

DANIELLA INÁCIO BARROS

**TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ABÓBORA E ABOBRINHA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002**

DANIELLA INÁCIO BARROS

**TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ABÓBORA E ABOBRINHA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

APROVADA: 25 de fevereiro de 2002.

Prof. Eduardo Fontes Araújo
(Conselheiro)

Prof. Mário Puiatti

Profª Maria Laene M. de Carvalho

Prof. Roberval Daiton Vieira

Profª Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias
(Orientadora)

A Deus.

Aos meus pais Anísio Inácio dos Reis e Maria Raimunda Inácio Barros.

Aos meus avós Didácio Coutinho Barros e Anália Rocha Barros.

Ao meu noivo Helber Véras Nunes.

Dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida, força e presença em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Empresa Hortíceres, pelo fornecimento das sementes.

À Professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela amizade, compreensão, confiança, orientação e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos Conselheiros Luiz Antônio dos Santos Dias e Eduardo Fontes Araújo, pela disponibilidade, paciência e contribuição na elaboração deste trabalho.

Aos Professores Mário Puiatti, Roberval Daiton Vieira e Maria Laene Moreira de Carvalho, pela disposição em participar da banca examinadora.

A Pesquisadora Maria Carmen Bhering, pela sincera amizade, pela convivência, confiança, pelo apoio, estímulo no decorrer do curso e principalmente pela orientação e experiência na pesquisa com tetrazólio.

Ao Pesquisador Jorge Magalhães, pela amizade, pela atenção e pelo incentivo.

À Professora Eveline Mantovani Alvarenga, pela amizade, sugestões e incentivo.

Aos Professores Glauco Vieira Miranda e Joenes Mucci Peluzio, pela amizade, confiança, estímulo e atenção.

A Mara Rodrigues e Vicente Madaleno dos Santos, pela amizade, pela atenção e disposição em todos os momentos.

Aos laboratoristas da Fitotecnia do Setor de Sementes José Eduardo e Marcos, pelo convívio agradável e pela ajuda.

A amiga Raquel pela ajuda, disposição, atenção e incentivo em todos os momentos.

As colegas Josete e Marlei, pela amizade, pelo incentivo e pelo apoio constante.

A todos os colegas do curso de Fitotecnia, pelo carinho e pelo convívio.

Aos amigos Ronaldo Coimbra, Gilmar Vieira, Izabel Cristina pelo estímulo e pelo convívio agradável.

Aos amigos Maria Neusa e José Nilson, pela amizade, pela atenção, pelo carinho, pelo apoio e pelas orações.

Aos meus pais, Anísio Inácio dos Reis e Maria Raimunda Inácio Barros por terem me dado a vida, me preparado para o mundo, pela compreensão, orgulho, apoio infinito e pelo amor e confiança.

Aos meus avós, Didácio Coutinho Barros e Anália Rocha Barros pelo amor, pela ajuda financeira, pela confiança e pelo apoio constante.

A minha tia Maria Ângela dos Reis (Tequinha), pelo amor, carinho, compreensão, ajuda constante e por todas as orações.

Aos meus sogros, Raimundo Nonato de Souza Nunes e Maria das Graças Vêras Nunes, pelo amor, pelo carinho, pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu noivo, Helber Vêras Nunes, por compartilhar juntos tempos difíceis e bons pelo amor que nos une, pela confiança, pela compreensão e pelo convívio harmonioso.

Enfim, a todos os que nesta longa caminhada, com momentos alegres e difíceis, me ajudaram, se não com ações, com gestos e exemplos meu reconhecimento e gratidão.

BIOGRAFIA

DANIELLA INÁCIO BARROS, filha de Anísio Inácio dos Reis e Maria Raimunda Inácio Barros, nasceu em Gurupi, Estado do Tocantins, em 07 de julho de 1975.

Realizou o curso primário na Escola Presbiteriana, em Gurupi, Tocantins, e concluiu o segundo grau no Colégio Bernardo Sayão, em Gurupi, TO.

