
TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE PINHÃO MANSO

TETRAZOLIUM TEST IN SEEDS OF *Jatrophas curcas* L.

Jeruska Azevedo Moreira BRENHA¹, Naiane Cristina de OLIVEIRA¹, Ana Carina da Silva CÂNDIDO², Amanda Regina GODOY³, Charline Zaratin ALVES⁴

1 – Aluna de graduação do curso de Agronomia do Campus de Chapadão do Sul – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

2 – Doutora em Biologia, Técnica do Laboratório de Análise de Sementes – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

3 – Doutora em Olericultura – Professora do Departamento de Fitotecnia – Campus de Ponta Grossa – Universidade Estadual de Ponta Grossa

4 – Doutora em Tecnologia de Sementes – Professora do Departamento de Agronomia – Campus de Chapadão do Sul – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

RESUMO:

Nos últimos anos, a demanda e a comercialização de sementes de pinhão manso aumentaram, gerando a necessidade do estabelecimento de padrões estaduais e federais e do desenvolvimento de metodologias adequadas para a avaliação da qualidade das sementes. O teste de tetrazólio tem se constituído em importante alternativa, pela eficiência e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor das sementes, permitindo obter resultados em menos de 24 horas. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia para a realização do teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso na avaliação da qualidade fisiológica. A avaliação inicial das sementes de pinhão manso foi efetuada através dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, emergência e índice de velocidade de emergência. Foram realizados dois ensaios; o primeiro foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4, onde foram testados quatro métodos de preparo da semente (semente com tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio, semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio, semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula, semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio) e quatro concentrações da solução de tetrazólio (0,25%; 0,5%; 0,75% e 1,0%). Para a avaliação da viabilidade, as sementes foram seccionadas longitudinalmente no sentido da abertura dos cotilédones. Os resultados mais promissores no primeiro ensaio foram utilizados para a montagem do segundo ensaio, que também foi realizado num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 (três tempos de imersão na solução

de tetrazólio – 2, 4 e 6 horas e três concentrações – 0,25%; 0,5% e 0,75%), sendo que para a avaliação da viabilidade, as sementes foram seccionadas longitudinalmente no sentido transversal da abertura dos cotilédones. O segundo ensaio foi realizado em 2 temperaturas (30°C e 40°C), se constituindo em ensaios independentes. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso deve ser realizado na concentração de 0,5%, num período de 6 horas de imersão, a 40°C. As sementes devem ser pré-embecidas com o tegumento com posterior retirada para a imersão na solução de tetrazólio, utilizando o corte longitudinal no plano transversal da abertura dos cotilédones para a avaliação da viabilidade.

Palavras-chave: *Jatropha curcas* L., vigor, viabilidade.

ABSTRACT:

In recent years, demand and marketing of *jatropha* seeds increased, demanding the establishment of state and federal standards and developing appropriate methodologies for evaluating the quality of seeds. The tetrazolium test has become an important alternative for its efficiency and speed in determining the viability and vigor of the seeds, allowing to obtain results in less than 24 hours. Aiming to standardize a methodology for conducting the tetrazolium test in seeds of *Jatropha curcas* in evaluating the physiological quality. The initial evaluation of *Jatropha curcas* seeds was performed through standard germination, first count germination, emergence and emergence speed index. Two experiments were conducted: the first was conducted in a completely randomized design in a factorial scheme 4 x 4, where were tested four methods of preparation of the seed (seed-coats intact, whole seed, pre-soaked coated seed, coated seed distal cut on the region opposite to the caruncle, and whole seed, pre-soaking without the seed coat) and four concentrations of the tetrazolium (0,25%, 0,5%, 0,75% and 1,0%). For the evaluation of viability, seeds were sectioned longitudinally in the opening of the cotyledons. The most promising results in the first trial were used as samples of the second test, which was also conducted in a completely randomized design in a factorial 3 x 3 (three times of immersion in tetrazolium solution - 2, 4 and 6 hours and three concentrations – 0,25%, 0,5% and 0,75%), being that for the evaluation of the seeds were longitudinally sectioned transverse to the opening of the cotyledons. The second test was conducted at 2 temperatures (30°C and 40°C), being independent trials. Based on these results, it can be concluded that the tetrazolium test in *jatropha* seeds should be carried out at 0,5% concentration, within 6 hours of immersion at 40°C. The seeds should be pre-soaked with the seed coat, followed by its removal for immersion in tetrazolium solution, using the longitudinal cut in the transverse direction of the opening of the cotyledons to evaluate the viability.

Key words: *Jatropha curcas* L., vigor, viability.

1 INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euphorbiaceae, podendo ser cultivado em áreas de solos pouco férteis e de clima desfavorável à maioria das culturas alimentares tradicionais. É uma planta produtora de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em biodiesel. Além de perene e de fácil cultivo, é uma cultura que pode se desenvolver nas pequenas propriedades, com a mão-de-obra familiar disponível, podendo ser utilizada como cultura no arranjo produtivo, tornando-se mais uma fonte de renda para as propriedades rurais (DOURADO, 2009).

