

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE  
MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) PELO TESTE DE TETRAZÓLIO**

**CAROLINA MARIA GASPAR DE OLIVEIRA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU-SP

Dezembro - 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE  
MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) PELO TESTE DE TETRAZÓLIO**

**CAROLINA MARIA GASPAR DE OLIVEIRA**

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cibele Chalita Martins

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Dezembro - 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

G249a Gaspar-Oliveira, Carolina Maria, 1980-  
Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) pelo teste de tetrazólio / Carolina Maria Gaspar de Oliveira. - Botucatu : [s.n.], 2007.

xv, 96 f. : il. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007  
Orientador: Cibele Chalita Martins  
Inclui bibliografia

1. Mamona. 2. Sementes - Qualidade. 3. Sementes - Viabilidade. 4. Tetrazólio. I. Martins, Cibele Chalita. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

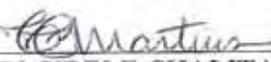
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

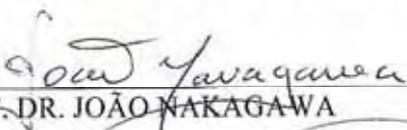
TÍTULO: "AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE  
MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) PELO TESTE DE TETRAZÓLIO"

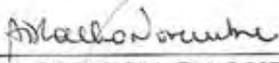
ALUNA: CAROLINA MARIA GASPAR DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> CIBELE CHALITA MARTINS

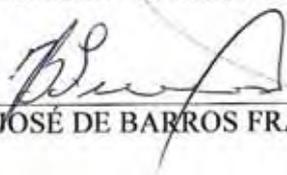
Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> CIBELE CHALITA MARTINS

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. JOÃO NAKAGAWA

  
\_\_\_\_\_  
PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANA DIONISIA DA LUZ COELHO NOVEMBRE

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. NELSON MOREIRA DE CARVALHO

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. JOSÉ DE BARROS FRANÇA NETO

Data da Realização: 03 de dezembro de 2007.

## **DEDICO**

*Aos meus pais, por todo o  
carinho, compreensão,  
incentivo e amor  
incondicional.*

## **OFEREÇO**

*Ao meu amado marido  
Marcelo, companheiro para  
a vida toda. Obrigada pelo  
incentivo, reconhecimento,  
e principalmente pela  
paciência.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, por estar sempre presente em minha vida, me guiando e a quem confio todos os meus passos.*

*À minha família pelo apoio e incentivo, em especial, meu irmão Henrique e meus sogros Hélio e Mafalda, por estarem sempre torcendo por mim.*

*À Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, pela oportunidade de realizar este curso.*

*À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e incentivo à pesquisa.*

*E às pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cibele Chalita Martins pela orientação e amizade no decorrer do curso.*

*Ao Prof. Dr. João Nakagawa pela amizade e ensinamentos durante toda a minha formação.*

*À Dr<sup>ª</sup> Maria Cristina Leme de Lima Dias por ter me iniciado no aprendizado sobre o teste de tetrazólio.*

*Ao Prof. Dr. Cláudio Cavariani, responsável pelo Laboratório de Análise de Sementes, pelo apoio e colaboração.*

*Aos membros da banca examinadora Dr. José de Barros França Neto, Prof. Dr. Nelson Moreira de Carvalho e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.*

*À Valéria Cristina Giandoni pela amizade e preciosa colaboração durante a realização deste trabalho.*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal – Setor Agricultura pela atenção, ajuda e amizade e pelo excelente período de convivência, em especial, Vera, Lana, Maurílio e Cirinho.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-graduação e Biblioteca, pela atenção e por todos os serviços que prestaram sempre de forma solícita.*

*Aos amigos Fábio Suano de Souza, Claudemir Zucarelli e Maria Filomena de Andrade Rodrigues, pela colaboração indispensável.*

*Ao colega José Salvador Foloni, docente da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, pelo fornecimento de lotes de sementes de mamoneira.*

*Aos amigos e colegas da Pós-graduação e graduação, em especial Carla, Rogério, Sandra, Mariana, Nara e Armando.*

# SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 O teste de tetrazólio na avaliação da qualidade das sementes.....	7
2.2 A estrutura da semente de mamoneira e o teste de tetrazólio.....	9
2.3 Metodologia do teste de tetrazólio.....	11
2.4 Interpretação dos resultados do teste de tetrazólio.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Etapa 1 - Métodos de preparo das sementes para o teste de tetrazólio.....	20
3.2 Etapa 2 - Concentração da solução e período de coloração das sementes para o teste de tetrazólio.....	24
3.2.1 Caracterização dos lotes.....	24
3.2.1.1 Teor de água.....	24
3.2.1.2 Teste de germinação em areia.....	24
3.2.1.3 Teste de germinação em papel.....	25
3.2.1.4 Emergência de plântulas em campo.....	26
3.2.1.5 Índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE).....	27
3.2.2 Concentração da solução e período de coloração das sementes.....	27
3.2.2.1 Primeira fase: estudo preliminar para a definição dos tratamentos de concentração da solução e período de coloração.....	27
3.2.2.2 Segunda fase: avaliação dos tratamentos.....	28

	Página
3.2.2.2.1 Comparação dos resultados de viabilidade do teste de tetrazólio.....	31
3.2.2.2.2 Qualificação das cores das sementes pelo catálogo de Munsell.	32
3.2.2.2.3 Correlação entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação.....	32
3.2.3 Análise estatística.....	33
3.3 Etapa 3 – Metodologia de pré-condicionamento das sementes para o teste de tetrazólio.....	33
3.3.1 Primeira fase: seleção dos tratamentos de pré-condicionamento.....	34
3.3.2 Segunda fase: avaliação da uniformidade de embebição dos lotes de sementes nos tratamentos selecionados.....	36
3.3.3 Terceira fase: comparação dos resultados do teste de tetrazólio com os do teste de germinação.....	37
3.3.4 Análise estatística.....	39
3.4 Etapa 4 – Metodologia para a avaliação do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio.....	39
3.4.1 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio..	40
3.4.2 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes por outros testes.....	40
3.4.2.1 Envelhecimento acelerado.....	41
3.4.2.2 Teste de classificação do vigor de plântulas.....	41
3.4.2.3 Comprimento de plântulas.....	42
3.4.2.4 Massa da matéria seca de plântulas.....	43
3.4.3 Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Etapa 1 - Métodos de preparo das sementes para o teste de tetrazólio.....	44
4.2 Etapa 2 - Concentração da solução e período de coloração das sementes para o teste de tetrazólio.....	49
4.2.1 Caracterização dos lotes.....	49

	Página
4.2.2 Concentração da solução e período de coloração das sementes.....	50
4.2.2.1 Primeira fase: estudo preliminar para a definição dos tratamentos de concentração da solução e período de coloração.....	50
4.2.2.2 Segunda fase: avaliação dos tratamentos.....	53
4.2.2.2.1 Comparação dos resultados de viabilidade do teste de tetrazólio.....	53
4.2.2.2.2 Qualificação das cores das sementes pelo catálogo de Munsell.	55
4.2.2.2.3 Correlação entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação.....	59
4.3 Etapa 3 – Metodologia de pré-condicionamento das sementes para o teste de tetrazólio.....	60
4.3.1 Primeira fase: seleção dos tratamentos de pré-condicionamento.....	62
4.3.2 Segunda fase: avaliação da uniformidade de embebição dos lotes de sementes nos tratamentos selecionados.....	66
4.3.3 Terceira fase: comparação dos resultados do teste de tetrazólio com os do teste de germinação.....	71
4.4 Etapa 4 – Metodologia para a avaliação do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio.....	77
4.4.1 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio..	77
4.4.2 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes por outros testes.....	83
5 CONCLUSÕES.....	88
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

**LISTA DE TABELAS**

	Página	
Tabela 1	Caracterização física e fisiológica dos cinco lotes de sementes de mamoneira, utilizados na segunda etapa, determinada pelo teor de água (%) e pelos testes de germinação em areia (%), germinação em papel (%), emergência de plântulas em solo (%) (conduzido de 02 a 23 de Fevereiro de 2006) e índice de velocidade de emergência (IVE).....	50
Tabela 2	Sementes de mamoneira viáveis pelos testes de tetrazólio (TZ), conduzidos nos diferentes tratamentos de concentração da solução e período de coloração, e pelos testes de germinação em areia e em papel.....	54
Tabela 3	Porcentagem de sementes de mamoneira distribuídas nas cores do catálogo de Munsell (1976), após os testes de tetrazólio conduzidos nos diferentes tratamentos de concentração (%) e período de coloração (minutos).....	56
Tabela 4	Distribuição das sementes de mamoneira nos grupos de cores, com as correspondentes cores do catálogo de Munsell, após o teste de tetrazólio, conduzido nos diferentes tratamentos de concentração da solução (%) e período de coloração (minutos).....	58
Tabela 5	Correlação simples das médias dos testes de germinação em areia, em papel, e dos testes de tetrazólio (TZ) conduzidos nos tratamentos de concentração da solução e período de coloração para sementes de mamoneira.....	60
Tabela 6	Caracterização física e fisiológica dos cinco lotes de sementes de mamoneira, utilizados na terceira etapa, determinada pelo teor de água (%) das sementes com e sem tegumento e pelos testes de germinação em areia (%), emergência de plântulas em campo (%) (conduzido de 01 a 21 de Abril de 2006) e índice de velocidade de emergência (IVE).....	61

	Página	
Tabela 7	Teor de água das sementes de mamoneira (lote 6) sem tegumento após o pré-condicionamento nos métodos entre papel com tegumento (EPC), entre papel sem tegumento (EPS) e imersão em água com tegumento (IAC), nos 69 tratamentos....	63
Tabela 7	Continuação.....	64
Tabela 8	Teor de água de sementes de mamoneira sem tegumento após o pré-condicionamento nos métodos entre papel com tegumento (EPC), entre papel sem tegumento (EPS) e imersão em água com tegumento (IAC), nos 30 tratamentos selecionados, para a média de cinco lotes.....	67
Tabela 9	Teor de água de cinco lotes de sementes de mamoneira sem tegumento após os tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel com tegumento.....	69
Tabela 10	Teor de água de cinco lotes de sementes de mamoneira sem tegumento após os tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel sem tegumento.....	70
Tabela 11	Porcentagem de sementes viáveis e de sementes viáveis e não viáveis com coloração desuniforme e com manchas esbranquiçadas, observadas no teste de tetrazólio realizado após dez tratamentos de pré-condicionamento nos métodos entre papel com tegumento (EPC) e sem tegumento (EPS), para o lote 6 de sementes de mamoneira.....	71
Tabela 12	Sementes viáveis de mamoneira determinadas pelo teste de tetrazólio, realizado após seis tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel com tegumento (EPC), e pelo teste de germinação em areia.....	74
Tabela 13	Sementes viáveis de mamoneira determinadas pelo teste de tetrazólio, realizado após seis tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel com tegumento (EPC), e pelo teste de germinação em areia, para a média dos cinco lotes.....	76

Tabela 14	Viabilidade (viáveis vigorosas e não vigorosas) e vigor (viáveis e vigorosas) de sementes de mamoneira pelo teste de tetrazólio.....	83
Tabela 15	Caracterização dos cinco lotes de sementes de mamoneira utilizados na quarta etapa pelo teor de água (TA) e pelos testes de primeira contagem do teste de germinação (PC), germinação em papel (GP), germinação entre areia (GA), normais fortes pelo teste de classificação das plântulas (NF), emergência de plântulas em campo (EC) (conduzido de 01 a 21 de Novembro de 2006), índice de velocidade de emergência (IVE), envelhecimento acelerado (EA), comprimento de plântulas (CP) e massa de matéria seca de plântulas (MS).....	84
Tabela 16	Análise de correlação simples (r) entre as médias dos testes de primeira contagem da germinação (PC), germinação em papel (GP), germinação entre areia (GA), normais fortes pelo teste de classificação das plântulas (NF), emergência de plântulas em campo (EC), índice de velocidade de emergência (IVE), viabilidade e vigor pelo teste de tetrazólio (TZ), envelhecimento acelerado (EA), comprimento de plântulas (CP) e massa de matéria seca de plântulas (MS), realizados para cinco lotes de sementes de mamoneira.....	85

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Semente de mamoneira em corte longitudinal, no sentido da espessura, paralelo aos cotilédones (a) e em corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento (b).....	9
Figura 2	Preparo da semente de mamoneira mediante corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento da semente, através do tegumento, endosperma e embrião: corte (a); semente cortada (b); sementes cortadas imersas na solução de tetrazólio (c).....	21
Figura 3	Preparo da semente de mamoneira mediante corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula, evitando-se atingir o eixo embrionário, no sentido da largura da semente, através do tegumento, endosperma e embrião: sementes cortadas (a); sementes cortadas imersas na solução de tetrazólio (b).....	21
Figura 4	Preparo da semente de mamoneira mediante remoção do tegumento: processo de remoção do tegumento (a); sementes sem o tegumento (b).....	22
Figura 5	Preparo da semente de mamoneira mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento da semente, através do endosperma e embrião: corte (a); sementes cortadas imersas na solução de tetrazólio (b).....	22
Figura 6	Preparo da semente de mamoneira mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido da espessura da semente, paralelo aos cotilédones, através do endosperma e embrião: corte (a); sementes cortadas (b)..	23
Figura 7	Teste de germinação em areia para sementes de mamoneira.....	25
Figura 8	Teste de emergência de plântulas em campo: visão geral (a), e detalhe das plântulas de mamoneira emersas, com os cotilédones abertos (b).....	26

	Página
Figura 9	Corte longitudinal no sentido do comprimento da semente de mamoneira, mostrando o endosperma (a) e as estruturas embrionárias: cotilédones (b), eixo hipocótilo-radícula (c), epicótilo (d), córtex e cilindro central (e)..... 29
Figura 10	Sementes viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando as estruturas do embrião desenvolvidas, intactas e com cor rosa..... 30
Figura 11	Sementes viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando pequenas necroses nos cotilédones, ou no endosperma, sem atingir a junção do eixo embrionário e dos cotilédones..... 30
Figura 12	Sementes viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando pequenas necroses na ponta extrema da radícula, sem atingir o cilindro central... 31
Figura 13	Sementes não viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando lesões intensas, embriões descoloridos ou com áreas críticas do embrião descoloridas..... 31
Figura 14	Qualificação das sementes de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, nas fichas de cores do catálogo de Munsell..... 32
Figura 15	Pré-condicionamento das sementes de mamoneira: entre papel toalha para germinação (a); imersão em água (b)..... 35
Figura 16	Sementes de mamoneira apresentando coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) após o teste de tetrazólio; detalhes: mancha no eixo hipocótilo-radícula em semente vigorosa (c); mancha no endosperma (d)..... 38
Figura 17	Teste de classificação de plântulas de mamoneira: normais fortes (a), normais fracas (b), e anormais (c)..... 42

	Página
Figura 18	Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento, através do endosperma e embrião..... 45
Figura 19	Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento, através do tegumento, endosperma e embrião..... 45
Figura 20	Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano no sentido da espessura da semente, paralelo aos cotilédones, através do endosperma e embrião..... 46
Figura 21	Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula evitando-se atingir o eixo embrionário: com tegumento (a); após a retirada do tegumento (b); e após corte longitudinal mediano através do embrião (c)..... 47
Figura 22	Sementes de mamoneira preparadas mediante remoção do tegumento, após duas horas de imersão no tetrazólio (a); e após corte longitudinal mediano através do embrião (b)..... 47
Figura 23	Sementes de mamoneira preparadas mediante remoção do tegumento, após seis horas de imersão no tetrazólio (a); e após corte longitudinal mediano através do embrião (b)..... 48
Figura 24	Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 1,0% por 30 minutos (a), 60 minutos (b) e 90 minutos (c)..... 51
Figura 25	Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,5% por 60 minutos (a), 90 minutos (b) e 120 minutos (c)..... 51

	Página
Figura 26	Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,2% por 60 minutos (a), 120 minutos (b) e 180 minutos (c)..... 52
Figura 27	Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,1% por 120 minutos (a), 180 minutos (b) e 240 minutos (c)..... 52
Figura 28	Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,075% por 120 minutos (a), 180 minutos (b) e 240 minutos (c)..... 53
Figura 29	Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sementes com tegumento por 10 horas a 35°C..... 72
Figura 30	Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sementes sem tegumento por 6 horas a 25°C..... 72
Figura 31	Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sementes sem tegumento por 6 horas a 30°C..... 73
Figura 32	Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sementes sem tegumento por 6 horas a 40°C..... 73
Figura 33	Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, com coloração rosa-claro a rosa em toda a extensão do embrião e do endosperma, com tecidos firmes e túrgidos, sem apresentar lesões visíveis..... 78
Figura 34	Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, apresentando pequenos danos superficiais em volta dos cotilédones, mas sem atingi-los..... 78

	Página	
Figura 35	Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, com coloração fraca, indicando restrição à penetração da solução de tetrazólio.....	78
Figura 36	Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, com coloração vermelho carmim (tecido em deterioração) na extremidade apical inferior do eixo hipocótilo-radícula.....	79
Figura 37	Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, apresentando áreas com coloração rosa-escuro a vermelho carmim no endosperma, mas o tecido está túrgido e brilhante.....	79
Figura 38	Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, apresentando endosperma e/ou cotilédones com menos de 50% das áreas não coloridas.....	80
Figura 39	Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, com a extremidade do eixo hipocótilo-radícula sem coloração, mas com os tecidos firmes e túrgidos.....	80
Figura 40	Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, apresentando endosperma e/ou embrião com coloração vermelha-escuro, porém brilhante e sem alteração de textura.....	80
Figura 41	Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, que só teriam possibilidade de germinar sob condições extremamente favoráveis.....	81
Figura 42	Sementes não viáveis de mamoneira, apresentando mais de 50% das áreas dos cotilédones e/ou endosperma não coloridas.....	81
Figura 43	Sementes não viáveis de mamoneira, apresentando ausência de coloração na região do eixo hipocótilo-radícula e tecidos flácidos e brancos ou amarelados.....	82
Figura 44	Sementes não viáveis de mamoneira, com áreas do endosperma e embrião totalmente sem coloração.....	82

## RESUMO

O teste de tetrazólio é um método rápido e eficaz para avaliar a viabilidade e o vigor de sementes. O presente trabalho teve por objetivo padronizar a metodologia do teste de tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.). A pesquisa foi realizada em quatro etapas. Na primeira, testou-se o método de preparo das sementes (corte longitudinal mediano através do tegumento, endosperma e embrião; corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula sem atingir o eixo embrionário; remoção do tegumento; remoção do tegumento com corte longitudinal mediano através do endosperma e embrião; e remoção do tegumento com corte longitudinal mediano, paralelo aos cotilédones, através do endosperma e embrião), avaliando-se a coloração. Na segunda, a concentração da solução de tetrazólio (1,0%, 0,5%, 0,2%, 0,1% e 0,075%) e o período de coloração (30 a 240 minutos) foram estudados e os resultados comparados com os obtidos nos testes de germinação. Na terceira, testaram-se os métodos de pré-condicionamento das sementes (entre papel umedecido, sementes com tegumento, por 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 horas, a 30°C, 35°C e 40°C; entre papel umedecido, sementes sem tegumento, e imersão em água das sementes com tegumento, ambos por 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C), sendo os resultados avaliados pela uniformidade na coloração e comparados aos obtidos no teste de germinação. Na quarta, avaliou-se a classificação dos lotes de sementes quanto à viabilidade e ao vigor pelo teste de tetrazólio, sendo os resultados comparados aos obtidos nos testes de germinação em areia, em papel, primeira contagem da germinação em papel, emergência de plântulas em campo, índice de velocidade de

emergência, classificação do vigor de plântulas, comprimento e massa da matéria seca de plântulas e envelhecimento acelerado. O delineamento experimental empregado nas etapas foi o inteiramente casualizado, e a comparação de médias realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados indicaram que o teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade e o vigor de sementes de mamoneira. A avaliação da qualidade fisiológica das sementes de mamoneira pelo teste de tetrazólio deve ser realizada pré-condicionando as sementes com tegumento, entre papel toalha umedecido, por 16 horas a 35°C, ou por 18 horas a 30°C ou 40°C. Após esse período, o tegumento deve ser removido e as sementes cortadas longitudinal e medianamente, no sentido do comprimento, através do endosperma e embrião e, então, imersas na solução de tetrazólio na concentração de 0,2% por 120 minutos, na temperatura de 35°C, para o desenvolvimento da coloração.

EVALUATION OF CASTOR BEAN SEED PHYSIOLOGICAL QUALITY BY THE TETRAZOLIUM TEST. Botucatu, 2007. 111p. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CAROLINA MARIA GASPAR DE OLIVEIRA

Adviser: CIBELE CHALITA MARTINS

## SUMMARY

The tetrazolium test is a quick and accurate method for estimating seed viability and vigor. This research had the objective of standardizing the tetrazolium test methodology for the evaluation of physiological quality of castor bean seeds (*Ricinus communis* L.). The research was carried out in four parts. In the first one, seed preparation methods (longitudinal cut through the middle of the seed coat, endosperm and embryo; longitudinal and diagonal cut without reaching the embryo; coat removal; coat removal with longitudinal cut through the middle of the endosperm and embryo; and coat removal with longitudinal cut parallel to cotyledons through the middle of the endosperm and embryo) were evaluated by staining evaluations. In the second part tetrazolium solution concentrations (1.0%, 0.5%, 0.2%, 0.1% and 0.075%) and staining periods (30 to 240 minutes) were tested. The results were compared to the ones from the germination test. In the third part, seed preconditioning methods (between moist paper towel, seeds with coat, for 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18 hours, at 30°C, 35°C and 40°C; between moist paper towel, seeds without coat, and seeds with coat immersed in water, both for 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours, at 25°C, 30°C, 35°C and 40°C) were evaluated and the results were evaluated by staining uniformity and compared with germination test values. In the fourth part, seed lot classification for viability and vigor were evaluated by the tetrazolium test and the results were compared to ones from the germination test in sand, in paper, first count of the germination test in paper, seedling emergence in the field, emergence speed index, seedling vigor classification, seedling length and dry matter and accelerated aging tests. All tests were conducted at the same time. The statistical design was completely randomized, and the means comparisons were accomplished by the Tukey test at 0.05 level of probability. The results showed that the tetrazolium test is efficient for estimating castor bean seed viability and vigor. To evaluate physiological quality by the tetrazolium test, castor bean seeds should be preconditioned with coat between moist paper towel for 16 hours

at 35°C or for 18 hours at 30°C or 40°C. After this period, the coat must be removed and the seeds should be cut longitudinally, in the length direction, through the middle of the endosperm and embryo and then placed in tetrazolium solution at a concentration of 0.2% for 120 minutes, at 35°C, for the staining development.

---

Keywords: *Ricinus communis* L., seed, tetrazolium test, physiological quality, vigor.

