Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Preparo das sementes de algodoeiro para o teste de tetrazólio

Bruna Apolônio Santana

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2013

Bruna Apolônio Santana
Engenheira Agrônoma

Preparo das sementes de algodoeiro para o teste de tetrazólio

Orientador:
Prof[a]. Dr[a]. **ANA DIONISIA DA LUZ COELHO NOVEMBRE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2013

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

Santana, Bruna Apolônio
Preparo das sementes de algodoeiro para o teste de tetrazólio / Bruna Apolônio Santana.- - Piracicaba, 2013.
64 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Gossypium hirsutum L. 2. Viabilidade e vigor 3. Micro-ondas I. Título

CDD 633.51
S232p

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

"Todo joelho se dobrará
E toda língua proclamará
Que jesus cristo é o senhor
Nada poderá me abalar
Nada poderá me derrotar
Pois minha força e vitoria
Tem um nome
É jesus"
Eliana Ribeiro

Dedico e Ofereço

Aos Meus Pais, *Sebastião e Graça,*

Pelo carinho, dedicação e

por serem minha fortaleza e a razão do meu viver

Ao Meu Amor , *Marcelo Pachiel,*

Pela compreensão e cumplicidade

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a mão todos os dias e me guiar diante das dificuldades e por nunca me deixar desistir.

Aos meus pais pela dedicação, apoio, incentivo e por serem meu refugio nos momentos difíceis.

Aos meus irmão, Francine e Stephan e aos meus avós Alice, Valdir, Ana e Bernardo, por sempre torcerem por mim.

Ao Marcelo, por todos os momentos difíceis ao meu lado e todas as palavras de amor, motivação e esperança.

À Nati e a Fabrícia por dividirem comigo todos os momentos de alegrias, tristezas e dificuldades. Por serem confidentes, prestativas e por compartilharem comigo suas vidas, sem vocês eu não teria conseguido.

Ao Denis por ser amigo para todas as horas, divertido, prestativo, e por me lembrar a cada instante de que “Quem tem amigo, tem tudo!”. Muito obrigada por me ajudar na estatística da pesquisa.

À Irlécia, Rosana, Verônica Portillo e a família “Chandler”,em especial, à Maria e Brian Chandler por terem me acolhido com tanto carinho, me ajudado nos momentos de dificuldades e por me fazerem sentir da família.

Aos amigos Martha, Tati, Rodrigo, Verônica, Bruna e Drielly, por tornarem minha vida mais prazerosa.

Aos amigos da ESALQ Paty, Cris, Vitinho, Vanessa, Rô, Si, Clíssia, Chiquinho, Marcão, Carti, Jú, Bia, Ana, Felipe e Camila, pelo convívio e por todos os momentos de alegria.

À Helena M. C. P. Chamma, pela amizade, apoio, incentivo e por ter sempre uma palavra de conforto nos momentos difíceis, além de uma profissional exemplar.

Aos funcionários do laboratório, Adilson, Hodair, João, Ticão, Zezé e aos secretários Rafael e Luciane, pela amizade e serviços prestados durante o curso.

A professora Ana Novembre pela orientação e conhecimentos transmitidos.

À CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Ao Banco SANTANDER pela concessão da Bolsa de Mobilidade Estudantil para os Estados Unidos.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 DESENVOLVIMENTO 17
2.1 Revisão Bibliográfica 17
2.2 Material e Métodos 21
2.2.1 Testes para a caracterização da qualidade das sementes de algodão 21
2.2.1.1 Grau de umidade (G.U.) 21
2.2.1.2 Teste de germinação (G): 21
2.2.1.3 Primeira contagem da germinação (PC) 21
2.2.1.4 Envelhecimento acelerado (EA) 21
2.2.1.5 Germinação a 18ºC (G18ºC) 22
2.2.1.6 Teste de frio (FRIO) 22
2.2.1.7 Emergência da plântula (EP) 22
2.2.2 Teste de tetrazólio 22
2.2.2.1 Método 1: Uso de estufa para o preparo de sementes de algodão para o teste de tetrázolio 22
a) Cinética da absorção de água pelas sementes de algodão 22
b) Testes preliminares de coloração 24
2.2.2.1.1 Métodos propostos utilizando estufa para o preparo das sementes 24
a) Tratamento - Regras para análises de sementes (RAS) 24
b) Tratamento - Corte seguido de hidratação e coloração (CHC) 25
c) Tratamento - Hidratação seguida de corte e coloração (HCC) 25
d) Tratamento - Corte seguido de coloração (CC) 25
2.2.2.2 Método 2: Uso de radiação micro-ondas para o preparo das sementes de algodão para o teste de tetrazólio 27
a) Cinética da absorção de água pelas sementes de algodão 27
b) Testes preliminares 27
2.2.2.2.1 Métodos propostos utilizando micro-ondas para o preparo das sementes 28
a) Tratamento - Regras para análises de sementes (RAS) 28
b) Tratamento - Corte, imersão oito minutos potência média (CI8min) 28
c) Tratamento - Corte, imersão três minutos potência alta (CI3min) 28

d) Tratamento - Corte das sementes secas (CS) 29
e) Tratamento - Corte, hidratação por uma hora a 30ºC (CH60min) 29
2.2.3 Análise estatística 31
2.3 Resultados e Discussão 31
2.3.1 Método 1: Uso de estufa para o preparo das sementes 31
2.3.1.1 Caracterização da qualidade das sementes de algodão 31
2.3.1.2 Cinética de absorção de água pelas sementes de algodão hidratadas em estufa 33
2.3.1.3 Classificação das sementes pelo teste de tetrazólio 36
Classe 1 – Sementes viáveis e vigorosas 36
Classe 2 – Sementes viáveis 37
Classe 3 – Sementes não viáveis 38
2.3.1.4 Avaliação dos tratamentos propostos para uso de estufa no preparo das sementes 38
2.3.2 Método 2: Uso de micro-ondas para o preparo das sementes 47
2.3.2.1 Caracterização dos lotes de sementes de algodão 47
2.3.2.2 Cinética de absorção de água pelas sementes de algodão utilizando radiação micro-ondas 49
2.3.2.3 Avaliação dos tratamentos propostos para uso de radiação micro-ondas para preparo das sementes 51
3 CONCLUSÕES 59
REFERÊNCIAS 61

RESUMO

Preparo das sementes de algodoeiro para o teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio avalia as condições física e fisiológica de cada semente individualmente e permite a avaliação rápida da viabilidade e do vigor. No entanto, para as sementes de algodão, o preparo da semente requer a remoção dos tegumentos, interno e externo, e a eliminação dos tegumentos pode causar injúrias físicas nos tecidos do embrião, dificultando a avaliação do teste e a obtenção de resultados precisos. Neste contexto, os objetivos desta pesquisa foram: a) avaliar métodos de preparo da semente de algodão utilizando estufa e micro-ondas; b) classificar as sementes quanto à viabilidade e ao vigor em três classes: viáveis vigorosas, viáveis e não viáveis. Para isso, foram utilizadas sementes de algodão, cultivar BRS 269 – Buriti, representadas por quatro lotes e analisadas em duas épocas. A caracterização inicial do parâmetro fisiológico foi pelos testes de germinação e de vigor (primeira contagem, envelhecimento acelerado, germinação a 18ºC, frio e emergência da plântula). Em seguida, foi estudada a absorção de água, pela hidratação das sementes por imersão em água, utilizando estufa e radiação de micro-ondas, e entre papel a 25º, a 30ºC e a 35ºC. Para o preparo das sementes para o teste de tetrazólio,utilizando a estufa, foram avaliados: o método descrito nas regras para análise de sementes - RAS (hidratação seguida da remoção dos tegumentos para a coloração) e outros métodos que incluem: o corte da semente seguido da hidratação e da coloração (CHC), a hidratação da semente seguida do corte e da coloração (HCC) e o corte da semente seguido da coloração (CC), utilizando as temperaturas de 30ºC, 35ºC e 40ºC para a coloração dos tecidos. Para o preparo das sementes utilizando a radiação micro-ondas foram avaliados: o método indicado nas RAS e o corte da semente seguido da hidratação por imersão em água durante oito minutos em potência média (CI8min), o corte da semente seguido da imersão em água durante três minutos em potência alta (CI3min), o corte da semente seca seguido da coloração (CS) e o corte da semente seguido da hidratação por sessenta minutos a 30ºC (CH60min). O preparo das sementes do algodoeiro para o teste de tetrazólio pode ser feito pelo corte das sementes seguido da hidratação, por 2h a 30°C, e da coloração em estufa a 40°C. A utilização da radiação micro-ondas é outra opção para o preparo dessas sementes para o teste tetrazólio; o indicado é o corte das sementes seguido da hidratação, por imersão em água por três minutos, e coloração por 13 minutos em potência alta (CI3min) e o corte seguido da hidratação por 60 minutos a 30°C e coloração por 18 minutos em potência média (CH60min). A classificação das sementes em três classes, viável e vigorosa, viável e não viável, é suficiente para estimar a viabilidade e o vigor das sementes do algodoeiro pelo teste de tetrazólio.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum* L.; Viabilidade e vigor; Micro-ondas

ABSTRACT

Preparation of cotton seeds for tetrazolium test

The tetrazolium test assesses the physical and physiological characteristics of each seed individually and allows fast assessment of viability and vigor. However, for cotton seeds, preparation of seed requires removal of the inner and outer teguments, which may cause physical injuries in embryo tissues, making difficult the evaluation of the test and obtaining accurate results. In this context, the objectives of this research were: a) to evaluate methods of preparation of cotton seed, without removal of the tegument, using a hot air oven and microwave and b) classify seeds by viability and vigor into three classes: vigorous viable, viable and non-viable. For this, we used cotton seeds, BRS 269 – Buriti cultivate, represented in four lots and analyzed in two seasons. The initial characterization of the physiological parameter was made by testing germination and vigor (first count, accelerated aging, germination at 18°C, cold and seedling emergence). Following, the absorption of water was studied , by seed hydration with water immersion using a hot air oven and microwave radiation and hydration in a hot air oven at 25ºC, at 30ºC and at 35ºC. For the preparation of the seeds for the tetrazolium test, using the hot air oven, the method described in the rules for seed analysis RAS (hydration followed by removal of teguments for coloring) and other methods that include: cut of the seed, hydratation and staining (CHC), hydration of seed, cut and staining (HCC) and cut and staining (CC), using the temperatures of 30ºC, 35ºC and 40ºC, for tissues staining were used. For the preparation of the seeds using microwave radiation, the following treatments were analyzed: the method indicated by RAS and the cut of the seed followed by hydration by immersion into water, for eight minutes medium power (CI8MIN), cut of the seed during three minutes immersion into water, high power (CI3MIN), cut of the dry seeds and staining (CS) and cut, hydration for 60 minutes at 30°C (CH60MIN). Preparation of cotton seeds for the tetrazolium test can be made by the cut of the seeds followed by hydration, for 2 hours, at 30°C and staining in a hot air oven, at 40°C. Microwave radiation is another option for preparing the seeds for tetrazolium test. The indicated is the cut of the seeds, followed by hydration, by immersion into water, during 3 minutes and staining for 13 minutes, in high power (CI3min) and the cut followed by hydration for 60 minutes at 30°C and staining for 18 minutes in medium power (CH60min). The classification of the seeds in three classes, viable and vigorous, viable and non viable is sufficient to estimate the viability and vigor of cotton seeds by the tetrazolium test.

Keywords: *Gossypium hirsutum L*; Viability and vigor; Microwave

1 INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma das plantas mais importantes para a produção de fibras naturais para a indústria têxtil; é resistente à seca e permite o aproveitamento quase completo da planta, sendo a semente e a fibra responsáveis por 65% e 35% do peso total produzido, respectivamente. O Brasil é o quinto principal produtor de algodão e a China é o maior produtor, seguido de Índia, Estados Unidos da América e Paquistão em produtividade (FAO, 2011). A produção anual mundial é de cerca de 26,08 milhões de toneladas de algodão em pluma, cultivados em 35 milhões de hectares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO, 2012). No Brasil, a produção de sementes de algodão na safra 2010/2011 foi de 21.132 toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS, 2012).

No Brasil, o algodão é cultivado principalmente nas regiões Centro-Oeste e do Cerrado, onde são obtidas produtividades superiores e fibras de qualidade. Em 2012, foram colhidos 3.795 kg/ha no Mato Grosso, maior estado produtor de algodão em caroço (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012). Por se tratar de um cultivo de alto custo de produção, o uso de tecnologia no processo de produção visa à redução das perdas, o aproveitamento das áreas disponíveis e o aumento da produtividade.

Uma prática cultural simples, porém pouco utilizada pelos agricultores, é o uso de sementes com qualidade superior. No Brasil, embora a taxa de utilização de sementes certificadas de algodão tenha aumentado, correspondeu a apenas 55% do total de sementes utilizadas no país na safra 2011/12 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS, 2012). É necessário, portanto, aumentar a produção de sementes de alta qualidade que atendam a crescente demanda dos agricultores por cultivares adaptados, mais produtivos e que gerem mais retorno financeiro para o produtor.

A análise da qualidade da semente é necessária para assegurar ao produtor a aquisição de sementes que proporcionem rápida emergência da plântula em campo e um estande inicial de plântulas uniformes e vigorosas. Os atributos de qualidade das sementes são definidos por parâmetros genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários. Um dos fatores fundamentais para o produtor de algodão é a qualidade da semente utilizada, pois foi observado que o uso de sementes de algodão com taxas altas de germinação e vigor pode aumentar a produção de 10 a 20% quando comparado com a produção em que foram utilizadas sementes de parâmetro fisiológico inferior (DELOUCHE; POTTS, 1974).

Portanto, programas de controle de qualidade são fundamentais para a obtenção de sementes com qualidade fisiológica superior, uma vez que essas sementes maximizam os efeitos da utilização de insumos e contribuem para a eficiência dos fatores de produção (POPINIGIS, 1977).

Embora o teste de germinação seja o principal teste utilizado para analisar a viabilidade das sementes comerciais, os resultados desse teste são obtidos em períodos variáveis em função da espécie e não geram informações sobre o vigor da semente e a emergência da plântula em campo. Assim, são necessários testes adicionais para complementar o diagnóstico de qualidade das sementes.

A utilização de testes de vigor, juntamente com o teste de germinação, é indicada para identificar os lotes que possuem potencial para apresentar melhor desempenho no campo, pois as condições ambientais no momento da semeadura nem sempre são favoráveis ao estabelecimento da cultura (BYRUM; COPELAND, 1995). Mesmo com os resultados gerados em laboratório e em campo, é difícil estabelecer a relação entre os dados obtidos, devido às interações da semente com as condições ambientais no momento da semeadura e da germinação. Adicionalmente, alguns testes para a determinação do parâmetro fisiológico das sementes requerem um período de tempo considerável. Por isso, o estudo e o desenvolvimento de métodos que indiquem os resultados de qualidade das sementes no menor tempo possível e que sejam viáveis para a utilização em laboratórios de rotina são fundamentais.

Dentre os testes utilizados para a análise de sementes, o de tetrazólio apresenta vantagens em relação aos demais por avaliar as condições físicas e fisiológicas do embrião e do tecido de reserva de cada semente individualmente e permitir a rápida avaliação da viabilidade e do vigor. Além disso, de acordo com França Neto (1998), ao contrário do teste de germinação, que pode ter seus resultados afetados pela presença de microrganismos, o teste do tetrazólio não tem influência de fungos e ainda fornece o diagnóstico da causa da redução da viabilidade das sementes.