Com o incentivo criado pelo governo federal brasileiro a partir do Programa de Biodiesel, o plantio de áreas com essa espécie vem crescendo, tanto por pequenos agricultores como por empresas agrícolas que buscam explorar novos nichos de mercado; isso se deve principalmente às vantagens que o pinhão manso apresenta em relação à mamona (oleaginosa indicada pelo governo como primeira escolha para projetos relacionados à agricultura familiar), como: menor exigência hídrica e nutricional, capacidade de recuperação de áreas degradadas em função de suas raízes profundas, além de apresentar maior produtividade média, de 5 t/ha, enquanto a mamona produz, em média, 2 t/ha (TEIXEIRA, 2005).

Assim, a demanda e a comercialização de sementes de pinhão manso aumentaram, gerando a necessidade do estabelecimento de padrões estaduais e federais e do desenvolvimento de metodologias adequadas para a avaliação da qualidade das sementes (MARTINS et al., 2008).

A semente de qualidade é um componente essencial para o bom desempenho das culturas, considerando que transporta todo o potencial genético da cultivar e é responsável pela perfeita distribuição espacial das plantas no terreno. Além disso, a semente pode constituir-se no principal meio de contaminação das áreas agrícolas por patógenos, pragas e plantas indesejáveis, aspecto que deve ser considerado de grande importância para os agricultores familiares em função da restrição da pequena propriedade (DOURADO, 2009).

A germinação das sementes desta espécie pode ser dificultada pela má qualidade física, fisiológica e sanitária dos lotes, os quais podem apresentar sementes mal formadas, com danos internos ou alta incidência de micro-organismos. Dentro deste contexto, o emprego de testes rápidos, em programas de controle de qualidade, torna-se uma ferramenta imprescindível para a avaliação da qualidade fisiológica de um lote de sementes (GRIS et al., 2007).

O teste de germinação deve seguir um procedimento padrão recomendado pelas Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), publicação oficial que normatiza a análise de sementes, para que a germinação ocorra nas condições ótimas

de cada espécie. No entanto, para pinhão manso, a metodologia deste teste ainda não foi estabelecida nas RAS.

Martins et al. (2008) recomenda uma metodologia para a condução do teste de germinação das sementes de pinhão manso, considerando a avaliação final aos dez dias da semeadura. Porém, não há outras informações sobre o assunto. Nesse sentido, a busca por testes rápidos, que permitam avaliar de maneira eficiente o potencial fisiológico dos lotes, é importante para complementar e agilizar a tomada de decisões durante várias etapas de produção, principalmente, após a maturidade.

Neste contexto, o teste de tetrazólio tem se constituído em importante alternativa, pela eficiência e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor das sementes, permitindo obter resultados em menos de 24 horas (BARROS e MARCOS FILHO, 1990). Esse teste consiste na observação da coloração desenvolvida em diferentes estruturas da semente, permitindo determinar a presença, a localização e a natureza das alterações nos tecidos das sementes (FRANÇA NETO, 1999), além de, muitas vezes, possibilitar a identificação das causas da redução do potencial fisiológico. O teste de tetrazólio também pode suplementar resultados do teste de germinação de lotes com sementes dormentes ao final do teste e diagnosticar causas de deterioração (KRZYZANOWSKI et al., 1999).

A eficiência do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade das sementes depende do desenvolvimento do método adaptado para cada espécie, como a definição de condições apropriadas para o pré-condicionamento, o preparo, a coloração e a avaliação das sementes (PINTO et al., 2009). É importante ressaltar que não há informações consistentes na literatura sobre o teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso.

Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia para a realização do teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso na avaliação da qualidade fisiológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, câmpus de Chapadão do Sul/MS. Foram utilizadas sementes de pinhão manso colhidas na safra de 2010, provenientes do banco de germoplasma estabelecido há três anos em área cedida pela Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Chapadão, localizada no município de Chapadão do Sul-MS (latitude:18°41'33"sul - longitude:52°40'45"oeste; altitude: 810m; precipitação média anual: 1850 mm; temperaturas médias anuais: mínima de 13 e máxima de 28°C).

As avaliações da qualidade inicial das sementes de pinhão manso foram

realizadas através dos seguintes testes: **teste de germinação** - conduzida com quatro subamostras de 50 sementes, distribuídas em papel germitest e dispostas em rolo, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, e colocadas para germinar em BOD regulada a 25°C. As contagens foram realizadas aos cinco e dez dias após a semeadura, segundo Martins et al. (2008); **primeira contagem de germinação** - realizada em conjunto com o teste de germinação, determinando-se a porcentagem de plântulas normais no quinto dia após a sua instalação (MARTINS et al., 2008); **emergência de plântulas** - realizado em casa de vegetação, com quatro subamostras de 50 sementes. As sementes foram distribuídas em bandejas multicelulares de poliestireno expandido de 128 células, empregando-se areia como substrato. As contagens efetuadas 15 dias após a semeadura, permitiram avaliar a porcentagem de emergência das plântulas; **índice de velocidade de emergência** – foi calculada a soma do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da semeadura (MAGUIRE, 1962).

Na busca da padronização de uma metodologia para o teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso, foram conduzidos dois ensaios. No primeiro ensaio, os tratamentos constaram de quatro métodos de preparo da semente e quatro concentrações da solução de tetrazólio (0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%). Os métodos de preparo da semente foram: semente com tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S1), semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2), semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula (S3), semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S4).