## 1 INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) vem ganhando importância no cenário nacional devido principalmente ao Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel - PROBIODIESEL, que busca fontes alternativas de energia, capazes de substituir o petróleo. Este programa criou um novo mercado para o óleo de mamona, que exigirá grandes áreas de plantio para atender a demanda do mercado de combustíveis. De acordo com o IBGE (2007), na safra 2006 a área plantada de mamoneira foi de 137.555 ha e para 2007 há a previsão de colheita de 195.971 ha, o que representa uma demanda de 980 a 2000 toneladas de sementes.

Dessa maneira, a produção de sementes de mamoneira tem se apresentado cada vez mais tecnificada, com a participação de grandes empresas neste segmento de mercado. A obtenção de informações precisas e completas sobre a qualidade das sementes produzidas torna-se importante durante a produção e comercialização, principalmente, em comparação a outras opções para a produção do biodiesel, como a soja, o amendoim e o girassol, que dispõem de tecnologias estabelecidas de produção de sementes.

O teste de tetrazólio é utilizado na rotina dos laboratórios de análise de sementes como uma importante ferramenta no controle da qualidade. A rapidez de execução do teste o torna importante para o setor, agilizando as decisões, pois seus resultados são empregados no estabelecimento de bases para a comercialização, avaliação da viabilidade e

para a identificação de problemas no processamento e armazenamento, além de permitir uma estimativa do vigor das sementes.

Diversos fatores podem interferir na obtenção de resultados satisfatórios no teste de tetrazólio, principalmente aqueles relacionados à metodologia de execução como: preparo das sementes antes da coloração, concentração da solução de tetrazólio, período e temperatura de exposição à solução e critérios de interpretação.

A eficiência do teste em avaliar a viabilidade e, em alguns casos, o vigor das sementes está relacionada ao desenvolvimento de metodologia adequada e ao estabelecimento de critérios complementares para a avaliação de cada espécie, como foi realizado para amendoim, soja, milho, algodão, braquiária, tomate, abobrinha, melancia, feijão-vagem, café, seringueira, entre outras.

Assim, o objetivo desse estudo foi padronizar a metodologia do teste de tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O teste de tetrazólio na avaliação da qualidade das sementes**

A qualidade fisiológica da semente é avaliada por meio de duas características fundamentais: viabilidade e vigor, que representam diferentes atributos da semente. A viabilidade, medida principalmente pela germinação, procura determinar o máximo potencial germinativo da semente, oferecendo, para isso, as condições ambientais mais favoráveis para o processo. O vigor representa atributos mais sutis da qualidade fisiológica, não revelados pelo teste de germinação, e é determinado sob condições desfavoráveis, ou medindo-se o declínio de alguma função bioquímica ou fisiológica da semente (MARCOS FILHO et al., 1987).

Entre os testes mais utilizados para avaliar a qualidade das sementes, destaca-se o teste de tetrazólio, pela sua rapidez, pois os resultados podem ser obtidos em aproximadamente 24 horas, e pela sua confiabilidade, comprovada na avaliação da qualidade de sementes de soja (FRANÇA NETO et al., 1998), milho (DIAS e BARROS, 1999), café (DIAS e SILVA, 1998), feijão-vagem (BHERING et al., 1996), amendoim (BITTENCOURT, 1995), tomate (SANTOS, 2003), capim-colonião e braquiária (DIAS e ALVES, 2001 a, b), entre outras.

Além disso, os dados obtidos pelo teste de tetrazólio podem ser empregados no estabelecimento de bases para a comercialização, avaliação da viabilidade das

sementes na maturidade, controle de qualidade durante o processamento e período de armazenamento e a identificação de problemas. Permite, ainda, uma avaliação do vigor das sementes (MARCOS FILHO et al., 1987; SANTOS, 2003).

Entretanto, o teste de tetrazólio ainda não tem uso generalizado para algumas espécies como a mamona (*Ricinus communis* L.), principalmente, devido à falta de treinamento de pessoal e à deficiência de conhecimentos sobre a metodologia adequada (MARCOS FILHO et al., 1987). As recomendações encontradas para a realização deste teste em sementes de mamoneira são restritas e imprecisas em função da carência de pesquisas relacionadas ao assunto (BRASIL, 1992), e as diferenças entre os métodos sugeridos acarretam dificuldades para o estabelecimento de padrões a serem seguidos.

As informações gerais para a realização do teste de tetrazólio de várias espécies estão indicadas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) e têm sido aprimoradas nos últimos anos. Assim, os estudos desenvolvidos têm procurado estabelecer as condições de pré-condicionamento, a temperatura, a concentração da solução de tetrazólio, o período de coloração e os critérios complementares para a avaliação, como pode se observar nos trabalhos de seringueira (WETZEL et al., 1992), amendoim (BITTENCOURT, 1995), soja (FRANÇA NETO et al., 1998), milho (DIAS e BARROS, 1999), algodão (VIEIRA e VON PINHO, 1999), braquiária (DIAS e ALVES, 2001b), tomate (SANTOS, 2003), abobrinha (BARROS et al., 2005), melancia (BHERING et al., 2005), entre outras espécies.

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade de enzimas do grupo das desidrogenases, particularmente a desidrogenase do ácido málico, envolvidas na atividade respiratória das sementes, que catalisam a redução dos íons do sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio) nos tecidos vivos. Íons de hidrogênio são transferidos para o sal de tetrazólio, que atua como um receptor desse elemento. O tetrazólio, que é um sal incolor e difusível é, então, reduzido a um composto não difusível de cor vermelha, conhecido por trifetilformazan, o que indica que as desidrogenases estão ativas, e conseqüentemente que há atividade respiratória nas mitocôndrias e, portanto, há viabilidade celular e do tecido (DELOUCHE et al., 1976).

Assim, a coloração resultante da reação do tetrazólio é uma indicação positiva da viabilidade por meio da detecção da respiração das células. As sementes deterioradas ou danificadas mecanicamente desenvolvem rapidamente uma coloração

vermelha-escuro intensa e profunda, enquanto as vigorosas apresentam coloração rósea a vermelha e brilhante (DELOUCHE et al., 1976; BITTENCOURT, 1995; FRANÇA NETO et al., 1998). Por outro lado, nos tecidos mortos ou muito deteriorados as enzimas desidrogenases estão inativadas e por isso não ocorre a reação com o sal de tetrazólio e, conseqüentemente, a coloração dos tecidos (MARCOS FILHO et al., 1987).

## 2.2 A estrutura da semente de mamoneira e o teste de tetrazólio

Na interpretação do teste de tetrazólio é necessário o conhecimento das estruturas anatômicas da semente em análise (FRANÇA NETO et al., 1998). Essas informações permitem estabelecer corretamente as condições para o preparo e os critérios para a avaliação da semente. Nesse sentido, as sementes de mamoneira são constituídas por tegumento, endosperma e embrião (Figura 1).

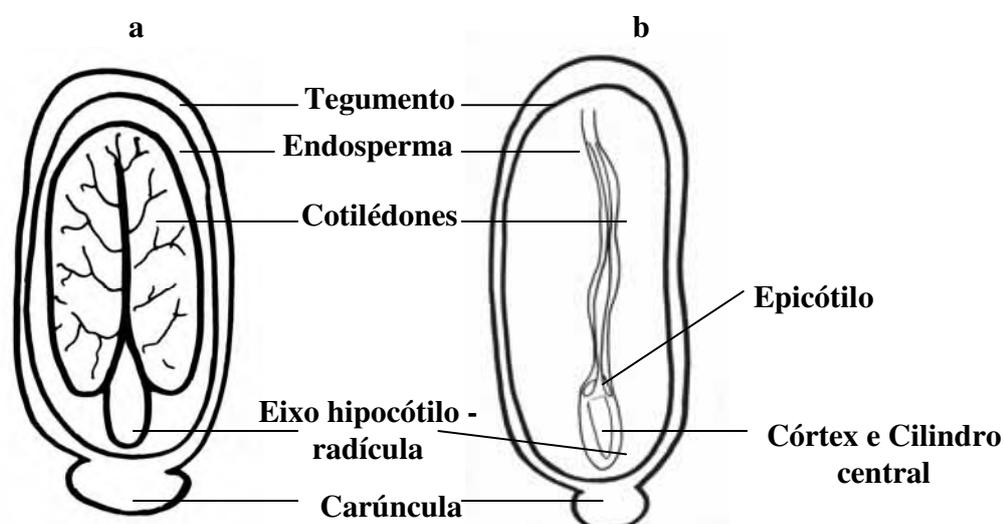


Figura 1 – Semente de mamoneira em corte longitudinal, no sentido da espessura, paralelo aos cotilédones (a) e em corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento (b).

As substâncias de reserva estão presentes principalmente no endosperma, que preenche a maior parte do interior da semente, é rico em óleo e proteínas e tem a função de nutrir o embrião durante o seu desenvolvimento, sendo totalmente absorvido até a formação da plântula autotrófica (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O embrião está inserido no endosperma e é formado pelos cotilédones e pelo eixo embrionário. As sementes de mamoneira apresentam dois cotilédones delgados, semelhantes a folhas, e que possuem comprimento e largura similares ao da semente (Figura 1). Durante a germinação, esses cotilédones têm a função de liberar enzimas específicas para o tecido endospermático, a fim de disponibilizar as reservas ali armazenadas para o desenvolvimento do eixo embrionário. Os cotilédones emergem acima do solo e passam a realizar fotossíntese limitada (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O eixo embrionário é pequeno em relação ao tamanho da semente. A porção abaixo do nó cotiledonar é denominada hipocótilo, e na extremidade do eixo situa-se a radícula e, devido à impossibilidade de se precisar onde termina o hipocótilo e onde começa a radícula, é denominado de eixo hipocótilo-radícula (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Em *Ricinus*, o tegumento é representado por: uma epiderme externa, constituída de células alongadas tangencialmente e pigmentadas; uma epiderme interna constituída de células colunares; e por camadas de células parenquimáticas comprimidas entre as duas camadas de epiderme (ESAU, 1974). A carúncula desenvolve-se a partir de divisões das células do tegumento nas proximidades da micrópila e é rica em lipídeos e proteínas, que atraem insetos, como as formigas, que dispersam as sementes (ESAU, 1974; LEUBNER, 2007).

As sementes de mamoneira são sensíveis aos danos que podem ocorrer durante a extração de dentro dos frutos, já que estes apresentam certa resistência física à máquina descascadora, enquanto as sementes apresentam tegumento quebradiço, embrião e tecidos de reserva macios e delicados e radícula muito próxima à superfície da semente (Figura 1). Tais danos se manifestam sob as formas de esmagamento total ou de partes da semente, abrasões, rachaduras, quebras ou até mesmo remoção total do tegumento (LAGO et al., 1985).

A composição química influencia diretamente o vigor e o potencial de armazenamento das sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Assim, as sementes de mamoneira são constituídas, em média, por 18% a 26% de proteínas e 40% a 60% de óleo (STREET e OPIK, 1974), sendo estes componentes a fonte de energia e aminoácidos para o embrião (ESAU, 1974). A quantidade de carboidratos na semente varia de 0,7% a 12,7%, e no tegumento de 53% a 70%. Ainda, nos tegumentos e cápsulas há compostos fenólicos como o tanino, presente em até 2,5% do total da semente (MOSHKIN, 1986). A composição química pode variar com a cultivar e a região de cultivo.

Além disso, de forma geral a semente de mamoneira é muito variável em cor, forma, tamanho, peso, proporção do tegumento, presença ou ausência de carúncula e maior ou menor aderência do tegumento ao endosperma (MAZZANI, 1983).

### **2.3 Metodologia do teste de tetrazólio**

A amostra de sementes para o teste de tetrazólio deve ser representativa do lote e coletada conforme as prescrições das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), que indicam que o teste deve ser efetuado com 200 sementes, em duas repetições de 100 ou quatro de 50. Em avaliações internacionais predominam as recomendações da International Seed Testing Association - ISTA (2004), que prescrevem a utilização de quatro repetições de 100 sementes para a realização desse teste. Entretanto, as amostras para testes não oficiais podem ser menores, para sementes de soja, milho, algodão, amendoim e feijão-de-vagem os estudos realizados sugerem a utilização de duas repetições de 50 sementes (FRANÇA NETO et al., 1998; DIAS e BARROS, 1999; VIEIRA e VON PINHO, 1999; BITTENCOURT, 1995; BHERING et al., 1999).

O material necessário para a condução do teste de tetrazólio é simples e barato, podendo ser encontrado na maioria dos laboratórios, e consiste de bisturis ou lâminas de barbear, pinças, papel-toalha, copinhos de plástico ou béquers de 50 ml, placas de Petri, estufa ou germinador com controle de temperatura, refrigerador, recipiente de vidro cor âmbar, sal de tetrazólio ou cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio e lupas com aumento de 6x e iluminação fluorescente (DIAS e BARROS, 1999).

Geralmente, o início do preparo das sementes para a realização do teste de tetrazólio é o pré-condicionamento, ou hidratação, que promove o amolecimento das sementes, devido à reidratação dos tecidos e à ativação do sistema enzimático, com intensificação da respiração e das demais atividades metabólicas. Esse processo facilita o preparo das sementes para o teste, a penetração da solução de tetrazólio e o desenvolvimento de uma coloração mais nítida e evidente (MOORE, 1985).

O teor de água das sementes após o período de hidratação é um fator importante para o desenvolvimento da coloração no teste de tetrazólio (SANTOS, 2003). Nesse sentido, destaca-se que a semente de mamoneira, no processo de embebição, absorve de 28 a 32% de água, e então inicia a hidrólise das macromoléculas para a nutrição do embrião (BELTRÃO et al., 2001). Sementes de soja devem atingir no mínimo 27% de água, para que não ocorram problemas de sementes com manchas mosaico e dificuldade no desenvolvimento da coloração pelo tetrazólio (COSTA et al., 1998). Em seringueira, Wetzel et al. (1992) observaram que as sementes devem atingir cerca de 30% de água para obter uma coloração nítida na avaliação.

Durante o pré-condicionamento a absorção de água deve ser lenta para evitar a ocorrência de trincas nas sementes, ou mesmo a lixiviação de substâncias solúveis, principalmente em sementes deterioradas (MOORE, 1985). A temperatura na qual a semente embebe exerce efeito significativo sobre o processo, interagindo com a disponibilidade de água; sendo que a velocidade de absorção aumenta com a elevação da temperatura, em função do aumento na pressão de difusão da solução de embebição (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Dessa maneira, as temperaturas mais indicadas durante o período de embebição estão entre 30°C e 40°C (MOORE, 1985), pois promovem a redução do tempo de hidratação e, conseqüentemente, de execução do teste, sem comprometer os resultados (COSTA et al., 1998).

Os componentes da semente também influenciam a velocidade de embebição e o desenvolvimento da coloração pelo tetrazólio, devido à composição química e a qualidade fisiológica da semente e do tegumento, que possuem diferentes características morfológicas, químicas e de impermeabilidade (WOODSTOCK, 1988). Resultados de pesquisa têm demonstrado que a absorção processa-se mais rapidamente em sementes com

alto teor protéico, em função da característica hidrofílica das proteínas (BURCH e DELOUCHE, 1959; LOPEZ e GRABE, 1973).

O pré-condicionamento das sementes pode ser realizado entre papel-toalha (ou papel de germinação) umedecido, em forma de rolo ou dobrado em quatro, como indicado para as sementes de soja, amendoim e seringueira (FRANÇA NETO et al., 1998; BITTENCOURT, 1995; WETZEL et al., 1992), ou pela imersão das sementes em água, como para as de abóbora e jenipapo (DIAS et al., 2001; NASCIMENTO e CARVALHO, 1998).

Ainda, de acordo com a espécie, variam o tempo e a temperatura para a hidratação das sementes. Em algodão, o pré-condicionamento é realizado por 14 a 16 horas a 25°C (VIEIRA e VON PINHO, 1999). A recomendação para sementes de soja é de 16 horas a 25°C (FRANÇA NETO et al., 1998) ou por seis horas a 41°C (COSTA et al., 1998). Já, para sementes de amendoim, Bittencourt (1995) observou que a embebição deve ser realizada por 16 horas à temperatura de 20°C. Em sementes de seringueira, que possuem o tegumento rígido, este deve ser retirado antes do pré-condicionamento, o qual pode ser realizado por seis ou 18 horas, à temperatura ambiente (WETZEL et al., 1992).

Entretanto, as condições para o condicionamento satisfatório ainda não foram estabelecidas para algumas espécies, como a mamoneira, para a qual o pré-condicionamento tem sido executado de diversas maneiras: entre papel-toalha umedecido por 16 horas (GRABE, 1976) ou por 18 horas (BRASIL, 1992), ou imersão direta em água morna durante três a quatro horas (GRABE, 1976). Destaca-se que não há especificação da temperatura que deve ser utilizada para nenhum dos procedimentos descritos.

A velocidade com que a solução de tetrazólio atinge e colore os tecidos das sementes depende do número de barreiras que este encontra (PIÑA-RODRIGUES e SANTOS, 1988). Assim, em muitas espécies, o preparo da semente é necessário visando uma rápida, mas não brusca, penetração do tetrazólio. O método de preparo das sementes depende das características da espécie em exame, sendo que os mais utilizados são: bissecção (ou corte) longitudinal, transversal ou lateral, puncionamento e remoção dos tegumentos (MARCOS FILHO et al., 1987).

Sementes pequenas de leguminosas e de alguns outros gêneros não requerem preparo, podendo ser colocadas diretamente na solução de tetrazólio (FRANÇA NETO et al., 1998). Outras espécies, no entanto, possuem sementes com tegumento espesso e

duro que deve ser removido antes da coloração. É o caso de algumas espécies florestais como a copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) (FOGAÇA et al., 2001), a sucará (*Gleditschia amorphoides* Taub.) (FOGAÇA et al., 2006), a pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link.) (KROHN et al., 2001) e o guapuruvu (*Schizolobium parahyba* Vell. Blake) (PAULA et al., 2001).

Sementes de amendoim possuem o tegumento fino, entretanto, a remoção do tegumento antes da imersão das sementes na solução de tetrazólio possibilita a redução do período de coloração em cinco horas, além de permitir a utilização de solução de menor concentração (BITTENCOURT, 1995). Em sementes de algodão e de melancia, é recomendado remover o tegumento anteriormente à imersão das sementes na solução de tetrazólio (VIEIRA e VON PINHO, 1999; BHERING et al., 2005). Para essas espécies, nos períodos de tempo estabelecidos, se os tegumentos não forem retirados não há absorção da solução de tetrazólio.

A remoção do tegumento após o pré-condicionamento, geralmente, possibilita maior uniformidade e rapidez no desenvolvimento da coloração. No entanto, este procedimento pode prejudicar os resultados pela ocorrência de danos ao embrião durante a remoção (MARCOS FILHO et al., 1987; VIEIRA e VON PINHO, 1999).

Algumas espécies necessitam que seja realizado o corte da semente para a exposição do embrião e o contato direto deste com a solução de tetrazólio. Wetzel et al. (1992) recomendam que após a embebição, as sementes de seringueira devem ser cortadas longitudinalmente, de forma paralela aos cotilédones. As sementes de diversas gramíneas como milho (DIAS e BARROS, 1999), trigo (DELOUCHE et al., 1976), arroz (DIAS e SHIOGA, 1997), capim-colonião e braquiária (DIAS e ALVES, 2001 a, b), entre outras, devem ser seccionadas longitudinal e medianamente através do embrião, pois o tetrazólio não penetra o pericarpo das gramíneas.

Na literatura encontram-se recomendações relacionadas ao preparo das sementes de mamoneira, indicando que este pode ser realizado de diversas formas: corte longitudinal através do tegumento e do tecido de reserva, corte longitudinal diagonal evitando-se atingir o eixo embrionário, remoção ou separação da extremidade distal da semente, incluindo um fragmento do tecido de reserva (BRASIL, 1992), ou remoção do tegumento (GRABE, 1976).

No processo de coloração, as sementes são colocadas em recipientes e cobertas com solução de tetrazólio suficiente para mantê-las submersas. O período de coloração das sementes depende das características de cada espécie, da temperatura ambiente e da concentração da solução de tetrazólio, mas geralmente está entre 30 e 240 minutos (DELOUCHE et al., 1976; MARCOS FILHO et al., 1987).

Várias concentrações da solução de tetrazólio podem ser utilizadas no teste, dependendo da espécie avaliada, do método de preparo das sementes e da permeabilidade do tegumento, sendo as mais utilizadas 0,075%, 0,1%, 0,2%, 0,5% e 1,0% (DELOUCHE et al., 1976; MARCOS FILHO et al., 1987). Entretanto, são recomendadas as menores concentrações do sal por possibilitarem melhor visualização da coloração dos tecidos e dos diferentes tipos de injúrias (MARCOS FILHO et al., 1987; FRANÇA NETO et al., 1998). Para a obtenção de uma coloração adequada, a solução de tetrazólio deve apresentar valores de pH entre seis a oito, pois soluções ácidas alteram a velocidade e a intensidade de coloração dos tecidos, dificultando a interpretação dos resultados (PIÑA-RODRIGUES e SANTOS, 1988).

A precisão do teste de tetrazólio não é afetada por temperaturas entre 20°C e 45°C, mas a coloração se estabelece mais rapidamente nas temperaturas mais elevadas (GRABE, 1976). Por esse motivo, Marcos Filho et al. (1987) recomendaram que as sementes imersas na solução de tetrazólio sejam colocadas em uma câmara regulada à temperatura de 30°C a 40°C, e mantidas no escuro, pois a solução de tetrazólio é fotossensível e, assim, a luz pode alterar a coloração e comprometer os resultados do teste.

Wetzel et al. (1992) recomendaram a coloração de sementes de seringueira em solução de tetrazólio de 0,5% por duas a três horas a 40°C. Esses autores verificaram que para esta espécie quanto maior o período de pré-condicionamento, menor o período de coloração e vice-versa. Em sementes de soja, a recomendação é de concentração da solução de 0,075% e temperatura de 35°C a 40°C, por 150 a 180 minutos (FRANÇA NETO et al., 1998). Bittencourt (1995) recomendou a exposição das sementes de amendoim sem tegumento em solução 0,05% de tetrazólio por três horas a 40°C. Para algodão, a recomendação é de solução de tetrazólio a 0,1% a 30°C por, aproximadamente, quatro horas (VIEIRA e VON PINHO, 1999).

Em sementes de mamoneira a prescrição das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) é de coloração na solução de tetrazólio a 1,0% à temperatura de 30°C e por um período de seis a 24 horas. Também para esta espécie, Grabe (1976) recomendou a concentração da solução de tetrazólio de 1,0% por duas a três horas a 35°C.

Após o período de coloração, as sementes devem ser lavadas e mantidas submersas em água até o momento da avaliação, que deve ser realizada imediatamente. Porém, existe a possibilidade de manter as sementes de café e de milho imersas em água sob 5°C por até 24 horas, sem que ocorra alteração nas estruturas vitais das sementes e na interpretação dos resultados (DIAS e SILVA, 1998; DIAS e BARROS, 1999). No entanto, em sementes de amendoim, Bittencourt (1995) constatou que a manutenção das sementes em refrigerador por períodos maiores que seis horas favorece o desenvolvimento de fungos na superfície interna dos cotilédones e sobre o eixo embrionário, dificultando a análise. Em sementes de feijão-de-vagem e de soja a avaliação deve ser feita em, no máximo, 12 horas e as sementes mantidas em refrigerador (BHERING et al., 1996; FRANÇA NETO et al., 1998).