O teste de tetrazólio foi desenvolvido para avaliar a viabilidade das sementes e, posteriormente, foram estabelecidos critérios complementares de avaliação que possibilitaram sua utilização para estimar o vigor das sementes. Para estabelecer o método adequado para o teste de tetrazólio para uma determinada espécie de semente são estudados o método de hidratação, o preparo das sementes para a coloração, a concentração da solução de tetrazólio, o tempo e a temperatura para a coloração dos tecidos e os critérios de avaliação. Esses são os

fatores que determinam ou não a adequação desse teste para avaliar a viabilidade e o vigor das sementes.

Embora alguns pesquisadores como Cervi e Mendonça (2009) tenham avaliado a adequação do teste de tetrazólio para as sementes de algodão, não há consenso quanto ao método adequado e, além disso, a remoção dos tegumentos é, ainda, o principal problema.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

A qualidade da semente adquirida pelo produtor tem importância fundamental no estabelecimento da planta em campo. No entanto, as sementes de algodão podem apresentar variação de qualidade devido à desuniformidade de maturação, às pragas, doenças e aos danos causados aos tecidos durante o beneficiamento (VIEIRA; VON PINHO, 1999). Para aferir a qualidade, as empresas utilizam constantemente diversos testes e, por isso, o desenvolvimento de testes que forneçam resultados em um curto período de tempo é necessário para agilizar e auxiliar as decisões durante as etapas de produção, especialmente nas fases de pré e de pós-colheita (BHERING et al., 2005). Assim, o teste de tetrazólio é utilizado como teste complementar para determinar a viabilidade e o vigor das sementes de algodão, mas a principal dificuldade é o modo e o tempo de preparo das sementes para a avaliação.

O teste é baseado na alteração da coloração dos tecidos vivos da semente devido à absorção do sal de tetrazólio (2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio). Essa alteração decorre da atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, reduzem o sal de tetrazólio nos tecidos vivos formando uma substancia estável de coloração vermelha, denominada formazan (DELOUCHE et al., 1976), que colore os tecidos vivos, e que por não se difundir nas células, limita a região colorida e possibilita determinar a viabilidade dos tecidos das sementes.

A avaliação da semente no teste de tetrazólio deve ser realizada considerando a intensidade de coloração, a turgescência dos tecidos, a ausência de fraturas ou lesões nas regiões vitais e a formação das partes da semente (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2009). Existe variação na classificação das diferentes espécies de sementes como, por exemplo, para as sementes de milho são três classes: viáveis vigorosas, viáveis e não vigorosas e não viáveis (DIAS; BARROS, 1999), para as sementes de algodão são oito classes de viabilidade: classes 1 a 5 sementes viáveis, sendo que as sementes agrupadas nas classes de 1 a 3 são viáveis e vigorosas, classe 6 sementes inviáveis e classes 7 e 8 sementes mortas (VIEIRA; VON PINHO, 1999) e para as sementes de soja são oito categorias de viabilidade: classes 1 a 5 sementes viáveis, classes 6 e 7 sementes não viáveis e classe 8 semente morta (FRANÇA NETO et al., 1998)

Assim, o conhecimento da estrutura da semente e a avaliação dos tecidos permitem determinar alterações nas sementes que interfiram negativamente na viabilidade e no vigor e, eventualmente, as causas dessas alterações.

A rapidez, a intensidade e a profundidade de coloração dos tecidos estão relacionadas à qualidade das sementes e, de modo geral, tecidos vigorosos desenvolvem, lentamente, coloração superficial rosa clara. A presença de tecidos não coloridos, porém firmes, brilhantes e túrgidos, pode ocorrer devido à resistência à penetração do sal de tetrazólio pelas membranas. Já os tecidos deteriorados ou mecanicamente danificados têm coloração vermelha intensa devido à intensidade de difusão da solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio pelas membranas celulares desestruturadas e pela intensidade de atividade respiratória, geralmente observada nestes tecidos. Podem ser observados ainda, tecidos flácidos e linhas divisórias vermelha intensa contornando áreas mortas de tecidos em estágio avançado de deterioração. Em tecidos mortos onde não há respiração celular e consequentemente redução do sal de tetrazólio, não é formado o formazan e os tecidos das sementes permanecem com coloração branca ou amarela e textura flácida (Vieira e Von Pinho, 1999).

A obtenção de resultados precisos para o teste de tetrazólio depende de vários fatores, como o preparo das sementes, a concentração da solução, o período e a temperatura de exposição das sementes ao sal de tetrazólio, além dos critérios de interpretação (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2009), que devem ser seguidos para que os resultados obtidos sejam equivalentes à qualidade das sementes.

De acordo com o método proposto nas Regras para Análises de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), as sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) devem ser preparadas antes da coloração e, desta forma, as sementes devem ser hidratadas entre papel, durante 18 horas a 25ºC. Para que haja contato entre os tecidos e o sal de tetrazólio é necessário cortar a semente, bissecção longitudinal através da metade distal, ou a remover o tegumento a partir da extremidade distal. Em seguida, as sementes devem ser mantidas em solução de 0,1% durante 2 a 4 horas entre 30ºC a 35ºC para a coloração dos tecidos e, logo após, lavadas em água corrente e mantidas úmidas até a avaliação.

A hidratação da semente de algodão permite o amolecimento dos tecidos e facilita a penetração da solução do tetrazólio. A bissecção longitudinal da semente, através da metade distal, ou a remoção do tegumento a partir da extremidade distal, recomendada nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009), é necessária devido à impermeabilidade do tegumento à solução de tetrazólio. Este procedimento permite o contato entre os tecidos e a

solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, facilitando o desenvolvimento rápido e a uniformidade da coloração da semente.

O método proposto para o teste de tetrazólio para as sementes de algodão, por Vieira e Von Pinho (1999), estabeleceu a hidratação das sementes por um período de 14 a 16 horas a 25ºC e recomenda que a coloração seja realizada a 30ºC por quatro horas. No entanto, o método não descreve o substrato para hidratação das sementes e os procedimentos para a remoção dos tegumentos externo e interno.

Em pesquisa desenvolvida por Santos et al. (1992) sobre a utilização do teste de tetrazólio para a avaliação da germinação e do vigor de sementes de algodão, como um teste complementar ao teste padrão de germinação, as sementes foram hidratadas em papel umedecido por um período de 16 horas a 30ºC. Os tegumentos foram removidos manualmente e os embriões foram imersos em solução de 0,5% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por duas horas e meia a 35ºC. Os embriões foram avaliados quanto à viabilidade e ao vigor, incluídos nas classes 1 a 3 os embriões considerados viáveis e vigorosos, nas classes 1 a 5 viáveis e nas classes 6 a 8 os não viáveis.

Em estudos sobre os efeitos de época de colheita e a localização dos frutos na planta sobre o parâmetro fisiológico de sementes de algodão, o teste de tetrazólio foi utilizado para aferir a viabilidade e o vigor das sementes utilizadas. As sementes foram hidratadas entre papel por 16 horas a 30ºC. Em seguida, os tegumentos foram removidos e os embriões imersos em solução de 0,1% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por quatro horas, na ausência de luz e mantidas sob temperatura ambiente (BRIGANTE, 1992). Os embriões foram avaliados quanto à viabilidade e ao vigor, incluídos nas classes 1 a 3 os embriões considerados viáveis e vigorosos, nas classes 1 a 5 viáveis e nas classes 6 a 8 os não viáveis.

Em pesquisa recente, Cervi e Mendonça (2009) estudaram a adequação do teste de tetrazólio para as sementes de algodão. As sementes foram cortadas na extremidade oposta ao eixo embrionário após duas horas de imersão em água, seguida de mais seis horas de imersão depois do corte. A solução da concentração de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio foi de 0,075% e a coloração foi a 40ºC por duas horas e meia. Embora o método proposto por esses pesquisadores tenha reduzido o tempo de preparo das sementes de algodão, não eliminou a retirada dos tegumentos externo e interno.

A remoção dos tegumentos requer habilidade e tempo e, muitas vezes, causa injúrias físicas nos tecidos da semente, dificultando a avaliação do teste e a obtenção de resultados precisos. Por isso, o estudo de métodos que eliminem a remoção dos tegumentos tornaria a execução do teste rápida, simples e precisa.

Alguns pesquisadores têm estudado a adequação do teste de tetrazólio visando à eliminação da remoção do tegumento. Pesquisas realizadas por Fogaça (2003) propuseram que as sementes de *Jacaranda cuspidifolia* sejam hidratadas durante 24 horas a 35ºC, cortadas longitudinalmente, sem remoção dos tegumentos, e coloridas em concentração de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por 3 horas a 35 ºC.

Em pesquisa realizada por Gaspar-Oliveira et al. (2009) utilizando sementes de mamona, o preparo da semente pelo corte longitudinal mediano, no sentido do comprimento e da espessura, através do endosperma e do embrião e sem a remoção do tegumento, possibilitou o contato da parte interna da semente com a solução de tetrazólio, favorecendo a coloração uniforme de todo o embrião e endosperma. No entanto, o corte do tegumento causou danos ao embrião e, em alguns casos, destruição do eixo do embrião, devido à pressão exercida pela lâmina para cortar o tegumento da semente e, por isso, esse procedimento não foi recomendado.

Para avaliar a viabilidade das sementes de *Brachiaria brizantha* pelo teste de tetrazólio foi indicado hidratar as sementes por seis horas a 30°C, seguido do corte ao longo do embrião, retirando e descartando aproximadamente 1/3 da largura da semente. A coloração foi realizada utilizando solução de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, por duas horas, no escuro a 40°C (NOVEMBRE et al., 2006).

A necessidade de obtenção de resultado rápido e preciso tem aumentado o uso de radiação micro-ondas em procedimentos de análises de sementes em vários laboratórios. As radiações micro-ondas foram utilizadas em pesquisas para secagem de sementes de pimentão (SARMENTO et al., 2012), desinfecção de sementes antes da semeadura como verificado por Cardoso et al. (2006) em sementes de graviola e determinação do grau de umidade em sementes de cebola, cenoura e tomate como descrito por Frandoloso et al. (1998). Não existem resultados de pesquisa sobre a utilização de radiações micro-ondas para o teste de tetrazólio.

Portanto, o desenvolvimento de métodos para o teste de tetrazólio rápidos e sem a necessidade de remoção dos tegumentos permitirá a classificação da viabilidade e do vigor das sementes de modo preciso e prático. Assim, os objetivos desta pesquisa foram avaliar os métodos de preparo da semente de algodão para o teste de tetrazólio, sem a remoção dos tegumentos, utilizando estufa e micro-ondas e classificar as sementes de algodão quanto a viabilidade e o vigor em três classes: viáveis vigorosas, viáveis e não viáveis.

2.2 Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Sementes do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo, em Piracicaba/SP. Foram utilizados quatro lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), do cultivar BRS 269 - Buriti. Para verificar a estabilidade dos resultados, em função dos tratamentos utilizados para cada método avaliado, foram analisadas duas épocas, em intervalos de 30 dias.

2.2.1 Testes para a caracterização da qualidade das sementes de algodão

2.2.1.1 Grau de umidade (G.U.): determinado pelo método da estufa a 105ºC ± 3ºC durante 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando duas amostras de 5 g. Os resultados obtidos para cada lote foram expressos em porcentagem média (base úmida).

2.2.1.2 Teste de germinação (G): foram utilizadas oito repetições de 25 sementes, totalizando 200 sementes por lote. As sementes foram distribuídas sobre substrato composto por duas folhas de papel umedecidas com água na proporção de 2,3 vezes o peso do papel seco e cobertas por outra folha de papel umedecida. As folhas de papel foram embrulhadas na forma de rolos de papel conforme descrito pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os rolos foram colocados em germinador 25ºC ±1 ºC, e avaliados no terceiro (primeira contagem) e sétimo dia (contagem final). O número de plântulas normais foi registrado de acordo com os critérios estabelecidos em Brasil (2009) e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.2.1.3 Primeira contagem da germinação (PC): constou do registro das plântulas avaliadas na primeira contagem do teste de germinação; os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.2.1.4 Envelhecimento acelerado (EA): foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote. As sementes foram distribuídas em caixas de plástico sobre uma tela de alumínio, colocada acima de uma lâmina de 40 ml de água. As caixas de plástico contendo as sementes foram mantidas em uma câmara de germinação a 42ºC por um período de 48 horas (AOSA, 1983). Após este período as sementes foram avaliadas por meio do teste de germinação, aos quatro dias após a instalação do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântula normal.

2.2.1.5 Germinação a 18ºC (G18ºC): realizado de acordo como o método recomendado pela AOSA (1983) e descrito por Dias e Mantovani-Alvarenga (1999). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes distribuídas sobre substrato composto por duas folhas de papel umedecidas com água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, cobertas por outra folha umedecida de papel e os rolos mantidos a 18ºC ± 0,5ºC, no escuro. A avaliação foi feita por contagem única sete dias após a instalação do teste e o resultado foi expresso em porcentagem de plântulas normais.

2.2.1.6 Teste de frio (FRIO): de acordo com as recomendações de Cícero e Vieira (1994), utilizando quatro repetições de 50 sementes por lote, distribuídas em rolos de papel umedecido com uma quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso seco do papel. Os rolos foram colocados no interior de sacos de plástico e vedados com fita adesiva, permanecendo em câmara regulada a 10ºC, durante sete dias. Após este período, os rolos foram retirados dos sacos plásticos e transferidos para um germinador à temperatura de 25ºC, por quatro dias até a avaliação do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântula normal.

2.2.1.7 Emergência da plântula (EP): foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote, distribuídas em caixas plásticas com areia umedecida com água, a 60% da capacidade de retenção, e cobertas com camada de dois centímetros (cm) desse substrato. As caixas foram mantidas em temperatura ambiente em local coberto. A avaliação foi realizada 12 dias após a instalação do teste, registrando o número de plântulas normais com altura maior ou igual a 2,5cm (FARIA et al., 2003). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.2.2 Teste de tetrazólio

2.2.2.1 Método 1: Uso de estufa para o preparo de sementes de algodão para o teste de tetrázolio

a) Cinética da absorção de água pelas sementes de algodão: o estudo da hidratação foi utilizado para determinar o teor de água da semente durante a hidratação e definir o grau de umidade adequado para coloração dos tecidos pelo sal de tetrazólio. As taxas de absorção de água pelas sementes foram obtidas pela avaliação da massa úmida das sementes do lote três, adotando como referência o teor de água inicial de 7,1%, determinado pelo método de estufa a 105ºC ± 3ºC por 24 horas (BRASIL, 1999). Para a hidratação das sementes foram

analisadas a hidratação entre uma folha de papel umedecida e a imersão direta das sementes em água utilizando quatro repetições de 25 sementes.

As sementes foram distribuídas sobre uma folha de papel, umedecida com água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Em seguida o papel foi dobrado, colocado em caixa de plástico transparente, (11cm x 11cm x 3cm), e mantido em germinadores a 25ºC, a 30ºC e a 35ºC. As avaliações foram realizadas de uma em uma hora. Antes da pesagem foi retirado o excesso de água da superfície das sementes com auxílio de papel. As pesagens foram realizadas utilizando balança analítica e foram calculados os teores de água e o número de sementes que emitiram a raiz primária, em cada período analisado, até que fossem observados 30% de protrusão da raiz primária.