Em Janeiro de 1999, graduou-se em Agronomia, pela Universidade do Tocantins (Unitins).

Em agosto de 1999, iniciou o programa de mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa-MG, sob a orientação do Prof^a Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Em março de 2002, iniciou o programa de doutorado em Agronomia na Universidade Federal da Paraíba em Areia-PB.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A semente e a plântula das cucurbitáceas.....	3
2.2. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes	4
2.3. Teste de Tetrazólio	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Caracterização da qualidade fisiológica dos lotes.....	13
3.1.1. Teste de germinação (TG)	13
3.1.2. Emergência de plântulas em areia (EPA)	14
3.1.3. Envelhecimento acelerado (EA).....	14
3.2. Estudo do teste de tetrazólio (TTZ).....	15
3.2.1. Preparo da solução	15
3.2.2. Número de sementes por lote	15
3.2.3. Pré-condicionamento e preparo das sementes	16
3.2.4. Coloração das sementes.....	17
3.2.5. Interpretação do teste	18
3.2.6. Procedimento estatístico	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Desenvolvimento da metodologia do teste	20
4.1.1. Definição do método de pré-condicionamento e do período de coloração	20
4.1.2. Estabelecimento das classes de viabilidade e vigor	23
4.1.2.1. Sementes de abóbora.....	24
4.1.2.2. Sementes de abobrinha.....	38
4.2. Aplicabilidade do método	50

4.2.1. Abóbora	50
4.2.2. Abobrinha	53
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

BARROS, Daniella Inácio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abóbora e abobrinha.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Conselheiros: Eduardo Fontes Araújo e Luiz Antônio dos Santos Dias.

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Sementes do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com o objetivo de desenvolver metodologia apropriada para o uso do teste de tetrazólio em sementes de abóbora (*Cucurbita moschata*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*) visando determinar a viabilidade e o vigor e também correlacionar os resultados do teste de tetrazólio com aqueles obtidos nos testes de germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em areia. Foram utilizados lotes comerciais de sementes de abóbora (variedade Menina Brasileira) e abobrinha (híbrido Atlanta AG 303, híbrido Clarinda AG 135 e variedade Caserta) que foram caracterizados quanto à qualidade fisiológica e submetidos a diversos estudos preliminares visando determinar o método de pré-condicionamento e o período de coloração mais adequados para a condução do teste de tetrazólio com sementes destas espécies. Foram testados os seguintes procedimentos: umedecimento em papel toalha durante 16 e 24 horas em germinador a 25°C, imersão direta em água em câmara de germinação tipo BOD a 40°C por períodos de 15, 30 e

60 minutos para a remoção do tegumento e para a retirada da membrana interna que envolve o embrião, por mais 30 e 60 minutos. As sementes foram então imersas em solução de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio por 30, 60 e 90 minutos em BOD a 40 °C para coloração. Cada amostra submetida ao teste de tetrazólio foi também avaliada quanto à germinação e ao vigor das plântulas estabelecendo-se cinco classes de viabilidade e vigor sendo: classe 1 – sementes viáveis de alto vigor; classe 2 – sementes viáveis de baixo vigor; classe 3 – sementes viáveis não vigorosas; classe 4 – sementes não viáveis e classe 5 – sementes mortas. Cada semente avaliada foi incluída em uma das cinco classes e os danos e lesões foram descritos. O potencial de vigor (1-2) foi determinado pelo somatório das sementes das classes 1 e 2 e a viabilidade pela soma das sementes das classes 1 e 3. Desenvolvida a metodologia, esta foi aplicada a diferentes lotes comerciais de sementes de abóbora e abobrinha e aferida com os resultados do teste de germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em areia. Os resultados permitiram concluir que: o teste de tetrazólio mostrou-se eficiente para avaliar a viabilidade e o vigor de sementes de abóbora e abobrinha. Para tanto, o método de pré-condicionamento mais eficiente foi a imersão direta em água a 40°C por 30 minutos para a remoção do tegumento e por mais 30 minutos para a retirada da membrana interna após o corte na extremidade superior dos cotilédones. A coloração ideal das sementes foi obtida após 60 minutos de imersão em solução de tetrazólio a 0,075%, em BOD a 40°C. Foram obtidas correlações positivas e significativas entre os resultados dos testes de tetrazólio, de germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em areia.

