significativamente a absorção de água pelos tecidos da semente, dificultando ou impedindo o processo germinativo de todos os lotes de maneira semelhante, com redução drástica a partir de -0,2 MPa e valores próximos de zero ou nulidade de germinação sob potenciais de -0,8 MPa. Resultados semelhantes foram observados por ALBUQUERQUE et al. (2000) em sementes de *Crotalaria spectabilis*, os quais constataram que, potenciais osmóticos semelhantes aos aqui testados, promoveram redução acentuada na germinação das sementes, com valores de germinação de 18,8% sob potencial de -0,4 MPa.

Tabela 11. Germinação de cinco lotes de sementes de crotalária, safra 2007/2008, submetidas a níveis de potenciais osmóticos de polietileno glicol, a 25 °C.

Lote	0,0	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8
..... % .....					
1	88 ab	61 a	52 a	20 a	2 a
2	92 a	57 a	26 ab	9 a	0 a
3	88 ab	41 a	37 ab	12 a	0 a
4	89 a	43 a	19 b	11 a	0 a
5	77 b	52 a	17 b	13 a	1 a
C.V. (%)	5,9	20,0	40,0	45,5	142,9

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

De acordo com MAYER & POLJAKOFF-MAYBER (1989), a inibição da germinação sob estresse hídrico é atribuída à redução da atividade respiratória, que ocorre de forma mais lenta na presença de potenciais osmóticos muito baixos, interferindo na síntese de ATP necessária ao desencadeamento do processo germinativo. Esta resposta também pode estar associada à natureza da substância inibidora, pois soluções de PEG 6000, apesar de não absorvidas pelas sementes e não tóxicas, tem alta viscosidade que, somada à baixa taxa de difusão de O<sub>2</sub>, podem comprometer a disponibilidade de oxigênio, reduzindo ou atrasando o processo germinativo das sementes (YOON et al., 1997).

Portanto, germinação substancial dos lotes de sementes foi verificada apenas no tratamento controle (Tabela 11), com menor desempenho germinativo do lote 5, ao passo que, a redução do potencial osmótico no substrato promoveu queda acentuada na germinação de todos os lotes. Deste modo, devido aos efeitos adversos de concentrações crescentes de PEG 6000 na germinação de sementes de crotalária, a avaliação do vigor das sementes por meio do estresse hídrico foi conduzida pela utilização do menor nível de estresse, correspondente a -0,2 MPa.

O estresse hídrico de -0,2 MPa não revelou-se capaz de diferenciar os lotes em níveis de vigor, considerando as características avaliadas (Tabela 12), verificando-se efeitos drásticos no início do processo germinativo das sementes, refletido principalmente pela velocidade de germinação. Segundo FALLERI (1994), este fato se deve ao prolongamento da fase estacionária de embebição das sementes, devido à redução da atividade enzimática, levando a um menor desenvolvimento meristemático e, conseqüentemente, a atraso na protrusão da raiz primária. Além disso, o crescimento das plântulas é fortemente afetado, uma vez que a menor disponibilidade de água desencadeia redução do processo de digestão e translocação de reservas dos produtos metabolizados e, por conseqüência, o crescimento das mesmas (BEWLEY & BLACK, 1994). DELL'AQUILLA (1992) atribuiu a diminuição no crescimento de plântulas às mudanças na turgescência celular em decorrência da redução da síntese de proteínas no embrião sob estresse hídrico.

A água constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos, ativando o crescimento da plântula e apresentando profunda influência na estrutura e nas propriedades das proteínas, membranas, ácidos nucleicos e de outros constituintes celulares (TAIZ & ZEIGER, 2009). O PEG 6000, como agente osmótico, tem a capacidade de simular a deficiência hídrica, cujo efeito crescente é proporcional a sua concentração (VILLELA et al., 1991). Vários trabalhos têm reportado redução acentuada na germinação e vigor de sementes sob baixos potenciais osmóticos de PEG 6000, tais como soja (SCHUAB et al., 2007), feijão (MORAES et al., 2005) e olho-de-dragão (FONSECA & PEREZ, 2003).