Para a imersão direta em água, as sementes foram distribuídas em copos plásticos descartáveis de 50 ml, cobertas com água e mantidas em germinadores a 25ºC, a 30ºC e a 35ºC. As avaliações foram realizadas de uma em uma hora. Antes da pesagem foi retirado o excesso de água da superfície das sementes com auxílio de papel. As pesagens foram realizadas utilizando balança analítica e foram calculados os teores de água e o número de sementes que emitiram a raiz primária, em cada período analisado, até que fossem observados 30% de protrusão da raiz primária.

A massa seca das sementes e o teor de água correspondente a cada intervalo analisado foram calculados de forma indireta, com base no teor de água inicial e na massa úmida observada em cada intervalo utilizando as fórmulas descritas nas regras para análise de sementes (BRASIL, 2009), equações 1, 2 e 3.

$$\%\text{Umidade (U)} = \frac{100\ x\ (P - p)}{(P - t)} \tag{1}$$

Em que:

P = peso inicial (peso do recipiente + peso da tampa+ peso da semente úmida)

p = peso final (peso do recipiente + peso da tampa+ peso da semente seca)

t = tara (peso do recipiente + peso da tampa)

$$Massa\ seca(\text{g}) = Pi\ x\ \frac{(100 - \text{U})}{100} \tag{2}$$

Em que:

Pi = peso inicial da amostra de sementes

U = umidade (%)

$$\text{G. U.}\, sem.\, hidratada(\%) = \frac{(Massa\ úmida - Massa\ seca)x100}{\text{Massa úmida}} \tag{3}$$

Em que:

$\text{G. U.}\, sem.\, hidratada(\%) =$ grau de umidade das sementes depois de hidratadas

$Massa\ úmida$ = peso das sementes hidratadas

Após a análise dos dados obtidos pelo estudo da hidratação, o método recomendado para a hidratação das sementes para o teste de tetrazólio foi a imersão direta das sementes em água durante duas horas a 30ºC. Foi instalado o teste de germinação nas sementes submetidas a estas condições de acordo com Brasil (2009), para assegurar que o método proposto não causaria redução na porcentagem de germinação devido à possibilidade de ocorrência de danos no embrião durante a hidratação por imersão em água.

b) Testes preliminares de coloração: foi realizado utilizando quatro repetições de 25 sementes do lote três. Com base nos dados obtidos para a hidratação das sementes foi realizado o corte e a determinação do número de horas necessário para a coloração das sementes para cada tratamento proposto a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC. O desenvolvimento da coloração foi observado a cada 30 minutos até que fosse atingida a coloração adequada e uniforme dos tecidos, que permitisse a classificação das sementes quanto à viabilidade e ao vigor.

2.2.2.1.1 Métodos propostos utilizando estufa para o preparo das sementes

Para o teste de tetrazólio foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes de cada lote. Os tratamentos foram determinados com base nos dados obtidos no estudo da hidratação e pelos testes preliminares de coloração. Foram estabelecidos os seguintes tratamentos para avaliação da viabilidade e do vigor das sementes de algodão:

a) Tratamento - Regras para análises de sementes (RAS): hidratação seguida de remoção do tegumento, como proposto nas Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes de algodão foram submetidas à hidratação entre papel, durante 18 horas à 25ºC. Em seguida, os tegumentos foram retirados manualmente e os embriões foram colocados na solução 0,1% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por 2 horas a 35ºC. Os embriões foram submersos em água diversas vezes para remoção do excesso de solução do sal de tetrazólio e avaliados em seguida, quanto à viabilidade e ao vigor.

b) Tratamento - Corte seguido de hidratação e coloração (CHC): as sementes secas foram cortadas longitudinalmente, a partir da metade distal, com o auxílio de uma pinça e bisturi com lâmina número 22 (Figura 1a). Em seguida, metade de cada semente foi distribuída em recipiente de plástico com células individualizadas, imersas em água e mantidas durante 2 horas a 30ºC (Figura 1b), valor obtido com base nos resultados do estudo da hidratação das sementes de algodão. Para a coloração, as sementes foram colocadas, novamente, em recipiente plástico com células individualizadas, imersas em solução de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por 2 horas e meia a 30ºC (CHC 30ºC), duas horas a 35ºC (CHC 35ºC) e uma hora e meia a 40ºC (CHC 40ºC), em estufa no escuro. O número de horas necessário para a coloração foi obtido com base nos dados dos testes preliminares. Em seguida, as sementes foram imersas em água para remoção do excesso de solução e avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor.

c) Tratamento - Hidratação seguida de corte e coloração (HCC): as sementes foram hidratadas em água durante 2 horas a 30ºC e cortadas longitudinalmente, a partir da metade distal, com o auxílio de uma pinça e bisturi com lâmina número 22. Em seguida, metade de cada semente foi colocada em recipiente plástico com células individualizadas e imersas em solução de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, por duas horas a 30ºC (HCC 30ºC) e por uma hora e meia a 35ºC (HCC 35ºC) e a 40ºC (HCC 40ºC), em estufa no escuro. Em seguida, as sementes foram imersas em água para remoção do excesso de solução do sal de tetrazólio e avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor.

d) Tratamento - Corte seguido de coloração (CC): foi realizado o corte longitudinal, a partir da metade distal, da semente seca com o auxílio de uma pinça e bisturi com lâmina número 22. Em seguida, metade de cada semente foi colocada em caixa de plástico que tem células individualizadas, imersas em solução de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio e mantidas por duas horas a 30ºC (CC 30ºC) e 35ºC (CC 35ºC) e por uma hora e meia a 40ºC (CC 40ºC), no escuro. Em seguida, as sementes foram imersas em água para remoção do excesso de solução e avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor.

Os tratamentos contendo os modos de preparo, temperatura e tempo utilizados para o teste de tetrazólio em sementes de algodão estão dispostos de forma simplificada na Tabela 1.

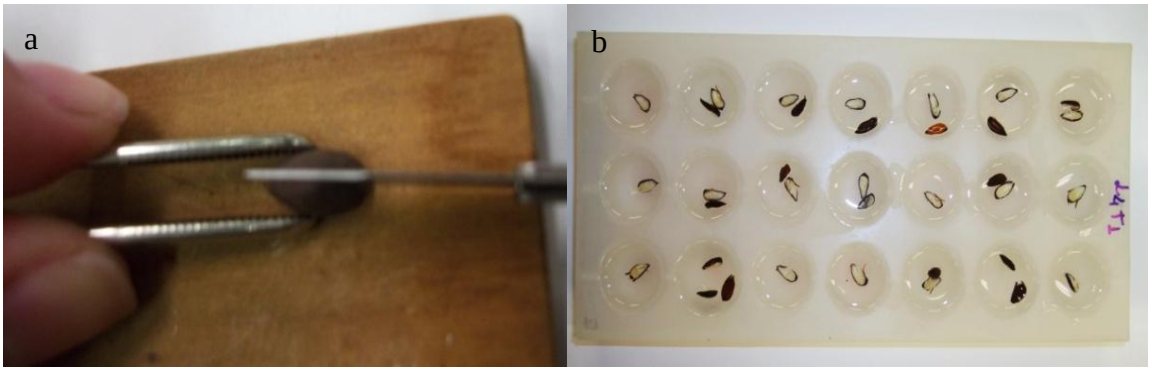

Figura 1- Corte longitudinal, a partir da metade distal (a) e imersão em água a 30ºC por 2 horas (b) de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), do cultivar BRS 269 - Buriti para o teste de tetrazólio

Tabela 1 – Relação de tratamentos utilizados para o preparo das sementes para o teste de tetrazólio, lotes 1, 2, 3 e 4, em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar BRS 269 - Buriti

Tratamentos	Preparo para a coloração	Coloração
		Tempo e Temperatura
RAS	Hidratação 18 horas a 25ºC e remoção dos tegumentos (RAS)	120 minutos a 35ºC
CHC	Corte das sementes secas e hidratação por 2 horas a 30ºC (CHC)	150 minutos a 30ºC
		120 minutos a 35ºC
		90 minutos a 40ºC
HCC	Hidratação por 2 horas a 30ºC e corte (HCC)	120 minutos a 30ºC
		90 minutos a 35ºC
		90 minutos a 40ºC
CC	Corte das sementes secas (CC)	120 minutos a 30ºC
		120 minutos a 35ºC
		90 minutos a 40ºC

Assim, os critérios básicos para a classificação das sementes de algodão em níveis de viabilidade e de vigor foram similares aos utilizados por Moore (1985). No entanto, nessa pesquisa as sementes foram classificadas em três níveis para a avaliação do teste de tetrazólio: 1) viáveis e vigorosas 2) viáveis e 3) não viáveis, semelhante ao indicado para as sementes de milho (DIAS; BARROS, 1999), amendoim (BITTENCOURT; VIEIRA, 1999) e tomate (SANTOS et al., 2003).

Para registrar as imagens obtidas das sementes de algodão, avaliadas pelo teste de tetrazólio, as sementes foram digitalizadas utilizando scanner HP Scanjet 2400, instalado de

forma invertida no interior de uma caixa de alumínio, 60 cm × 50 cm × 12 cm, e as avaliações por meio do *software* Photosmart, com resolução de 600 dpi.

Com base nos resultados obtidos utilizando estufa para a hidratação e coloração dos tecidos, método 1, foi analisado o uso de radiação micro-ondas para o preparo das sementes de algodão para o teste de tetrazólio para a avaliação da viabilidade e do vigor das sementes, método 2. As análises utilizando radiação micro-ondas foram realizadas em três etapas: estudo da hidratação das sementes, testes preliminares de coloração e análise dos métodos propostos.

2.2.2.2 Método 2: Uso de radiação micro-ondas para o preparo das sementes de algodão para o teste de tetrazólio

a) Cinética da absorção de água pelas sementes de algodão: o estudo da hidratação foi utilizado para determinar o teor de água da semente durante a hidratação e definir o grau de umidade adequado para coloração dos tecidos pelo sal de tetrazólio. As taxas de hidratação das sementes foram obtidas pela avaliação da massa úmida das sementes do lote três, considerando como referência o teor de água inicial de 7,8%, determinado pelo método de estufa a 105°C ± 3ºC durante 24 horas (BRASIL, 2009).

Foram utilizadas duas repetições de 25 sementes para cada período avaliado e analisadas a hidratação das sementes imersas em água na potência média (60% da potência do aparelho) e potência alta (100% da potência do aparelho) de micro-ondas marca Panasonic, modelo NN-S60 BH, potência de 1100 watts e frequência de 2450MHz. Para isso, as sementes imersas em água foram colocadas em recipiente plástico, resistente à radiação e mantidas em aparelho de micro-ondas. As avaliações foram realizadas de um em um minuto. Foram feitas medições da temperatura da água em cada intervalo analisado e antes da pesagem foi retirado o excesso de água da superfície das sementes com auxílio de papel. As pesagens foram realizadas utilizando balança analítica e foi calculado o teor de água em cada período analisado, até que o teor de água das sementes atingisse 25%. Logo após cada avaliação, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, de acordo com Brasil (2009), para verificar se o uso de radiação micro-ondas durante a hidratação alterou a germinação das sementes. A massa seca das sementes e o teor de água correspondente a cada intervalo analisado foram calculados de forma indireta, baseados no teor de água inicial e na massa úmida determinada em cada intervalo analisado, como descrito anteriormente.

b) Testes preliminares: foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes do lote três. Utilizando os dados obtidos para a hidratação das sementes foi realizado o corte e os

testes preliminares para determinar o número de horas necessário para a coloração utilizando a potência média e alta do aparelho de micro-ondas. As avaliações foram realizadas a cada minuto até a observação da coloração adequada e uniforme dos tecidos, que permitisse a classificação das sementes quanto ao vigor e à viabilidade.

2.2.2.2.1 Métodos propostos utilizando micro-ondas para o preparo das sementes

A escolha dos tratamentos foi realizada com base nos dados obtidos no estudo da hidratação e nos testes preliminares de coloração. Foram estabelecidos os seguintes tratamentos para o teste de tetrazólio utilizando radiação micro-ondas para o preparo das sementes, utilizando quatro repetições de 25 sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4.

a) Tratamento - Regras para análises de sementes (RAS): hidratação seguida de remoção do tegumento como proposto nas Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes de algodão foram submetidas à hidratação entre papel, durante 18 horas à 25ºC. Em seguida, os tegumentos foram retirados, manualmente, e os embriões foram colocados na solução de 0,1% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por duas horas a 35ºC. Os embriões foram submersos em água diversas vezes para remoção do excesso de solução e avaliados em seguida quanto à viabilidade e ao vigor.

b) Tratamento - Corte, imersão oito minutos potência média (CI8min): as sementes foram cortadas longitudinalmente a partir da metade distal, com o auxílio de uma pinça e bisturi, lâmina número 22, e apenas metade de cada semente foi utilizada. Em seguida, foram imersas em 400 ml de água e submetidas às micro-ondas durante oito minutos sob potência média, valor obtido com base nos estudos da hidratação das sementes. Para a coloração, as sementes foram distribuídas em recipiente plástico com células individualizadas e imersas em solução de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por uma hora e meia a 40°C, em estufa no escuro. As sementes foram imersas em água para remoção do excesso de solução de sal de tetrazólio e avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor. O número de horas necessárias para a coloração foi obtido com base nos dados obtidos no método 1.

c) Tratamento - Corte, imersão três minutos potência alta (CI3min): foi realizado o corte longitudinal a partir da metade distal da semente, com o auxílio de uma pinça e bisturi, lâmina número 22, e apenas metade de cada semente foi utilizada (Figura 2a). Em seguida, foram imersas em 400 ml de água e submetidas a micro-ondas durante três minutos em potência alta. Para a coloração, cada repetição de 25 sementes foi individualizada em embalagem de tecido de tule e colocada em um único recipiente plástico (Figura 2b) e, em seguida, imersa em solução 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, sob radiação alta de

micro-ondas durante 13 minutos (Figura 2c). Além do recipiente contendo as sementes imersas na solução de tetrazólio, foram colocados mais três recipientes com 400 ml de água para que a temperatura da água não se elevasse rapidamente (Figura 2d). Após o período de coloração, as sementes foram mantidas na solução de tetrazólio por mais dez minutos, e em seguida, imersas em água para remoção do excesso de solução de sal de tetrazólio e avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor.

d) Tratamento - Corte das sementes secas (CS): as sementes foram cortadas longitudinalmente a partir da metade distal, com o auxílio de uma pinça e bisturi, lâmina número 22, e apenas metade de cada semente foi utilizada. Cada repetição de 25 sementes foi individualizada em embalagem de tecido de tule, colocada em um único recipiente plástico e, em seguida, imersa em solução de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio e mantida sob radiação alta de micro-ondas durante 13 minutos. Além do recipiente contendo as sementes imersas na solução de tetrazólio, foram colocados mais três recipientes com 400 ml de água para que a temperatura da água não se elevasse rapidamente. Após o período de coloração, as sementes foram mantidas na solução de tetrazólio por mais dez minutos e, logo após, imersas em água para remoção do excesso de solução de sal de tetrazólio e avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor.

e) Tratamento - Corte, hidratação por uma hora a 30ºC (CH60min): as sementes foram cortadas longitudinalmente, a partir da metade distal com o auxílio de uma pinça e bisturi, lâmina número 22, e apenas metade de cada semente foi utilizada. Em seguida, as sementes foram imersas em água por uma hora a 30ºC, valor obtido com base em testes preliminares. Para a coloração, cada repetição de 25 sementes foi individualizada em embalagem de tecido de tule, colocada em um único recipiente plástico e em seguida, imersa em solução de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, sob radiação média de micro-ondas durante 18 minutos. Além do recipiente contendo as sementes imersas na solução de tetrazólio, foram colocados mais três recipientes com 400 ml de água para que a temperatura da água não se elevasse rapidamente. Após o período de coloração, as sementes foram mantidas na solução de tetrazólio por mais dez minutos e, em seguida, imersas em água para remoção do excesso de solução de sal de tetrazólio e avaliadas quanto à viabilidade e ao vigor.