ABSTRACT

BARROS, Daniella Inácio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2002. **Tetrazolium tests for evaluating physiological quality of pumpkin and squash seeds.** Advisor: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias. Committee members: Eduardo Fontes Araújo and Luiz Antônio dos Santos Dias.

This work was done in the Seed Research Laboratory of the Agronomy Department, Universidade Federal de Viçosa (UFV), to develop an appropriate tetrazolium method for testing viability and vigor of pumpkin (*Cucurbita moshata*) and squash (*Cucurbita pepo*) seeds, and also to correlate the tetrazolium test results with the tests of germination, accelerated aging and seedling emergence in sand. Commercial seed lots of pumpkin (cultivar Menina Brasileira) and squash (hybrid Atlanta AG 303, hybrid Clarinda AG 135 and cultivar Caseta) were tested for physiological quality and different preliminary studies were done to find an appropriate method of pre-conditioning and coloration period for conducting the tetrazolium test. Following procedures were tested: seed moistening in wet paper towel for 16 to 24 h in a germinator at 25°C; immersion in water for 15, 30, and 60 minutes at 40°C for removal of the tegument, and for 30 and 60 minutes for removal of embryo surrounding internal membrane. The preconditioned seeds were then immersed for 30, 60, and 90 minutes in 2,3,5, triphenyl chloride tetrazolium solution at 40°C for

coloration. Each sample tested with tetrazolium was also evaluated for germination and seedling vigor, which established 5-classes of viability and vigor: class 1- viable seed with high vigor; class 2- viable seeds with low vigor; class 3 - nonvigorous viable seeds; class 4 - unviable seeds and class 5 - dead seeds. Each evaluated seed was allotted to one class and the damage and the lesions were described. The vigor potential (1-2) was determined by adding the number of seeds in classes 1 and 2 and the viability by summing the classes 1 to 3. The final procedure was applied to different commercial seed samples of both the species, and the results were validated by germination, accelerated aging and seedling emergence in sand tests. The tetrazolium test was efficient for evaluating the viability and the vigor of pumpkin and squash seeds. The ideal preconditioning was Immersion in water for 30 minutes at 40°C, for removal of the tegument and followed by 30 minutes for the internal membrane removal, which was best done by cutting the tip of the cotyledons. The ideal coloration was obtained after 60 minutes immersion in a 0.075% tetrazolium solution at 40°C. There were positive significant correlations between tetrazolium tests, and germination, accelerated aging and seedling emergence in sand.

1. INTRODUÇÃO

A produção de sementes de hortaliças no Brasil pode ser considerada uma atividade recente, pois até 15 anos atrás, a maior parte da demanda de sementes era suprida pela importação.

Sabe-se que o objetivo fundamental de um sistema de produção de sementes é a obtenção de materiais de elevada qualidade física, fisiológica, genética e sanitária, permitindo que as características desejáveis dos cultivares obtidos pela pesquisa sejam disponíveis aos agricultores.

Desta forma, é de grande importância o desenvolvimento de testes para avaliação da qualidade das sementes que permitam estimar não só o seu desempenho em campo como também o seu potencial de armazenamento, diminuindo riscos e prejuízos decorrentes da comercialização de lotes de má qualidade.

Na atualidade, um dos aspectos de maior interesse, quando se avalia a qualidade fisiológica das sementes, refere-se à obtenção de resultados confiáveis em período de tempo relativamente curto. A utilização de testes rápidos para avaliar a qualidade das sementes é importante principalmente para agilizar decisões quanto ao manejo de lotes durante as etapas de pós-colheita das sementes.