#### **2.4 Interpretação dos resultados do teste de tetrazólio**

No início da interpretação é necessário identificar a intensidade da coloração das diferentes estruturas da semente. Os tecidos vivos e vigorosos, geralmente túrgidos, colorem-se de forma lenta e uniforme e apresentam coloração rosa ou vermelha, brilhante e limpa, bem superficial (DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1998). Tecidos de sementes vigorosas podem restringir a entrada rápida da solução de tetrazólio, propiciando o desenvolvimento de uma coloração rosa-claro ou até mesmo a ausência de coloração dos tecidos localizados mais internamente. Porém, observa-se nesses casos que os tecidos encontram-se firmes, túrgidos e brilhantes, indicando forte resistência do sistema de membranas à penetração da solução de tetrazólio (VIEIRA e VON PINHO, 1999).

A ocorrência da coloração vermelho-escuro é característica de tecidos em deterioração, que permitem maior intensidade de difusão da solução de tetrazólio nas membranas celulares danificadas (DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1998). Os tecidos deteriorados muitas vezes estão vivos, porém, fracos e são identificados por

apresentarem-se flácidos e colorirem-se mais rápido e escuro que os tecidos normais (VIEIRA e VON PINHO, 1999).

A ausência de coloração identifica tecidos mortos, que não apresentam atividade enzimática suficiente para a produção do trifenilformazan. Esses tecidos normalmente são flácidos e apresentam cor branca opaca, mas podem ser amarelados, cinzentos ou esverdeados e apresentar pontuações ou manchas avermelhadas, dependendo da presença de fungos, bactérias ou compostos formados durante a deterioração (DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1998).

A intensidade de coloração das sementes no teste de tetrazólio é variável entre as espécies. Por exemplo, a cor rosa observada em sementes viáveis e de alto vigor de soja é mais clara que a verificada em sementes de milho e algodão de mesma qualidade. Nestas espécies, a cor que sinaliza um tecido de alto vigor é a rosa-escura ou vermelha. Em sementes de soja essa cor rosa-escura significaria tecido em deterioração (FRANÇA NETO et al., 1998; VIEIRA e VON PINHO, 1999; DIAS e BARROS, 1999).

A terminologia utilizada para denominar as cores observadas nas sementes no teste de tetrazólio costuma ser estabelecida pelos autores e, por isso, pode variar entre os trabalhos. Sementes de soja e de amendoim apresentam tonalidades de coloração semelhantes, entretanto, de acordo com Bittencourt (1995), em amendoim, a cor rosa suave designa tecidos vigorosos, as cores vermelha intenso e rosa muito intenso indicam tecido em deterioração e as cores vermelha muito intenso e roxa indicam tecidos muito deteriorados. Para sementes de soja, França Neto et al. (1998) descrevem a cor vermelha carmim para tecido vivo e vigoroso e a cor vermelha carmim forte ou vermelho intenso para tecidos em deterioração. Essas diferenças podem acarretar problemas de interpretação durante a avaliação das sementes. Por essa razão, é interessante utilizar-se de uma terminologia padronizada, correlacionando-se as cores observadas nas sementes com uma referência não subjetiva.

Nesse contexto, o catálogo de cores de Munsell (MUNSELL, 1976) apresenta-se como um padrão de classificação de cores, sendo muito utilizado em diversas áreas da ciência, como na classificação de solos, descrição de cores de frutos, alimentos e bebidas, fabricação de tintas, desenhos gráficos, e outros. Esse catálogo surgiu da necessidade de medir a cor qualitativa e quantitativamente de uma forma objetiva e apresenta a distribuição da cor em três dimensões: tonalidade (espécie de cor ou matizes, determinadas pelo

comprimento de onda), valor (definido pelo brilho ou intensidade luminosa), e cromaticidade (saturação da cor ou intensidade cromática) (ARAÚJO, 2004; PAULI, 2007). Entretanto, não há descrições na literatura que indiquem a utilização deste catálogo, ou de qualquer outra referência, para descrever as cores apresentadas pelas sementes no teste de tetrazólio.

Além da coloração, na interpretação dos resultados do teste de tetrazólio também devem ser observadas a turgescência dos tecidos, a ausência de fraturas ou lesões nas regiões vitais, danos causados por insetos e a formação morfológica da semente. Deve ser considerada, ainda, a região de transição entre os tecidos normais e os tecidos mortos ou deteriorados, bem como a extensão e localização das regiões coloridas e descoloridas (FRANÇA NETO et al., 1998).

As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) prescrevem para a avaliação de *Ricinus spp* que se considere a semente viável aquela com o embrião e o endosperma coloridos, podendo o endosperma apresentar pequenas necroses na superfície, desde que não estejam em contato com o embrião.

Já, de acordo com Grabe (1976), a avaliação da viabilidade de sementes de mamoneira deve ser realizada segundo os parâmetros do grupo “outras dicotiledôneas não leguminosas”, por ele estabelecidos, segundo os quais uma semente é viável quando as estruturas do embrião estão bem desenvolvidas, intactas e apresentam coloração vermelha após a exposição ao sal de tetrazólio. Além disso, a semente viável pode apresentar pequenas necroses nos cotilédones, em outras áreas que não sejam a junção do eixo embrionário e dos cotilédones, ou pequenas necroses na ponta extrema da radícula.

Para aferir a interpretação dos resultados devem ser realizados testes de germinação paralelos aos testes de tetrazólio, pois há uma correlação positiva e significativa entre esses testes (FRANÇA NETO et al., 1998; CARBONERA e LEMANSKI, 1997; VIEIRA e VON PINHO, 1999). São aceitáveis diferenças de até 5% entre os resultados dos dois testes, pois diferenças maiores indicam problemas na execução ou na avaliação de um deles. Falhas na amostragem, presença de sementes dormentes ou duras, microrganismos nas sementes ou no germinador, também podem causar discrepâncias entre os resultados destes testes (DIAS e BARROS, 1995; FRANÇA NETO, 1999).

A determinação de níveis de viabilidade e de vigor pode ser efetuada mediante a separação das sementes em diferentes classes durante a interpretação. Foram

estabelecidas oito classes para as sementes de soja, de feijão-vagem e de algodão (FRANÇA NETO et al., 1998; BHERING et al., 1996; VIEIRA e VON PINHO, 1999). Nesses casos, a soma das porcentagens de sementes incluídas nas classes 1 a 3 expressa os resultados do vigor; a soma das classes 1 a 5, a viabilidade. As sementes pertencentes às classes 6 a 8 não são viáveis. Por outro lado, a Association of Official Seed Analysts - AOSA (1983) recomenda a interpretação do teste procurando enquadrar as sementes em três classes; as classes 1 e 2 representam as sementes viáveis e a 3, as não-viáveis; nesse caso, as da classe 1 são computadas para a avaliação do vigor. Esse procedimento foi adotado para a interpretação de testes conduzidos com sementes de milho, café, amendoim e tomate (DIAS e BARROS, 1999; DIAS e SILVA, 1998; BITTENCOURT, 1995; SANTOS, 2003).

Entre as vantagens do teste de tetrazólio destaca-se o fato de possibilitar o exame das condições físicas e fisiológicas das estruturas do embrião de cada semente individualmente; ser realizado com amostra menor que a exigida para o teste de germinação; permitir rápida avaliação, na maioria dos casos em menos de 24 horas; requerer equipamento simples e barato; e dependendo da espécie, permitir a identificação de diferentes níveis de vigor e possibilitar o diagnóstico da causa da queda de viabilidade da semente. No entanto, podem ser verificadas também algumas limitações como: necessitar de pessoal com treinamento especial sobre a estrutura embrionária da semente e técnicas de interpretação; ser relativamente tedioso, uma vez que as sementes são avaliadas uma a uma; necessitar de um maior número de mão-de-obra por hora se comparado a outros testes; não mostrar a eficácia de tratamentos químicos nem as injúrias que estes possam causar; não detectar a presença de patógenos nas sementes; não identificar as sementes dormentes; e nem sempre possibilitar a detecção de danos mecânicos recentes (MARCOS FILHO et al., 1987; VIEIRA e CARVALHO, 1994; FRANÇA NETO, 1999).

Embora existindo dificuldades na condução do teste de tetrazólio, as pesquisas têm trazido resultados positivos, com possibilidade de aprimoramento do método para as sementes de várias espécies. Em sementes de mamoneira, a padronização do método para o teste de tetrazólio irá expandir a utilização pelas empresas e laboratórios de análise de sementes, que devido à demanda, necessitam de um método rápido de avaliação da qualidade dessas sementes.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal, setor de Agricultura, da Faculdade de Ciências Agronômicas, da Universidade Estadual Paulista, em Botucatu - SP.

Utilizaram-se 15 lotes de sementes de mamoneira, cultivar AL Guarany 2002, de diversas procedências, numerados de 1 a 15, homogeneizados e amostrados em 2.000g cada um, para a realização das análises (BRASIL, 1992). A pesquisa foi realizada em quatro etapas descritas a seguir.

#### **3.1 Etapa 1 - Métodos de preparo das sementes para o teste de tetrazólio**

Nesta etapa, foram avaliados cinco métodos de preparo das sementes para o teste de tetrazólio, utilizando-se apenas o lote 1, em duas repetições de 25 sementes para cada preparo, que estão descritos e ilustrados a seguir:

- Corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento da semente, através do tegumento, endosperma e embrião (Figura 2) (BRASIL, 1992);

- Corte longitudinal diagonal, no sentido da largura da semente, na região distal da carúncula, evitando-se atingir o eixo embrionário, através do tegumento, endosperma e embrião (Figura 3) (BRASIL, 1992);
- Remoção do tegumento (Figura 4) (GRABE, 1976);
- Remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento da semente, através do endosperma e embrião (Figura 5).
- Remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido da espessura da semente, paralelo aos cotilédones, através do endosperma e embrião (Figura 6).



Figura 2 – Preparo da semente de mamoneira mediante corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento da semente, através do tegumento, endosperma e embrião: corte (a); semente cortada (b); sementes cortadas imersas na solução de tetrazólio (c).



Figura 3 – Preparo da semente de mamoneira mediante corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula, evitando-se atingir o eixo embrionário, no sentido da largura da semente, através do tegumento, endosperma e embrião: sementes cortadas (a); sementes cortadas imersas na solução de tetrazólio (b).



Figura 4 – Preparo da semente de mamoneira mediante remoção do tegumento: processo de remoção do tegumento (a); sementes sem o tegumento (b).

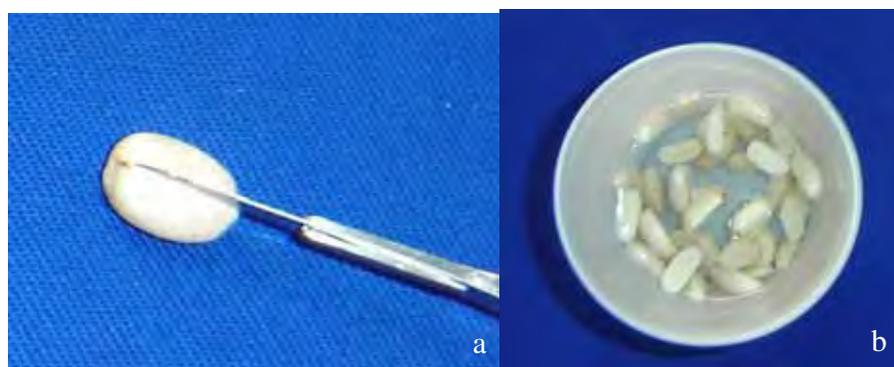


Figura 5 – Preparo da semente de mamoneira mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento da semente, através do endosperma e embrião: corte (a); sementes cortadas imersas na solução do tetrazólio (b).



Figura 6 – Preparo da semente de mamoneira mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido da espessura da semente, paralelo aos cotilédones, através do endosperma e embrião: corte (a); sementes cortadas (b).

Antes dos preparos, as sementes foram pré-condicionadas entre papel toalha de germinação, previamente umedecido com 2,5 vezes a massa (g) do papel em água destilada, dobrado em quatro e colocado dentro de sacos plásticos de 0,05mm, para manter a umidade, por 18 horas a 30°C em câmara de germinação tipo B.O.D. (MOORE, 1985; BRASIL, 1992; FRANÇA NETO et al., 1998).

Os cortes e as remoções do tegumento foram realizados com o auxílio de bisturi e de lâmina de barbear. Após os preparos, as sementes foram imersas na solução de tetrazólio na concentração de 0,5% e mantidas em câmara escura a 35°C (GRABE, 1976). A uniformidade da coloração foi avaliada a cada hora até o período de duas horas, exceto para o método de preparo remoção do tegumento, cujo período de coloração foi de até seis horas, para permitir maior absorção da solução de tetrazólio pelas sementes.

Nos métodos de preparo mediante corte longitudinal diagonal evitando-se atingir o eixo embrionário e mediante remoção do tegumento, nos quais o embrião não estava exposto diretamente à solução de tetrazólio, para a avaliação da parte interna da semente, realizou-se o corte longitudinal mediano através do embrião, após o período de coloração.

Na avaliação do melhor método de preparo para o teste de tetrazólio em sementes de mamoneira, considerou-se aquele que proporcionou o desenvolvimento da

coloração mais nítida para as sementes, sendo este parâmetro avaliado visualmente por comparação entre os métodos. Assim, nesta etapa, não foi realizada análise estatística.

O melhor método de preparo das sementes de mamoneira para o teste de tetrazólio estabelecido nesta etapa foi utilizado nas etapas seguintes desta pesquisa.

### **3.2 Etapa 2 – Concentração da solução e período de coloração das sementes para o teste de tetrazólio.**

No estudo da concentração da solução e do período de coloração das sementes de mamoneira para o teste de tetrazólio foram utilizados cinco lotes de sementes de mamoneira, numerados de 1 a 5, devidamente caracterizados quanto a sua qualidade fisiológica inicial, para uma melhor interpretação dos resultados.

#### **3.2.1 Caracterização dos lotes**

A caracterização física e fisiológica dos lotes de sementes foi realizada pela avaliação do teor de água, da germinação em areia, da germinação em papel e da emergência de plântulas em campo (porcentagem e velocidade de emergência de plântulas).

##### **3.2.1.1 Teor de água**

O teor de água das sementes foi determinado pelo método da estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (BRASIL, 1992), utilizando duas repetições de 15 sementes.

##### **3.2.1.2 Teste de germinação em areia**

O teste de germinação em areia foi realizado com oito repetições de 25 sementes, semeadas entre areia esterilizada (EA), previamente umedecida com água destilada, na proporção de 50% da capacidade de retenção (BRASIL, 1992). O teste foi conduzido dentro de caixas plásticas transparentes (110 x 110 x 35mm), sendo utilizadas duas por repetição, acondicionadas em sacos plásticos, com 0,033mm de espessura, para a manutenção

da umidade (Figura 7), sob alternância de temperatura de 20°C por 16 horas e 30°C por oito horas sob luz ( $78 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ / 8 horas). Aos 14 dias após a instalação do teste, contabilizaram-se as plântulas normais e anormais e as sementes mortas.

Para verificar a viabilidade das sementes não germinadas após este período, as sementes remanescentes foram escarificadas com lixa d'água número 80, e colocadas para germinar por mais sete dias, em rolo de papel toalha para germinação, umedecido com 2,5 vezes a massa (g) do papel em água destilada, sob mesma alternância de temperatura, contabilizando as plântulas normais e anormais e as sementes mortas, que foram somadas ao resultado obtido no 14º dia após a instalação do teste.



Figura 7 – Teste de germinação em areia para sementes de mamoneira.

### 3.2.1.3 Teste de germinação em papel

No teste de germinação em papel semearam-se oito repetições de 25 sementes, em rolos de papel toalha para germinação (RP), previamente umedecidos com 2,5 vezes a massa (g) do papel em água destilada, acondicionados em sacos plásticos, de 0,033 mm de espessura, para a manutenção da umidade (BRASIL, 1992; COIMBRA et al., 2007; GASPAR-OLIVEIRA et al., 2007). Os rolos foram dispostos na posição horizontal em

germinador, sob temperaturas alternadas de 20°C por 16 horas e 30°C por oito horas sob luz ( $78 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ / 8 horas), realizando-se a primeira contagem e a retirada das plântulas normais aos sete dias após a semeadura (BRASIL, 1992). Aos 14 dias após a instalação do teste, contabilizaram-se as plântulas normais e anormais e as sementes mortas. A viabilidade das sementes não germinadas após este período foi verificada adotando-se o mesmo procedimento descrito no teste de germinação em areia.

### 3.2.1.4 Emergência de plântulas em campo

No teste de emergência de plântulas em campo foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote, semeadas diretamente no solo, a cinco centímetros de profundidade, no espaçamento de vinte centímetros entre linhas, dentro de túnel plástico, com irrigação controlada. Consideraram-se plântulas emersas aquelas em que o cotilédone saiu do solo e estava aberto, aos 21 dias após a semeadura (Figura 8). Os testes foram conduzidos nos meses de Fevereiro, Abril e Novembro do ano de 2006, e não foram observados períodos de baixa temperatura.



Figura 8 – Teste de emergência de plântulas em campo: visão geral (a), e detalhe das plântulas de mamoneira emersas, com os cotilédones abertos (b).

### **3.2.1.5 Índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE)**

O índice de velocidade de emergência de plântulas foi conduzido em conjunto com o teste de emergência de plântulas em campo, contabilizando-se diariamente o número de plântulas emersas até os 21 dias após a sementeira, e calculando-se o IVE pela fórmula proposta por Maguire (1962).

### **3.2.2 Concentração da solução e período de coloração das sementes**

Esta pesquisa foi realizada em duas fases. A primeira, consistiu de um estudo preliminar para definir os tratamentos de concentração da solução e período de coloração, utilizando-se apenas um dos lotes de sementes (lote 1). Na segunda fase, os tratamentos estabelecidos foram avaliados nos cinco lotes de sementes (1 ao 5), pela comparação com os resultados dos testes de germinação.

#### **3.2.2.1 Primeira fase: estudo preliminar para a definição dos tratamentos de concentração da solução e período de coloração**

Nesta fase as concentrações da solução de tetrazólio estudadas foram 1,0%, 0,5%, 0,2%, 0,1% e 0,075% (DELOUCHE et al., 1976; BRASIL, 1992). O preparo e o armazenamento das soluções seguiram metodologia descrita por Grabe (1976).

Em cada concentração testada, duas repetições de 25 sementes, do lote 1, foram pré-condicionadas entre papel toalha de germinação, previamente umedecido com 2,5 vezes a massa (g) do papel em água destilada, dobrado em quatro e colocado dentro de sacos plásticos de 0,05mm para manter a umidade, por 18 horas a 30°C (MOORE, 1985; BRASIL, 1992; FRANÇA NETO et al., 1998). Após esse período, as sementes foram preparadas seguindo os melhores resultados da Etapa 1, assim, o tegumento foi removido e as sementes cortadas longitudinal e medianamente, no sentido do comprimento da semente, através do endosperma e embrião, mantendo as duas partes de cada uma das sementes unidas, colocadas em copos plásticos e imersas na solução de tetrazólio.

As amostras foram mantidas em câmara de germinação a 35°C, na ausência de luz, verificando-se a coloração em intervalos de 30 minutos, para todas as concentrações, até que a maioria das sementes apresentasse coloração vermelha (GRABE, 1976). O período necessário para que cada amostra colorisse foi denominado de período médio de coloração.

Para cada concentração, além deste período médio de coloração, estabeleceram-se mais dois períodos para serem testados como tratamentos, que foram superior e inferior ao período médio em 30 minutos para as concentrações de 1,0% e 0,5%, e superior e inferior em 60 minutos para as demais concentrações, compondo 15 tratamentos (cinco concentrações x três períodos de coloração).

### **3.2.2.2 Segunda fase: avaliação dos tratamentos**

Nesta fase, os tratamentos de concentração da solução e período de coloração para o teste de tetrazólio foram avaliados quanto à comparação dos resultados de viabilidade com o teste de germinação, quanto à coloração resultante nas sementes e também quanto à correlação dos resultados de viabilidade entre o teste de tetrazólio e os testes de germinação em areia e em papel.

Em cada tratamento avaliado, quatro repetições de 25 sementes, de cada um dos cinco lotes, foram pré-condicionadas e preparadas da mesma forma descrita na primeira fase desta etapa. Entretanto, nesta segunda fase, optou-se pela utilização de apenas uma das metades da semente no teste de tetrazólio, devido à dificuldade em se manter unidas as duas partes, escolhendo aquela que apresentava o embrião mais íntegro ou de melhor visualização (DIAS e BARROS, 1999). Após a coloração, a solução de tetrazólio foi drenada e as sementes lavadas em água corrente para estacionar o processo.

As sementes foram avaliadas uma a uma e classificadas em viáveis e não viáveis. Os critérios para a interpretação da viabilidade das sementes foram baseados no estudo das partes vitais do embrião, no desenvolvimento das estruturas essenciais durante a germinação, na tonalidade e uniformidade da coloração, e na comparação dos testes de tetrazólio já estabelecidos para espécies similares (WETZEL et al., 1992; BITTENCOURT, 1995; FRANÇA NETO et al., 1998; VIEIRA e VON PINHO, 1999).

Em sementes de mamoneira, para a avaliação do teste de tetrazólio, as estruturas que devem ser observadas são: os cotilédones, a área de ligação entre os cotilédones e o eixo embrionário, o eixo hipocótilo-radícula, o córtex e o cilindro central (Figura 9).

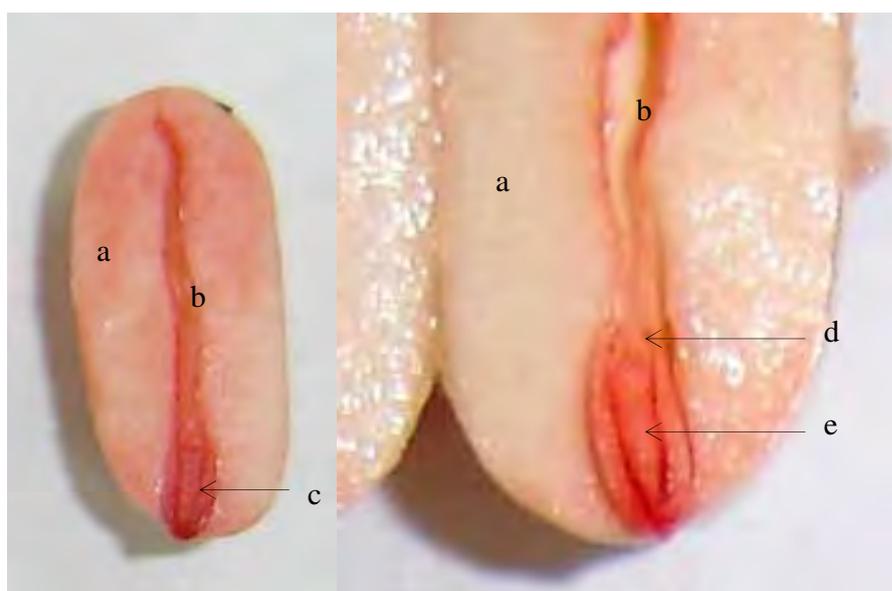


Figura 9 – Corte longitudinal no sentido do comprimento da semente de mamoneira, mostrando o endosperma (a) e as estruturas embrionárias: cotilédones (b), eixo hipocótilo-radícula (c), epicótilo (d), córtex e cilindro central (e).