Para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio, foram utilizadas duas subamostras de 25 sementes para cada tratamento. As sementes foram preparadas de acordo com os tratamentos e pré-embebidas entre papel germitest umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel seco, por um período de 16 horas em BOD regulada a 30°C. Após a pré-embebição, as sementes foram imersas em solução de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio nas concentrações de 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0%, durante 6 horas, a 30°C, no escuro.

Após esse período, as sementes foram seccionadas longitudinalmente no plano da abertura dos cotilédones e as duas metades foram examinadas. De acordo com a extensão e a intensidade da coloração, a presença de áreas brancas leitosas e a localização dessas áreas em relação às áreas vitais das sementes, os embriões foram individualmente classificados em duas categorias: viáveis e não viáveis, de acordo com os critérios desenvolvidos por Moore (1972).

Os critérios para a escolha dos procedimentos mais adequados para a realização do teste foram em função da facilidade de remoção do tegumento, eficiência de coloração dos embriões (baseados na intensidade e na uniformidade da coloração)

e relações entre os valores obtidos no teste de tetrazólio com os do teste de germinação e emergência.

Os resultados mais promissores no primeiro ensaio foram utilizados para a montagem do segundo ensaio, o qual constou dos seguintes tratamentos: três tempos de imersão das sementes na solução de tetrazólio (2, 4 e 6 horas) e três concentrações (0,25%, 0,50% e 0,75%).

Para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio, foram utilizadas duas subamostras de 25 sementes para cada tratamento. As sementes foram colocadas na pré-embebição com o tegumento, permanecendo assim por 16 horas em BOD regulada a 30°C. Posteriormente, foi retirado o tegumento para a imersão na solução de tetrazólio. A remoção foi realizada pressionando as sementes do lado oposto do embrião, com o auxílio de uma pinça, de forma a causar a ruptura do tegumento com o menor dano possível no endosperma. Após a pré-embebição, as sementes foram imersas em solução de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio nas concentrações de 0,25%, 0,50% e 0,75%, nos tempos de 2, 4 e 6 horas, no escuro, utilizando as temperaturas de 30°C e 40°C, separadamente.

Após cada tempo de imersão, as sementes foram seccionadas longitudinalmente no plano transversal da abertura dos cotilédones e as duas metades foram examinadas, de acordo com a metodologia descrita para o primeiro ensaio.

O delineamento experimental utilizado nas avaliações da qualidade inicial das sementes de pinhão manso foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições de 50 sementes.

Para o primeiro ensaio, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 4x4, ou seja, quatro métodos de preparo da semente x quatro concentrações da solução de tetrazólio. No segundo ensaio, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 3x3, ou seja, três tempos de imersão na solução de tetrazólio x três concentrações, ambos com duas repetições de 25 sementes. Os dados foram submetidos à análise da variância e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Os dados de índice de velocidade de emergência foram transformados em $\sqrt{(X+0,5)}$.

No segundo ensaio não foi feita análise estatística entre as temperaturas testadas, se constituindo em ensaios independentes, onde foi realizada apenas a comparação visual dos tratamentos correspondentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados da avaliação inicial da qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso. Verificou-se uma porcentagem de 46% para a primeira

contagem de germinação e 74% de germinação total. Já o índice de velocidade de emergência obteve um valor de 5,5 e a emergência após 15 dias obteve uma porcentagem de 65%.

TABELA 1 – Qualidade inicial de sementes de *Jatropha curcas* L. avaliada pelos testes de primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência de plântulas (EMERG), em %. Chapadão do Sul (MS), UFMS – CPCS, 2011.

Sementes	PCG	G	EMERG	IVE
de		%		
pinhão manso	46	74	65	5,5
CV (%)	5,5	5,4	5,8	6,2

De acordo com os resultados obtidos no primeiro ensaio, a interação entre métodos de preparo da semente e concentração da solução de tetrazólio foi significativa. Observou-se que não houve coloração da semente com tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S1) em nenhuma das concentrações testadas, indicando que a presença do tegumento impede a penetração da solução de tetrazólio, conferindo ausência de coloração às sementes, havendo a necessidade da retirada do tegumento para coloração das estruturas viáveis.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gris et al. (2007) em sementes de pinhão manso, Oliveira et al. (2005) em sementes de *Tabebuia spp.*, e Oliveira et al. (2006) em sementes de mamona, onde foi observada a necessidade da retirada de todo o tegumento das sementes para a penetração da solução de tetrazólio no embrião, após o tratamento de embebição. A necessidade da remoção do tegumento, como parte do preparo das sementes antes da coloração, também foi relatada para sementes de amendoim (BITTENCOURT e VIEIRA, 1999), algodão (VIEIRA e VON PINHO, 1999), melancia (BHERING et al., 2005), seringueira (WETZEL et al., 1992), sucará (FOGAÇA et al., 2006), guapuruvu (FERREIRA et al., 2007) e guaritá (FOGAÇA, 2003).