A descrição dos tratamentos contendo os modos de preparo, as potências, as temperaturas e os tempos utilizados para o teste de tetrazólio em sementes de algodão estão na tabela 2.

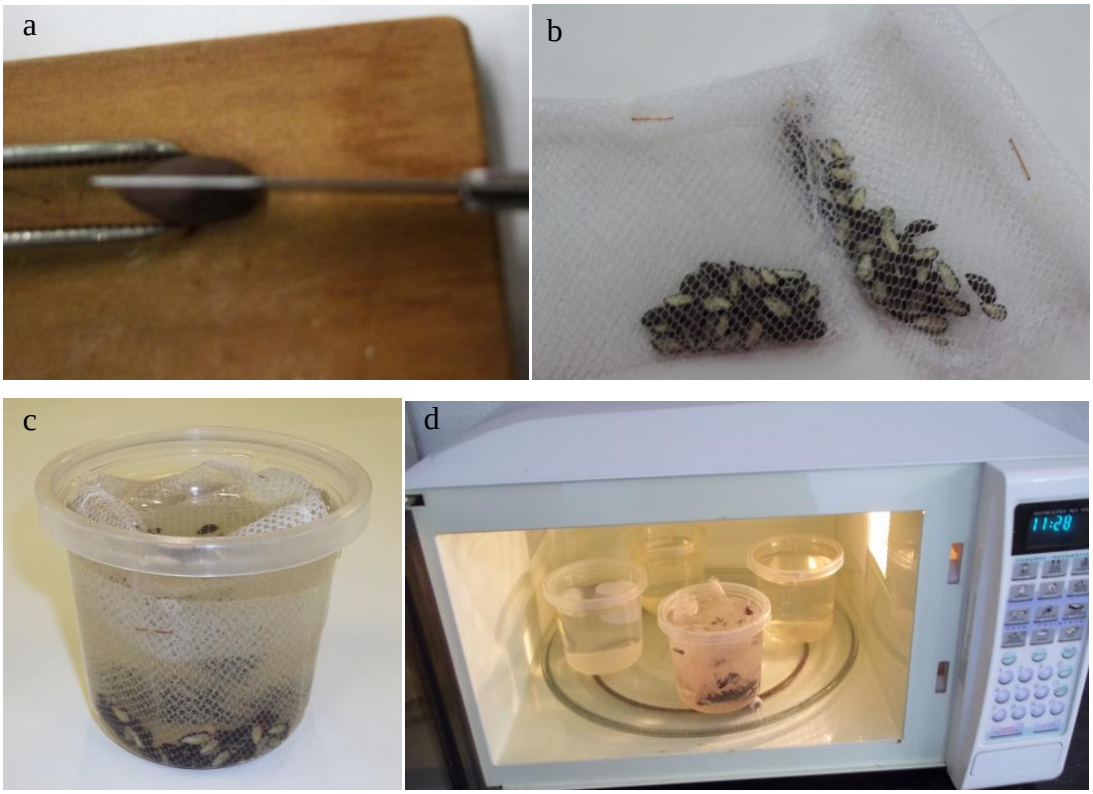

Figura 2 - Corte longitudinal a partir da metade distal (a), individualização das repetições utilizando tecido de tule (b), hidratação das sementes em micro-ondas (c) e coloração das sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar BRS 269 - Buriti para o teste de tetrazólio utilizando micro-ondas (d)

Tabela 2 - Relação dos tratamentos utilizando micro-ondas para o preparo das sementes para o teste de tetrazólio, sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), lotes 1, 2, 3 e 4, cultivar BRS 269 - Buriti

Tratamentos	Preparo para a coloração	Coloração
RAS	Hidratação 18 horas a 25ºC e remoção dos tegumentos (RAS)	120 minutos a 35ºC em estufa
CI8min	Corte, imersão 8 minutos potência média (CI8min)	90 minutos a 40ºC em estufa
CI3min	Corte, imersão 3 minutos potência alta (CI3min)	13 minutos em potência alta
CS	Corte das sementes secas (CS)	13 minutos em potência alta
CH60min	Corte, hidratação 60 minutos a 30ºC (CH60min)	18 minutos em potência média

A avaliação da viabilidade e do vigor das sementes de algodão utilizando radiação micro-ondas foi realizada de acordo com a localização e a intensidade da coloração, turgescência, presença de tecidos não coloridos e danificados (GASPAR-OLIVEIRA, 2007). Assim, as sementes foram classificadas, individualmente, em três classes: 1) viáveis e vigorosas 2) viáveis e 3) não viáveis. Os critérios para interpretação dos resultados foram os mesmos utilizados para a avaliação do teste de tetrazólio utilizando estufa para o preparo das sementes, método 1.

2.2.3 Análise estatística: os resultados obtidos em cada época para os dois métodos, uso de estufa ou micro-ondas para o preparo das sementes de algodão para o teste de tetrazólio, foram analisados separadamente utilizando o delineamento estatístico inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram calculados os coeficientes de correlação simples de Pearson (r) entre os resultados dos testes utilizados para avaliação da qualidade das sementes de algodão e os do teste de tetrazólio.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Método 1: Uso de estufa para o preparo das sementes

2.3.1.1 Caracterização da qualidade das sementes de algodão

As sementes utilizadas apresentaram teores de água semelhantes durante a primeira época (Tabela 3) e segunda época (Tabela 4) de avaliação, portanto, não houve interferência do grau de umidade no comportamento das sementes durante os testes conduzidos.

Os resultados da primeira época para caracterização da qualidade das sementes (Tabela 3), indicaram diferenças estatísticas na porcentagem de germinação entre os lotes utilizados, sendo a qualidade das sementes dos lotes 3 e 4 superiores a dos lotes 1 e 2. Embora os lotes 1 e 2 tenham apresentado resultado inferior em relação aos demais, é importante ressaltar que todos os lotes de sementes apresentaram germinação superior a 70%, valor mínimo estabelecido pelo padrão de comercialização de sementes de algodão no Brasil (BRASIL, 2005).

Os resultados obtidos no teste de germinação devem ser analisados em conjunto com os testes de vigor porque, em geral, as condições favoráveis utilizadas no teste de germinação raramente ocorrem no campo (BYRUM; COPELAND, 1995). Assim, a complementação do

teste de germinação com os testes de vigor auxiliam identificar com precisão os lotes que potencialmente terão desempenho superior em campo.

Os resultados do teste de primeira contagem da germinação caracterizaram a qualidade das sementes de forma similar a do teste de germinação, sendo os lotes 3 e 4 superiores aos lotes 1 e 2. Os resultados dos lotes 1, 3 e 4 foram superiores ao do lote 2 pelo teste de envelhecimento acelerado e os resultados dos testes de germinação a 18ºC, frio e emergência da plântula classificaram as sementes do lote 4 como superiores e as do lote 1 como inferiores aos demais quanto ao nível de vigor.

De modo geral, na primeira época, as sementes do lote de sementes 4 foram classificadas como as de vigor superior e as do lote 1 de vigor inferior.

Tabela 3 - Valores médios (%), grau de umidade (G.U.) e testes de germinação (G), primeira contagem (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a 18ºC (G18ºC), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP), para as sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti, para a primeira época de avaliação

Lotes	G.U.	G	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
1	7,1	83 b	76 b	85 a	63 c	25 c	81 b
2	7,3	82 b	77 b	76 b	66 bc	38 b	86 ab
3	7,1	91 a	89 a	85 a	81 b	36 bc	87 ab
4	7,2	96 a	89 a	90 a	94 a	60 a	90 a
C.V.(%)	-	2,8	4,5	4,7	10,4	13,4	4,3

(*)Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Podem ser observados na Tabela 4 os resultados para a caracterização da qualidade das sementes dos lotes durante a segunda época de avaliação. O teste de germinação classificou o lote 4 como superior, os lotes 1 e 3 como intermediários e o 2 como inferior. Pelas análises dos testes de vigor foi identificado que os lotes 3 e 4 foram superiores em relação ao lote 1 para a primeira contagem da germinação. Também foi observado para o teste de envelhecimento acelerado que os lotes 3 e 4 foram superiores, ratificando os resultados do teste de primeira contagem da germinação. A qualidade das sementes pode variar em função do teste de vigor utilizado; assim, poderá haver variação na classificação das sementes quanto à qualidade dependo do teste usado.

Os resultados dos testes de germinação a 18ºC e de emergência da plântula classificaram estatisticamente a qualidade das sementes de maneira semelhante, sendo o lote 4 considerado como o de qualidade superior e os lotes 1, 2 e 3 como inferiores. As sementes do

lote 4 foram classificadas como superiores em todos os testes, com exceção do teste de frio. (Tabela 4).

De modo geral, as sementes dos lotes 3 e 4 apresentaram vigor superior em relação às dos lotes 1 e 2, resultado semelhante ao obtido na primeira época de avaliação. A caracterização da qualidade das sementes, lotes 1, 2, 3 e 4, durante a primeira e segunda épocas de avaliação, foi semelhante em função dos testes utilizados, o que indica que o intervalo de tempo entre uma época e outra não promoveu redução na qualidade das sementes de algodão.

Tabela 4 - Valores médios (%), grau de umidade (G.U.) e testes de germinação (G), primeira contagem (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a 18ºC (G18ºC), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP), para as sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti, para a segunda época de avaliação

Lotes	G.U.	G	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
1	7,9	88 ab	78 b	81 b	80 b	41 b	86 b
2	8,0	87 b	82 ab	71 c	76 b	33 b	82 b
3	8,0	92 ab	91 a	90 a	76 b	71 a	83 b
4	7,9	95 a	90 a	94 a	95 a	41 b	93 a
C.V.(%)	-	3,7	6,5	2,8	3,1	11,2	3,3

(*)Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

2.3.1.2 Cinética de absorção de água pelas sementes de algodão hidratadas em estufa

As sementes de algodão, do cultivar BRS 269 - Buriti, hidratadas entre papel (Figura 3) apresentaram aumento crescente do teor de água nas primeiras quatro horas de hidratação. A rápida captação de água ocorre devido ao gradiente de potencial formado pela diferença de potencial hídrico entre a semente, que possui potencial hídrico negativo, e o substrato. Durante a embebição, a água é difundida para o interior da semente promovendo o aumento do volume e este processo é influenciado principalmente pela temperatura (BAYRAM et al., 2004), que afeta diretamente a velocidade de absorção de água pela semente. A entrada e a distribuição da água nas sementes são reguladas pelo potencial de água e ocorrem tanto por capilaridade como por difusão, no sentido do maior para o menor potencial hídrico (SILVA; VILLELA, 2011). A maior absorção de água foi observada utilizando a temperatura de 35ºC, pois temperaturas elevadas aumentam a absorção de água pelas sementes, até certos limites.

Do mesmo modo, a imersão das sementes em água (Figura 4) teve resultados semelhantes à hidratação em papel, no entanto, este método proporcionou mais absorção de água em menor período de tempo, principalmente a 35ºC, por haver maior disponibilidade de água do que para as sementes hidratadas entre papel.

A emissão da raiz primária das sementes hidratadas entre papel foi observada após 14 horas de hidratação a 25ºC, 12 horas a 30ºC e 10 horas a 35ºC. Já, para as sementes imersas em água, a emissão da raiz primária ocorreu de forma mais rápida, 5 horas após o início da hidratação a 25ºC, 4 horas a 30ºC e 3 horas a 35ºC. O tempo necessário para a emissão da raiz primária foi maior para as sementes hidratadas entre papel porque à medida que decresce o potencial hídrico do substrato, a velocidade de absorção de água pelas sementes diminui, aumentando o intervalo de tempo necessário para que seja atingida a quantidade mínima de água necessária para a emissão da raiz primária (KOLLER; HADAS, 1982). Desta forma, para as sementes de algodão, a emissão da raiz primária variou de acordo com a velocidade de absorção de água pelos tecidos das sementes e, por isso, o tempo necessário para emissão da raiz primária das sementes imersas em água foi menor do que o necessário para as hidratação entre papel (Figuras 1 e 2).

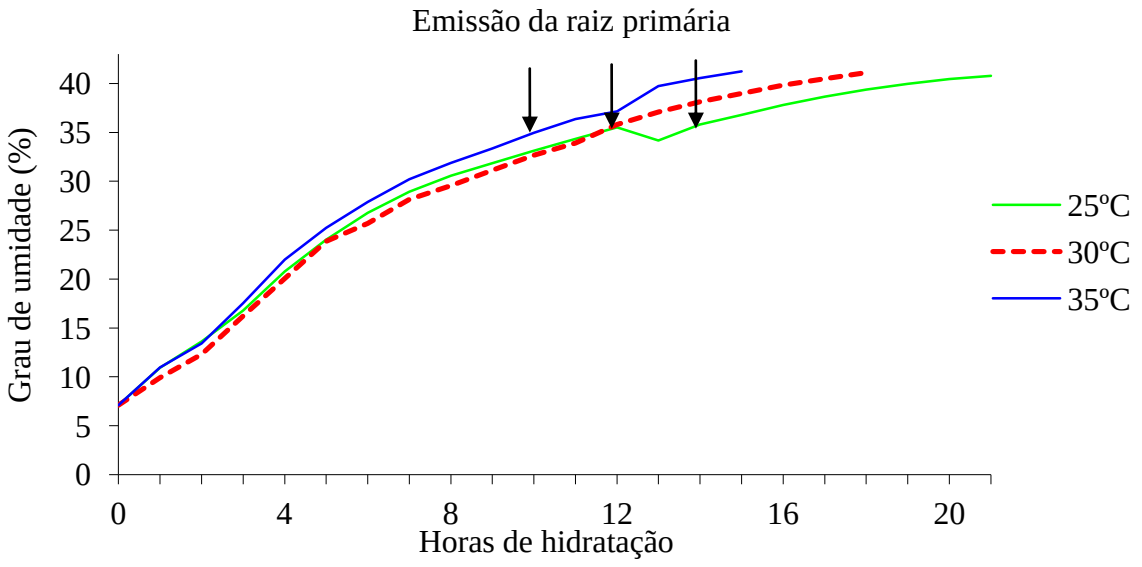

Figura 3- Cinética da absorção de água pelas sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar BRS 269 - Buriti, hidratadas entre papel a 25ºC, a 30ºC e a 35ºC