Consideraram-se sementes viáveis as que apresentaram as estruturas do embrião desenvolvidas, intactas e com cor rosa a vermelha após a exposição ao sal de tetrazólio (Figura 10), e também as que o embrião apresentava pequenas necroses nos cotilédones, ou no endosperma, sem atingir a junção do eixo embrionário e dos cotilédones (nó cotiledonar) (Figura 11) ou pequenas necroses na ponta extrema da radícula, sem atingir o cilindro central (Figura 12). Foram consideradas sementes não viáveis aquelas com embriões completamente descoloridos ou com áreas críticas do embrião descoloridas (Figura 13) (GRABE, 1976; BRASIL, 1992).



Figura 10 – Sementes viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando as estruturas do embrião desenvolvidas, intactas e com cor rosa.



Figura 11 – Sementes viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando pequenas necroses nos cotilédones, ou no endosperma, sem atingir a junção do eixo embrionário e dos cotilédones.

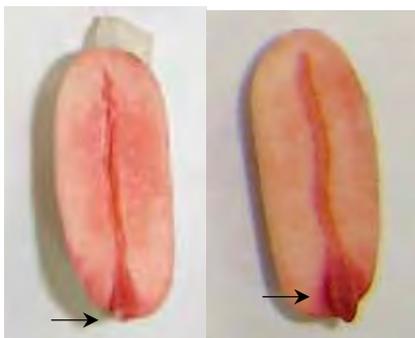


Figura 12 – Sementes viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando pequenas necroses na ponta extrema da radícula, sem atingir o cilindro central.



Figura 13 – Sementes não viáveis de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, apresentando lesões intensas, embriões descoloridos ou com áreas críticas do embrião descoloridas.

#### **3.2.2.2.1 Comparação dos resultados de viabilidade do teste de tetrazólio**

Os resultados de viabilidade do teste de tetrazólio foram comparados com os resultados dos testes de germinação em areia e em papel e foram considerados os melhores tratamentos aqueles que apresentaram diferença de até 5% entre os resultados dos testes (DIAS e BARROS, 1995; FRANÇA NETO, 1999).

### 3.2.2.2 Qualificação das cores das sementes pelo catálogo de Munsell

Em cada tratamento, para os cinco lotes de sementes, a coloração das sementes após o teste de tetrazólio foi avaliada mediante comparação com as fichas de cor do catálogo de Munsell (MUNSELL, 1976), determinando-se a porcentagem de sementes observada em cada cor (Figura 14). Considerou-se a cor predominante em mais da metade da semente, observando o endosperma e o embrião.



Figura 14 – Qualificação das sementes de mamoneira, coloridas pelo tetrazólio, nas fichas de cores do catálogo de Munsell.

As cores do catálogo são designadas por meio de números e letras, entretanto essa nomenclatura dificulta o reconhecimento e a identificação da cor quando não há visualização da ficha. Por essa razão, as cores observadas para as sementes de mamoneira após o teste de tetrazólio foram, subjetivamente, renomeadas e classificadas nos grupos de cores rosa-pálido, rosa-claro, rosa, rosa-escuro, vermelho-carmim e vermelho-carmim escuro, pois essas denominações são mais usuais na literatura sobre o teste de tetrazólio (DELOUCHE et al., 1976; GRABE, 1976; BITTENCOURT, 1995; FRANÇA NETO et al., 1998; SANTOS, 2003).

### 3.2.2.3 Correlação entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação

Realizou-se a correlação entre os resultados do teste de tetrazólio, conduzido nos tratamentos de concentração da solução e período de coloração e os testes de

germinação em areia e em papel. Considerou-se o melhor tratamento aquele que proporcionou para a média dos lotes a melhor correlação com os testes de germinação. Havendo mais de um tratamento nessas condições, optou-se por aquele que apresentou o menor período de coloração e/ou a menor concentração do sal de tetrazólio.

### **3.2.3 Análise estatística**

Na análise estatística foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL - GOMES, 1973).

Nos testes de germinação em areia e em papel, em que se utilizaram oito repetições de 25 sementes, as mesmas foram agrupadas antes das avaliações, formando quatro repetições de 50 sementes.

Na comparação dos resultados de viabilidade do teste de tetrazólio, conduzido nos tratamentos de concentração da solução e período de coloração, e da germinação em areia e em papel, as médias foram comparadas considerando cada lote separadamente e também a média dos lotes. Realizou-se, também, a análise de correlação simples ( $r$ ) entre os dados dos testes de tetrazólio, germinação em areia e em papel.

Na análise da qualificação das cores das sementes foram comparadas as médias dos cinco lotes para os tratamentos do teste de tetrazólio nos parâmetros cores do catálogo e grupos de cores. Os dados foram transformados em arcsen raiz ( $x+\alpha$ ) (BANZATTO e KRONKA, 2006) e as médias apresentadas nas tabelas referem-se aos dados originais.

### **3.3 Etapa 3 – Metodologia de pré-condicionamento das sementes para o teste de tetrazólio**

Nesta etapa foram avaliados três métodos de pré-condicionamento das sementes para o teste de tetrazólio em diferentes períodos e temperaturas.

A pesquisa foi realizada em três fases: a primeira consistiu de um estudo preliminar, com o objetivo de selecionar os tratamentos de pré-condicionamento que

promovessem a embebição adequada das sementes; na segunda fase, os tratamentos selecionados na fase anterior foram testados em cinco lotes de sementes, para avaliar se todos os lotes atingiriam teor de água semelhante no mesmo tratamento; na terceira fase, realizou-se a comparação entre os resultados do teste de tetrazólio, conduzido nos tratamentos de pré-condicionamento com os resultados do teste de germinação. Os melhores tratamentos de cada fase foram avaliados nas fases seguintes.

A caracterização da qualidade física e fisiológica dos lotes de sementes foi realizada pela determinação do teor de água inicial das sementes com tegumento e sem tegumento, pelo teste de germinação em areia e pela porcentagem e velocidade de emergência de plântulas em campo (IVE), seguindo os procedimentos descritos na segunda etapa dessa pesquisa.

### **3.3.1 Primeira fase: seleção dos tratamentos de pré-condicionamento**

Na primeira fase realizou-se um estudo preliminar de embebição das sementes, utilizando-se apenas um dos lotes (lote 6), em duas repetições de 15 sementes para cada tratamento, selecionando-se as que não apresentavam dano visível no tegumento.

A absorção de água pelas sementes foi avaliada em 69 tratamentos de pré-condicionamento, assim distribuídos:

- Entre papel, sementes com tegumento, por 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 horas a 30°C, 35°C e 40°C;
- Entre papel, sementes sem tegumento, por 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C;
- Imersão em água das sementes com tegumento, por 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C.

Dentre esses, o tratamento entre papel, sementes com tegumento, por 18 horas é o recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) para sementes de mamoneira; e a temperatura de 30°C é a mais baixa dentre as indicadas para o

pré-condicionamento das sementes no teste de tetrazólio por Moore (1985). Assim, esse tratamento foi considerado a testemunha.

Nos métodos entre papel as sementes com e sem tegumento foram colocadas para embeber em papel-toalha para germinação, previamente umedecido na proporção de 2,5 vezes seu peso com água destilada, dobrado em quatro e colocado dentro de sacos plásticos de 0,05mm para manutenção da umidade (Figura 15a) (BRASIL, 1992; FRANÇA NETO et al., 1998). No método imersão em água, as sementes com tegumento foram colocadas em copos plásticos descartáveis com capacidade de 200 ml, com 120 ml de água destilada (Figura 15b) (GRABE, 1976).



Figura 15 – Pré-condicionamento das sementes de mamoneira: entre papel toalha para germinação (a); imersão em água (b).

Após os períodos de embebição, as amostras foram retiradas do germinador e determinou-se o teor de água das sementes. Nos métodos de pré-condicionamento nos quais as sementes estavam com tegumento, o mesmo foi removido antes da avaliação do teor de água, de forma que os métodos com e sem tegumento pudessem ser comparados sem a influência da água presente no tegumento.

Os tratamentos de pré-condicionamento que apresentaram resultados de teor de água das sementes menores e diferentes estatisticamente do apresentado pela testemunha, foram eliminados deste estudo, pois não promoveram a embebição adequada das sementes, não sendo avaliados na próxima fase.

### **3.3.2 Segunda fase: avaliação da uniformidade de embebição dos lotes de sementes nos tratamentos selecionados**

Nesta fase, os tratamentos de pré-condicionamento foram avaliados para cinco lotes (lotes 6 a 10), em duas repetições de 15 sementes para cada tratamento, selecionando-se as que não apresentavam dano visível no tegumento.

Em uma primeira avaliação, os lotes foram utilizados como repetições com o objetivo de eliminar os tratamentos que proporcionassem para a média dos lotes teor de água menor e diferente estatisticamente do apresentado pela testemunha.

Foram testados os seguintes tratamentos de pré-condicionamento:

- Entre papel, sementes com tegumento, por 8 e 10 horas a 35°C e 40°C, e por 12, 14, 16 e 18 horas a 30°C, 35°C e 40°C;
- Entre papel, sementes sem tegumento, por 3 horas a 35°C e 40°C, por 4 e 5 horas a 30°C, 35°C e 40°C, e por 6 horas a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C;
- Imersão em água das sementes com tegumento, por 6 horas a 35°C e 40°C.

Após os períodos de embebição, as amostras foram retiradas do germinador e determinou-se o teor de água das sementes sem o tegumento, seguindo o mesmo procedimento descrito na primeira fase desta etapa. Os resultados dos tratamentos foram comparados com os da testemunha e os tratamentos eliminados não foram avaliados na segunda análise.

Na segunda análise, os tratamentos de pré-condicionamento foram conduzidos para os cinco lotes separadamente, com o objetivo de avaliar se, dentro do mesmo tratamento, os lotes apresentavam teores de água estatisticamente semelhantes. Como os lotes partiram de mesmo teor de água inicial, após os tratamentos de embebição deveriam apresentar teores de água similares.

Foram avaliados os seguintes tratamentos de pré-condicionamento:

- Entre papel, sementes com tegumento, por 10 e 12 horas a 35°C e 40°C, e por 14, 16 e 18 horas a 30°C, 35°C e 40°C;
- Entre papel, sementes sem tegumento, por 4 horas a 35°C e 40°C, por 5 horas a 30°C, 35°C e 40°C, e por 6 horas a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C;

Os tratamentos foram avaliados pela determinação do teor de água após a embebição das sementes sem tegumento, seguindo o mesmo procedimento descrito na primeira fase desta etapa. Selecionaram-se os tratamentos de pré-condicionamento que apresentaram teor de água semelhante estatisticamente nos cinco lotes estudados.

### **3.3.3 Terceira fase: comparação dos resultados do teste de tetrazólio com os do teste de germinação**

Nesta fase, inicialmente realizou-se uma análise preliminar, utilizando-se apenas um lote de sementes (lote 6), com o objetivo de eliminar os tratamentos que não promovessem uniformidade na coloração das sementes após o teste de tetrazólio. Foram avaliados os seguintes tratamentos de pré-condicionamento:

- Entre papel, sementes com tegumento por 10, 12 e 16 horas a 35°C, por 14 horas a 35°C e 40°C, e por 18 horas a 30°C e 40°C;
- Entre papel, sementes sem tegumento por 6 horas a 25°C, 30°C e 40°C.

O teste de tetrazólio foi realizado para cada tratamento de pré-condicionamento com quatro repetições de 25 sementes. Após o pré-condicionamento, o tegumento foi removido e as sementes cortadas longitudinal e medianamente, no sentido do comprimento, através do endosperma e embrião, selecionando-se a melhor metade de cada uma delas. As amostras foram colocadas em copos plásticos e imersas na solução de tetrazólio a 0,2%, mantidas em câmara de germinação a 35°C, na ausência de luz, por 120 minutos, de acordo com os melhores resultados observados nas etapas 1 e 2 desta pesquisa. As sementes

foram avaliadas, considerando-se as sementes viáveis e não viáveis, pelos mesmos parâmetros descritos na segunda etapa dessa pesquisa.

Avaliou-se também a porcentagem de sementes que apresentaram coloração desuniforme e, ou, manchas esbranquiçadas (Figura 16). Os tratamentos de pré-condicionamento que proporcionaram, estatisticamente, as maiores quantidades de sementes com essas características não foram utilizados na aferição dos resultados com o teste de germinação.

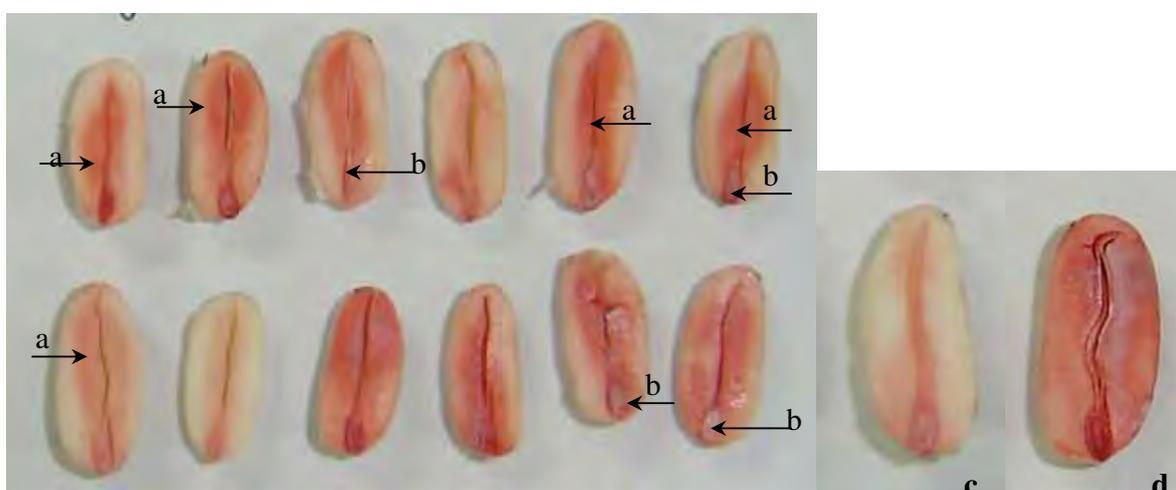


Figura 16 – Sementes de mamoneira apresentando coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) após o teste de tetrazólio; detalhes: mancha no eixo hipocótilo-radícula em semente vigorosa (c); mancha no endosperma (d).

Posteriormente, o teste de tetrazólio foi realizado para cinco lotes de sementes (6 ao 10), com os mesmos procedimentos descritos anteriormente, avaliando-se os seguintes tratamentos de pré-condicionamento: entre papel, sementes com tegumento por 12 e 16 horas a 35°C, por 14 horas a 35°C e 40°C, e por 18 horas a 30°C e 40°C.

Os resultados dos testes de tetrazólio foram comparados com o teste de germinação em areia, realizado na caracterização dos lotes, e foi considerado o melhor tratamento de pré-condicionamento aquele que apresentou resultados semelhantes ao do teste de germinação, com 5% de tolerância na diferença entre as médias (DIAS e BARROS, 1995;

FRANÇA NETO, 1999). Havendo mais de um tratamento nessas condições, optou-se pelo mais rápido e adaptável à rotina de um laboratório de análise de sementes.

### **3.3.4 Análise estatística**

A análise estatística das três fases deste estudo foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1973).

Na segunda fase foram realizadas duas análises estatísticas: na primeira, os lotes foram empregados como repetições e considerou-se a média dos lotes e, na segunda, os lotes foram considerados separadamente.

Na terceira fase foram realizadas três análises estatísticas: na primeira foram comparadas as médias dos tratamentos do teste de tetrazólio para um lote de sementes, avaliando a porcentagem de sementes viáveis, não viáveis, coloração desuniforme e manchas esbranquiçadas; na segunda foram comparados os resultados de viabilidade nos seis tratamentos do teste de tetrazólio com o resultado do teste de germinação em areia para cada um dos cinco lotes separadamente, em um fatorial 5 x 7 (lotes x tratamentos); na terceira análise, os lotes foram considerados como repetições e compararam-se as médias dos lotes da viabilidade pelo teste de tetrazólio com as médias do teste de germinação.

No teste de germinação em areia, em que se utilizaram oito repetições de 25 sementes, as mesmas foram agrupadas antes das avaliações, formando quatro repetições de 50 sementes.

## **3.4 Etapa 4 – Metodologia para a avaliação do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio**

Nesta etapa, foram realizadas análises complementares em cinco lotes de sementes de mamoneira (lotes 11 a 15), com o objetivo de identificar alterações nos tecidos das sementes viáveis que possibilitassem a classificação das sementes quanto ao vigor pelo teste de tetrazólio.

### **3.4.1 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio**

O teste de tetrazólio foi executado para cinco lotes (11 ao 15) com quatro repetições de 50 sementes, de acordo com os melhores resultados observados nas etapas 1, 2 e 3 desta pesquisa. As sementes foram pré-condicionadas com tegumento entre papel toalha de germinação, previamente umedecido com 2,5 vezes a massa (g) do papel em água destilada, dobrado em quatro e colocado dentro de sacos plásticos de 0,05mm, para manter a umidade, por 18 horas a 30°C (MOORE, 1985; BRASIL, 1992; FRANÇA NETO et al., 1998). Após esse período, o tegumento foi removido e as sementes cortadas longitudinal e medianamente, no sentido do comprimento, através do endosperma e embrião, selecionando-se a melhor metade de cada uma delas. As amostras foram colocadas em copos plásticos e imersas na solução de tetrazólio a 0,2%, mantidas em câmara de germinação a 35°C na ausência de luz por 120 minutos.

As sementes foram analisadas minuciosamente e divididas em três classes: viáveis e vigorosas, viáveis e não vigorosas e não viáveis. As considerações da classificação do vigor foram baseadas nos critérios estabelecidos por Bittencourt (1995), Vieira e Von Pinho (1999) e Santos (2003), em sementes de amendoim, algodão e tomate, respectivamente, adaptados para as características morfológicas das estruturas das sementes de mamoneira e, também, nas prescrições das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) e de Grabe (1976) para esta espécie.

Após a classificação nas três classes, determinou-se a porcentagem de sementes alocadas em cada uma delas, calculando em seguida, o potencial de vigor (viáveis e vigorosas) e o potencial de germinação ou viabilidade (somatório da porcentagem de sementes viáveis vigorosas e não vigorosas).

### **3.4.2 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes por outros testes**

Os resultados de viabilidade e vigor dos lotes pelo teste de tetrazólio foram aferidos mediante comparação com outros testes de avaliação de qualidade. Assim, para todos os lotes avaliaram-se o teor de água, a germinação em areia, a germinação em papel, a primeira contagem do teste de germinação em papel, a emergência de plântulas em campo e o

índice de velocidade de emergência (IVE), seguindo os procedimentos descritos na segunda etapa dessa pesquisa. Também foram realizados os testes de envelhecimento acelerado, classificação do vigor de plântulas, comprimento e massa da matéria seca de plântulas, que estão descritos a seguir.

#### **3.4.2.1 Envelhecimento acelerado**

As sementes foram colocadas para envelhecer em uma camada única sobre tela em caixas plásticas transparentes (110 x 110 x 35 mm), contendo 40 ml de água, fechadas com saco plástico de 0,033mm de espessura, e mantidas a 42°C por 24 horas, em câmara de germinação sem controle de umidade. Após esse período seguiu-se o teste de germinação, com oito repetições de 25 sementes em rolo de papel toalha para germinação, umedecido com duas vezes a massa (g) do papel em água, mantido em temperatura constante de 25°C por 14 dias, quando a contagem foi realizada (VIEIRA e CARVALHO, 1994; SOUZA, et al., 2007).

#### **3.4.2.2 Teste de classificação do vigor de plântulas**

Realizou-se o teste de classificação do vigor de plântulas em conjunto com o teste de germinação em areia. A avaliação foi realizada aos 14 dias após a instalação do teste e classificaram-se as plântulas em: normais fortes (vigorosas), para aquelas com as estruturas essenciais bem formadas e maiores que as demais; e normais fracas (pouco vigorosas), para as bem formadas, porém menores que as anteriores e pouco desenvolvidas (Figura 17) (NAKAGAWA, 1999). A porcentagem foi calculada sobre o total de sementes instaladas no teste, ou seja, 25 sementes para cada uma das quatro repetições.

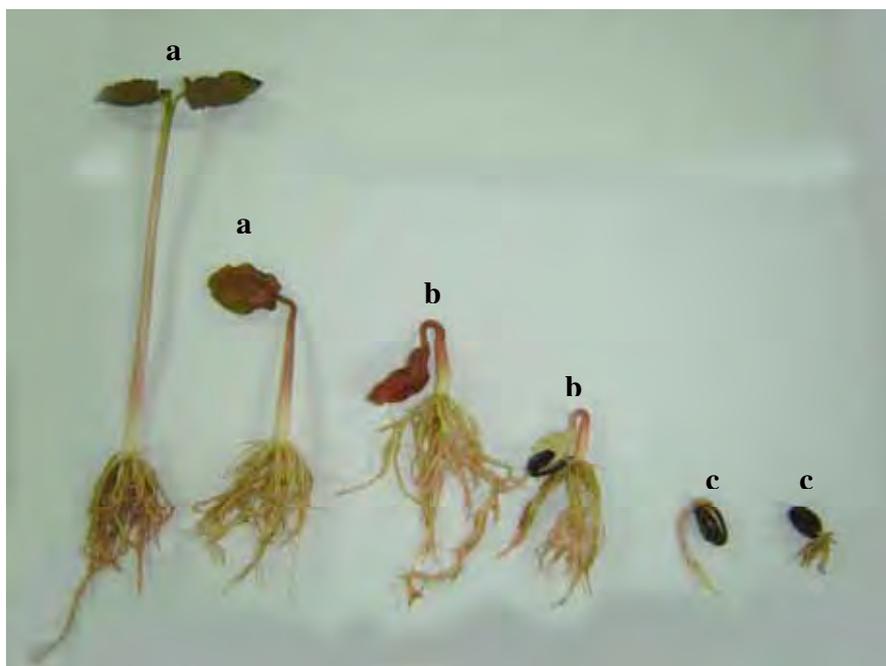


Figura 17 – Teste de classificação do vigor de plântulas de mamoneira: normais fortes (a), normais fracas (b), e anormais (c).