Na Tabela 2, verificou-se que na concentração de 0,25%, a semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2) foi o que permitiu obter uma maior viabilidade das sementes de pinhão manso, não diferindo estatisticamente da semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula (S3) e semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S4). Já na concentração de 0,50%, a semente inteira, embebição com o tegumento (S2) não diferiu estatisticamente da semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S4), porém

diferiu da semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula (S3) e também da semente com tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S1).

Na concentração de 0,75%, a semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2) e semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula (S3) não diferiram entre si, porém diferiram da semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S4) e da semente com tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S1); e na concentração de 1,0%, a semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2) foi superior estatisticamente aos demais. Entretanto, observa-se que em todas as concentrações testadas, a semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2) foi superior numericamente aos demais tratamentos, o que justifica esse tratamento no segundo ensaio.

TABELA 2. Dados médios obtidos para viabilidade (%) de sementes de *Jatropha curcas* L. nos diferentes métodos de preparo da semente (S1- semente com tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio, S2- semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio, S3- semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula, S4- semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio) em função das concentrações da solução de tetrazólio (C1- 0,25%, C2- 0,50%, C3- 0,75%, C4-1,0 %). Chapadão do Sul (MS), UFMS – CPCS, 2011.

Métodos de preparo da semente	Concentração da solução de tetrazólio (%)			
	0,25	0,50	0,75	1,00
S1	0 b*	0 c	0 c	0 d
S2	24 a	35 a	44 a	40 a
S3	18 a	22 b	38 a	17 c
S4	22 a	34 a	28 b	30 b
CV (%)	5,4	5,2	4,8	5,7

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Observa-se na Figura 1, que para a semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2), os dados se

ajustaram a um modelo de equação quadrática ($R^2 = 0,9731$), sendo que até a concentração de 0,75% houve um aumento, em média, de 9,5% na visualização da viabilidade a cada aumento de 0,25% na concentração. Já para a semente com tegumento e corte distal na região oposta à carúncula (S3) e semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S4), os dados se ajustaram a uma equação de terceiro grau.

Verificou-se também que para a semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2) e semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula (S3), a partir da concentração de 0,75% foi observado um decréscimo na visualização da viabilidade das sementes de pinhão manso. Este fato pode ser justificado pelo fato da concentração de 1,0% ter colorido intensamente as estruturas da semente, dificultando a diferenciação de tecidos mais vigorosos daqueles em processo de deterioração.

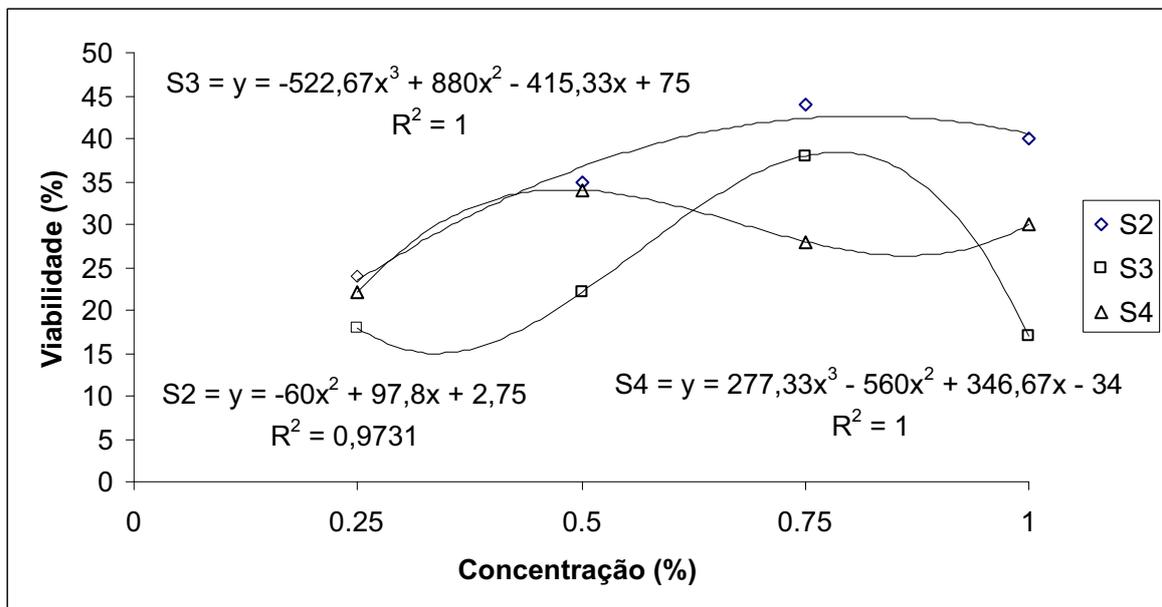


FIGURA 1: Porcentagem média de visualização da viabilidade (%) de sementes de pinhão manso nos diferentes métodos de preparo da semente em função da concentração da solução de tetrazólio. S2 – semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio; S3 – semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula; S4 – semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio. Chapadão do Sul (MS), UFMS – CPCS, 2011.