Tabela 12. Vigor de sementes de crotalária, safra 2007/2008, avaliado pela primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento e massa seca de plântulas, sob estresse hídrico de -0,2 MPa promovido por polietileno glicol, a 25 °C.

Lote	Primeira contagem de germinação (%)	Índice de velocidade de germinação (%)	Comprimento de plântulas (cm)	Massa seca de plântulas (mg)
1	19 a	5,0 a	22 a	14 a
2	12 a	4,5 a	20 a	15 a
3	13 a	4,4 a	21 a	14 a
4	19 a	5,1 a	16 a	13 a
5	16 a	4,3 a	19 a	13 a
C.V. (%)	35,2	8,9	23,3	14,0

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

De acordo com SÁ (1987), o desempenho de sementes sob condições de baixa disponibilidade de água depende do potencial fisiológico das mesmas, uma vez que sementes de maior vigor superam melhor esta condição. No entanto, sementes de crotalária apresentaram alta sensibilidade ao estresse hídrico, que interferiu drasticamente nos processos fisiológicos e bioquímicos das sementes, independentemente do vigor dos lotes e do nível de potencial osmótico promovido por soluções de PEG 6000, com grau de deterioração semelhante entre os lotes, os quais demonstraram baixa tolerância a este agente osmótico.

## 5. CONCLUSÕES

- O sistema automatizado de análise de imagem de plântulas com o uso do *software* SVIS, a condutividade elétrica e o envelhecimento acelerado com solução saturada de sal mostraram-se promissores na avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de *Crotalaria juncea* L.;
- A utilização do *software* SVIS permite a obtenção de resultados consistentes pela análise de imagens digitais de plântulas com três dias de idade;
- O teste de condutividade elétrica deve ser conduzido com 50 sementes embebidas em 75 mL de água desionizada, a 25 °C por 4 ou 8 horas de embebição;
- O teste de envelhecimento acelerado é eficiente na avaliação do vigor das sementes pelo método do uso de solução saturada de sal durante 96 horas.

## 6. REFERÊNCIAS

ADLER, M.J.; CHASE, C.A. Comparison of the allelopathic potential of leguminous summer cover crops: cowpea, sunn hemp, and velvetbean. **Hortscience**, Alexandria, v.42, n.2, p.289–293. 2007.

ALBUQUERQUE, M.C.F.; RODRIGUES, T.J.D.; MENDONÇA, E.A.F. Absorção de água por sementes de *Crotalaria spectabilis* Roth determinada em diferentes temperaturas e disponibilidade hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, vol.22, n.1, p.206-215, 2000.

AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; SCHAMMASS, E.A.; GUIRADO, N.; ROSSI, F.; MENDES, P.C.D.; MURAOKA, T. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.62, n.6, p.534-542, 2005.

AOSA. **Seed Vigor Testing Handbook**. Contribution no.32 to the Handbook on Seed Testing, 2009.

ARAUJO, R.F.; ARAUJO, E.F.; SILVA, R.F. O teste de tetrazólio em camada de aleurona na avaliação da qualidade de sementes de milho danificadas durante a colheita e durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p.104-109, 2000.

ARTOLA, A.; CARILLLO CASTAÑEDA, G. Accelerated aging time estimation for birdsfoot trefoil seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.33, n.2, p.493-497, 2005a.

ARTOLA, A.; CARRILLO-CASTAÑEDA, G. The bulk conductivity test for birdsfoot trefoil seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.33, n.1, 231-236, 2005b.

BARROS, A.S.R.; DIAS, M.C.L.L.; CICERO, S.M.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de frio. In: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D. and França-Neto, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 5.2-5.11. 1999.

BEWLEY, J.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 3. ed. New York: Plenum, 1994. 445p.

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

BRASIL. 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 30, de 21 de maio de 2008. **(Estabelece os padrões para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical)**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, Anexo IV, 23 maio 2008. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14240>

BAUER, P.J.; PARK, D.M.; CAMPBELL, B.T. Cotton Production in Rotation with Summer Legumes. **The Journal of Cotton Science**, Baton Rouge, v.13, n.3, p.183-188, 2009.

BITTENCOURT, S.R.M.de. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de amendoim através do teste de tetrazólio**. 1999. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D. Use of reduced concentrations of tetrazolium solutions for the evaluation of the viability of peanut seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.25, n.1, p.75-82, 1997.