#### 3.4.2.3 Comprimento de plântulas

No teste de comprimento de plântulas utilizaram-se quatro repetições de dez sementes, instaladas sobre uma linha traçada no terço superior do papel toalha para germinação, pré-umedecido com 2,5 vezes a massa (g) do papel em água destilada. Os rolos de papel foram colocados em posição vertical na câmara de germinação e acondicionados em sacos plásticos de 0,033mm de espessura para evitar a desidratação (VIEIRA e CARVALHO, 1994). O teste foi conduzido em temperatura constante de 30°C por sete dias, quando foram realizadas as avaliações do comprimento da radícula, da parte aérea (do hipocótilo até a inserção dos cotilédones) e total das plântulas normais com régua em milímetros. O cálculo do comprimento das plântulas foi obtido dividindo-se o resultado total pelo número de sementes do teste (NAKAGAWA, 1999; VANZOLINI et al., 2007).

#### **3.4.2.4 Massa da matéria seca de plântulas**

As plântulas normais do teste de crescimento de plântulas tiveram os tecidos de reserva removidos com bisturi e foram colocadas dentro de sacos de papel para secar em estufa de circulação de ar a 80°C por 24 horas (VIEIRA e CARVALHO, 1994). Após esse período, as amostras foram pesadas, e foi calculada a massa da matéria seca por plântula (mg/plântula), mediante a divisão da massa total pelo número de plântulas do teste.

#### **3.4.3 Análise estatística**

Em todos os testes, o delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados de viabilidade e vigor dos lotes, obtidos pelo teste de tetrazólio, foram comparados com os resultados dos demais testes realizados, mediante análise de correlação simples (PIMENTEL - GOMES, 1973).

Nos testes em que se utilizaram oito repetições de 25 sementes, as mesmas foram agrupadas antes das análises, formando quatro repetições de 50 sementes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Etapa 1 – Métodos de preparo das sementes para o teste de tetrazólio

Os preparos da semente mediante corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento e da espessura, através do endosperma e embrião com e sem a remoção do tegumento (Figuras 18, 19 e 20) favoreceram o contato da parte interna da semente com a solução de tetrazólio, resultando em uma coloração uniforme de todo o embrião e endosperma. Entretanto, o preparo sem a remoção do tegumento (Figura 19) causou danos ao embrião e, em alguns casos, destruição do eixo hipocótilo-radícula, devido à pressão exercida pela lâmina para ultrapassar o tegumento da semente no corte. Já o preparo remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido da espessura, através do endosperma e embrião (Figura 20) causou danos aos cotilédones, pois os mesmos estão fortemente aderidos, o que casou a dificuldade em separá-los. Esses danos ao embrião dificultam a identificação de injúrias pré-existentes, assim como a avaliação correta da viabilidade. Fogaça (2003) também observou ocorrência de danos em sementes de guaritá (*Astronium graveolens* Jacq.), devido à presença do tegumento no momento do corte da semente.



Figura 18 – Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento, através do endosperma e embrião.



Figura 19 – Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento, através do tegumento, endosperma e embrião.



Figura 20 – Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante remoção do tegumento, seguida de corte longitudinal mediano, no sentido da espessura, paralelo aos cotilédones, através do endosperma e embrião.

Nos preparos mediante corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula evitando-se atingir o eixo embrionário (Figura 21) e mediante remoção do tegumento (Figura 22), as sementes não apresentaram coloração na região central do tecido de reserva e no embrião. Somente as regiões periféricas das sementes, que tiveram contato direto com a solução de tetrazólio, ficaram coloridas. No caso do preparo mediante remoção do tegumento, mesmo após seis horas imersas na solução de tetrazólio (Figura 23), as sementes apresentaram embrião e endosperma sem coloração. Considerando que o embrião está localizado na parte interna da semente e é a principal estrutura a ser analisada na avaliação da viabilidade e do vigor no teste de tetrazólio, estes métodos de preparo mostraram-se ineficientes.

Além disso, no preparo mediante corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula evitando-se atingir o eixo embrionário, após a imersão na solução de tetrazólio, o endosperma amolece e a semente aumenta de tamanho, dificultando a remoção do tegumento na avaliação, o que pode causar danos às sementes (Figura 21). Por essa razão, não foram testados períodos maiores que duas horas para esse método.

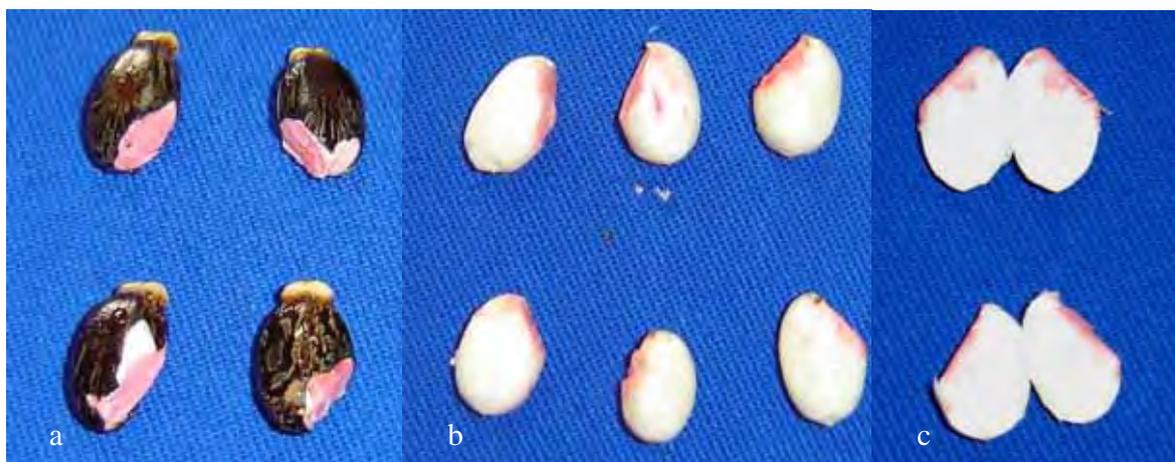


Figura 21 – Sementes de mamoneira após a imersão no tetrazólio, preparadas mediante corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula evitando-se atingir o eixo embrionário: com tegumento (a); após a retirada do tegumento (b); e após corte longitudinal mediano através do embrião (c).



Figura 22 – Sementes de mamoneira preparadas mediante remoção do tegumento, após duas horas de imersão no tetrazólio (a); e após corte longitudinal mediano através do embrião (b).



Figura 23 – Sementes de mamoneira preparadas mediante remoção do tegumento, após seis horas de imersão no tetrazólio (a); e após corte longitudinal mediano através do embrião (b).

Esses resultados mostraram que, nos períodos de coloração empregados nesta pesquisa, o tegumento e o endosperma não permitiram a difusão da solução de tetrazólio até o embrião. Portanto, no preparo das sementes para o teste o tegumento deve ser removido e as sementes devem ser cortadas longitudinal e medianamente através do endosperma e embrião antes de serem submetidas à coloração.

Os resultados observados neste estudo discordam das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) e de Grabe (1976), pois os métodos de preparo indicados por estes autores para mamoneira não proporcionaram coloração adequada das sementes, dificultando a diferenciação dos tecidos e a avaliação da qualidade das sementes pelo teste de tetrazólio.

A remoção do tegumento das sementes de mamoneira após a embebição e antes da coloração, embora seja uma operação relativamente delicada e trabalhosa, possibilitou considerável facilidade no corte, não danificando as sementes, e permitindo a correta avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. A necessidade da remoção do tegumento, como parte do preparo das sementes antes da coloração, também é relatada para sementes de amendoim (BITTENCOURT, 1995), algodão (VIEIRA e VON PINHO, 1999), melancia (BHERING et al., 2005), seringueira (WETZEL et al., 1992), copafba (FOGAÇA et al., 2001), sucará (FOGAÇA et al., 2006), pata-de-vaca (KROHN et al., 2001), guapuruvu (PAULA et al., 2001) e guaritá (FOGAÇA, 2003).

O corte longitudinal mediano antes da coloração (Figuras 18, 19 e 20) possibilitou o contato direto dos tecidos internos (embrião e endosperma) com a solução de tetrazólio e a coloração das regiões vitais da semente. A exposição do embrião diretamente na solução de tetrazólio também é necessária para o desenvolvimento de uma coloração adequada em sementes de milho (DIAS e BARROS, 1999), trigo (DELOUCHE et al., 1976), arroz (DIAS e SHIOGA, 1997), capim-colonião e braquiária (DIAS e ALVES, 2001 a, b), seringueira (WETZEL et al., 1992), tomate (SANTOS, 2003) entre outros.

A coloração do endosperma no teste de tetrazólio não é comum, mas foi verificada nas sementes de mamoneira. Nesta espécie o endosperma é um tecido vivo, e contem proteínas em forma de grãos de aleurona que secretam enzimas hidrolíticas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Esse fato também foi observado em sementes de seringueira, embora, para essa espécie, o preparo recomendado seria o corte longitudinal paralelo aos cotilédones (WETZEL et al., 1992).

Portanto, o método de preparo das sementes de mamoneira para o teste de tetrazólio que apresentou os melhores resultados foi o de remoção do tegumento seguida de corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento da semente, através do endosperma e embrião.

## **4.2 Etapa 2 – Concentração da solução e período de coloração das sementes para o teste de tetrazólio.**

### **4.2.1 Caracterização dos lotes**

A caracterização da qualidade física e fisiológica dos lotes de sementes de mamoneira utilizados nesta etapa está apresentada na Tabela 1. Todos os lotes apresentaram o mínimo de germinação estabelecido para a comercialização que é de 80% (D.O.U., 2005) e teor de água semelhante, o que garante que os testes de avaliação de qualidade estão isentos de possíveis variações de resultados entre os lotes devido ao teor de água.

O teste de germinação em papel não diferenciou os lotes. Os demais testes indicaram diferença de qualidade entre os lotes. No teste de germinação em areia os

dados indicaram superioridade dos lotes 1, 2, 3 e 4, entretanto, este último lote não diferiu do lote 5, que foi inferior aos anteriores. Os resultados do teste de emergência de plântulas em campo mostraram que os lotes 2, 3 e 4 e os lotes 3, 4 e 1 tinham vigor similar, entretanto, numericamente, os lotes 2 e 3, e foram superiores ao lote 4, e o lote 3 foi superior aos lotes 4 e 1. O lote 5 apresentou resultado inferior aos demais, sem diferir dos lotes 1 e 4. O índice de velocidade de emergência (IVE) demonstrou que os lotes 2 e 3 germinaram mais rapidamente que os demais.

Tabela 1 – Caracterização física e fisiológica dos cinco lotes de sementes de mamoneira, utilizados na segunda etapa, determinada pelo teor de água (%) e pelos testes de germinação em areia (%), germinação em papel (%), emergência de plântulas em campo (%) (conduzido de 02 a 23 de Fevereiro de 2006) e índice de velocidade de emergência (IVE).

<b>Lotes</b>	<b>Teor de água (%)</b>	<b>Germinação em areia (%)</b>	<b>Germinação em papel (%)</b>	<b>Emergência de plântulas (%)</b>	<b>IVE</b>
<b>1</b>	5,0 A	98 A <sup>1</sup>	100 A	78 BC	4,0 B
<b>2</b>	5,5 A	99 A	97 A	91 A	5,0 A
<b>3</b>	5,0 A	98 A	98 A	90 AB	5,0 A
<b>4</b>	5,0 A	91 AB	96 A	80 ABC	4,0 B
<b>5</b>	5,5 A	86 B	94 A	74 C	4,0 B
<b>CV%</b>	8,6	4,7	3,1	6,9	8,3
<b>DMS</b>	1,8	9,7	6,7	12,4	0,8

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.2.2 Concentração da solução de tetrazólio e período de coloração das sementes**

##### **4.2.2.1 Primeira fase: estudo preliminar para a definição dos tratamentos de concentração da solução e período de coloração**

Nas concentrações da solução de tetrazólio de 1,0 e 0,5%, a maioria das sementes adquiriu coloração vermelha característica do teste (GRABE, 1976) após 60 e 90

minutos de imersão na solução (Figuras 24 e 25), respectivamente, sendo estes os períodos médios. Nessas concentrações, intervalos de 30 minutos de período de coloração foram suficientes para que se detectassem diferenças acentuadas na cor das sementes. Assim, os períodos de 30, 60 e 90 minutos e os períodos de 60, 90 e 120 minutos foram os mais promissores para as concentrações de 1,0% e 0,5%, respectivamente.



Figura 24 – Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 1,0% por 30 minutos (a), 60 minutos (b) e 90 minutos (c).



Figura 25 – Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,5% por 60 minutos (a), 90 minutos (b), e 120 minutos (c).

A maioria das sementes apresentou coloração vermelha característica para o teste de tetrazólio (GRABE, 1976) após 120 minutos para a solução de 0,2% (Figura 26) e após 180 minutos para as concentrações de 0,1% e 0,075% (Figuras 27 e 28), sendo estes os períodos médios. Nessas concentrações, somente foram observadas diferenças acentuadas

na cor das sementes com intervalos de 60 minutos de período de coloração. Assim, os períodos mais promissores para a concentração de 0,2% foram 60, 120 e 180 minutos e para as concentrações de 0,1% e 0,075% foram 120, 180 e 240 minutos. Neste caso, o período máximo avaliado de 240 minutos não proporcionou coloração mais escura que é a característica para o teste de tetrazólio, entretanto, não foram testados períodos mais longos que este para não prolongar demasiadamente a duração do teste, já que a coloração padrão já havia sido alcançada. Além disso, para a maioria das espécies, o período de coloração das sementes encontra-se entre 30 a 240 minutos (DELOUCHE et al., 1976; MARCOS FILHO et al., 1987).



Figura 26 – Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,2% por 60 minutos (a), 120 minutos (b), e 180 minutos (c).



Figura 27 – Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,1% por 120 minutos (a), 180 minutos (b), e 240 minutos (c).

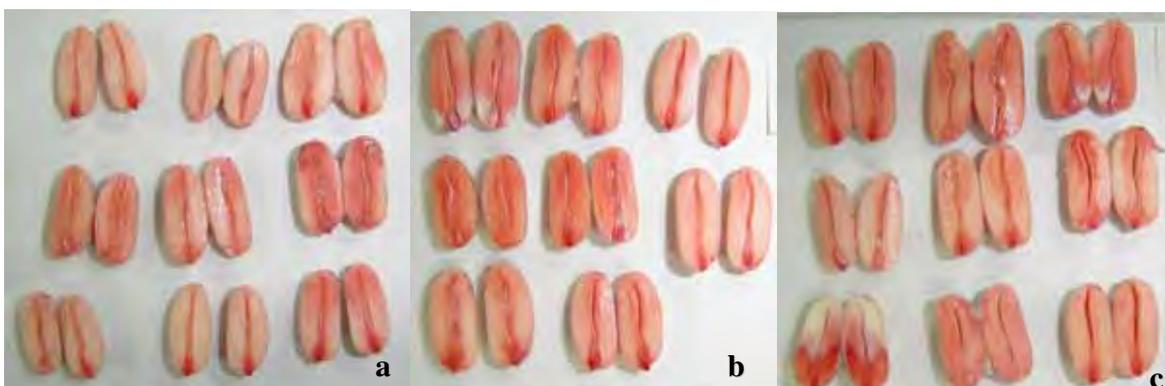


Figura 28 – Sementes de mamoneira após a coloração na solução de tetrazólio a 0,075% por 120 minutos (a), 180 minutos (b), e 240 minutos (c).

Observou-se que quanto maior a concentração, menor é o período necessário para as sementes adquirirem a cor adequada para a avaliação pelo teste de tetrazólio.

Assim, os tratamentos de concentração da solução de tetrazólio e períodos de coloração mais favoráveis ao desenvolvimento da coloração das sementes de mamoneira, selecionados nesta etapa da pesquisa foram:

- 0,075 % por 120, 180 e 240 minutos;
- 0,1% por 120, 180 e 240 minutos;
- 0,2% por 60, 120 e 180 minutos;
- 0,5% por 60, 90 e 120 minutos; e
- 1,0% por 30, 60 e 90 minutos.

#### **4.2.2.2 Segunda fase: avaliação dos tratamentos**

##### **4.2.2.2.1 Comparação dos resultados de viabilidade do teste de tetrazólio**

Os dados da análise de comparação de médias, realizada para cada lote separadamente (Tabela 2), indicaram que não houve diferença estatística significativa entre os resultados dos testes de tetrazólio e de germinação para os lotes 1 e 5.

Tabela 2 – Sementes de mamoneira viáveis pelos testes de tetrazólio (TZ), conduzidos nos diferentes tratamentos de concentração da solução e período de coloração, e pelos testes de germinação em areia e em papel.

Tratamentos		Sementes viáveis (%)					Média dos lotes
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	
<b>Germinação em areia</b>		98	99 A <sup>1</sup>	98 A	91 AB	86	94 A <sup>1</sup>
<b>Germinação em papel</b>		100	97 A	98 A	96 A	94	97 A
<b>TZ</b>	0,075% x 120 min	93	93 A	88 AB	93 A	95	92 AB
	x 180 min	98	98 A	97 A	98 A	92	97 A
	x 240 min	97	98 A	93 AB	94 A	90	94 A
<b>TZ</b>	0,1% x 120 min	94	93 A	88 AB	98 A	88	92 AB
	x 180 min	99	92 A	96 A	97 A	93	95 A
	x 240 min	97	95 A	93 AB	98 A	94	95 A
<b>TZ</b>	0,2% x 60 min	99	94 A	95 A	95 A	89	94 A
	x 120 min	98	94 A	94 AB	92 A	91	94 A
	x 180 min	97	89 A	91 AB	96 A	93	93 AB
<b>TZ</b>	0,5% x 60 min	99	91 A	90 AB	90 AB	92	92 AB
	x 90 min	100	74 AB	87 AB	81 BC	91	87 ABC
	x 120 min	99	83 A	89 AB	79 C	87	87 ABC
<b>TZ</b>	1,0% x 30 min	97	85 A	87 AB	97 A	96	92 AB
	x 60 min	96	75 AB	79 AB	77 C	85	82 BC
	x 90 min	96	47 B	75 B	79 C	89	77 C
<b>CV%</b>		2,0	8,0	5,3	2,7	3,4	7,7
<b>DMS</b>		7,9	28,3	19,4	10,0	12,4	11,1

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos demais lotes podem-se observar diferenças estatísticas na porcentagem de sementes viáveis entre os testes. Destacam-se nos lotes 2 e 3 o tratamento 1,0% por 90 minutos, e no lote 4 os tratamentos 0,5% por 90 e 120 minutos, e 1,0% por 60 e 90 minutos como os que apresentaram os resultados mais discrepantes dos observados nos

testes de germinação. Portanto, esses tratamentos não devem ser utilizados na condução do teste de tetrazólio de sementes de mamoneira, pois resultaram na coloração excessiva das sementes, mesmo as pouco vigorosas e, por isso, os resultados diferiram dos observados no teste de germinação. Wetzel et al. (1992) também verificaram problemas de avaliação do teste de tetrazólio na concentração da solução de 1,0% para sementes de seringueira.

Comparando-se os resultados médios dos lotes, observa-se que houve diferença estatística significativa entre os testes de tetrazólio e os testes de germinação para os tratamentos 1,0% por 60 e 90 minutos; os demais foram iguais ou intermediários.

Sendo assim, os resultados indicaram que as maiores concentrações da solução de tetrazólio proporcionaram aumento da discrepância entre os resultados do teste de tetrazólio.

#### **4.2.2.2.2 Qualificação das cores das sementes pelo catálogo de Munsell**

A distribuição das sementes dos cinco lotes segundo as cores do catálogo, após o teste de tetrazólio conduzido em diferentes tratamentos de concentração da solução e período de coloração, pode ser observada na Tabela 3.

Os dados indicaram que houve diferença estatística significativa entre as cores do catálogo para todos os tratamentos. Dentre eles, destacam-se os que foram considerados os melhores na comparação com os resultados de viabilidade pelo teste de tetrazólio (Tabela 2).

De maneira geral, os tratamentos com as concentrações de 0,075% e de 0,1%, em todos os períodos, e de 0,2% por 60 e 120 minutos, apresentaram mais de 50% das sementes nas cores 2,5R 8/6, 7/8 e 6/12 (Tabela 3). Nos tratamentos de concentração da solução de 0,2% por 180 minutos e de 0,5% por 60 minutos a maioria das sementes apresentou-se nas cores 2,5R 6/12 e 1,25R 6/12, observadas também na maioria das sementes do tratamento de 1,0% por 30 minutos, que além dessas cores, também apresentou sementes com as cores 2,5R 6/10, 5/12 e 5/10.

Tabela 3 – Percentagem das sementes de mamoneira distribuídas nas cores do catálogo Munsell (1976), após os testes de tetrazólio conduzidos nos diferentes tratamentos de concentração da solução (%) e período de coloração (minutos).

Cores	Tratamentos do teste de tetrazólio																			
	0,075%				0,1%				0,2%				0,5%				1,0%			
	120	180	240	120	180	240	60	120	180	240	60	120	60	120	180	240	60	120	180	240
<b>2,5R 9/2</b>	1 EF <sup>1</sup>	1 CD	1 D	1 CD	0 E	0 D	1 D	0 E	0 D	0 D	0 EF	1 D	1 D	1 FG	1 D	0 D	0 D	0 D	0 EF	1 CD
<b>5R 8/4</b>	6 CDE	1 CD	0 D	1 CD	0 E	1 D	1 D	1 E	0 D	0 D	0 F	0 D	1 G	1 G	0 D	0 D	0 D	0 D	0 F	0 D
<b>5R 8/6</b>	8 CD	9 B	4 CD	10 B	5 DE	4 CD	9 BC	3 DE	0 D	0 D	0 F	0 D	0 G	0 G	0 D	0 D	0 D	0 D	0 F	1 CD
<b>2,5R 8/6</b>	46 A	26 A	23 B	31 A	29 AB	11 BC	16 B	11 CD	2 CD	2 CD	1 EF	0 D	0 G	0 G	0 D	1 D	0 F	0 D	0 F	0 D
<b>2,5R 7/6</b>	0 F	1 CD	1 D	0 D	0 E	1 D	0 D	0 E	0 D	0 D	0 F	0 D	0 G	0 G	0 D	0 D	0 F	0 D	0 F	0 D
<b>2,5R 7/8</b>	21 B	37 A	40 A	35 A	34 A	33 A	41 A	37 A	14 B	14 B	11 BC	2 D	3 EFG	2 D	4 CD	0 F	0 D	0 D	0 F	0 D
<b>2,5R 6/10</b>	2 EF	4 BC	3 D	2 CD	3 DE	5 CD	3 CD	4 DE	7 BC	7 BC	16 B	10 BC	8 CDE	22 A	5 CDE	1 CD				
<b>2,5R 6/12</b>	12 BC	11 B	12 BC	13 B	17 BC	26 AB	18 B	21 B	27 A	27 A	27 A	15 AB	19 BC	17 AB	4 CDEF	1 CD				
<b>1,25R 6/12</b>	2 DEF	8 B	13 BC	5 BC	8 CD	13 BC	7 BC	16 BC	37 A	37 A	27 A	23 A	31 A	13 AB	9 BC	2 CD				
<b>2,5R 5/12</b>	0 F	1 CD	2 D	0 D	1 E	2 D	0 D	2 E	4 CD	4 CD	6 CD	10 BCD	21 A	17 AB	31 A	36 A				
<b>2,5R 5/10</b>	1 EF	1 CD	1 D	1 CD	1 E	1 D	1 D	0 E	2 CD	2 CD	5 CD	8 BC	6 DEF	16 AB	14 B	8 BC				
<b>1,25R 5/14</b>	0 F	0 CD	1 D	1 D	0 E	2 D	1 D	2 E	6 BC	6 BC	4 DE	14 AB	19 B	8 BC	25 A	13 B				
<b>2,5R 4/14</b>	0 F	0 CD	0 D	0 D	0 E	0 D	0 D	1 E	0 D	0 D	1 EF	2 D	2 EFG	2 CD	2 DEF	3 BCD				
<b>2,5R 4/10</b>	0 F	0 D	0 D	0 D	0 E	0 D	2 D	0 E	0 D	0 D	0 F	1 D	0 G	0 D	1 EF	4 CD				
<b>2,5R 4/12</b>	0 F	0 D	0 D	0 D	0 E	0 D	0 D	0 E	0 D	0 D	0 EF	4 CD	1 G	0 D	8 BCD	29 A				
<b>CV%</b>	64,9	53,5	71,2	55,9	69,6	67,1	58,8	60,5	59,3	45,3	58,0	51,7	60,3	55,0	73,7					

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Análise realizada com os dados transformados em arcsen raiz (x+alfá).