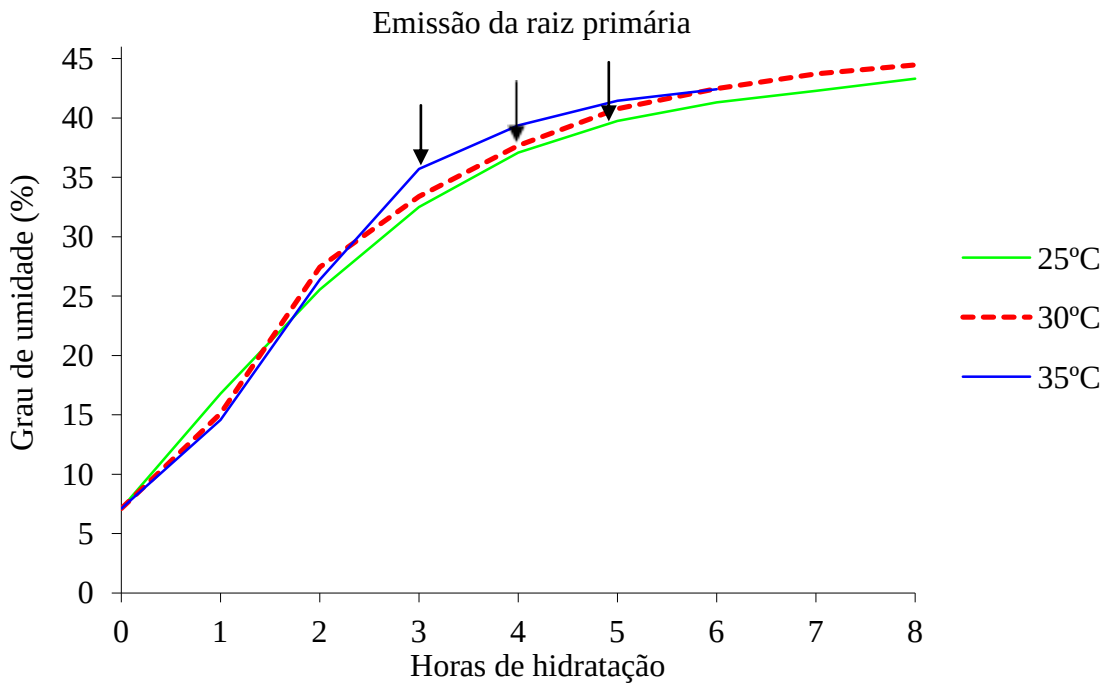

Figura 4 - Cinética da absorção de água pelas sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar BRS 269 - Buriti, hidratadas por imersão direta em água a 25ºC, a 30ºC e a 35ºC

O estudo da hidratação das sementes de algodão foi realizado para a identificação do fim da fase I da hidratação, em que ocorre o início da reativação do metabolismo celular, e início da fase II da germinação, descritas por Bewley e Black (1978). A reativação do metabolismo é necessária para que haja liberação de íons de hidrogênio que reagem com o sal de tetrazólio, possibilitando a identificação dos tecidos em viáveis e não viáveis.

Embora a absorção de água pelos tecidos da semente tenha ocorrido de forma mais rápida utilizando 35ºC, esta temperatura não proporcionou coloração uniforme dos tecidos e, por isso, foi utilizada a imersão em água por 2 horas a 30ºC para a hidratação das sementes para o teste de tetrazólio, por ser mais rápido do que a 25ºC e permitir a coloração uniforme dos tecidos, como foi observado nos testes preliminares.

Alguns estudos indicam que a imersão direta em água pode causar danos durante a hidratação devido à rapidez de absorção de água pelas sementes (ZUCARELI et al., 2011), que pode causar a perda de solutos devido ao tempo necessário para a reorganização das membranas celulares dos tecidos. Apesar disso, não foi observada redução significativa da viabilidade das sementes pelos testes de germinação e tetrazólio devido à rápida

movimentação da água para os tecidos do embrião, revelando que essa técnica pode ser usada sem restrição para a avaliação da qualidade das sementes de algodão.

Considerando as sementes de algodão imersas em água, essas atingiram 27,5% de água após 2 horas de hidratação a 30ºC, fase II. Este teor de água não deve ser excedido, para evitar que haja emissão da raiz primária, caracterizada pela fase III da hidratação. Além disso, o grau de umidade atingido pela semente possibilitou o preparo das sementes do tratamento HCC, hidratação seguida de corte e coloração, facilitando o corte longitudinal e promovendo a coloração uniforme e adequada dos tecidos.

Novembre et al. (2006), em estudo utilizando o teste de tetrazólio para as sementes de *Brachiaria brizantha*, observaram que a hidratação das sementes entre papel por seis horas a 30ºC permitiu a semente atingir grau de umidade de 25%, quantidade de água suficiente para a reestruturação do sistema de membranas celulares (BEWLEY; BLACK, 1994).

O estudo da hidratação da semente é importante para o monitoramento do teor de água das sementes, pois o grau de umidade observado após a hidratação dos tecidos pode ser utilizado como parâmetro de referência para a padronização do teste de tetrazólio (CHAMMA; NOVEMBRE, 2007).

2.3.1.3 Classificação das sementes pelo teste de tetrazólio

Para a avaliação da viabilidade e do vigor das sementes de algodão pelo teste de tetrazólio, as sementes foram avaliadas individualmente e agrupadas em classes considerando os critérios básicos de interpretação descritos por Delouche et al. (1976) para as sementes de algodão e por Dias e Barros (1999) para a classificação de sementes de milho. Assim, foram estabelecidas as seguintes classes:

Classe 1 – Sementes viáveis e vigorosas: que têm as áreas vitais íntegras, sementes firmes e túrgidas e sem lesões visíveis e com coloração uniforme e superficial rosa clara a rosa em toda a extensão do embrião (Figura 5a). Sementes com menor intensidade de coloração, indicando restrição à penetração da solução de tetrazólio, mas com tecidos túrgidos (Figura 5b). Sementes com poucos danos superficiais ou áreas brancas localizados na parte externa dos cotilédones e, ou, danos superficiais no eixo embrionário, mas sem atingir o cilindro central (Figura 5c), ou coloração vermelha na região da radícula, mas sem danos nos tecidos do embrião (Figura 5d-d’).

Figura 5 - Sementes viáveis e vigorosas de algodão avaliadas pelo teste de tetrazólio: (a) sem lesões visíveis e com coloração uniforme e superficial rosa, (b) túrgidas com menor intensidade de coloração indicando restrição à absorção do sal de tetrazólio, (c) poucos danos superficiais nos cotilédones, (d-d’) coloração vermelha na região da radícula

Classe 2 – Sementes viáveis: que têm as áreas vitais íntegras e a coloração do embrião rósea a vermelha brilhante com tecidos firmes e túrgidos. Os cotilédones podem permanecer descoloridos, desde que os tecidos estejam firmes e túrgidos, Figura 6a-a’. Pode ter áreas com tecidos mortos (tecido flácido e branco leitoso), desde que não sejam nos tecidos vitais (área de ligação dos cotilédones e o eixo do embrião) e que não seja mais do que 50% da área dos cotilédones, Figura 6b-b’. Podem ocorrer danos e, ou, áreas mortas no eixo embrionário, mas sem atingir o tecido condutor e a radícula, Figura 6c.

Figura 6 - Sementes viáveis de algodão avaliadas pelo teste de tetrazólio: (a-a’) tecidos firmes e túrgidos, coloração rósea a vermelha com regiões descoloridas nos cotilédones, (b-b’) tecido flácido e morto nos cotilédones, (c) área morta nos cotilédones e eixo do embrião

Classe 3 – Sementes não viáveis: são as que o embrião não desenvolveu coloração completa e a área de ligação dos cotilédones e o eixo do embrião permaneceram descoloridos, Figura 7a. Apresentam lesões, áreas mortas ou tecidos deteriorados localizados nas áreas vitais, como o tecido condutor do eixo do embrião, área de ligação dos cotilédones e o eixo e a região da radícula, Figura 7b-b'. Nesta classe estão incluídas também sementes que têm área maior do que 50% de tecido dos cotilédones morto (Figura 7c), ou eixo embrionário totalmente flácido e, ou, com coloração branca ou vermelha intensa (Figura 7d), que indicam tecidos mortos ou deteriorados, respectivamente.

Figura 7 - Sementes não viáveis de algodão avaliadas pelo teste de tetrazólio: (a) semente morta, (b-b') tecidos mortos e, ou, deteriorados no eixo do embrião e na área de ligação entre os cotilédones e o eixo do embrião, (c) área maior do que 50% de tecido morto dos cotilédones, (d) eixo do embrião com tecidos flácidos e com coloração branca

A classificação da viabilidade e do vigor em três classes para a avaliação das sementes pelo teste de tetrazólio, facilitou a distinção da qualidade das sementes de algodão nessa pesquisa. Essa classificação foi usada também por Dias e Barros (1999), Bittencourt e Vieira (1999) e Santos (2003) para o teste de tetrazólio em sementes de milho, amendoim e tomate, respectivamente.

2.3.1.4 Avaliação dos tratamentos propostos para uso de estufa no preparo das sementes

Todos os tratamentos considerados nessa pesquisa possibilitaram a coloração dos tecidos; no entanto, os métodos em que a semente foi cortada seca (CHC e CC), proporcionaram a coloração uniforme dos tecidos e com intensidade adequada em comparação às sementes cortadas após a hidratação (HCC). Provavelmente isto ocorreu devido à danificação das partes da semente durante o corte dos tecidos hidratados, uma vez

que, a força aplicada na lâmina para o corte do tegumento, que é mais resistente, dilacerou algumas partes, pois os tecidos internos estavam hidratados e macios. Por isso, as sementes cortadas foram individualizadas em células durante o preparo das sementes para o teste de tetrazólio para facilitar a avaliação. Fogaça (2003) também verificou que houve danos ao embrião durante o corte de sementes hidratadas de guaritá (*Astronium graveolens* Jacq.) devido à presença de tegumento, no momento do preparo das sementes para o teste de tetrazólio.

Para a coloração foi utilizada a concentração de 0,075% de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, pois, de acordo com França Neto et al. (1998) esta concentração é suficiente para o desenvolvimento da coloração ideal dos tecidos vigorosos e não vigorosos e de acordo com Cervi e Mendonça (2009) esta concentração é eficiente para a coloração dos tecidos das sementes de algodão. A duração do período de coloração das sementes variou em cada tratamento proposto, como observado na Tabela 1, pois o desenvolvimento da coloração depende de vários fatores, tais como, a temperatura utilizada para a coloração, as características da semente, os modos de preparo e a concentração da solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio conforme destacado por GRABE (1970).

Os dados obtidos para o teste de tetrazólio para viabilidade na primeira época estão descritos na Tabela 5. A variação estatística entre os resultados dos tratamentos CHC 35ºC e CHC 40ºC foi similar a do resultado do teste de germinação para as sementes do lote1, classificadas como de viabilidade inferior. Este resultado foi similar ao dos testes de primeira contagem, de germinação a 18ºC, frio e emergência de plântulas para caracterização da qualidade das sementes na primeira época de avaliação (Tabela 3). O teste de germinação classificou as sementes do lote 2 como inferiores, no entanto, em nenhum dos tratamentos propostos nesta pesquisa os resultados foram similares. Os resultados do teste de germinação caracterizaram as sementes dos lotes 3 e 4 como de qualidade superior e em todos os tratamentos propostos nessa pesquisa os resultados foram semelhantes aos do teste de germinação. Deste modo, estatisticamente qualquer um dos métodos poderia ser indicado para a avaliação da viabilidade dessas sementes. No entanto, o método proposto nas regras de análises de sementes (RAS) não foi considerado adequado porque após o período de hidratação recomendado neste método, foi observada a emissão da raiz primária das sementes, o que dificultou a retirada dos tegumentos, sem que danificasse as partes do embrião.

Os preparos das sementes relacionados aos tratamentos CHC 30ºC, HCC 30ºC, HCC 35ºC e HCC 40ºC não favoreceram a uniformidade da coloração dos tecidos da semente e os dos métodos CC 30ºC, CC 35ºC e CC 40ºC causaram danificações nas partes do embrião.

Assim, houve dificuldade para avaliar os tecidos viáveis e os não viáveis e diferenciar os danos devido ao corte e os já existentes na semente. Cervi e Mendonça (2009) também relataram a ocorrência de danos causados devido aos cortes, na extremidade oposta ao embrião e longitudinal na lateral das sementes de algodão, que dificultaram a avaliação dessas sementes no teste de tetrazólio.

Tabela 5 - Valores médios de viabilidade (%), testes de germinação (TG) e de tetrazólio em função dos tratamentos: regras para análise de sementes (RAS); corte da semente seca, hidratação e coloração (CHC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC; hidratação, corte e coloração (HCC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC e corte e coloração (CC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC para sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS - 269 Buriti, para a primeira época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
TG	83 dC	82 cC	91 aB	96 aA
RAS	90 bcB	92 abAB	91 aAB	95 aA
CHC 30ºC	91 bcA	91 abA	92 aA	95 aA
CHC 35ºC	89 cdB	91 abAB	93 aAB	96 aA
CHC 40ºC	87 cdB	91 abAB	94 aA	95 aA
HCC 30ºC	91 bcA	92 abA	93 aA	94 aA
HCC 35ºC	91 abcB	93 abAB	95 aAB	97 aA
HCC 40ºC	97 aA	96 aA	93 aA	95 aA
CC 30ºC	96 abA	89 bB	94 aA	93 aAB
CC 35ºC	90 bcA	93 abAB	94 aAB	95 aA
CC 40ºC	91 abcA	93 abA	92 aA	95 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

O corte longitudinal a partir extremidade distal das sementes secas ou hidratadas causou, em alguns casos, danos ao embrião e destruição do eixo do embrião, devido à pressão exercida pela lâmina para cortar os tegumentos da semente. Apesar disso, os resultados dos tratamentos CHC 35ºC e CHC 40ºC possibilitaram classificar a qualidade das sementes de maneira semelhante à classificação do teste de germinação (Tabela 5), exceto para o lote 2. A comparação da qualidade das sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 indicou que, de modo geral, o lote 1 foi classificado como o de qualidade inferior, os lotes 2 e 3 como intermediários e o lote 4 como superior, classificação similar à obtida na caracterização da qualidade das sementes desses lotes como, por exemplo, os resultados dos testes de frio, emergência da plântula e germinação a 18ºC (Tabela 3). Estes tratamentos permitiram, ainda, a coloração adequada e

uniforme dos tecidos facilitando a avaliação e com a redução do tempo para a coloração das sementes, 120 minutos e 90 minutos, respectivamente.

Na segunda época de avaliação (Tabela 6), todos os resultados dos tratamentos propostos nessa pesquisa caracterizaram a viabilidade das sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 de maneira semelhante à classificação obtida no teste de germinação, deste modo, estatisticamente qualquer um dos tratamentos poderia ser indicado para a avaliação da viabilidade das sementes desses lotes.

Entretanto, no tratamento CHC 30ºC as sementes não desenvolveram coloração uniforme e suficiente para a avaliação das partes vitais do embrião e o preparo das sementes, em função dos tratamentos HCC 30ºC, HHC 35ºC, HCC 40ºC e CC 30ºC, CC 35ºC, CC 40ºC, causou danos aos tecidos durante o corte das sementes hidratadas e secas, e coloração insuficiente dos tecidos, por isso, esses métodos não foram considerados adequados.