Dentre as concentrações utilizadas para semente com o tegumento na pré-embebição e sem o tegumento na imersão na solução de tetrazólio (S2), observou-se que as concentrações de 0,50% e 0,75% possibilitaram uma visualização mais nítida dos tecidos vivos do embrião. A concentração de 0,25% não possibilitou uma análise

adequada pela pouca coloração conferida às sementes.

Com relação ao método de preparo, verificou-se que a semente com o tegumento na pré-embebição e corte distal na região oposta à carúncula (S3) não foi adequado, pois houve pouca ou nenhuma coloração do embrião em todas as concentrações testadas, onde podemos inferir que a solução de tetrazólio não conseguiu atingir o embrião com eficiência, conferindo uma maior coloração ao redor do corte, justamente onde houve o dano mecânico para a entrada da solução.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gaspar-Oliveira (2011) em sementes de mamona, onde no preparo mediante corte longitudinal diagonal na região distal da carúncula, as sementes não apresentaram coloração na região central do tecido de reserva e no embrião, somente as regiões periféricas das sementes, que tiveram contato direto com a solução de tetrazólio, ficaram coloridas. Considerando que o embrião está localizado na parte interna da semente e é a principal estrutura a ser analisada na avaliação da viabilidade e do vigor no teste de tetrazólio, esse método de preparo se mostrou ineficiente. Já Gris et al. (2007), em sementes de pinhão manso, verificaram que o melhor método de preparo da semente para o teste de tetrazólio é a retirada do tegumento e corte distal na região oposta à carúncula. Oliveira et al. (2006) em sementes de mamona, recomendaram o corte em bisel e corte nas laterais das sementes de mamona.

Para semente sem o tegumento na pré-embebição e na imersão na solução de tetrazólio (S4), todas as concentrações testadas foram eficientes, com exceção da concentração de 1,0%. Porém, verificou-se que esse método de preparo também não foi adequado, pois no momento do corte das sementes para a leitura do teste de tetrazólio, houve uma grande quantidade de sementes quebradas devido à força mecânica imposta para a retirada do tegumento, que estava mais rígido, tendo em vista que as sementes não foram embebidas em água antes da retirada do mesmo.

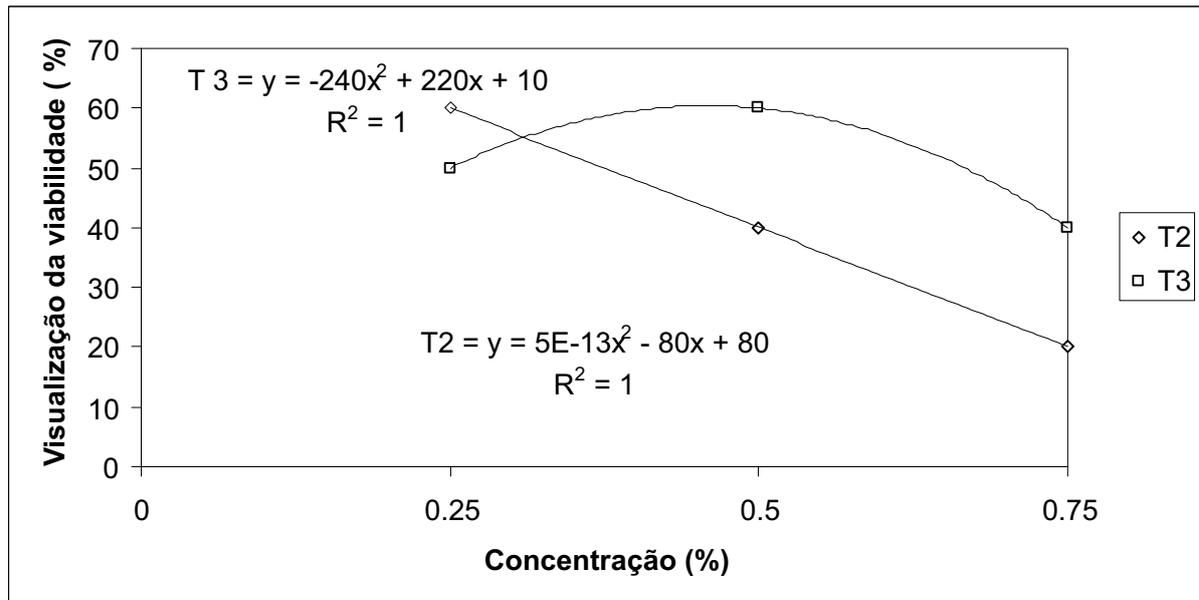
Diante dos resultados obtidos, verificou-se que o melhor método de preparo é com a semente inteira, embebição com o tegumento com posterior retirada para a imersão na solução de tetrazólio. As concentrações mais promissoras foram 0,25%, 0,50% e 0,75%. Sendo assim, esses resultados foram escolhidos para a montagem do segundo ensaio.

De acordo com os dados obtidos no segundo ensaio na temperatura de 30°C, observou-se que a interação entre tempo e concentração foi significativa. Observa-se na Figura 2, que no tempo de 4 horas de imersão, os dados se ajustaram a um modelo de equação linear ($R^2 = 1$), sendo que a medida em que se aumentou a concentração, diminuiu a porcentagem de visualização da viabilidade, sendo essa redução em média, de 20% a cada aumento de 0,25% na concentração.