A classificação subjetiva das cores do catálogo de Munsell, observadas nas sementes de mamoneira após o teste de tetrazólio (Tabela 3), nos grupos de cores usuais na literatura sobre o teste, e a análise de variância entre os grupos de cores e os tratamentos de concentração da solução e período de coloração podem ser observadas na Tabela 4. Houve diferença estatística significativa entre os grupos de cores para todos os tratamentos. Dentre eles, destacam-se os que foram considerados os melhores na comparação com os resultados de viabilidade pelo teste de tetrazólio (Tabela 2).

Assim, de maneira geral, nos tratamentos com as concentrações de 0,075% e de 0,1%, em todos os períodos, e de 0,2% por 60 e 120 minutos, a maior parte das sementes apresentou-se nos grupos de cores rosa-claro, rosa e rosa-escuro (Tabela 4). Nos tratamentos de concentração da solução de 0,2% por 180 minutos, de 0,5% por 60 minutos e de 1,0% por 30 minutos, a maioria das sementes apresentou-se nos grupos de cores rosa, rosa-escuro e vermelho carmim.

Os resultados observados na distribuição das sementes nas cores do catálogo e nos grupos de cores (Tabelas 3 e 4) indicam que as cores mais escuras nas sementes refletem o aumento gradativo da concentração da solução de tetrazólio e do período de coloração, e que, quanto mais escura a cor da semente, maior é a dificuldade de visualização dos tecidos e a identificação das injúrias, podendo confundir tecidos vivos com aqueles em deterioração (MARCOS FILHO et al., 1987). Isso ocorreu nos tratamentos de concentração 0,5% por 120 minutos e 1,0% por 60 e 90 minutos, para os quais a cor mais escura apresentada pelas sementes resultou na dificuldade de avaliação da viabilidade, contribuindo para que esses tratamentos apresentassem resultados do teste de tetrazólio muito discrepantes dos observados pelos testes de germinação (Tabela 2).

Tabela 4 – Distribuição das sementes de mamoneira nos grupos de cores, com as correspondentes cores do catálogo de Munsell, após teste de tetrazólio, conduzido nos diferentes tratamentos de concentração da solução (%) e período de coloração (minutos).

Grupos de cores (%)	Tratamentos do teste de tetrazólio														
	0,075%			0,1%			0,2%			0,5%			1,0%		
	120	180	240	120	180	240	60	120	180	60	90	120	30	60	90
<b>Rosa-pálido</b>	2,5R 9/2	1 C <sup>1</sup>	1 C	1 C	0 B	0 D	1 C	0 C	0 C	0 D	1 C	1 C	0 B	0 C	1 C
	5R 8/4														
<b>Rosa-claro</b>	5R 8/6	60 A	36 A	28 B	42 A	34 A	25 B	16 B	2 C	1 D	1 C	0 C	1 B	0 C	1 C
	2,5R 8/6														
	2,5R 7/6														
<b>Rosa</b>	2,5R 7/8	23 B	42 A	44 A	37 A	39 A	44 A	41 A	21 B	28 B	11 B	11 B	26 A	6 B	1 C
	2,5R 6/10														
<b>Rosa-escuro</b>	2,5R 6/12	14 B	19 B	24 B	17 B	26 A	25 B	38 A	64 A	52 A	50 A	38 A	30 A	13 B	3 C
	1,25R 6/12														
	2,5R 5/12														
<b>Vermelho carmim</b>	2,5R 5/10	2 C	2 C	3 C	2 C	3 B	2 C	6 BC	12 B	16 C	37 A	45 A	42 A	72 A	60 A
	1,25R 5/14														
	2,5R 4/14														
<b>Vermelho carmim-escuro</b>	2,5R 4/10	0 C	0 C	0 C	0 C	0 B	2 C	0 C	0 C	0 D	1 C	5 BC	0 B	9 B	33 B
	2,5R 4/12														
<b>CV%</b>		40,5	33,2	42,3	36,4	46,7	37,0	42,3	35,4	20,1	33,8	38,2	48,0	34,6	50,1

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Análise realizada com os dados transformados em arcsen raiz (x+talfo).

A avaliação da coloração das sementes após o teste de tetrazólio mediante comparação com as fichas de cor do catálogo de Munsell (MUNSELL, 1976) possibilitou a identificação precisa das cores apresentadas pelas sementes. Sugere-se a utilização deste catálogo em trabalhos de pesquisa sobre o teste de tetrazólio para padronizar e auxiliar na reprodução da metodologia, como uma forma de especificar a cor das sementes após a coloração pela solução de tetrazólio, podendo ser uma referência inclusive em âmbito internacional, já que esse catálogo é reconhecido em todo o mundo. Entretanto, não é recomendada a utilização desta comparação na rotina da análise de sementes, pois é muito trabalhosa e pouco prática. Além disso, para facilitar a identificação das cores, estas devem ser renomeadas e classificadas em grupos de cores comuns, mais usuais na literatura sobre o teste de tetrazólio.

#### **4.2.2.2.3 Correlação entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação**

Na análise da correlação pode-se observar que houve correlação positiva e significativa entre os testes de germinação em areia e em papel e, também, entre o teste de germinação em areia e o teste de tetrazólio na concentração de 0,075% por 180 e 240 minutos e de 0,2% por 120 minutos, e entre o teste de germinação em papel e o teste de tetrazólio na concentração de 0,2% por 60 e 120 minutos (Tabela 5). Por esse motivo, estes tratamentos foram considerados os melhores e qualquer um deles pode ser utilizado para a condução do teste de tetrazólio em sementes de mamoneira.

Apesar das recomendações existentes para sementes de mamoneira (GRABE, 1976; BRASIL, 1992) prescreverem a utilização de solução de tetrazólio a 1,0%, essa metodologia foi ineficiente neste estudo. Pesquisas realizadas com sementes de outras espécies também têm mostrado que soluções menos concentradas que as prescritas pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) têm possibilitado melhores resultados (BITTENCOURT, 1995; BHERING et al., 1996; FRANÇA NETO et al., 1998; DIAS e BARROS, 1999; VIEIRA e VON PINHO, 1999; BHERING et al., 2005).

Considerando-se a eficiência na seleção dos lotes (Tabela 2), aliada à correlação com os testes de germinação em areia e em papel (Tabela 5) para a identificação do melhor tratamento de concentração da solução e período de coloração para o teste de tetrazólio, conclui-se que os melhores resultados foram obtidos com a imersão das sementes em solução de



de mamoneira utilizados nesta etapa. Os resultados do teor de água inicial indicaram diferença estatística significativa entre os lotes, entretanto pode-se considerá-los semelhantes, pois as diferenças foram pequenas, aproximadamente 0,6% e, portanto, não devem ter interferido nas avaliações.

Os dados de germinação indicaram superioridade dos lotes 10, 9, 6, e 7, entretanto, este último lote não diferiu do lote 8, que foi inferior aos anteriores. Observou-se que todos os lotes apresentaram o mínimo de germinação estabelecido para a comercialização, que é de 80% (D.O.U., 2005).

Os resultados do teste de emergência de plântulas em campo mostraram que os lotes tinham vigor similar, entretanto, numericamente, os lotes 10, 7 e 6 foram superiores aos lotes 8 e 9. O índice de velocidade de emergência (IVE) demonstrou que os lotes 6 e 7 germinaram mais rapidamente que os demais, enquanto o lote 8 apresentou a germinação mais lenta, e os lotes 9 e 10 apresentaram velocidade intermediária sem diferir dos demais.

Tabela 6 – Caracterização física e fisiológica dos cinco lotes de sementes de mamoneira, utilizados na terceira etapa, determinada pelo teor de água (%) das sementes com e sem tegumento e pelos testes de germinação em areia (%), emergência de plântulas em campo (%) (conduzido de 01 a 21 de Abril de 2006) e índice de velocidade de emergência (IVE).

Lotes	Teor de água (%)		Germinação em areia (%)	Emergência de plântulas (%)	IVE
	Com tegumento	Sem tegumento			
<b>6</b>	5,5 A <sup>1</sup>	4,0 A	93 A	91 A	8,4 A
<b>7</b>	5,0 C	3,6 B	90 AB	92 A	8,4 A
<b>8</b>	4,9 C	3,4 B	80 B	72 A	5,4 B
<b>9</b>	5,1 AB	3,6 B	96 A	74 A	7,3 AB
<b>10</b>	5,2 B	3,6 B	96 A	87 A	7,6 AB
<b>CV%</b>	0,8	2,2	3,1	14,0	14,4
<b>DMS</b>	0,2	0,3	11,3	25,5	2,3

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### **4.3.1 Primeira fase: seleção dos tratamentos de pré-condicionamento**

Os dados do teor de água após a embebição, para os 69 tratamentos de pré-condicionamento do teste de tetrazólio estudados podem ser observados na Tabela 7. O teor de água das sementes de mamoneira após o tratamento entre papel, sementes com tegumento por 18 horas à 30°C (BRASIL, 1992), considerado a testemunha e indicado na tabela com hachuriado na cor cinza escura, foi de 18,8%. Todos os tratamentos de pré-condicionamento que apresentaram resultados de teor de água menores e diferentes estatisticamente do apresentado pela testemunha foram eliminados, pois não atingiram o teor de água mínimo para o estabelecimento de uma coloração uniforme e nítida durante o teste de tetrazólio.

Assim, os 30 tratamentos selecionados estão marcados na tabela com hachuriado na cor cinza claro, e foram: método entre papel, sementes com tegumento, por 8 e 10 horas a 35°C e 40°C, por 12, 14, 16 e 18 horas a 30°C, 35°C e 40°C; método entre papel, sementes sem tegumento, por 3 horas a 35°C e 40°C, por 4 e 5 horas a 30°C, 35°C e 40°C, e por 6 horas a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C; e método imersão em água das sementes com tegumento, por 6 horas a 35°C e 40°C.

Nos resultados de teor de água após a embebição verificou-se que independente do tratamento, quanto maior a temperatura, maior a quantidade de água absorvida, assim como relataram Carvalho e Nakagawa (2000).

Tabela 7 – Teor de água das sementes de mamoneira (lote 6) sem tegumento após o pré-condicionamento nos métodos entre papel com tegumento (EPC), entre papel sem tegumento (EPS) e imersão em água com tegumento (IAC), nos 69 tratamentos.

Tratamentos			Teor de água (%)
EPC	6h	30°C	10,7 <sub>A23 A24 A25 A26 A27 A28 A29</sub> <sup>1</sup>
		35°C	14,0 <sub>A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23</sub>
		40°C	13,9 <sub>A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23</sub>
	8h	30°C	12,8 <sub>A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26</sub>
		35°C	15,7 <sub>A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17</sub>
		40°C	16,0 <sub>A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16</sub>
	10 h	30°C	14,8 <sub>A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20</sub>
		35°C	16,8 <sub>A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14</sub>
		40°C	19,1 <sub>A2 A3 A4 A5 A6</sub>
	12 h	30°C	15,6 <sub>A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18</sub>
		35°C	18,9 <sub>A2 A3 A4 A5 A6</sub>
		40°C	19,3 <sub>A2 A3 A4 A5</sub>
	14 h	30°C	17,1 <sub>A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13</sub>
		35°C	17,8 <sub>A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9</sub>
		40°C	20,5 <sub>A1 A2 A3 A4</sub>
	16 h	30°C	17,6 <sub>A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10</sub>
		35°C	21,4 <sub>A1 A2</sub>
		40°C	21,4 <sub>A1 A2</sub>
18 h	30°C	18,8 <sub>A2 A3 A4 A5 A6 A7</sub>	
	35°C	20,8 <sub>A1 A2 A3</sub>	
	40°C	23,1 <sub>A1</sub>	
EPS	1h	25°C	8,8 <sub>A27 A28 A29 A30 A31 A32</sub>
		30°C	9,2 <sub>A27 A28 A29 A30 A31 A32</sub>
		35°C	9,3 <sub>A26 A27 A28 A29 A30 A31</sub>
		40°C	9,3 <sub>A26 A27 A28 A29 A30 A31</sub>
	2h	25°C	12,3 <sub>A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27</sub>
		30°C	11,4 <sub>A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27 A28</sub>
		35°C	12,2 <sub>A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27</sub>
		40°C	14,2 <sub>A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22</sub>
	3h	25°C	12,2 <sub>A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27</sub>
		30°C	13,7 <sub>A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23</sub>
		35°C	16,1 <sub>A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16</sub>
		40°C	17,4 <sub>A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11</sub>
	4h	25°C	14,6 <sub>A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21</sub>
		30°C	16,1 <sub>A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16</sub>

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesmo índice *An* não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 7 – Continuação.

Tratamentos			Teor de água (%)	
EPS	4h	35°C	18,7 <sub>A2 A3 A4 A5 A6 A7<sup>1</sup></sub>	
		40°C	17,4 <sub>A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12</sub>	
	5h	25°C	15,2 <sub>A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19</sub>	
		30°C	16,6 <sub>A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14</sub>	
		35°C	20,3 <sub>A1 A2 A3 A4</sub>	
		40°C	17,8 <sub>A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9</sub>	
	6h	25°C	18,3 <sub>A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8</sub>	
		30°C	18,5 <sub>A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8</sub>	
		35°C	22,8 <sub>A1</sub>	
		40°C	23,1 <sub>A1</sub>	
	IAC	1h	25°C	5,8 <sub>A32</sub>
			30°C	6,4 <sub>A30 A31 A32</sub>
35°C			6,2 <sub>A31 A32</sub>	
40°C			7,3 <sub>A29 A30 A31 A32</sub>	
2h		25°C	8,2 <sub>A28 A29 A30 A31 A32</sub>	
		30°C	9,2 <sub>A27 A28 A29 A30 A31 A32</sub>	
		35°C	8,9 <sub>A27 A28 A29 A30 A31 A32</sub>	
		40°C	10,8 <sub>A22 A23 A24 A25 A26 A27 A28</sub>	
3h		25°C	8,9 <sub>A27 A28 A29 A30 A31 A32</sub>	
		30°C	10,0 <sub>A24 A25 A26 A27 A28 A29</sub>	
		35°C	9,7 <sub>A25 A26 A27 A28 A29 A30</sub>	
		40°C	11,7 <sub>A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27 A28</sub>	
4h		25°C	10,7 <sub>A23 A24 A25 A26 A27 A28 A29</sub>	
		30°C	11,2 <sub>A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27 A28</sub>	
		35°C	11,8 <sub>A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27</sub>	
		40°C	13,0 <sub>A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25</sub>	
5h		25°C	11,3 <sub>A21 A22 A23 A24 A25 A26 A27 A28</sub>	
		30°C	12,8 <sub>A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24 A25 A26</sub>	
		35°C	14,3 <sub>A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22</sub>	
		40°C	15,2 <sub>A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19</sub>	
6h		25°C	13,4 <sub>A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23 A24</sub>	
		30°C	13,9 <sub>A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21 A22 A23</sub>	
		35°C	15,4 <sub>A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18</sub>	
		40°C	16,2 <sub>A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15</sub>	
CV%			5,5	
DMS			3,5	

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesmo índice *An* não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Entre os tratamentos selecionados, o maior teor de água foi obtido para o pré-condicionamento no método entre papel sem tegumento por 6 horas a 40°C e no método entre papel com tegumento por 18 horas a 40°C, e o menor para o método imersão em água das sementes com tegumento por 6 horas a 35°C. Assim, a faixa de teor de água obtida no pré-condicionamento foi de 15,4% a 23,1%.

Esses teores de água são inferiores a 28%, que é o valor necessário para que a semente de mamona inicie a hidrólise das macromoléculas (BELTRÃO et al., 2001). Entretanto, pode-se afirmar que o teor de água de aproximadamente 19%, alcançado com o pré-condicionamento das sementes por 18 horas a 30°C entre papel com tegumento (testemunha) (BRASIL, 1992), foi suficiente para ativar as enzimas, assim como para a realização do teste de tetrazólio, pois possibilitou o desenvolvimento da coloração adequada para a avaliação correta da viabilidade das sementes nas etapas anteriores desta pesquisa.

As sementes de mamoneira apresentaram teor de água inicial sem tegumento de aproximadamente 4,0% (Tabela 6), assim sendo, houve um ganho de 11,4% a 19,1% de teor de água, de acordo com o tratamento de pré-condicionamento (Tabela 7).

Entre os métodos, a imersão em água das sementes com tegumento foi o que apresentou menor eficiência no aumento do teor de água das sementes, considerando-se os períodos e temperaturas testadas, com apenas dois tratamentos selecionados para a segunda fase. Como não houve interesse em prolongar o período para a realização do teste de tetrazólio e o método entre papel sem tegumento com seis horas já apresentou teor de água suficiente, não foram testados outros tratamentos para o método imersão em água. Além disso, a imersão direta das sementes em água pode acarretar problemas devido à redução na disponibilidade de oxigênio, comprometendo a qualidade das sementes e, assim, podendo levar à obtenção de resultados incorretos, se realizada por período excessivo (BARROS et al., 2005).

#### **4.3.2 Segunda fase: avaliação da uniformidade de embebição dos lotes de sementes nos tratamentos selecionados**

Na primeira análise, na qual os lotes foram utilizados como repetições, os resultados de teor de água após a embebição para os 30 tratamentos de pré-condicionamento estão apresentados na Tabela 8. O teor de água das sementes de mamoneira no tratamento testemunha foi de 20,6%, indicado na tabela com linha cinza escura.

Os tratamentos que apresentaram teor de água estatisticamente menor que o da testemunha foram considerados inadequados para a metodologia do teste de tetrazólio, pois não atingiram o teor de água mínimo para a coloração adequada das sementes, quando testados para cinco lotes. Assim, os 22 tratamentos selecionados estão indicados na tabela com linha cinza clara: entre papel sementes com tegumento por 10 e 12 horas a 35°C e 40°C, e por 14, 16 e 18 horas a 30°C, 35°C e 40°C; entre papel sementes sem tegumento por 4 horas a 35°C e 40°C, por 5 horas 30°C, 35°C e 40°C, e por 6 horas a 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. A faixa do teor de água das sementes variou de 17,4% a 23,7% entre os tratamentos.

Tabela 8 – Teor de água de sementes de mamoneira sem tegumento após o pré-condicionamento nos métodos entre papel com tegumento (EPC), entre papel sem tegumento (EPS) e imersão em água com tegumento (IAC), nos 30 tratamentos selecionados, para a média de cinco lotes.

Tratamentos			Teor de água (%)	
EPC	8h	35°C	15,5	K
		40°C	16,7	IJK
	10 h	35°C	17,4	FGHIJK
		40°C	18,6	DEFGHIJK
	12 h	30°C	17,2	GHIJK
		35°C	18,8	CDEFGHIJK
		40°C	20,9	ABCDE
	14 h	30°C	18,8	CDEFGHIJK
		35°C	19,2	CDEFGHIJ
		40°C	21,4	ABCDE
	16 h	30°C	19,2	CDEFGHIJ
		35°C	21,1	ABCDE
40°C		23,1	AB	
18 h	30°C	20,6	ABCDEF	
	35°C	22,0	ABCD	
	40°C	23,7	A	
EPS	3h	35°C	16,2	JK
		40°C	16,7	HIJK
	4h	30°C	17,2	GHIJK
		35°C	19,4	CDEFGHIJ
		40°C	19,9	BCDEFGHI
	5h	30°C	18,6	EFGHIJK
		35°C	20,1	BCDEFGH
		40°C	20,9	ABCDE
	6h	25°C	18,6	DEFGHIJK
		30°C	20,3	BCDEFG
		35°C	22,2	ABC
		40°C	22,8	AB
IAC	6h	35°C	15,8	K
		40°C	16,7	IJK
CV%			7,1	
DMS			3,4	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados da segunda análise, realizada com os dados do teor de água de cinco lotes de sementes após 22 tratamentos de pré-condicionamento selecionados na análise anterior, indicaram que os tratamentos entre papel sementes com tegumento por 10, 12 e 16 horas a 35°C, por 14 horas a 35°C e 40°C, e por 18 horas a 30°C e 40°C (Tabela 9) e entre papel sementes sem tegumento por 6 horas a 25°C, 30°C e 40°C (Tabela 10) promoveram a uniformidade de absorção de água pelas sementes, com todos os lotes apresentando teor de água semelhante. Assim, esses dez tratamentos foram selecionados para a fase seguinte.

A qualidade fisiológica das sementes de mamoneira não influenciou na absorção de água, nos métodos de pré-condicionamento estudados. Da mesma maneira, em sementes de amendoim, Bittencourt (1995) verificou que após 16 horas de embebição na temperatura de 20°C as sementes com níveis diferenciados de vigor (alto, médio e baixo) alcançaram a mesma faixa de teor de água. Diferente do observado nesta pesquisa, para sementes algodão, o período de embebição deve ser de 14 a 16 horas a 25°C; no entanto, lotes de qualidade inferior, devem ser embebidos por um maior período, para que ocorra ativação suficiente do sistema enzimático (VIEIRA e VON PINHO, 1999).

Tabela 9 – Teor de água de cinco lotes de sementes de mamoneira sem tegumento após os tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel com tegumento.