Tabela 6 - Valores médios de viabilidade (%), testes de germinação (TG) e de tetrazólio em função dos tratamentos: regras para análise de sementes (RAS); corte da semente seca, hidratação e coloração (CHC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC; hidratação, corte e coloração (HCC) a 30ºC, 35ºC e a 40ºC e corte e coloração (CC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC, em sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS - 269 Buriti, para a segunda época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
TG	88 aB	87 abB	92 abAB	95 abA
RAS	90 aB	93 aAB	94 abAB	97 aA
CHC 30ºC	87 aB	90 abB	90 abB	98 aA
CHC 35ºC	87 aB	85 bB	87 bB	99 aA
CHC 40ºC	87 aB	87 abB	91 abB	98 aA
HCC 30ºC	90 aA	93 aA	90 abA	88 bA
HCC 35ºC	92 aAB	91 abAB	89 abB	97 aA
HCC 40ºC	92 aA	91 abA	93 abA	97 aA
CC 30ºC	94 aAB	90 abB	95 aAB	96 aA
CC 35ºC	89 aB	90 abB	94 abAB	98 aA
CC 40ºC	95 aA	92 abA	92 abA	98 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Embora o tratamento proposto nas regras para análise de sementes (RAS), Tabela 6, tenha sido eficiente para caracterizar a viabilidade das sementes, lotes 1, 2, 3 e 4, de maneira semelhante a do teste de germinação, este método não foi eficiente, pois o preparo das sementes causou danos ao embrião e dificultou a identificação de injúrias já existentes,

prejudicando a avaliação da viabilidade das sementes. Por outro lado, os tratamentos CHC 35ºC e CHC 40ºC além de caracterizarem a qualidade das sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 de modo semelhante a do teste de germinação, possibilitaram destacar as sementes do lote 4 como superior a dos lotes 1, 2 e 3, resultado semelhante aos dos testes de germinação a 18ºC e emergência da plântula (Tabela 4).

Para os resultados do teste de tetrazólio, visando classificar o vigor das sementes de algodão, na primeira época (Tabela 7), foram utilizados como referência os dados obtidos no teste de germinação a 18ºC e a eficiência do tratamento para caracterizar a qualidade das sementes, independentemente do lote de semente avaliado. A temperatura baixa, principalmente durante o período inicial de hidratação, interfere na qualidade das sementes (HOPE; MAAMARI, 1994), podendo alterar a germinação e reduzir a velocidade de emergência da plântula. Por isso, sementes que têm germinação semelhante, mas que diferem quanto ao vigor, podem apresentar diferenças na porcentagem de emergência da plântula em campo. Assim, o resultado do teste de germinação a 18ºC pode indicar as sementes que têm potencial de desenvolvimento em condição adversa de ambiente.

Assim, de acordo com o teste de germinação a 18ºC, as semente dos lotes 1 e 2 foram classificadas como as de vigor inferior (Tabela 7), no entanto, nenhum dos métodos propostos nessa pesquisa classificou esses lotes de modo similar à classificação obtida no teste de germinação a 18ºC. Por outro lado, os resultados dos tratamentos RAS, CHC 30ºC e HCC 30ºC caracterizaram as sementes do lote 3 como as de qualidade inferior, resultado similar a classificação obtida no teste de germinação a 18ºC. As sementes do lote 4 foram caracterizadas como superiores no teste de germinação a 18ºC, resultado similar ao obtido para todos os tratamentos propostos nessa pesquisa, assim, de acordo com os resultados estatísticos, todos os métodos propostos poderiam ser utilizados para a avaliação do vigor das sementes do lote 4. No entanto, a remoção dos tegumentos indicada no método proposto nas RAS causou danos ao embrião, dificultando a avaliação das sementes.

Os resultados dos tratamentos RAS, CHC 30ºC, CHC 35ºC, CHC 40ºC, HCC 30ºC e CC 30ºC não classificaram as sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 da mesma foram que a classificação obtida no teste de germinação a 18ºC, no entanto, possibilitaram caracterizar as diferenças de qualidade entre as sementes destacando as sementes dos lotes 1 e 2 como as de qualidade inferior, as do lote 3 como as de qualidade intermediária e as do lote 4 como as de qualidade superior, exceto para o resultado do método CC 30ºC que classificou as sementes do lote 1 como superiores.

Embora os resultados dos tratamentos CHC 30ºC e HCC 30ºC tenham caracterizado a qualidade das sementes dos lotes 3 e 4 de forma eficiente, esses métodos não proporcionaram coloração suficiente e uniforme dos tecidos, dificultando a avaliação das sementes e, por isso, não são recomendados para o teste de tetrazólio. Apesar dos resultados dos tratamentos CHC 35ºC e CHC 40ºC (Tabela 7) terem caracterizado a qualidade das sementes do lote 4 quanto ao vigor, esses métodos não devem ser utilizados pois, além de não terem classificado as sementes dos demais lotes, não proporcionaram coloração suficiente dos tecidos. De forma similar, o corte das sementes hidratadas (HCC 30ºC, HCC 35ºC e HCC 40ºC) e o corte das sementes secas (CC 30ºC, CC 35ºC e CC 40ºC) causaram danos ao embrião da semente, principalmente, na região da radícula, dificultando a distinção dos danos ocorridos devido ao corte e aos já existentes, portanto, não são recomendados.

Tabela 7 - Resultados, testes de germinação a 18 ºC (%, G18ºC) e de tetrazólio (%) em função dos tratamentos: regras para análise de sementes (RAS); corte da semente seca, hidratação e coloração (CHC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC; hidratação, corte e coloração (HCC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC e corte e coloração (CC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC, para sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BR-269 Buriti , na primeira época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
G18 ºC	62 dC	66 dC	81 bB	94 aA
RAS	82 cB	85 bcAB	86 abAB	92 aA
CHC 30ºC	85 abcB	82 cB	87 abB	95 aA
CHC 35ºC	84 bcB	90 abcAB	92 aA	94 aA
CHC 40ºC	85 abcB	88 abcAB	90 aBA	94 aA
HCC 30ºC	84 abcB	82 cB	87 abAB	92 aA
HCC 35ºC	89 abcA	93 abA	94 aA	94 aA
HCC 40ºC	92 abA	95 aA	92 aA	94 aA
CC 30ºC	93 aA	82 cB	93 aA	93 aA
CC 35ºC	89 abcA	92 abA	92 aA	95 aA
CC 40ºC	92 abA	90 abcA	91 aA	94 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Na segunda época, Tabela 8, os resultados dos tratamentos RAS, CHC 30ºC, CHC 35ºC, CHC 40ºC e CC 35ºC classificaram as sementes do lote 1 como inferiores, semelhante à classificação obtida no teste de germinação a 18ºC. Este resultado também foi observado para os testes de primeira contagem, frio e emergência da plântula na segunda época (Tabela 4), reafirmando que a classificação do lote foi adequada.

A utilização do método proposto nas RAS dificultou a avaliação em função dos danos causados ao embrião para a remoção dos tegumentos. De modo semelhante, o tratamento CHC 30ºC proporcionou coloração insuficiente dos tecidos, dificultando a avaliação e, portanto, não é recomendado.

Os resultados do tratamento CHC 35ºC classificaram as sementes do lote 2 como as de vigor inferior, resultado similar aos dos testes de germinação a 18ºC (Tabela 8), envelhecimento acelerado, frio e emergência da plântula (Tabela 4). As sementes do lote 3 foram caracterizadas como de qualidade inferior pelo teste de germinação a 18ºC, no entanto, em nenhum dos tratamentos propostos nessa pesquisa os resultados foram semelhantes. Já para as sementes do lote 4, os resultados de todos os tratamentos propostos nessa pesquisa classificaram as sementes como superiores, resultado similar aos do teste de germinação a 18ºC. Embora todos os tratamentos utilizados tenham caracterizado a qualidade das sementes, o preparo das sementes utilizando os tratamentos HCC 30ºC, HCC 35ºC, HCC 40ºC e CC 30ºC e CC 40ºC causou danos ao embrião durante o corte, dificultando a obtenção de resultados precisos e, assim, não são recomendados para o teste de tetrazólio em sementes de algodão.

Tabela 8 - Resultados, testes de germinação a 18ºC (%, G18ºC) e de tetrazólio (%) em função dos tratamentos: regras para análise de sementes (RAS); corte da semente seca, hidratação e coloração (CHC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC; hidratação, corte e coloração (HCC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC e corte e coloração (CC) a 30ºC, a 35ºC e a 40ºC, para sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS - 269 Buriti, na segunda época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
G18 ºC	80 cB	76 cB	75 cB	95 abA
RAS	87 abcA	91 aA	90 abA	93 abA
CHC 30ºC	86bcB	89 abB	90 abB	98 aA
CHC 35ºC	87 abcB	83 bcB	87 bB	97 aA
CHC 40ºC	87 abcB	87 abB	91 abB	98 aA
HCC 30ºC	89 abA	91 aA	88 abA	88 bA
HCC 35ºC	90 abAB	91 abAB	87 bB	94 abA
HCC 40ºC	92 abA	93 aA	92 abA	97 aA
CC 30ºC	94 aA	89 abA	95 aA	95 abA
CC 35ºC	88 abcB	90 abAB	93 abAB	96 aA
CC 40ºC	94 aAB	91 aB	92 abAB	98 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados dos tratamentos CHC 40ºC e CC 35ºC classificaram as sementes dos lotes 1 e 4 de forma similar a classificação do teste de germinação a 18ºC , assim como o método CHC 35ºC (Tabela 8), que caracterizou de forma eficiente as sementes dos lotes 1, 2 e 4. Estes tratamentos apresentaram resultados satisfatórios em relação aos demais porque proporcionaram coloração uniforme dos tecidos, facilitando a avaliação do teste e classificarão o vigor das sementes de forma semelhante ao do teste de germinação a 18ºC. Além disso, os resultados referente aos métodos CHC 35ºC e CHC 40ºC classificaram a as sementes dos lotes 1, 2 e 3 como as de qualidade inferior e as do lote 4 como as de qualidade superior, semelhante à classificação obtida com os resultados do teste de emergência da plântula (Tabela 4). O resultado do tratamento CC 35ºC classificou as sementes do lote 1 como as de qualidade inferior, as dos lotes 2 e 3 como as de qualidade intermediária e as do lote 4 como superiores.

A escolha do método adequado para o teste de tetrazólio deve ser baseada na eficiência em distinguir os tecidos viáveis dos não viáveis e na possibilidade de diferenciar as sementes com qualidade fisiológica distinta (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANCA NETO, 1999). Assim, para a avaliação dos resultados dessa pesquisa foi considerado que o teste de tetrazólio deve fornecer um resultado similar aos dos testes de germinação, quando se refere à avaliação da viabilidade, e similar ao do teste de germinação a 18ºC, quando as sementes de algodão forem classificadas quanto ao vigor, independentemente do lote de semente avaliado.

Deste modo, para a avaliação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio, os tratamentos CHC 35ºC e CHC 40ºC (Tabela 5) foram considerados eficientes, com base nos resultados da análise estatística e da coloração das sementes, na primeira e segunda épocas de avaliação. Para a classificação do vigor, os métodos CHC 35ºC, CHC 40ºC e CC 35ºC foram os mais indicados na segunda época, Tabela 8. Na primeira época de avaliação do vigor das sementes, nenhum tratamento teve resultados satisfatórios quanto à classificação das sementes e, por isso, não foram considerados adequados.

Os dados de correlação linear entre os testes utilizados para caracterização do parâmetro fisiológico inicial das sementes de algodão e o teste de tetrazólio estão nas Tabelas 9 e 10. Houve correlação significativa e positiva entre o método CHC 35ºC e os testes de germinação, germinação a 18ºC e emergência da plântula. No entanto, este tratamento não é indicado porque foi necessário um período maior para coloração do que o tempo requerido para o tratamento CHC 40ºC.

O método CC 35ºC apresentou correlação positiva com os testes de germinação, primeira contagem, envelhecimento acelerado e emergência da plântula (Tabela 9), mas não

apresentou correlação significativa com o teste de germinação a 18 ºC, mesmo tendo sido eficiente para a avaliação do vigor das sementes dos lotes 1 e 4 na segunda época (Tabela 8). Este método não é indicado devido à dificuldade de corte das sementes e aos danos causados às estruturas durante o corte das sementes secas.

Tabela 9 – Coeficiente de correlação linear (r) entre os resultados dos dez tratamentos propostos para os testes de tetrazólio e os dos testes de germinação (G), primeira contagem da germinação (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a 18 ºC (G18ºC), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP) para classificação da viabilidade das sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS - 269 Buriti

Tratamentos	Testes					
	G	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
RAS	0,70 $^{n.s.}$	0,70 $^{n.s.}$	0,60 $^{n.s.}$	0,69 $^{n.s.}$	0,24 $^{n.s.}$	0,68 $^{n.s.}$
CHC 30ºC	0,67 $^{n.s.}$	0,62 $^{n.s.}$	0,69 $^{n.s.}$	0,73*	0,14 $^{n.s.}$	0,77*
CHC 35ºC	0,74*	0,61 $^{n.s.}$	0,70 $^{n.s.}$	0,84**	0,20 $^{n.s.}$	0,96 **
CHC 40ºC	0,80*	0,80*	0,75*	0,80*	0,41 $^{n.s.}$	0,89 **
HCC 30ºC	0,5 $^{n.s.}$	0,01 $^{n.s.}$	-0,52 $^{n.s.}$	0,13 $^{n.s.}$	-0,01 $^{n.s.}$	-0,19 $^{n.s.}$
HCC 35ºC	0,70 $^{n.s.}$	0,53 $^{n.s.}$	0,45 $^{n.s.}$	0,89**	0,02 $^{n.s.}$	0,94**
HCC 40ºC	0,10 $^{n.s.}$	0,08 $^{n.s.}$	0,54 $^{n.s.}$	0,12 $^{n.s.}$	-0,03 $^{n.s.}$	0,38 $^{n.s.}$
CC 30ºC	0,40 $^{n.s.}$	0,32 $^{n.s.}$	0,80*	0,23 $^{n.s.}$	0,10 $^{n.s.}$	0,17 $^{n.s.}$
CC 35ºC	0,74*	0,80*	0,73*	0,68 $^{n.s.}$	0,45 $^{n.s.}$	0,78*
CC 40ºC	0,63 $^{n.s.}$	0,33 $^{n.s.}$	0,56 $^{n.s.}$	0,83**	0,12 $^{n.s.}$	0,94**

$^{n.s.}$= não significativo, **=significativo a 1% de probabilidade e *= significativo a 5% de probabilidade

Os resultados do tratamento CHC 40ºC, Tabelas 9 e 10, tiveram correlação positiva com o teste de germinação e demais testes para caracterização da qualidade das sementes dos lotes avaliados, exceto com o teste de frio, em que a correlação não foi significativa. Este tratamento é indicado como método alternativo ao proposto nas regras para análise de semente para o teste de tetrazólio, por ter sido eficiente na avaliação da viabilidade das sementes, na primeira e segunda épocas, e do vigor, na segunda época e por ser um método rápido e prático, podendo ser implantado com facilidade na rotina dos laboratórios de sementes.