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

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 424p.

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**, Brasília, v.22, n.1, p.74-80, 2000.

CARVALHO, S.R.L.; REZENDE, J.O.; FERNANDES, J.C.; PEREIRA, A.P. Caracterização e avaliação de leguminosas e gramíneas com alto poder relativo de penetração de raízes em solo coeso dos tabuleiros costeiros do recôncavo baiano – Etapa I. **Magistra**, Cruz das Almas, v.14, n.1, p.25-36, 2002.

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**, Brasília, v.24, n.2, p.6-11, 2002.

COSTA, C.J.; SANTOS, C.P. Teste de tetrazólio em sementes de leucena. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v.32, n.2, p.66-72, 2010.

CUSTÓDIO, C.C.; SALOMAO, G.R.; MACHADO NETO, N.B. Estresse hídrico na germinação e vigor de sementes de feijão submetidas à diferentes soluções osmóticas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.40, n.4, p.617-623, 2009.

DELL'AQUILA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, Camberra, v.69, n.2, p.167-171, 1992.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade das sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.

DELOUCHE, J.C. Germinação, Deterioração e Vigor da Semente. **Revista Seed News**, Pelotas, v.6, n.6, p.1-8, 2004.

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

DEMINICIS, B.B.; VIEIRA, H.D.; SILVA, R.F. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Clitorea ternatea* L. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v.31, n.2, p.54-62, 2009.

DUARTE-JUNIOR, J.B.; COELHO, F.C. Adubos verdes e seus efeitos no rendimento da cana-de-açúcar em sistema de plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.3, p.723-732, 2008.

DUTRA, A.S.; VIEIRA, R.D. Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de milho e soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.715-721, 2004.

DUTRA, A.S.; TEÓFILO, E.M. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.29, n.1, p.193-197, 2007.

FALLERI, E. Effect of water stress on germination in six provenances of *Pinus pinaster* Ait. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, n.3, p.591-599, 1994.

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**, Londrina, v.28, n.2, p.152-158, 2006.

FONTANÉTTI, A.; CARVALO, G.J.; MORAIS, A.R.; ALMEIDA, K.; DUARTE, W.F. Adubação verde no controle de plantas invasoras nas culturas de alface-americana e de repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.967-973, 2004.

FONSECA, S.C.L.; PEREZ, S.C.J.G.A. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenantha pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.25, n.1, p.1-6, 2003.

FOSU, M.; KUHNE, R.F.; VLEK, P.L.G. Improving maize yield in the Guinea Savannah Zone of Ghana with leguminous cover crops and PK fertilization. **Journal of Agronomy**, New York, v.3, n.2, p.115-121, 2004.

FRANÇA-NETO, J.B., KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. (1998). **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina/Brazil, Embrapa/CNPSoja. 78p. (Documentos, 116).

GASPAR-OLIVEIRA, C.M.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v.32, n.1 p.186-196, 2010.

GARRIDO, M.S.; SOARES, A.C.F.; COIMBRA, J.L.; SOUSA, C.S. Management of crotalaria and pigeon pea for control of yam nematode diseases. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.3, p.222-227, 2008.

GUIMARÃES, S. C.; SOUZA, I. F.; PINHO, E. V. R. V. Emergência de *Tridax procumbens* em função da profundidade de semeadura, do conteúdo de argila no substrato e da incidência de luz na semente. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.20, n.3, p.413-419, 2002.

GUPTA, A., GUPTA, V., GOYAL, A., KAK, A.; PANDEY, C. Standardization of the tetrazolium test in *Baliospermum montanum* (Willd.) Muell.-Arg. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.38, n.2, p.513-516, 2010.

HAMPTON J.G.; TEKRONY D.M. Handbook of Vigour Tests Methods (3rd edition). **International Seed Testing Association**, Zurich, 1995. 117p.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; HANDA, S.; HANDA, A.K. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.3, p.371-377, 1984.

HEYDECKER, W. VIGOUR. IN: ROBERTS, E.H. **Viability of seeds**. Syracuse University Press. 1972. p.204-252.