		Teor de água (%)													
		Entre papel com tegumento													
Período	10h	12h		14h		16h		18h		30°C		35°C		40°C	
		35°C	40°C	35°C	40°C	30°C	40°C	30°C	40°C	30°C	40°C	30°C	40°C	30°C	40°C
<b>Lotes</b>															
<b>6</b>	16,8 A <sup>1</sup>	19,1 AB	18,9 A	19,3 B	17,1 B	17,8 A	20,5 A	17,6 B	21,4 A	21,4 B	18,8 A	20,8 B	23,1 A		
<b>7</b>	17,4 A	18,6 AB	19,0 A	23,1 A	19,9 AB	20,1 A	22,3 A	19,7 AB	22,3 A	23,8 AB	22,3 A	21,0 B	24,7 A		
<b>8</b>	16,2 A	16,5 B	16,8 A	18,2 B	18,0 AB	18,9 A	20,6 A	18,1 AB	19,6 A	22,4 AB	19,4 A	23,2 A	22,3 A		
<b>9</b>	18,6 A	20,3 A	19,9 A	22,0 B	20,3 A	20,4 A	22,0 A	20,5 A	21,3 A	24,8 A	21,9 A	24,3 A	25,3 A		
<b>10</b>	18,2 A	18,7 AB	19,5 A	21,7 A	18,8 AB	18,8 A	21,6 A	20,0 AB	21,8 A	23,1 AB	20,4 A	20,5 B	23,2 A		
<b>CV%</b>	5,4	4,5	6,5	2,4	4,0	3,5	5,1	3,6	4,4	3,0	5,8	1,6	5,5		
<b>DMS</b>	3,8	3,3	4,9	2,0	3,0	2,7	4,4	2,8	3,8	2,7	4,8	1,4	5,2		

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 10 – Teor de água de cinco lotes de sementes de mamoneira sem tegumento após os tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel sem tegumento.

		Teor de água (%)														
		Entre papel sem tegumento						6h								
Período	Temperatura	4h		5h		6h		25°C		30°C		35°C		40°C		
		35°C	40°C	30°C	35°C	30°C	35°C	40°C	25°C	30°C	35°C	40°C	25°C	30°C	35°C	40°C
<b>Lotes</b>																
<b>6</b>		18,7 AB	17,4 B	16,6 B	20,3 AB	17,8 B	18,3 A	18,5 A	22,8 AB	23,1 A						
<b>7</b>		21,9 A	21,3 A	21,7 A	21,5 A	23,5 A	19,0 A	20,5 A	24,5 A	25,5 A						
<b>8</b>		19,2 AB	20,7 A	16,6 B	17,5 B	19,7 AB	17,5 A	20,2 A	20,3 B	22,2 A						
<b>9</b>		19,7 AB	20,6 A	19,7 A	21,3 AB	23,1 A	19,2 A	21,8 A	22,0 AB	23,0 A						
<b>10</b>		17,5 B	19,6 AB	18,4 B	19,8 AB	20,3 AB	19,1 A	20,6 A	21,1 AB	20,4 A						
<b>CV%</b>		4,4	3,5	4,4	4,9	5,5	4,4	5,9	4,1	6,3						
<b>DMS</b>		3,4	2,8	3,3	4,0	4,6	3,3	4,8	3,7	5,8						

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### 4.3.3 Terceira fase: comparação dos resultados do teste de tetrazólio com os do teste de germinação

Os resultados dos testes de tetrazólio mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos de pré-condicionamento para todas as características avaliadas (Tabela 11), embora para porcentagem de sementes viáveis essas diferenças sejam insuficientes para desqualificar qualquer um dos tratamentos. Entretanto, a avaliação da porcentagem de sementes com coloração desuniforme e/ou manchas esbranquiçadas mostrou que alguns tratamentos podem ocasionar estes sintomas, os quais dificultam a interpretação correta do teste, influenciando nos resultados, como o tratamento entre papel com tegumento por 10 horas a 35°C (Figura 29) e o entre papel sem tegumento por 6 horas a 25°C, 30°C e 40°C (Figuras 30, 31 e 32, respectivamente).

Tabela 11 – Porcentagem de sementes viáveis e de sementes viáveis e não viáveis com coloração desuniforme e com manchas esbranquiçadas, observadas no teste de tetrazólio realizado após dez tratamentos de pré-condicionamento nos métodos entre papel com tegumento (EPC) e sem tegumento (EPS), para o lote 6 de sementes de mamoneira.

Tratamentos			Viáveis (%)	Coloração desuniforme (%)	Manchas esbranquiçadas (%)
EPC	10 h	35°C	92 BC <sup>1</sup>	45 AB	25 ABC
		35°C	98 A	22 BC	30 AB
	14 h	35°C	96 ABC	27 BC	11 BC
		40°C	97 AB	20 BC	8 BC
	16 h	35°C	98 A	9 C	18 ABC
		18 h	30°C	91 C	8 C
			40°C	99 A	10 C
	EPS	6h	25°C	95 ABC	76 A
30°C			96 ABC	63 A	28 AB
40°C			95 ABC	52 AB	14 BC
CV%			1,4	26,1	33,3
DMS		5,3	34,3	24,3	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O pré-condicionamento inadequado também resultou em coloração desuniforme e manchas nas sementes de amendoim (BITTENCOURT, 1995), canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) (OLIVEIRA et al., 2005) e soja (COSTA et al., 1998).

A principal característica da coloração desuniforme eram áreas com coloração mais escura, avermelhadas, no sentido do centro da semente para as laterais, as quais não apresentavam qualquer sinal de tecido em deterioração, ou seja, o tecido da semente apresentava-se túrgido e firme (Figuras 29 a 32). As principais características das manchas esbranquiçadas eram: o tecido em volta estar túrgido e firme e, embaixo da mancha, o tecido estava vermelho e túrgido (Figuras 29 a 32).

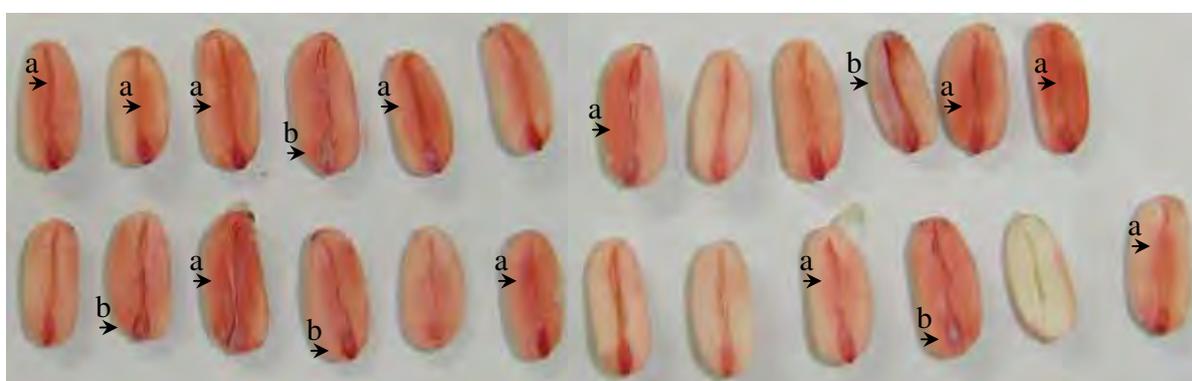


Figura 29 – Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sementes com tegumento por 10 horas a 35°C.

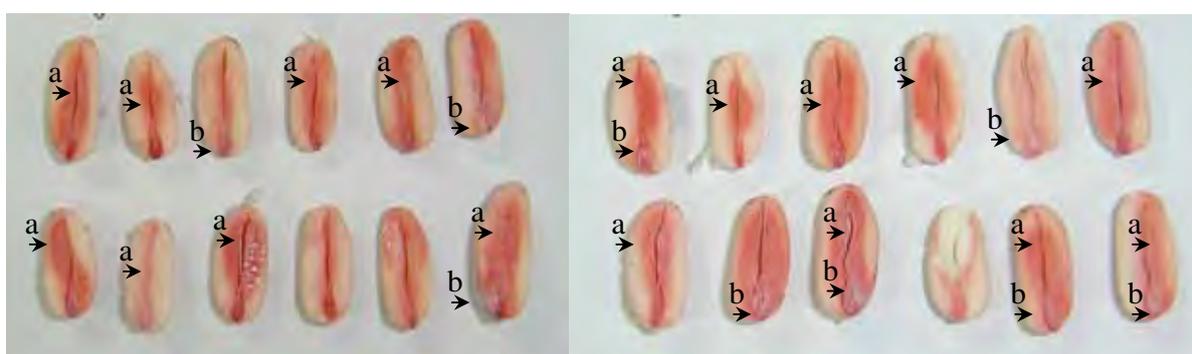


Figura 30 – Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sementes sem tegumento por 6 horas a 25°C.

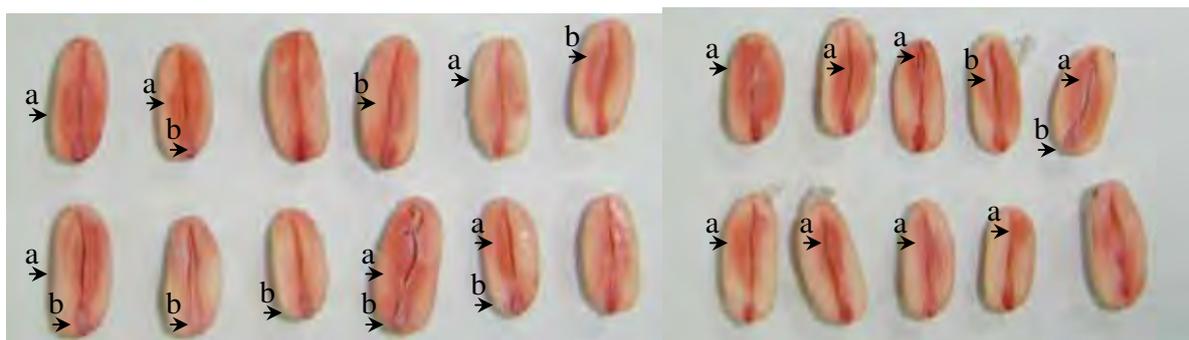


Figura 31 – Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e/ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sementes sem tegumento por 6 horas a 30°C.

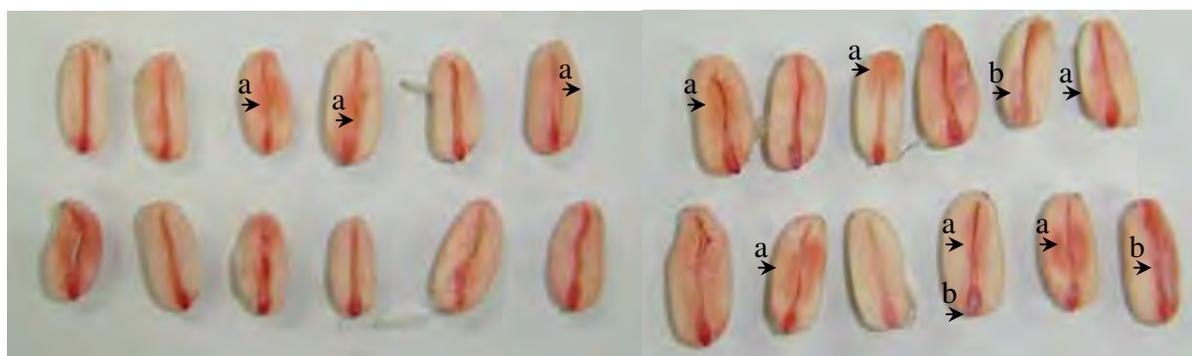


Figura 32 – Sementes de mamoneira com coloração desuniforme (a) e /ou manchas esbranquiçadas (b) (lote 6), após o teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento entre papel sem tegumento por 6 horas a 40°C.

A presença de coloração desuniforme e de manchas nas sementes foi causada pelas condições inadequadas proporcionadas pelos tratamentos no pré-condicionamento. Esses tratamentos provocaram uma rápida absorção de água, o que justifica as sementes apresentarem teor de água semelhante aos demais tratamentos, entretanto o período de embebição não foi suficiente para que a distribuição da água ocorresse de forma uniforme em toda a semente. Assim, não houve o estímulo adequado ao processo respiratório e atividade enzimática, comprometendo a uniformidade da coloração e a avaliação do teste (MARCOS FILHO et al., 1987; BITTENCOURT, 1995). De acordo com Copeland et al. (1959), o pré-condicionamento antes da coloração das sementes constitui uma das etapas críticas do teste de tetrazólio, pois a

absorção lenta de água, em temperatura controlada, é importante e necessária para prevenir injúrias por embebição.

Os resultados indicaram que o tegumento tem um papel de destaque no processo de embebição das sementes, regulando a entrada de água e fazendo com que a embebição ocorra de forma lenta e uniforme (WOODSTOCK, 1988). Isso pode ser verificado neste estudo, pois nenhum dos tratamentos do método de pré-condicionamento com sementes sem tegumento resultou em teor de água nas sementes necessário à realização do teste de tetrazólio, levando ao aparecimento de coloração desuniforme e manchas.

Os tratamentos que apresentaram maior porcentagem de sementes com coloração desuniforme e manchas esbranquiçadas foram considerados inadequados para o pré-condicionamento de sementes de mamoneira, visando a realização do teste de tetrazólio e, por isso, foram eliminados das análises seguintes.

Os resultados da segunda análise para sementes viáveis dos testes de germinação e de tetrazólio, considerando cada lote separadamente, estão na Tabela 12.

Tabela 12 – Sementes viáveis de mamoneira determinadas pelo teste de tetrazólio, realizado após seis tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel com tegumento (EPC), e pelo teste de germinação em areia.

Tratamentos			Sementes viáveis (%)				
			Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10
<b>Germinação em areia</b>			93 a <sup>1</sup>	90 ab	80 B b	96 A a	96 a
<b>EPC</b>	<b>12 h</b>	<b>35°C</b>	98 a	86 b	91 AB ab	86 AB b	96 ab
	<b>14 h</b>	<b>35°C</b>	96 a	91 a	97 A a	80 B b	97 a
		<b>40°C</b>	97	88	98 A	90 AB	96
	<b>16 h</b>	<b>35°C</b>	98 ab	97 ab	99 A a	88 AB b	99 a
	<b>18 h</b>	<b>30°C</b>	91 a	89 ab	97 A a	80 B b	99 a
		<b>40°C</b>	99	94	97 A	90 AB	98
<b>CV%</b>			3,8				
<b>DMS lotes</b>			11,1				
<b>DMS tratamentos</b>			10,2				

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna, e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foi possível observar diferenças significativas entre os lotes, contudo apenas para os lotes 8 e 9 houve interação com os tratamentos. No lote 8, apenas o tratamento entre papel com tegumento por 12 horas a 35°C apresentou resultado estatisticamente semelhante ao da germinação. Já no lote 9 os tratamentos entre papel com tegumento por 14 horas a 35°C e por 18 horas a 30°C apresentaram resultados estatisticamente diferentes da germinação.

Somente os tratamentos de pré-condicionamento entre papel com tegumento pelos períodos de 14 e 18 horas a 40°C não diferenciaram os lotes no teste de tetrazólio. Os demais tratamentos indicaram os lotes 6 e 10 como superiores e o lote 7 como intermediário. Entretanto, o teste de tetrazólio parece ter superestimado o potencial do lote 8, que apresentou valores baixos de emergência de plântulas em campo e IVE, na caracterização dos lotes desta etapa (Tabela 6). Isso pode ter ocorrido devido à presença de sementes duras e também de fungos no teste de germinação em areia, que não são identificados no teste de tetrazólio.

Da mesma maneira como observado nesta pesquisa, a avaliação da germinação pode ser prejudicada pela presença de fungos, verificando-se diferenças maiores que 5% entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação em sementes de algodão (SANTOS et al., 1992; VIEIRA e VON PINHO, 1999), soja (FRANÇA NETO et al., 1998), amendoim (BITTENCOURT, 1995) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) (OLIVEIRA et al., 2005).

No lote 9, o teste de tetrazólio parece ter subestimado o potencial germinativo (Tabela 12). No entanto, quando os resultados foram comparados com os testes de emergência de plântulas em campo e IVE, realizados na caracterização dos lotes (Tabela 6), verificou-se que este lote tinha qualidade inferior aos lotes 6 e 7, assim como indicou o teste de tetrazólio. Isso pode ter ocorrido, pois os danos observados nas sementes no teste de tetrazólio não se manifestaram no teste de germinação em areia, conduzido em condições controladas.

O teste de tetrazólio (Tabela 12) não possibilitou o ranqueamento desses lotes de forma semelhante à indicada pelos testes de germinação, emergência de plântulas em campo e IVE realizados na caracterização dos lotes desta etapa (Tabela 6). Entretanto, identificou um potencial de germinação para o lote 8, indicando que se as sementes forem tratadas, a germinação poderá aumentar e mostrou que o lote 9 poderá perder sua capacidade germinativa rapidamente.

Assim, este fato não deve ser um problema que afete a confiabilidade do teste de tetrazólio, pois, segundo Marcos Filho (1999), a emergência de plântulas em campo e os testes diretos de avaliação da qualidade das sementes são afetados por fatores muitas vezes não observados durante a condução de testes indiretos, como o tetrazólio, de modo que os resultados precisam ser interpretados com a devida cautela. Dentro deste enfoque, o teste de tetrazólio possibilita a avaliação da capacidade potencial inerente aos lotes de sementes e que a possível falta de concordância entre os resultados deste teste e a emergência das plântulas no campo não implica necessariamente em baixa eficiência, pois um analista experiente poderá pesquisar as causas destas diferenças e obter novos parâmetros que contribuam para a maior precisão dos resultados (MOORE, 1985; BITTENCOURT, 1995).

Na terceira análise, quando os lotes foram considerados como repetições (Tabela 13) não houve diferença estatística entre os resultados de germinação e de tetrazólio para os tratamentos estudados.

Tabela 13 – Sementes viáveis de mamoneira determinadas pelo teste de tetrazólio, realizado após seis tratamentos de pré-condicionamento no método entre papel com tegumento (EPC), e pelo teste de germinação em areia, para a média dos cinco lotes.

<b>Tratamentos</b>		<b>Sementes viáveis (%)</b>
<b>Germinação em areia</b>		91
<b>EPC</b>	<b>12 h 35°C</b>	91
	<b>14 h 35°C</b>	92
	<b>40°C</b>	94
	<b>16 h 35°C</b>	96
	<b>18 h 30°C</b>	91
	<b>40°C</b>	96
<b>Média</b>		93
<b>CV%</b>		6,5
<b>DMS</b>		8,3

Dessa maneira, qualquer um dos seis tratamentos de pré-condicionamento estudados pode ser utilizado na condução do teste de tetrazólio para sementes de mamoneira. A escolha vai depender da rotina, das condições de cada laboratório de análise de sementes e da rapidez com que as informações são requeridas. Porém, sob o aspecto prático, o pré-

condicionamento por 16 ou 18 horas são os mais indicados, pois estes períodos possibilitam colocar as sementes para embeber no final da tarde e submetê-las ao preparo e coloração no dia seguinte pela manhã. A escolha da temperatura vai depender da disponibilidade dos equipamentos dos laboratórios, e a maioria das câmaras de germinação permite alcançar a temperatura máxima recomendada de 40°C.

Esses resultados concordam com as prescrições encontradas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) para mamona, que prescrevem o pré-condicionamento das sementes entre papel por 18 horas e concordam parcialmente com Grabe (1976), para sementes classificadas em “outras dicotiledôneas não leguminosas”, que é o caso da mamona, pois esse autor recomendou o pré-condicionamento por 16 horas entre papel umedecido ou a embebição direta em água morna durante três a quatro horas.

#### **4.4 Etapa 4 – Metodologia para a avaliação do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio**

##### **4.4.1 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio**

Para a avaliação do vigor, as sementes foram classificadas em viáveis e vigorosas, viáveis e não vigorosas e não viáveis, sendo:

- 1) viáveis e vigorosas: sementes com coloração rosa-claro a rosa em toda a extensão do embrião e do endosperma, com tecidos firmes e túrgidos, sem apresentar lesões visíveis (Figura 33); podem apresentar pequenos danos superficiais em volta dos cotilédones, mas sem atingi-los (Figura 34); podem apresentar coloração fraca, indicando restrição à penetração da solução de tetrazólio (Figura 35), mas com os tecidos túrgidos; sementes com coloração vermelha carmim (tecido em deterioração) na extremidade apical inferior do eixo hipocótilo radícula (Figura 36); ainda podem apresentar áreas com coloração rosa-escuro a vermelho carmim no endosperma, mas o tecido deve estar túrgido e brilhante (Figura 37).

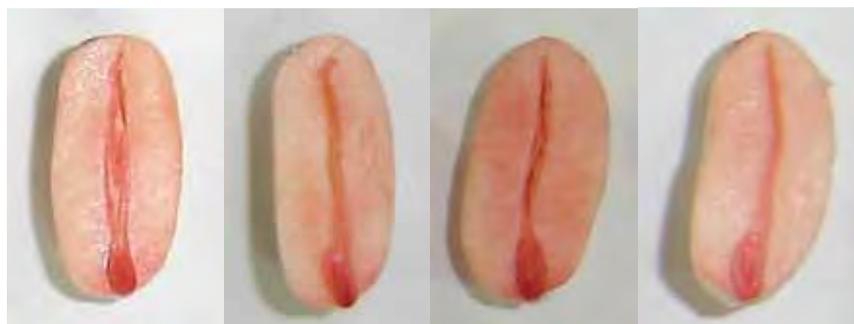


Figura 33 – Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, com coloração rosa-claro a rosa em toda a extensão do embrião e do endosperma, com tecidos firmes e túrgidos, sem apresentar lesões visíveis.

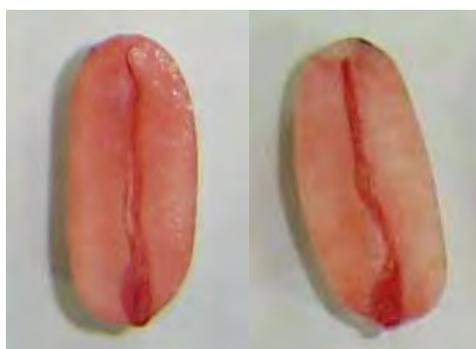


Figura 34 - Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, apresentando pequenos danos superficiais em volta dos cotilédones, mas sem atingi-los.

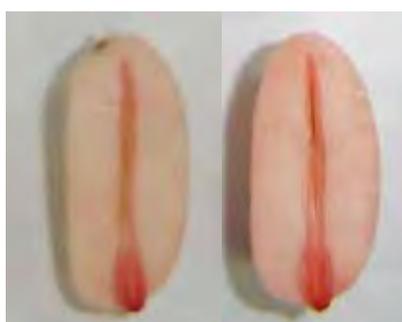


Figura 35 - Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, com coloração fraca, indicando restrição à penetração da solução de tetrazólio.



Figura 36 - Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, com coloração vermelho carmim (tecido em deterioração) na extremidade apical inferior do eixo hipocótilo-radícula.



Figura 37 - Sementes viáveis e vigorosas de mamoneira, apresentando áreas com coloração rosa-escuro a vermelho carmim no endosperma, mas o tecido está túrgido e brilhante.