Tabela 10 - Coeficiente de correlação linear (r) entre os resultados dos dez tratamentos propostos para o teste de tetrazólio e os dos testes de germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a 18 ºC (G18ºC), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP) para classificação do vigor das sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS - 269 Buriti

Tratamentos	Testes					
	G	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
RAS	0,82*	0,73*	0,45 n.s.	0,84**	0,52 n.s.	0,70 n.s.
CHC 30ºC	0,87**	0,72*	0,77*	0,86**	0,39 n.s.	0,71*
CHC 35ºC	0,72*	0,64 n.s.	0,64 n.s.	0,81*	0,29 n.s.	0,96**
CHC 40ºC	0,84**	0,78*	0,79*	0,84**	0,47 n.s.	0,89**
HCC 30ºC	0,69 n.s.	0,48 n.s.	0,23 n.s.	0,69 n.s.	0,35 n.s.	0,27 n.s.
HCC 35ºC	0,47 n.s.	0,36 n.s.	0,14 n.s.	0,73*	-0,22 n.s.	0,80*
HCC 40ºC	0,32*	0,29 n.s.	0,38 n.s.	0,47 n.s.	0,06 n.s.	0,74*
CC 30ºC	0,63 n.s.	0,50 n.s.	0,79*	0,45 n.s.	0,26 n.s.	0,21 n.s.
CC 35ºC	0,74*	0,75*	0,68 n.s.	0,69 n.s.	0,56 n.s.	0,74*
CC 40ºC	0,62 n.s.	0,34 n.s.	0,75**	0,74*	0,07 n.s.	0,80*

n.s.= não significativo, **=significativo a 1% de probabilidade e *= significativo a 5% de probabilidade

2.3.2 Método 2: Uso de micro-ondas para o preparo das sementes

2.3.2.1 Caracterização dos lotes de sementes de algodão

As sementes utilizadas apresentaram teores de água semelhantes durante a primeira época (Tabela 11) e a segunda época (Tabela 12) de avaliação e, desta forma, o grau de umidade das sementes não interferiu nos resultados das demais determinações, utilizadas para avaliar as sementes. Nos resultados da primeira época para caracterização da qualidade das sementes, dos lotes 1, 2, 3 e 4, (Tabela 11) todos os testes utilizados foram eficientes para caracterizar a qualidade das sementes e, de modo geral, classificaram as sementes do lote 4 como as de qualidade superior, exceto no teste de frio em que os resultados classificaram as sementes do lote 3 como as de qualidade superior. A sementes dos lotes 1 e 2 foram classificadas como as de qualidade inferior por todos testes, exceto para os de germinação e primeira contagem, respectivamente.

Tabela 11 - Valores médios (%), grau de umidade (G.U.) e testes de germinação (G), primeira contagem (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a baixa temperatura (G18ºC), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP) para as sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti, para a primeira época de avaliação

Lotes	G.U	G	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
1	7,9	88 ab	78 b	81 b	80 b	41b	86 b
2	7,9	87 b	82 ab	75 c	76 b	33 b	82 b
3	7,8	92 ab	91 a	90 a	76 b	71 a	83 b
4	7,9	95 a	90 a	94 a	95 a	41 b	93 a
C.V.(%)	...	3,7	6,5	3,3	3,1	11,2	3,3

(*)Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados da segunda época para caracterização da qualidade das sementes dos quatro lotes (Tabela 12), não indicaram diferenças significativas entre a qualidade das sementes, avaliadas pelos testes de germinação e de primeira contagem. De acordo com Delouche e Baskin (1973), o primeiro sinal de deterioração das sementes é a alteração nos processos bioquímicos que pode ser percebida apenas utilizando alguns testes de vigor. De modo geral, os testes baseados na avaliação da germinação diferenciam a qualidade das sementes apenas quando o processo está em estado avançado de deterioração e a redução da capacidade germinativa é maior. Por isso, não foram verificadas diferenças de qualidade das sementes dos lotes utilizados, porque pequenas alterações na taxa de deterioração nem sempre são detectadas no teste de germinação.

De modo geral, todos os resultados dos testes utilizados para caracterização da qualidade inicial das sementes, Tabela 12, indicaram que as sementes dos lotes 1 e 2 têm qualidade inferior às demais, exceto os dos testes de germinação e primeira contagem. As sementes do lote 4 apresentaram desempenho superior em relação aos demais lotes em todos os testes empregados, resultado semelhante ao observado durante a primeira época de avaliação.

Tabela 12 - Valores médios (%), grau de umidade (G.U.) e testes de germinação (G), primeira contagem (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a 18ºC (G18ºC), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP) para as sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti, para a segunda época de avaliação

Lotes	G.U.	G	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
1	7,8	92 a	85 a	75 b	81 b	39 c	82 b
2	7,5	90 a	86 a	88 a	86 b	43 c	89 a
3	7,4	92 a	85 a	89 a	84 b	57 b	87 ab
4	7,8	95 a	91 a	90 a	93 a	85 a	92 a
C.V.(%)	…	4,4	3,3	5,4	2,9	10,6	3,3

(*)Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

2.3.2.2 Cinética de absorção de água pelas sementes de algodão utilizando radiação micro-ondas

O estudo da hidratação das sementes indicou que a absorção de água pelas sementes foi mais rápida quando foi utilizada a potência média (Figura 8), sementes com 10% de água, em relação à potência alta (Figura 9), 13% de água, em que as sementes foram submetidas a temperatura de 42ºC após três minutos de exposição. O tempo necessário para a hidratação das sementes de algodão utilizando a radiação micro-ondas, em potência média, foi de oito minutos, tempo suficiente para que a semente atingisse, aproximadamente, 25 % de água.

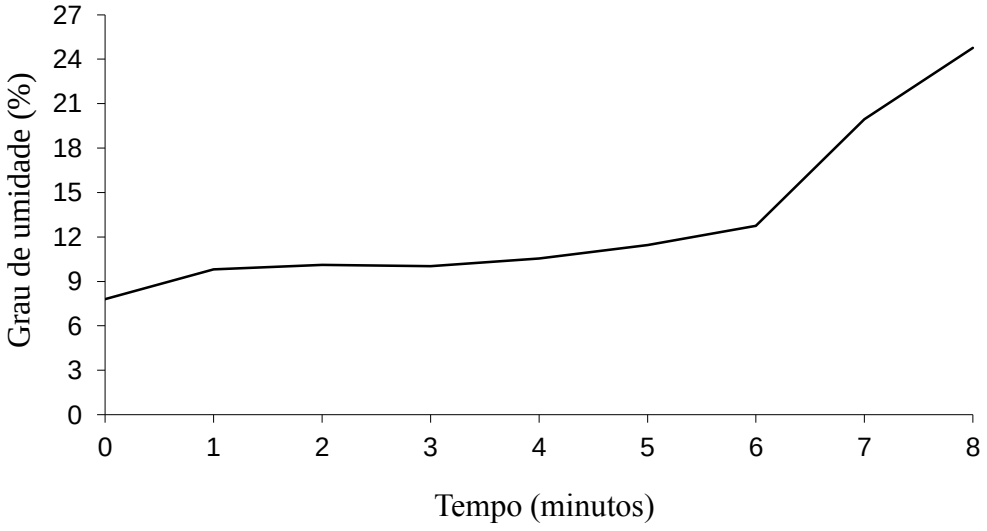

Figura 8 - Cinética da absorção de água das sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), lote 3, cultivar BRS 269 - Buriti, hidratadas por imersão direta em água em micro-ondas na potência média

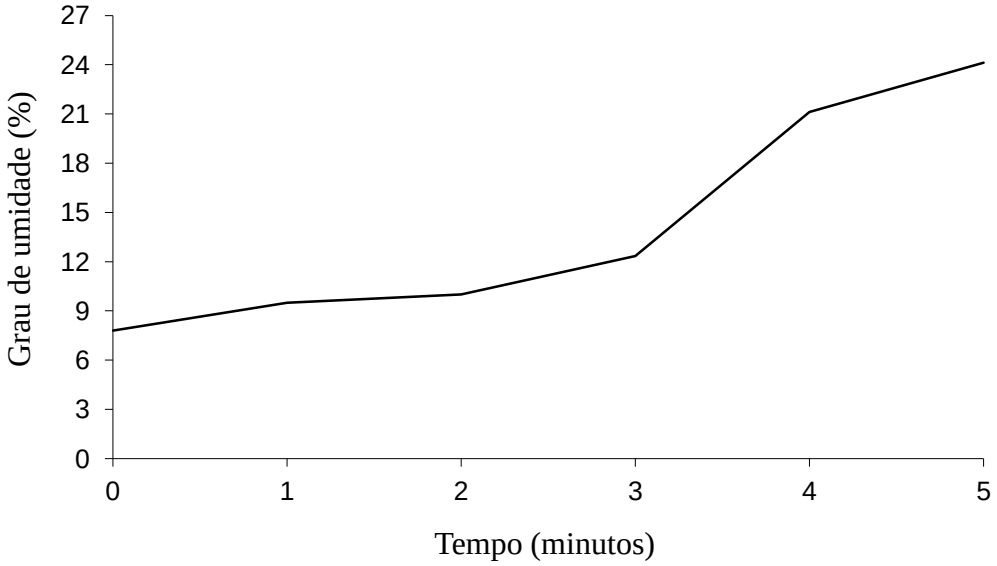

Figura 9 - Cinética da absorção de água pelas sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), lote 3, cultivar BRS 269 - Buriti, hidratadas por imersão direta em água em micro-ondas na potência alta

A hidratação da semente utilizando potência alta foi aferida até cinco minutos, período em que as sementes atingiram, aproximadamente, 25% de água. No entanto, após três minutos

de exposição foi observada a redução da germinação devido à temperatura da água, aproximadamente, 42ºC. Por isso, o período estabelecido para o tratamento CI3min foi de três minutos em potência alta, por possibilitar a hidratação suficiente dos tecidos, 13% de água, e a coloração adequada.

2.3.2.3 Avaliação dos tratamentos propostos para uso de radiação micro-ondas para preparo das sementes

O corte da semente seca, seguido de coloração por 13 minutos em micro-ondas (CS), não proporcionou coloração adequada dos tecidos, que mantiveram-se descoloridos. Provavelmente isto ocorreu porque o tempo de coloração em micro-ondas (13 minutos) é menor que o tempo de coloração em estufa (120 minutos a 30ºC), assim, o período de coloração não foi suficiente para a hidratação dos tecidos, a reativação do metabolismo e a reação com a solução de tetrazolio. Além disso, após 13 minutos em potência média de micro-ondas a temperatura da água atingiu 75ºC, causando a morte das partes do embrião, por isso, a redução dos resultados de viabilidade e de vigor referentes a esses tratamentos (Tabelas 13, 14, 15 e 16).

Na análise dos dados obtidos para o teste de tetrazólio, para a avaliação da viabilidade das sementes durante a primeira época (Tabela 13), para os lotes 1, 3 e 4, os resultados dos tratamentos RAS, CI8min, CI3min e CH60min classificaram as sementes de modo semelhante à classificação obtida no teste de germinação. Para o lote 2, os tratamentos RAS, CI8min e CH60min caracterizaram as sementes como superiores, similar aos resultados do teste de germinação.

O método proposto nas regras para análise de sementes (RAS), embora tenha classificado as sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 de modo similar à classificação obtida no teste de germinação (Tabela 13), não é recomendado em função da possibilidade de causar danos ao embrião durante a remoção dos tegumentos. A utilização do método CS não favoreceu a coloração dos tecidos, pois foram observadas várias sementes descoloridas e com regiões amareladas e brancas no embrião, o que dificultou a classificação das sementes e, por isso, este método não foi considerado adequado. Embora o resultado do tratamento CI8min tenha caracterizado, estatisticamente, a viabilidade das sementes, este método não proporcionou coloração uniforme dos tecidos, dificultando a avaliação da qualidade das sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4.

O resultado do tratamento CI3min (Tabela 13), não caracterizou a qualidade das sementes do lote 2 de modo similar ao do teste de germinação e a coloração dos tecidos não

foi adequada. No entanto, a utilização desse método favoreceu a manutenção da integridade dos tecidos e, assim, facilitou a avaliação do teste e a classificação da viabilidade das sementes dos lotes 1, 3 e 4. Além disso, os resultados desse tratamento classificaram a qualidade das sementes de forma semelhante similar à obtida nos testes utilizados para a caracterização inicial da qualidade das sementes, destacando a superioridade dos lotes 3 e 4 em relação a dos lotes 1 e 2. Os resultados do método CH60min classificaram a qualidade das sementes dos lotes 1, 2 e 3 como inferior e as do lote 4 superior.

Tabela 13 - Valores médios de viabilidade (%), testes de germinação (TG) e de tetrazólio de sementes de algodão, em função dos tratamentos: hidratação, remoção dos tegumentos e coloração a 35ºC (RAS), corte, imersão 8 minutos em micro-ondas e coloração a 40ºC em estufa (CI8min), corte, imersão 3 minutos em micro-ondas e coloração 13 minutos em micro-ondas (CI3min), corte e coloração 13 minutos em micro-ondas (CS), corte, imersão por 60 minutos a 30ºC e coloração 18 minutos em micro-ondas (CH60min), para sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti, para primeira época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
TG	88 abAB	87 aB	92 aAB	95 abA
RAS	90 aB	93 aAB	94 aAB	97 abA
CI8min	96 aA	90 aA	92 aA	98 abA
CI3 min	81 bB	78 bB	91 aA	90 bA
CS	49 cA	47 cAB	42 bB	44 cAB
C60min	91 aB	93 aAB	90 aB	99 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

De acordo com a Tabela 14, os resultados do teste de germinação classificaram a superioridade da qualidade das sementes dos lotes 1 e 4, resultados similares aos dos tratamentos RAS, CI8min, CI3min e CH60min. Para as sementes dos lotes 2 e 3, os resultados dos métodos RAS, CI8min, CI3min classificaram as sementes como superiores, resultados semelhantes aos do teste de germinação. O preparo utilizando o método proposto nas regras para análise de sementes (RAS), embora tenha classificado as sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 de modo similar a do teste de germinação, pode causar danos ao embrião em função da remoção dos tegumentos.

Quando as sementes foram preparadas utilizando o método CI8min (Tabela 14), não houve uniformidade de coloração, e quando utilizado o tratamento CS os embriões

permaneceram descoloridos, o que dificultou a classificação das sementes e, por isso, estes métodos não são recomendados. Por outro lado, além do tratamento CI3min ter proporcionado coloração uniforme dos tecidos e classificado as sementes dos lotes 1, 2 e 4 de forma similar a dos testes de germinação a 18ºC (Tabela 14), esse método destacou as diferenças de qualidade das sementes dos lotes 2, 3 e 4 em relação a do lote 1 , de forma similar à obtida no teste de envelhecimento acelerado (Tabela 12).

Tabela 14 - Valores médios de viabilidade (%), testes de germinação (TG) e de tetrazólio de sementes de algodão, em função dos tratamentos: hidratação, remoção dos tegumentos e coloração a 35ºC (RAS), corte, imersão 8 minutos em micro-ondas e coloração a 40ºC em estufa (CI8min), corte, imersão 3 minutos em micro-ondas e coloração 13 minutos em micro-ondas (CI3min), corte e coloração 13 minutos em micro-ondas (CS), corte, imersão por 60 minutos a 30ºC e coloração 18 minutos em micro-ondas (CH60min), para sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti, para segunda época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
TG	90 aA	90 aA	90 aA	95 aA
RAS	89 aA	89 aA	92 abA	97 aA
CI8min	91 aA	98 aA	92 abA	93 aA
CI3min	84 aB	97 aA	98 aA	96 aA
CS	42 bB	49 cAB	44 cAB	52 bA
CH60min	84 aAB	79 bB	88 bA	91 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados da primeira época de avaliação do teste de tetrazólio, utilizando radiação micro-ondas para a classificação do vigor de sementes de algodão, podem ser observados na Tabela 15. As sementes do lote 1 foram classificadas como as de vigor inferior, de acordo com os resultados dos tratamentos RAS e CI3min, resultado semelhante ao observado para o teste de germinação a 18ºC.