Já para o tempo de 6 horas de imersão, os dados se ajustaram a um modelo de equação quadrática ($R^2 = 1$), sendo que até a concentração de 0,50% houve um

aumento, em média, de 10% na visualização da viabilidade a cada aumento de 0,25% na concentração. A partir de 0,50% foi observado um decréscimo na visualização de viabilidade das sementes de pinhão manso.

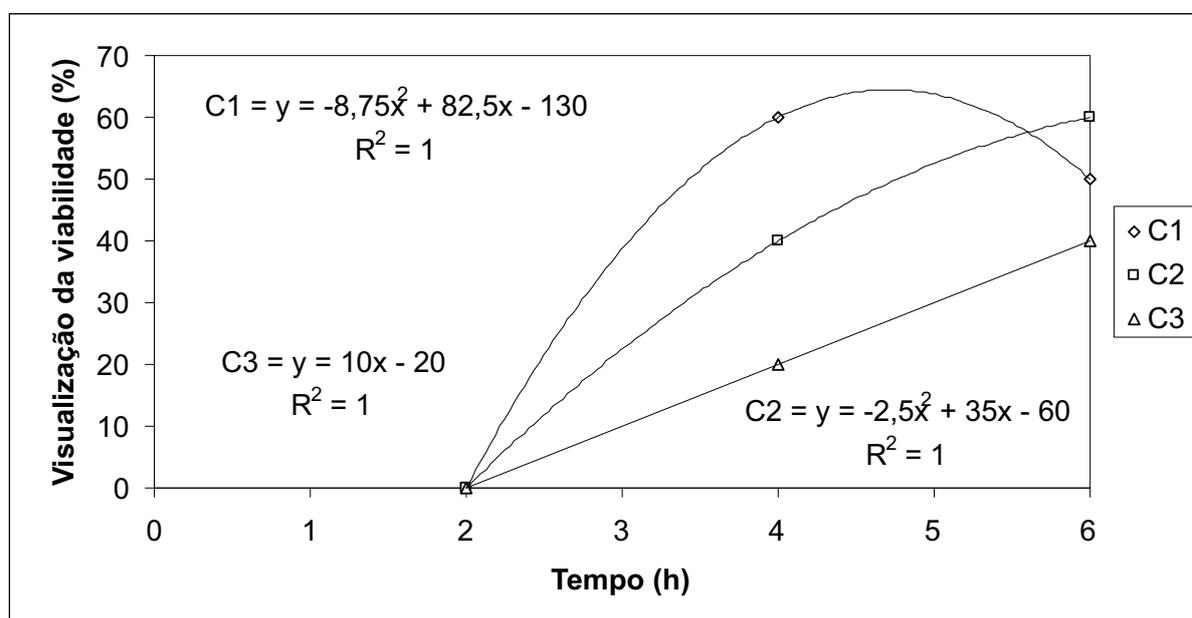
FIGURA 2: Porcentagem média de visualização da viabilidade (%) de sementes de pinhão manso nos diferentes tempos na solução de imersão em função da concentração da solução de tetrazólio. Chapadão do Sul (MS), UFMS – CPCS, 2011.



Observa-se na Figura 3, que para a concentração de 0,25%, os dados se ajustaram a um modelo de equação quadrática ($R^2 = 1$), sendo que no tempo de 2 horas não houve coloração das sementes, indicando ser necessário um tempo de permanência maior das sementes na solução de tetrazólio. O tempo de 4 horas indicou uma visualização da viabilidade de 60%, havendo decréscimo quando o tempo de imersão foi aumentado para 6 horas.

Para a concentração de 0,50%, verificou-se que os dados se ajustaram a um modelo de equação quadrática ($R^2 = 1$), sendo que novamente no tempo de 2 horas não houve coloração das sementes. Houve um aumento na visualização da viabilidade na medida em que se aumentou o tempo de imersão na solução de tetrazólio, com um máximo de 60% no tempo de 6 horas. Já para a concentração de 0,75%, observou-se que os dados se ajustaram a um modelo de equação linear ($R^2 = 1$), sendo que também no tempo de 2 horas não houve coloração das sementes. Houve um aumento na visualização da viabilidade na medida em que se aumentou o tempo de imersão na solução de tetrazólio, em média de 20% a cada aumento de 0,25% na concentração, com um máximo de 40% no tempo de 6 horas.

FIGURA 3: Porcentagem média de visualização da viabilidade (%) de sementes de pinhão manso nas diferentes concentrações testadas em função do tempo de imersão na solução de tetrazólio. Chapadão do Sul (MS), UFMS – CPCS, 2011.