HOFFMASTER, A.L.; FUJIMURA, K.; MCDONALD, M.B.; BENNETT, M.A. An automated system for vigor testing three-day-old soybean seedlings. **Seed Science and Technology**, v.31, n.3, 701-713, 2003.

ISTA. **Rules amendments 2001**. Seed Science and Technology. Suppl. 29: 1-131. 2001.

ISTA. **International rules for seed testing**. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Switzerland. 2009.

JESUS, R.P.; CORCIOLI, G.; DIDONET, A.D.; BORGES, J.D.; MOREIRA, J.A.A.; SILVA, N.F. Plantas de cobertura de solo e seus efeitos no desenvolvimento da cultura do arroz de terras altas em cultivo orgânico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.4, p.214-220, 2007.

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.

LANGE, A.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; TRIVELIN, P.C.O. Aproveitamento pelo trigo do nitrogênio residual da crotalaria (*Crotalaria juncea*) e da uréia aplicado ao solo em cultivo precedente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1715-1720, 2009.

LIMA, L.B.; PINTO, T.L.F.; NOVENBRE, A.D.L.C. Avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de pepino pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v.32, n.1, p.60-68, 2010.

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.

MAKKAWI, M.; GASTEL, A.J.G.M. Effect of accelerated ageing on germination and vigor in lentil (*Lens culinaris* Medikus) seed. **Journal of New Seeds**, Dhaid, v.8, n.3, p.87-98, 2007.

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

MARCOS FILHO, J.; VIEIRA, R.D. Seed Vigor Tests: Principles - Conductivity Tests. In: Riad Baalbaki; Sabry Elias; Julio Marcos Filho; Miller B. McDonald.

(Org.). **Seed Vigor Testing Handbook**. Contribution no.32 to the Handbook on Seed Testing, Ithaca, NY, USA: AOSA, 2009, p.77-90.

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**, Zürich, v.34, n.2, p.485-497, 2006.

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**, Lavras, v.31, n.1, p.102-112, 2009.

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

MONEGAT, C. **Plantas de cobertura do solo: características e manejo em pequenas propriedades**. Chapecó: Ed. do Autor, 1991. 337p.

MONQUERO, P.A.; AMARAL, L.R.; INÁCIO, E.M.; BRUNHARA, J.P.; BINHA, D.P.; SILVA, P.V.; SILVA, A.C. Efeito de adubos verdes na supressão de espécies de plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.27, n.1, p.85-95, 2009.

MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. **Seed ecology**. London: Butterworth, 1973. p.347-366.

MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zürich: ISTA, 1985. 99p.

MORAES, S.R.G.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A.; FONTANETTI, A.; CARVALHO, G.J.; MAXIMINIANO, C. Influência de leguminosas no controle de fitonematóides

em cultivo orgânico de alface americana e repolho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, p.188-191, 2006.

MORAES, G. A. F.; MENEZES, N. L. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p.219-226, 2003.

MORAES, G.A.F.; MENEZES, N.L.; PASQUALLI, L.L. Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.776-780, 2005.

MUASYA, R.M.; LOMMEN, W.J.M.; AUMA, E.O.; STRUIK, P.C. Evaluation of variation in individual seed electrical conductivity in common bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lots. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.34, n.3, 621-632, 2006.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: Vieira, R.D., Carvalho, N.M. (Ed.). **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP. 1994.

NAKAGAWA, J.; COIMBRA, R.A.; CAVARIANI, C. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Crotalaria juncea* L.: Influência do tamanho e da coloração das sementes. **Científica**, Jaboticabal, v.31, n.2, p.157-166, 2003.

PAULO, E.M.; BERTON, R.S.; CAVICHIOLI, J.C.; BULISANI, E.A.; KASAI, F.S. Produtividade do cafeeiro mundo novo enxertado e submetido à adubação verde antes e após recepa da lavoura. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.1, p.115-120, 2006.

PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R.D. Electrical conductivity and deterioration of soybean seeds exposed to different storage conditions. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.29, n.2, p.97-105, 2007.

PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R.D.; PERECIN, D. Electrical conductivity as an indicator of pea seed aging of stored at different temperatures. **Scientia Agricola**, v.64, p.119-124, 2007.