As sementes dos lotes 2 e 3 foram caracterizadas como inferiores pelo teste de germinação a 18ºC, resultado similar ao obtido para o tratamento CI3minpara o lote 2. No entanto, para o lote 3 em nenhum dos tratamentos propostos nessa pesquisa os resultados foram semelhantes aos do teste de germinação a 18ºC. Por outro lado, a classificação das sementes do lote 4, utilizando os métodos RAS, CI8min, CI3min, CH60min, foi similar a do teste de germinação a 18ºC.

O método proposto nas regras para análise de sementes (RAS) não é recomendado em função da possibilidade de causar danos ao embrião durante a remoção dos tegumentos. Já os resultados dos tratamentos CI8min e CH60min (Tabela 15), embora tenham demonstrado semelhança com os resultados obtidos no teste de germinação a 18ºC para o lote 4, não proporcionaram coloração uniforme das partes do embrião, como ocorrido também para o tratamento CS, dificultando a avaliação do vigor das sementes e, por isso, não são recomendados. Embora os resultados do tratamento CI3min não tenham classificado as sementes do lote 3 de forma similar à classificação obtida no teste de germinação a 18ºC (Tabela 15), este método caracterizou a qualidade das sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4, de modo semelhante à classificação obtida no teste de envelhecimento acelerado, caracterizando a qualidade das sementes dos lotes 1 e 2 como inferiores a dos lotes 3 e 4 (Tabela 11). Assim, os resultados desse tratamento reafirmaram a classificação dos lotes observada anteriormente.

Tabela 15 – Resultados dos testes de germinação a 18ºC (%, G18ºC) e de tetrazólio (%), em função dos tratamentos: hidratação, remoção dos tegumentos e coloração a 35ºC (RAS), corte, imersão 8 minutos em micro-ondas e coloração a 40ºC em estufa (CI8min), corte, imersão 3 minutos em micro-ondas e coloração 13 minutos em micro-ondas (CI3min), corte e coloração 13 minutos em micro-ondas (CS), corte, imersão por 60 minutos a 30ºC e coloração 18 minutos em micro-ondas (CH60min), para sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, cultivar BRS 269 - Buriti, na primeira época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
G18 ºC	80 cB	76 bB	75 bB	95 abA
RAS	87 bcA	91 aA	90 aA	93 abA
CI8min	96 aA	87 aB	90 aAB	97 aA
CI3min	80 cB	78 bB	91 aA	88 bA
CS	45 dA	45 cA	41 cA	44 cA
CH60min	91 abB	92 aAB	89 aB	99 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

A utilização de micro-ondas para o preparo das sementes para o teste de tetrazólio, para estimar o vigor, na segunda época, Tabela 16, indicou que os resultados dos tratamentos RAS, CI8min, CI3min e CH60min classificaram as sementes dos lotes 1 e 4 como superiores, de modo semelhante à classificação obtida pelo teste de germinação a 18ºC. As sementes do lote 2 foram classificadas como as de vigor inferior pelos resultados dos tratamentos RAS e

CH60min, resultados semelhantes aos do teste de germinação a 18ºC. Esta classificação foi similar à observada para as sementes do lote 3 avaliadas pelos métodos RAS, CI3min, CH60min.

Tabela 16 - Resultados dos testes de germinação a 18ºC (%, G18ºC) e de tetrazólio (%), em função dos tratamentos: hidratação, remoção dos tegumentos e coloração a 35ºC (RAS), corte, imersão 8 minutos em micro-ondas e coloração a 40ºC em estufa (CI8MIN), corte, imersão 3 minutos em micro-ondas e coloração 13 minutos em micro-ondas (CI3MIN), corte e coloração 13 minutos em micro-ondas (CS), corte, imersão por 60 minutos a 30ºC e coloração 18 minutos em micro-ondas (CH60MIN), para sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 – Buriti, na segunda época de avaliação

Tratamentos	Lotes			
	1	2	3	4
G18 ºC	81 aB	86 bAB	84 bB	93 aA
RAS	82 aBC	81 bC	89 abAB	96 aA
CI8min	89 aB	97 aA	91 abAB	92 aAB
CI3min	84 aB	96 aA	97 aA	95 aA
CS	41 bA	47 cA	44 cA	46 bA
CH60min	82 aBC	78 bC	86 bAB	91 aA

(*)Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Embora o tratamento indicado nas regras (RAS) tenha possibilitado determinar as diferenças de qualidade das sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 quanto ao nível de vigor, a remoção dos tegumentos causou danos ao embrião dificultando a avaliação do teste. Os tratamentos CI8min, CI3min e CS (Tabela 16), não são recomendados por não proporcionarem coloração uniforme dos tecidos que permitisse a avaliação das sementes pelo teste de tetrazólio. Costa e Santos (2010) também verificaram que as sementes de leucena submetidas ao corte lateral, sem remoção do tegumento, não coloriram adequadamente, independentemente da concentração da solução de tetrazólio e do período de coloração utilizados.

Por outro lado, o tratamento CH60min possibilitou diferenciar a qualidade das sementes dos lotes 1, 2, 3 e 4 de forma similar a do teste de germinação a 18ºC e, além disso, houve uniformidade de coloração dos tecidos, facilitando a avaliação do teste. Esse método permitiu, ainda, a classificação da qualidade das sementes, caracterizando a qualidade das sementes dos lotes 1 e 2 como inferiores a do lote 4, resultado similar aos obtidos para os testes de envelhecimento acelerado (Tabela 11) e de frio (Tabela 12).

Deste modo, para a avaliação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio, utilizando radiação micro-ondas, os tratamentos CI3min e CH60min (Tabela 13) e CI3min (Tabela 14) foram considerados os adequados com base nos dados estatísticos e no modo de preparo, tanto na primeira quanto na segunda épocas de avaliação. Para a classificação do vigor, os métodos CI3min e CH60min foram considerados adequados em função dos dados apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente. Os dados de correlação linear entre os testes utilizados para a caracterização do parâmetro fisiológico inicial das sementes de algodão e o teste de tetrazólio estão nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Coeficiente de correlação linear (r) entre os resultados dos cinco tratamentos propostos para o teste de tetrazólio e os dos testes de germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a baixa temperatura (GBT), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP), para classificação da viabilidade das sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti

Tratamentos	Testes					
	G	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
RAS	0,84**	0,76*	0,63 n.s.	0,68 n.s.	0,67 n.s.	0,64 n.s.
CI8min	0.26 n.s.	0,01 n.s.	0,52 n.s.	0,62 n.s.	0,16 n.s.	0,74*
CI3min	0,64 n.s.	0,69 n.s.	0,96**	0,44 n.s.	0,58 n.s.	0,61 n.s.
CS	0 n.s.	0,21 n.s.	0,05 n.s.	0,31 n.s.	0,19 n.s.	0,45 n.s.
CH60min	0,59 n.s.	0,33 n.s.	0,33 n.s.	0,70 n.s.	0,28 n.s.	0,58 n.s.

n.s.= não significativo, **=significativo a 1% de probabilidade e *= significativo a 5% de probabilidade

O resultado do tratamento CI3min, embora não tenha apresentado correlação significativa com os resultados do teste de germinação, relacionou-se com os do teste de envelhecimento acelerado. Os resultados do tratamento CH60min, Tabela 18, tiveram correlação positiva com os do teste de germinação a 18ºC.

Deste modo, os tratamentos CI3min e CH60min são indicados como métodos alternativos ao proposto nas RAS para o teste de tetrazólio em sementes de algodão, pois, permitiram coloração adequada dos tecidos, facilitando a diferenciação da qualidade das sementes em viáveis vigorosas, viáveis e não viáveis e os resultados podem ser obtidos em menor período de tempo do que o método proposto nas RAS.

Tabela 18 – Coeficiente de correlação linear (r) entre os resultados dos cinco tratamentos propostos para o teste de tetrazólio e os dos testes de germinação (G), primeira contagem de germinação (PC), envelhecimento acelerado (EA), germinação a baixa temperatura (G18ºC), frio (FRIO) e emergência da plântula (EP) para classificação do vigor das sementes de algodão, lotes 1, 2, 3 e 4, do cultivar BRS 269 - Buriti

Tratamentos	Testes					
	G18 ºC	PC	EA	G18 ºC	FRIO	EP
RAS	0,61 $^{n.s.}$	0,51 $^{n.s.}$	0,43 $^{n.s.}$	0,50 $^{n.s}$	0,69 $^{n.s.}$	0,49 $^{n.s.}$
CI8min	0,33 $^{n.s.}$	0,02 $^{n.s.}$	0,55 $^{n.s.}$	0,64 $^{n.s.}$	0,09 $^{n.s.}$	0,74*
CI3min	0,59 $^{n.s.}$	0,68 $^{n.s.}$	0,93**	0,36 $^{n.s.}$	0,61 $^{n.s.}$	0,54 $^{n.s.}$
CS	0,07 $^{n.s.}$	0,24 $^{n.s.}$	0,18 $^{n.s.}$	0,40 $^{n.s.}$	0,08 $^{n.s.}$	0,55 $^{n.s.}$
CH60min	0,67 $^{n.s.}$	0,40 $^{n.s.}$	0,45 $^{n.s.}$	0,77*	0,40 $^{n.s.}$	0,68 $^{n.s.}$

$^{n.s.}$= não significativo, **=significativo a 1% de probabilidade e *= significativo a 5% de probabilidade

3 CONCLUSÕES

a) O preparo das sementes do algodoeiro para o teste de tetrazólio pode ser feito pelo corte das sementes seguido da hidratação, por 2h a 30°C, e da coloração em estufa a 40°C.

b) A utilização da radiação micro-ondas é outra opção para o preparo dessas sementes para o teste tetrazólio; o indicado é o corte das sementes seguido da hidratação, por imersão em água por três minutos, e coloração por 13 minutos em potência alta (CI3min) e o corte seguido da hidratação por 60 minutos a 30°C e coloração por 18 minutos em potência média (CH60min).

c) A classificação das sementes em três classes, viável e vigorosa, viável e não viável, é suficiente para estimar a viabilidade e o vigor das sementes do algodoeiro pelo teste de tetrazólio.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO. **Estatística**: produção mundial. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/producao-mundial.aspx>. Acesso em: 23 fev. 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. **Estatisticas**: cultura do algodão. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br/category/estatisticas/#>. Acesso em: 23 fev. 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. East Lasing, 1983. 88 p. (Contribution, 32).

BAYRAM, M.; ONER, M.D.; KAYA, A. Influence of soaking on the dimensions and colour of soybean for bulgur production. **Journal of Food Engineering**, **Gaziantep,** v. 61, n. 3, p. 331-339, 2004.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination.** Berlin: Springer Verlag, 1978. v. 1, 306 p.

_____. **Seeds:** physiology of development and germination. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BHERING, M.C.; 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; VIEIRA, R.D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 8.2, p. 1-8.

BRASIL. Instrução normativa nº 25, de 16 de dezembro de 2005: Padrões para produção e comercialização de sementes de algodão. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 243, Seção 1, p. 2, 2005.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília, 2009. 395 p

BRIGANTE, G.P. Efeitos de épocas de colheita e localização dos frutos na planta sobre a qualidade fisiológica das sementes do algodoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 135-140, 1992.

BYRUM, J. R.; COPELAND, L.O. Variability in vigour testing of maize (*Zea mays* L.) seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 23, n. 2, p. 543-549, 1995.

CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P.; SANTOS; A.A.; MORAIS, M.H. **Detecção e controle de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de graviola (*Annona muricata* L.)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 27).

CERVI, F.; MENDONÇA, E.A.F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Revista brasileira de Sementes,** Londrina, v. 31, n. 1, p. 177-186, 2009.

CHAMMA, H.M.C.P.; NOVEMBRE, A.D.L.C. Teste de tetrazólio para as sementes de milho: período de hidratação e de coloração das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 125-129, 2007.

CICERO, S.M.; VIEIRA, R.D. Teste de frio. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 151-164.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**. Brasília, 2012. 30 p. (Décimo segundo levantamento, Setembro 2012). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_09_18_33_boletim_graos_-_setembro_2012.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2013.

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

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

DELOUCHE, J.C.; POTTS, H.C. **Programa de sementes:** planejamento e implementação. 2. ed. Brasília: AGIPLAN, 1974. 124 p.

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

DIAS, D.C.F.S.; MANTOVANI-ALVARENGA, E. Teste de germinação a baixa temperatura. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 7, p. 1-4.

DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 8.4, p. 1-10.

FAO. **FAOSTAT**: food and agricultural commodities production. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx >. Acesso em: 12 mar. 2013.

FARIA, A.Y.K.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; NETO, D.C. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 1, p. 121-127, 2003.

FOGAÇA, C.A. **Padronização do teste de tetrazólio para a avaliação da viabilidade de sementes de três espécies florestais**. 2003. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2003. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bja/33004102050P5/2003/fogaca_ca_me_jabo.pdf>Acesso em: 28 dez. 2012.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. da. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina : EMBRAPA, CNPSo, 1998.72 p. (EMBRAPA. CNPSo. Documentos, 116).

FRANDOLOSO, V.; TILLMANN, M.A.; BAUDET, L. Determinação do grau de umidade de sementes de cebola, cenoura e tomate em forno de microondas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 48-57, 1998.

GASPAR-OLIVEIRA, C.M. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* l.) pelo teste de tetrazólio** . 2007. 96 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2007.

GASPAR-OLIVEIRA, C.M.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. Métodos de preparo das sementes de mamoneira para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v. 31, n. 1, p. 160-167, 2009.

GRABE, D.F. **Tetrazolium testing handbook.** East Lansing: AOSA, 1970. 62 p. (Contribution, 29).

HOPE, H.J.; MAAMARI, R. Measurement of maize cold tolerance during germination. **Seed Science and Technology**. Zürich, v. 22, n. 1, p. 69-77, 1994.

KOLLER, D.; HADAS, A. Water relations in the germination of seeds. In: LANGE, D.L.: NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p. 401-431. (New Series, 12b).

KRZYZANOWSKI, F.; VIEIRA, R.D.; FRANCA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

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

NOVEMBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P.; GOMES, R.B.R. Viabilidade das sementes de braquiária pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v. 28, n. 2, p. 147-151, 2006.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.

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

SANTOS, V.L.M.; BANCI, C.A; CALIL, A.C.; MENDOZA, R. M.; SILVA, R.F.; SANTOS, C.M. Utilização do teste de tetrazólio na avaliação da germinação e do vigor de sementes de (*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.

SARMENTO H.G.S.; GONÇALVES, M.G.; DAVID, A.M.S.S.; AMARO, H.T.R.; ASSIS, M.O.; MOTA, W.F. Qualidade fisiológica de sementes de pimentão submetidas a diferentes procedimentos de secagem. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. S7875-S7882, 2012.

SILVA, K.R.; VILLELA, F.A. Pré-hidratação e avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 2, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222011000200016>. Acesso em:11 jan. 2013.

VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes**: conceitos e testes Londrina: ABRATES, 1999. cap. 8.1, p.1-13.

ZUCARELI, C.; CAVARIANI, C.; OLIVEIRA, E.A.P.; NAKAGAWA, J. Métodos e temperaturas de hidratação na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 684-692, 2011.