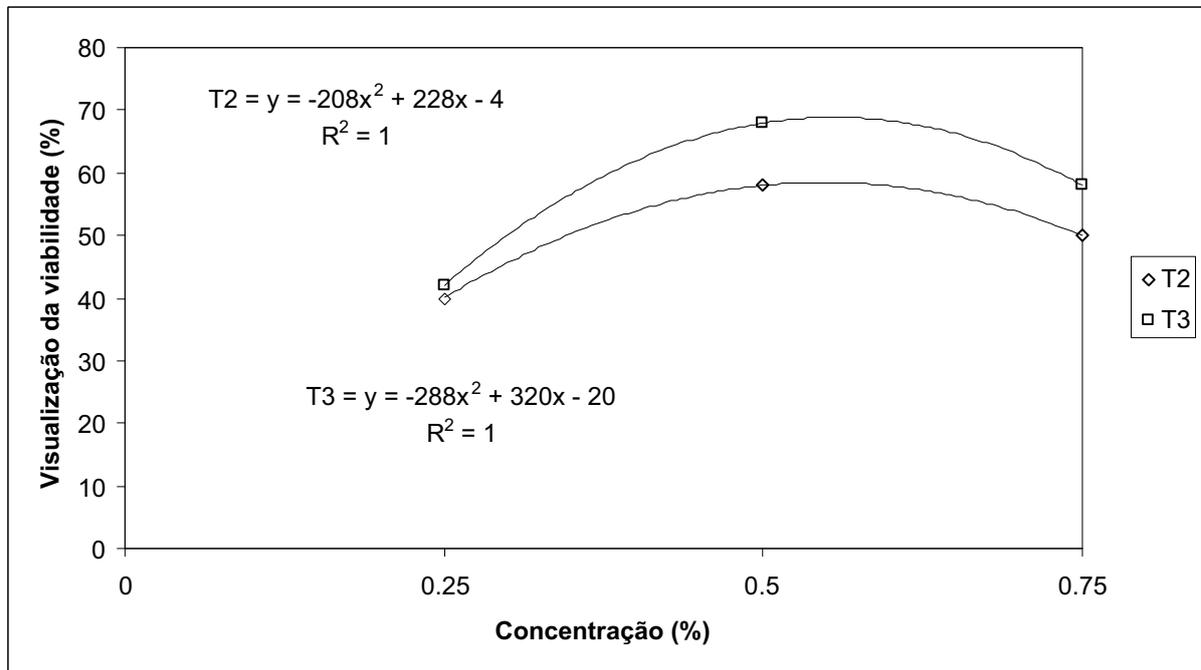


Verificou-se que o tempo de 2 horas de imersão na solução de tetrazólio não foi suficiente para colorir as estruturas vivas da semente, independente da concentração utilizada. Resultados contraditórios foram encontrados por Dantas et al. (2009), onde os autores verificaram que o tempo de 2 horas de imersão na solução de tetrazólio numa concentração de 0,1% a 30°C foi suficiente para avaliar a viabilidade das sementes de pinhão manso.

Comparando visualmente as concentrações utilizadas no tempo de 4 horas de imersão no tetrazólio, observou-se que a concentração de 0,25% possibilitou uma visualização mais nítida dos tecidos vivos do embrião. As concentrações de 0,50% e 0,75% coloriram intensamente as estruturas, dificultando a diferenciação de tecidos mais vigorosos daqueles em processo de deterioração. Já para o tempo de imersão de 6 horas, as concentrações de 0,25% e 0,50% foram mais adequadas comparadas com a concentração de 0,75%, que coloriu intensamente as estruturas das sementes. Estes resultados concordam com as observações feitas por Oliveira et al. (2006), verificando-se que o tempo de 6 horas na concentração de 0,50% a 30°C foi o mais indicado para a avaliação do teste de tetrazólio em sementes de mamona.

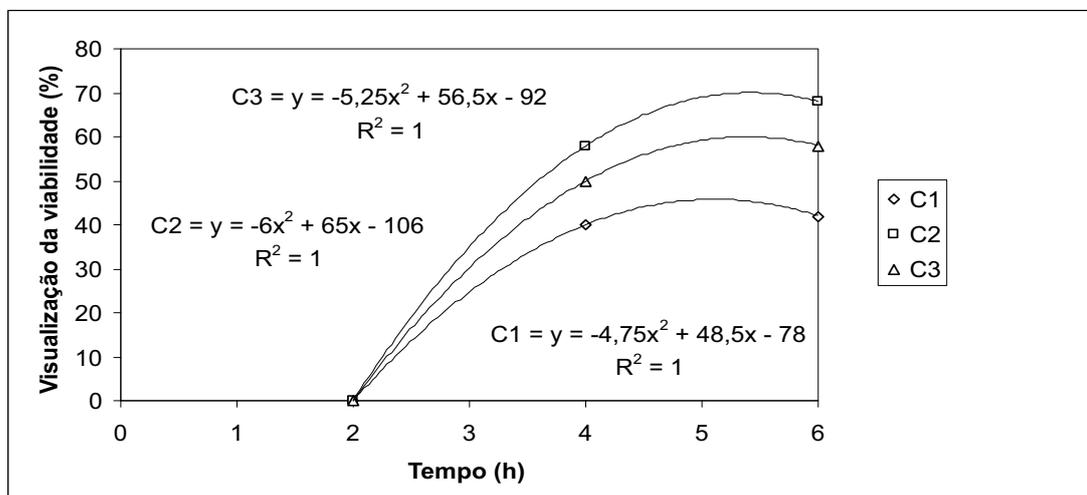
De acordo com os dados obtidos no segundo ensaio na temperatura de 40°C, observou-se que a interação entre tempo e concentração foi significativa. Observa-se na Figura 4, que nos tempos de 4 horas e 6 horas de imersão, os dados se ajustaram a um modelo de equação quadrática ($R^2 = 1$), havendo um máximo de viabilidade com a concentração de 0,50%. As concentrações de 0,25 e 0,75% se mostraram inadequadas para avaliação do vigor das sementes de pinhão manso.