PEÑALOZA, P.; RAMIREZ-ROSALES, G.; MCDONALD, M.B.; BENNETT, M.A. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed quality evaluation using seed physical attributes, saturated salt accelerated aging and the seed vigour imaging system. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.8, n.3, p.299-307, 2005.

POWELL, A.A. Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for soaking. **Journal Seed Technology**, v.10, n.2, p.81-100, 1986.

ROSSETTO, C.A.V.; LIMA, T.M.; GUIMARAES, E.C. Envelhecimento acelerado e deterioração controlada em sementes de amendoim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.8, p.795-801, 2004.

SÁ, M.E. **Relações entre qualidade fisiológica, disponibilidade hídrica E DESEMPENHO DE SEMENTES DE SOJA (GLYCINE MAX (L.) MERRILL)**. ESALQ-USP, PIRACICABA, SP. (TESE DE DOUTORADO). 1987.

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



SANTOS, M.A.O.; NOVENBRE, A.D.L.C.; MARCOS-FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.35, n.1, 213-223, 2007.

SCHUAB, S.R.P.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; FRANÇA-NETO, J.B.; MESCHÉDE, D.K.; ÁVILA, M.R. Germination test under water stress to evaluate soybean seed vigour. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.35, n.1, 187-199, 2007.

SEVERINO, F.J.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Weed suppression by smother crops and selective herbicides. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.1, p.21-26, 2004.

SILVA, E.C.; MURAOKA, T.; VILLANUEVA, F.C.A.; ESPINA, F.S.C. Aproveitamento de nitrogênio pelo milho, em razão da adubação verde, nitrogenada e fosfatada. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, n.2, p.118-127, 2009.

SILVA, J.B.; RODRIGUES, T.J.D.; VIEIRA, R.D. Desempenho de sementes de soja submetidas a diferentes potenciais osmóticos em polietilenoglicol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1634-1637, 2006.

SOUZA, C.R.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia preta pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v.31, n.3, p.57-62, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2009, 820p.

TEIXEIRA, C.M.; ARAÚJO, J.B.S.; CARVALHO, G.J. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.3, p.691-695, 2004.

TOMES L.J.; TEKRONY D.M.; EGLI D.B. Factors influencing the tray accelerated aging test for soubean seed. **Journal of Seed Technology**, Lansing, v.12, n.1, p.24-36, 1988.

TORRES, S.B.; MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de maxixe (*Cucumis anguria* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.108-112, 2001.

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Teste de condutividade elétrica em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p.151-158, 2005.

VIEIRA, R.D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.103-132.

VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: **Vigor de sementes: conceitos e testes**. (eds. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. AND FRANÇA-NETO, J.B. Londrina/Brazil. Chap. 8.1., p 1–12. 1999.

VIEIRA, R.D., SCAPPA NETO, A., BITTENCOURT, S.R.M.; PANOBIANCO, M. Electrical conductivity of the seed soaking solution and soybean seedling emergence. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.2, 164-168, 2004.

VIEIRA, R.D.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B.; BRUENNING, W.P.; PANOBIANCO, M. Temperature during soybean seed storage and the amount of electrolytes of soaked seeds solution. **Scientia Agricola**, v.65, p.496-501, 2008.

VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, E.V.R.; GUIMARÃES, R.J.; OLIVEIRA, R.J. **Testes rápidos para a determinação rápida da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras/Brazil, Universidade Federal de Lavras. 1998.

VILLELA, F.A.; DONI FILHO, L.; SIQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.11/12, p.1957-1968, 1991.

WANG, Q., KLASSEN, W., LI, Y., CODALLO, M. Cover crops and organic mulch to improve tomato yields and soil fertility. **Agronomy Journal**, Madison, v.101, n.2, p.345-351, 2009.

YOON, Y.; LANG, H.J.; COBB, B.G. Priming with salt solutions improves germination of pansy seed at high temperatures. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.2, p.248-250, 1997.

ZENG, Y.J.; WANG, Y.R. Methods of topographical tetrazolium testing for seed viability of *Nitraria tangutorum* Bobr. and *N. sibirica* Pall. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.37, n.3, p.691-698, 2009.