- 2) viáveis e não vigorosas: sementes com endosperma e/ou cotilédones com menos de 50% das áreas não coloridas (Figura 38); a extremidade do eixo hipocótilo-radícula pode apresentar-se sem coloração, desde que os tecidos estejam firmes e túrgidos (Figura 39), sem lesões visíveis, com possibilidade de originar plântulas normais; endosperma e/ou embrião com coloração vermelha carmim-escuro, porém brilhante e sem alteração de textura (Figura 40); incluem-se as sementes que só teriam possibilidade de germinar sob condições extremamente favoráveis (Figura 41).



Figura 38 - Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, apresentando endosperma e/ou cotilédones com menos de 50% das áreas não coloridas.



Figura 39 - Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, com a extremidade do eixo hipocótilo-radícula sem coloração, mas com os tecidos firmes e túrgidos.



Figura 40 - Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, apresentando endosperma e/ou embrião com coloração vermelha-escura, porém brilhante e sem alteração de textura.



Figura 41 - Sementes viáveis e não vigorosas de mamoneira, que só teriam possibilidade de germinar sob condições extremamente favoráveis.

- 3) não viáveis: sementes apresentando mais de 50% das áreas dos cotilédones e/ou endosperma não coloridas (Figura 42); com ausência de coloração na região do eixo hipocótilo-radícula, apresentando tecidos flácidos e brancos ou amarelados (Figura 43); com áreas do endosperma e embrião totalmente sem coloração (Figura 44), indicando a possibilidade de originarem plântulas anormais, ou ainda apresentando estado metabólico característico de sementes mortas.



Figura 42 - Sementes não viáveis de mamoneira, apresentando mais de 50% das áreas dos cotilédones e/ou endosperma não coloridas.

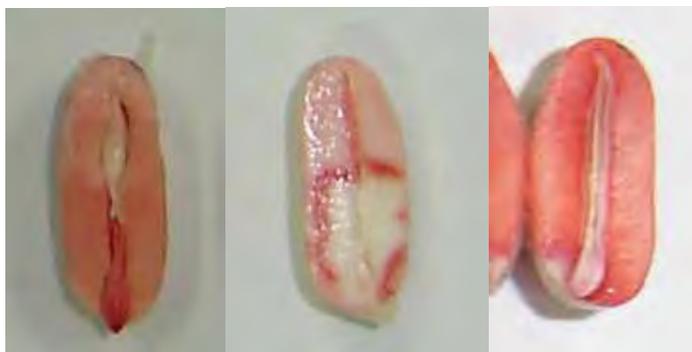


Figura 43 - Sementes não viáveis de mamoneira, apresentando ausência de coloração na região do eixo hipocótilo-radícula e tecidos flácidos e brancos ou amarelados.



Figura 44 - Sementes não viáveis de mamoneira, com áreas do endosperma e embrião totalmente sem coloração.

Os resultados do potencial de vigor (viáveis e vigorosas) e do potencial de germinação ou viabilidade (viáveis e vigorosas e não vigorosas) dos lotes podem ser observados na Tabela 14. Os resultados de viabilidade mostraram superioridade do lote 12 em relação aos lotes 14 e 15. Para o vigor verificou-se que o lote 11 mostrou-se superior aos lotes 12 e 13.

Tabela 14 – Viabilidade (viáveis vigorosas e não vigorosas) e vigor (viáveis e vigorosas) de sementes de mamoneira pelo teste de tetrazólio.

Lotes	Teste de tetrazólio	
	Viabilidade (%)	Vigor (%)
<b>11</b>	99 AB	66 A
<b>12</b>	100 A	52 B
<b>13</b>	99 AB	49 B
<b>14</b>	95 BC	54 AB
<b>15</b>	94 C	56 AB
<b>CV %</b>	2,2	10,5
<b>DMS</b>	4,7	12,7

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

#### 4.4.2 Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes por outros testes

Na Tabela 15 estão os resultados da comparação de médias realizada para os testes utilizados para a avaliação da viabilidade e do vigor dos cinco lotes de sementes utilizados nesta etapa e, na Tabela 16, a análise de correlação simples entre as médias desses testes e entre os resultados de viabilidade e vigor pelo teste de tetrazólio.

Nos resultados de comparação de médias (Tabela 15) verifica-se que os testes de germinação em papel, IVE e massa da matéria seca de plântulas não diferenciaram estatisticamente os lotes. Entretanto, quando os testes foram correlacionados entre si (Tabela 16), houve correlação positiva significativa entre o IVE e o teste de emergência de plântulas em campo, e entre a massa da matéria seca de plântulas e os testes de viabilidade pelo tetrazólio e comprimento de plântulas total e raiz.

Tabela 15 – Caracterização dos cinco lotes de sementes de mamoneira utilizados na quarta etapa pelo teor de água (TA) e pelos testes de primeira contagem do teste de germinação (PC), germinação em papel (GP), germinação em areia (GA), normais fortes pelo teste de classificação das plântulas (NF), emergência de plântulas em campo (EC) (conduzido de 01 a 21 de Novembro de 2006), índice de velocidade de emergência (IVE), envelhecimento acelerado (EA), comprimento de plântulas (CP) e massa de matéria seca de plântulas (MS).

Lotes	TA (%)	PC (%)	GP (%)	GA (%)	NF (%)	EC (%)	IVE	EA (%)	CP (cm)		MS (mg/plântula)
									Total	Raiz	
<b>11</b>	5,0 B	51 B <sup>1</sup>	86	93 A	70 A	91 A	8,4	60 C	10,2 AB	7,3 AB	54,0
<b>12</b>	5,1 B	51 B	82	96 A	62 AB	87 AB	7,6	62 BC	14,5 A	11,2 A	80,1
<b>13</b>	5,7 A	60 AB	87	92 A	51 B	92 A	8,4	84 A	9,6 AB	7,5 AB	62,9
<b>14</b>	5,2 B	64 A	78	81 B	54 B	87 AB	8,4	72 B	5,8 B	3,8 B	37,7
<b>15</b>	5,1 B	55 AB	82	80 B	60 AB	81 B	7,6	68 BC	7,3 B	5,2 B	45,5
<b>CV %</b>	1,4	10,2	6,2	4,1	11,2	4,0	7,4	7,2	28,9	31,2	34,9
<b>DMS</b>	0,3	12,6	11,2	7,9	14,5	7,6	1,3	10,9	6,0	4,8	42,7

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 16 – Análise de correlação simples (r) entre as médias dos testes de primeira contagem da germinação (PC), germinação em papel (GP), germinação entre areia (GA), normais fortes pelo teste de classificação das plântulas (NF), emergência de plântulas em campo (EC), índice de velocidade de emergência (IVE), viabilidade e vigor pelo teste de tetrazólio (TZ), envelhecimento acelerado (EA), comprimento de plântulas (CP) e massa de matéria seca de plântulas (MS), realizados para cinco lotes de sementes de mamoneira.

Correlação	PC	GP	GA	NF	EC	IVE	Viabilidade		Vigor		CP	
							TZ	EA	TZ	EA	Total	Raiz
<b>GP</b>	-0,33 <sup>ns</sup>											
<b>GA</b>	-0,55 <sup>ns</sup>	0,58 <sup>ns</sup>										
<b>NF</b>	-0,84 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>	0,35 <sup>ns</sup>									
<b>EC</b>	0,06 <sup>ns</sup>	0,61 <sup>ns</sup>	0,71 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>								
<b>IVE</b>	0,52 <sup>ns</sup>	0,35 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	-0,21 <sup>ns</sup>	0,76*							
<b>Viabilidade TZ</b>	-0,53 <sup>ns</sup>	0,55 <sup>ns</sup>	1,00**	0,34 <sup>ns</sup>	0,72*	0,11 <sup>ns</sup>						
<b>Vigor TZ</b>	-0,49 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	0,86**	0,10 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>					
<b>EA</b>	0,73*	0,27 <sup>ns</sup>	-0,18 <sup>ns</sup>	-0,90 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>	-0,19 <sup>ns</sup>	-0,69 <sup>ns</sup>				
<b>CP Total</b>	-0,73 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	0,87**	0,41 <sup>ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	-0,40 <sup>ns</sup>	0,87**	-0,05 <sup>ns</sup>	-0,39 <sup>ns</sup>			
<b>CP Raiz</b>	-0,69 <sup>ns</sup>	0,35 <sup>ns</sup>	0,88**	0,32 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	-0,38 <sup>ns</sup>	0,87**	-0,13 <sup>ns</sup>	-0,29 <sup>ns</sup>	0,99**		
<b>MS</b>	-0,58 <sup>ns</sup>	0,36 <sup>ns</sup>	0,86**	0,17 <sup>ns</sup>	0,32 <sup>ns</sup>	-0,36 <sup>ns</sup>	0,85**	-0,28 <sup>ns</sup>	-0,14 <sup>ns</sup>	0,97**	0,99**	

<sup>ns</sup> não significativo; \* significativo a 10%; \*\* significativo a 1%.

Somente a primeira contagem da germinação em papel e o envelhecimento acelerado apresentaram classificação dos lotes diferente dos demais testes (Tabela 15), e também não se correlacionaram com nenhum outro teste, apenas entre si (Tabela 16). De acordo com Marcos Filho (1999), o teste de envelhecimento acelerado depende da influência de vários fatores e pode indicar um potencial para uma amostra que pode não ser confirmado na prática. Isto foi verificado no presente estudo. Assim, esse teste foi considerado inadequado para a avaliação da qualidade dos lotes de sementes de mamoneira utilizados nesta pesquisa.

Os resultados dos testes de germinação entre areia (Tabela 15) e de viabilidade pelo tetrazólio (Tabela 14) indicaram os lotes 11, 12 e 13 como de qualidade semelhante, e superiores numericamente aos lotes 14 e 15. O teste de vigor pelo tetrazólio diferenciou os lotes, destacando o lote 11 como o de qualidade superior, da mesma maneira que o teste de classificação de plântulas (normais fortes) (Tabela 15). Esses resultados podem ser comprovados pela correlação altamente significativa entre os testes citados (Tabela 16).

O teste de viabilidade pelo tetrazólio também se correlacionou com o teste de emergência de plântulas em campo, e com os testes de comprimento de plântulas total e raiz, os quais também tiveram correlação com o teste de germinação em areia. Além disso, o teste de germinação em areia revelou correlação não significativa, mas positiva com a emergência de plântulas em campo, apresentando coeficiente de correlação de 0,71.

No presente estudo, as diferenças verificadas entre os resultados do teste de tetrazólio e do teste de germinação em areia, confirmaram a precisão do método, pois apresentaram diferenças de até 5% em relação aos valores do teste padrão de germinação (FRANÇA NETO et al., 1998). Por outro lado, quando esta comparação foi efetuada com os valores do teste de germinação conduzido em rolo de papel, observaram-se maiores diferenças. Porém, estes resultados podem ter sido mascarados pelo excessivo desenvolvimento de fungos, observado durante a condução dos experimentos (Tabelas 14 e 15). Outros autores também verificaram diferenças maiores que 5% entre os resultados do teste de tetrazólio e do teste padrão de germinação em sementes de soja, amendoim e algodão, quando estas se encontraram infectadas por fungos (FRANÇA NETO et al., 1998; BITTENCOURT, 1995; SANTOS et al., 1992).

Entretanto, apesar do teste de germinação em papel não ter apresentado correlação significativa com nenhum outro teste, os valores do coeficiente de correlação foram positivos e, quando comparado com o teste de emergência de plântulas em campo, foi de 0,61 e com o teste de tetrazólio de 0,55 (Tabela 16).

Entre os testes realizados para a avaliação da qualidade dos lotes de sementes, nem todos apresentaram a mesma classificação para os lotes, como pode ser verificado comparando-se os resultados dos testes de classificação de plântulas, emergência de plântulas em campo e comprimento de plântulas (Tabela 15). Os três testes avaliam características semelhantes das sementes, porém em condições totalmente diferentes. Assim, é preciso considerar que os testes de vigor oferecem apenas comparações entre o potencial fisiológico das sementes, não permitindo estimar o comportamento destas sob as mais variadas condições de ambiente e que, por isso, é conveniente a tomada de decisões baseada na interpretação conjunta dos resultados de dois ou três testes, cujos princípios estejam intimamente relacionados aos objetivos que se deseja atingir (MARCOS FILHO et al., 1987).

Outros pesquisadores também constataram que amostras de sementes classificadas nas categorias intermediárias apresentam, frequentemente, comportamento semelhante ao das sementes de alto vigor ou das de vigor mais baixo, dependendo do método empregado na sua avaliação (MARCOS FILHO et al., 1987; MARCOS FILHO, 1999; VIEIRA e CARVALHO, 1994; BITTENCOURT, 1995).

Dessa maneira, os resultados obtidos indicaram que os procedimentos definidos para a padronização da metodologia do teste de tetrazólio são eficientes para estimar a viabilidade de sementes de mamoneira.

Quanto à estimativa do vigor das sementes de mamoneira pelo teste de tetrazólio, recomenda-se que sejam realizados outros estudos, relacionados também a outros testes de avaliação de vigor, pois como mostram os trabalhos conduzidos com outras espécies como o amendoim (BITTENCOURT, 1995), soja (FRANÇA NETO et al., 1998), milho (DIAS e BARROS, 1999), algodão (VIEIRA e VON PINHO, 1999), tomate (SANTOS, 2003), abóbora (DIAS et al., 2001), jenipapo (NASCIMENTO e CARVALHO, 1998) e feijão-de-vagem (BHERING et al., 1996), o teste de tetrazólio é eficiente para estimar o vigor das sementes.

## **5 CONCLUSÕES**

O teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade e o vigor de sementes de mamoneira.

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes de mamoneira pelo teste de tetrazólio deve ser realizada pré-condicionando as sementes com tegumento, entre papel toalha umedecido, por 16 horas a 35°C ou por 18 horas a 30°C ou 40°C. Após esse período, o tegumento deve ser removido e as sementes cortadas longitudinal e medianamente através do embrião e, então, imersas na solução de tetrazólio na concentração de 0,2% por 120 minutos, na temperatura de 35°C, para o desenvolvimento da coloração.

As sementes de mamoneira podem ser classificadas quanto ao vigor em viáveis e vigorosas, viáveis e não vigorosas e não viáveis.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing, 1983. 93p. (Contribution, 32).

ARAÚJO, I.M.M. **Características aromáticas e cromáticas das castas Amaral e Vinhão**. 2004, 178f. Dissertação (Mestrado em viticultura e enologia) – Universidade do Porto, Porto, 2004.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.

BARROS, D.I.; DIAS, D.C.F.S.; BHERING, M.M.; DIAS, L.A.S.; ARAÚJO, E.F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p.165-171, 2005.

BELTRÃO, N.E. de M.; SILVA, L.C.; VASCONCELOS, O.L.; AZEVEDO, D.M.P. de; VIEIRA, D.J. Fisiologia. In: **Agronegócio da mamona no Brasil**. AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.) Brasília: EMBRAPA, 2001. p.37-61.

BHERING, M.C.; SILVA, R.F.; ALVARENGA, E.M.; DIAS, D.C.F.S.; PENA, M.F. **Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo teste de tetrazólio.** Viçosa: UFV, 1996. 27p.

BHERING, M.M.; DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.1, p.176-182, 2005.

BITTENCOURT, S.R.M.de. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de amendoim através do teste de tetrazólio.** 1995, 111f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

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

BURCH, T.A.; DELOUCHE, J.C. Absorption of water by seeds. **Proceedings Association off Seed Analysts**, East Lansing, v.49, n.1, p.142-150, 1959.

CARBONERA, R.; LEMANSKI, E.B. Comparação entre os testes de germinação e de tetrazólio na análise de rotina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 10., 1997, Foz do Iguaçu. **Anais... Informativo Abrates**, Curitiba, v.7, p. 105, 1997.

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

COIMBRA, R. de A.; TOMAZ, C. de A.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. Testes de germinação com o acondicionamento dos rolos de papel em sacos plásticos. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.29, n.1, p. 92-97, 2007.

COPELAND, T.G.; BRUCE, C.F.; MIDYETT JUNIOR, Y. W. The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination cains. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Oklahoma, v.49, p. 134-141, 1959.

COSTA, N.P. da.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; PEREIRA, J.E. Avaliação de metodologia alternativa para o teste de tetrazólio para sementes de soja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.2, p. 305-312, 1998.

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

DIAS, D.C.F.S; BARROS, D.I.; BHERING, M.C.; ARAÚJO, E.F.; DIAS, L.A.S. Teste de tetrazólio em sementes de abóbora. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Anais.... Informativo Abrates**, Londrina, v.11, n.2, p. 124, 2001.

DIAS, M.C.L.L; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq. pelo teste de tetrazólio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Anais.... Informativo Abrates**, Londrina, v.11, n.2, p. 317 (536), 2001a.

DIAS, M.C.L.L; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Anais.... Informativo Abrates**, Londrina, v.11, n.2, p. 317 (537), 2001b.

DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Avaliação da qualidade de sementes de milho. Londrina: IAPAR, 1995. 439 (IAPAR. Circular, 88)

DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. e FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8-4-1 a 8-4-10.

DIAS, M.C.L.L. & SHIOGA, P.S. Tratamentos para superar a dormência em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.1, p. 52-57, 1997.

DIAS, M.C.L.L.; SILVA, W.R. **Teste de tetrazólio em sementes de café**. Londrina: IAPAR, out 1998, 16p., Boletim técnico nº59.

D.O.U. – Diário Oficial da União. **Padrões para produção e comercialização de sementes de mamona**. (Publicado na seção 1 do D.O.U. nº 243 de 20/12/05). Disponível em: <[http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/padroses\\_mamona.pdf](http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/padroses_mamona.pdf)> Acesso em: 20/05/2006.

ESAU, K. A semente. In: ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo:Gud Blucher, 1974. p.256-263.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. da. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p.

FRANÇA NETO, J.B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. e FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8-1 a 8-7.

FOGAÇA, C.A. **Padronização do teste de tetrazólio para a avaliação da viabilidade de sementes de três espécies florestais**. 2003, 53f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

FOGAÇA, C.A.; KROHN, N.G.; SOUZA, M.A.; PAULA, R.C. Desenvolvimento do teste de tetrazólio para a avaliação da viabilidade de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. Caesalpinaceae. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Anais... Informativo Abrates**, Londrina, v.11, n.2, p. 279, 2001.

FOGAÇA, C.A.; ZUCARELI, C.; MALAVASI, M.M.; ZUCARELI, C.; MALAVASI, U.C. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Caesalpinaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, vol. 28, n. 3, p.101-107, 2006.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C, C.; NAKAGAWA, J. Germination test improvement for castor bean seeds (*Ricinus communis* L.) In: **ISTA CONGRESS 28.; Congresso Brasileiro de Sementes, 15.**, 2007, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 2007. p.70.

GRABE, D.F. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Ministério da Agricultura. AGIPLAN. 1976. 86p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200705\\_4.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200705_4.shtm)> Acesso em: 16 de Abril de 2007.

ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Biochemical tests for variability and the topographical tetrazolium test. In: **International rules for seed testing**. Edition 2004. ISTA. Bassersdorf, 2004. p.61- a 6-2.

KROHN, N.G.; FOGAÇA, C.A.; SOUZA, M.A.; PAULA, R.C. Preparação e coloração de sementes de *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinaceae) para a avaliação da viabilidade através do teste de tetrazólio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. *Anais.... Informativo Abrates*, Londrina, v.11, n.2, p. 278, 2001.

LAGO, A.A.; ZINK, E.; SAVY FILHO, A., TEIXEIRA, J.P.F.; BANZATTO, N.V. Deterioração de sementes de mamona armazenadas com e sem tegumento. **Bragantia**, Campinas, v.44, n. 1, p.17-25, 1985.

LEUBNER, G. **The Seed Biology Place**. Disponível em: <<http://www.seedbiology.de>>  
Acesso em: 29 de Junho de 2007.

LOPEZ, A.; GRABE, D.F. Effect on protein content on seed performance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Proceedings Association off Seed Analysts**, East Lansing, v.63, n.1, p.106-116, 1973.

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

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES, 1999. p.3-1 a 3-24.

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

MAZZANI, B. Euforbiáceas oleaginosas. Tártago. In: MAZZANI, B. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuárias, 1983. p. 277-360.

MOSHKIN, V.A. **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986.

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

MUNSELL, A. H. **Munsell book of color**. Baltimore: Macbeth Division of Kollmorgen, 1976. (Mathefinish collection).

NASCIMENTO, W.M.O. do; CARVALHO, N.M.de. Determinação da viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) através do teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 231-235, 1998.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2-1 a 2-24.

OLIVEIRA, L.M.de; CARVALHO, M.L.M.de; DAVIDE, A.C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert- Leguminosae Caesalpinioideae. **Cerne**, Lavras, v.11, n.2, p. 159-166, 2005.

PAULA, R.C.; SOUZA, M.A; KROHN, N.G.; FOGAÇA, C.A. Padronização do teste de tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Schizolobium parahyba* Vell. Blake - Caesalpinaceae. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., 2001, Curitiba. **Anais... Informativo Abrates**, Londrina, v.11, n.2, p. 278, 2001.

PAULI, E. Estética das cores: Da cor em si mesma cap.2. In: **Enciclopédia Simpozio**. Disponível em: <<http://www.cfh.ufsc.br/~simpozio/megaestetica/e-cores/3911y117.html>> Acesso em: 24 de Maio de 2007.

PIMENTEL - GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, 1973. 430p.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M; SANTOS, N.R.F. Teste de tetrazólio. In: PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. (Coord.) **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 91-100.

SANTOS, M.A.de O. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de tomate através do teste de tetrazólio**. 2003, 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SANTOS, V.L.M. dos; BANCI, C.A.; CALIL, A.C.; MENDOZA, R.M.; SILVA, R.F. da; SANTOS, C.M.dos. Utilização do teste de tetrazólio na avaliação da germinação e do vigor de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), como um teste complementar ao teste padrão de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 155-159, 1992.

SOUZA, S. A.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Accelerated aging test in castor seeds (*Ricinus communis* L.). In: **ISTA Congress 28.; Congresso Brasileiro de Sementes, 15.**, 2007, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 2007. p. 117.

STREET, H.E.; OPIK, H. Germinação. In: **Fisiologia das angiospermas: crescimento e desenvolvimento**. STREET, H.E.; OPIK, H. São Paulo: Polígono, 1974. p.7-34.

VANZOLINI, S.; ARAKI, C.A.S.; SILVA, A.C.T.M.; NAKAGAWA, J. Soybean length test in the evaluation of the physiological quality of soybean seeds. In: **ISTA CONGRESS 28.; Congresso Brasileiro de Sementes, 15.**, 2007, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 2007. p.107.

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**. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8.1-1 a 8.1-13.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.164p.

WETZEL, M.M.V.da S.; CÍCERO, S.M.; FERREIRA, B.C. da S. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de seringueira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.1, p.83-88, 1992.

WOODSTOCK, L.W. Seed imbibition: a critical period for successful germination. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v.12, n.1, p. 1-15, 1988.