FIGURA 4: Porcentagem média de visualização da viabilidade (%) de sementes de pinhão manso nos diferentes tempos de imersão em função da concentração da solução de tetrazólio. Chapadão do Sul (MS), UFMS – CPCS, 2011.



Verificou-se que para todas as concentrações testadas, o tempo de 2 horas de imersão na solução de tetrazólio foi insuficiente para a coloração das sementes. Na Figura 5, observou-se que as concentrações testadas seguiram o mesmo padrão de equação quadrática ($R^2 = 1$), sendo que à medida em que se aumentou o tempo de imersão, aumentou-se a visualização da viabilidade das sementes, apresentando um máximo de 68% de viabilidade para a concentração de 0,50% no tempo de 6 horas.

FIGURA 5: Porcentagem média de visualização da viabilidade (%) de sementes de pinhão manso nas diferentes concentração em função do tempo de imersão na solução de tetrazólio. Chapadão do Sul (MS), UFMS – CPCS, 2011.



Observou-se, de maneira geral, que o tempo de 6 horas de imersão na solução de tetrazólio e a concentração de 0,50% foi o que permitiu uma melhor coloração e visualização das estruturas vivas da semente de pinhão manso, além de aproximar o valor da viabilidade (68%) dos resultados obtidos para germinação (74%) e emergência (65%), encontrados na Tabela 1. A concentração de 0,25% não se mostrou adequada pela pouca pigmentação das estruturas das sementes, e a concentração de 0,75% coloriu intensamente, dificultando a diferenciação de tecidos mais vigorosos daqueles em processo de deterioração. Esses resultados estão de acordo com Pinto et al. (2009), em sementes de pinhão manso, Wetzel et al. (1992) em sementes de seringueira, que também constataram que a concentração de 0,50% foi o mais adequado para a realização do teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso.

De acordo com Grabe (1976), a precisão do teste de tetrazólio não é afetada por temperaturas entre 20 e 45°C, mas a coloração se estabelece mais rapidamente nas temperaturas mais elevadas. Os resultados deste trabalho estão de acordo com Wetzel et al. (1992) em sementes de seringueira, França Neto et al. (1998) em sementes de soja, e Bittencourt e Vieira (1997) em sementes de amendoim, que recomendaram o uso da temperatura de 40°C para o teste de tetrazólio.

4. CONCLUSÕES

O teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso deve ser realizado na concentração de 0,50%, num período de 6 horas de imersão, a 40°C.

As sementes devem ser pré-embebidas com o tegumento com posterior retirada para a imersão na solução de tetrazólio, utilizando o corte longitudinal no plano transversal da abertura dos cotilédones para a avaliação da viabilidade.

5. REFERÊNCIAS

BARROS, A.S.R.; MARCOS FILHO, J. Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.10, p.1447-1459, 1990.

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

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

BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇANETO, J.B **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.8, p.2.1-2.8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 365p.

DANTAS, B. F.; SOUZA, Y.A. de; OLIVEIRA, D.A. B. de; LIRA, M. A. P.; ARAÚJO, M. N.; LOPES, A. P.; SILVA, F. F. S.; REIS, R. C. R. Teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO, 1., Brasília, 2009. **Anais...** Brasília: Embrapa Agroenergia: ABPPM, 2009. p.26-27.

DOURADO, F. W. N. **Avaliação da qualidade de sementes e plântulas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2009. 90p. Dissertação de Mestrado, UESB, Vitória da Conquista.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional).

FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, L.M.; TONETTI, O.A.O.; DAVIDE, A.C. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell) Blake – Leguminosae Caesalpinaceae, pelos testes de germinação e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p. 83-89, 2007.

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

FOGAÇA, C.A. **Padronização do teste de tetrazólio para a avaliação da viabilidade de sementes de três espécies florestais**. 2003. 53p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <<http://www.athena.biblioteca.unesp.br>> Acesso em: 23 mai. 2011.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. da. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In:

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8.1 a 8.7.

GASPAR-OLIVEIRA, C.M.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. Pré-condicionamento de sementes de mamoneira para o teste de tetrazólio. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.33, n.2, p.303-311, 2011.

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

GRIS, C. F.; CARVALHO, M. L. M. de; OLIVEIRA, A.dos S. **Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica em sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2007 Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/caracterizacao/2.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2011.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes. Comitê de Vigor de Sementes. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-7, 1962.

MARTINS, C.C.; MACHADO, C.G.; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação em sementes de pinhão manso. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.863-868, 2008.

MOORE, R.P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, v. 44, n. 3, p. 22-24, 1972.

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

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; CALDEIRA, C. M.; SILVA, C. D.; SILVA, D. G. Teste de Tetrazólio em Sementes de Mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., Aracaju, 2006. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. CD-ROM.

PINTO, T.L.F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V.A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F.G. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.195-201, 2009.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, 2005.

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

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