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes é feita pelo teste de germinação que é o método oficial, sendo conduzido rotineiramente em laboratório sob condições ótimas, de modo que os resultados expressam a

máxima germinação do lote; porém, para a obtenção dos resultados são necessários, em média, de 8 a 14 dias para a maioria das espécies de hortaliças. Além disso, este teste não fornece informações seguras que permitam a diferenciação de lotes quanto ao vigor. Torna-se necessário, portanto, o desenvolvimento de testes seguros e rápidos, adaptados para tais espécies, que avaliem a viabilidade e o vigor, e que forneçam informações complementares àquelas fornecidas pelo teste de germinação.

O teste de tetrazólio é um teste que já vem sendo estudado desde a década de 30 por diversos pesquisadores, permitindo a rápida avaliação da viabilidade das sementes. Este teste tem mostrado se como alternativa promissora pela rapidez e precisão na determinação da viabilidade e do vigor, sendo adotado no Brasil, particularmente para sementes de soja, braquiária e café. Em sementes de soja, além de possibilitar a avaliação da qualidade em poucas horas, o teste de tetrazólio permite diagnosticar, conforme as lesões e sintomas presentes nos tecidos das sementes, as principais causas da perda da qualidade.

Apesar de seu potencial de utilização, seu uso ainda está restrito a poucas espécies como soja, feijão, milho, algodão e gramíneas forrageiras entre outros. Na indústria de sementes de hortaliças, o teste de tetrazólio ainda não tem uso generalizado, principalmente pela carência de informações sobre a metodologia mais adequada para as diferentes espécies.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver metodologia apropriada para o uso do teste de tetrazólio em sementes de abóbora e abobrinha, visando determinar a viabilidade e o vigor, correlacionando os resultados do teste de tetrazólio com os resultados de germinação e vigor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A semente e a plântula das cucurbitáceas

Para o estudo do teste de tetrazólio é importante e necessário o conhecimento das estruturas das sementes e das plântulas da espécie em estudo. Esse conhecimento é essencial para a preparação correta das sementes para a realização do teste e para a interpretação de seus resultados.

Os elementos básicos das estruturas da semente são tegumento, embrião e tecido de reserva. Mas do ponto de vista funcional, elas são constituídas por casca (cobertura protetora), eixo embrionário e tecido de reserva, que pode ser cotiledonar, endospermático ou perispermático (POPINIGIS, 1985 e CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

A cobertura protetora é a estrutura externa da semente, sendo constituída por camadas celulares originárias dos integumentos do óvulo. O eixo embrionário é constituído de três partes: o epicótilo ou plúmula, situada acima do ponto de ligação dos cotilédones ao eixo, parte que dará origem ao caule e as folhas das plantas; a radícula, localizada na parte inferior do eixo e que resulta na raiz primária quando a semente germina; e o hipocótilo, situado entre a radícula e o ponto de inserção dos cotilédones. Como a radícula não está bem diferenciada do hipocótilo, esse conjunto é chamado de eixo hipocótilo-radícula que apresenta forma variada sendo, em cucurbitáceas, plano e triangular. O eixo embrionário é a parte vital da semente, tem função

reprodutiva, por possuir tecidos meristemáticos com capacidade de divisão celular. É chamado de eixo porque se desenvolve nos dois sentidos, o das raízes e o do caule.

As sementes de *Cucurbita moschata* (abóbora) e *Cucurbita pepo* (abobrinha) são constituídas basicamente de tegumento (cobertura protetora) e embrião, que compreende o eixo embrionário (eixo hipocótilo-radícula) e os dois cotilédones, nos quais se localizam as reservas da semente (ESAÚ, 1974). Os cotilédones juntamente com o eixo embrionário formam o embrião, que preenche o interior da semente e apresenta-se coberto por uma membrana fina (consistência de papel) aderente. Segundo DELOUCHE et al. (1976) esta membrana representa o endosperma destas sementes. WELBAUM & BRADFORD (1990) e WELBAUM (1999) afirmam que o embrião das sementes de melão (*Cucumis melo*) está envolto em um envelope membranoso constituído por 2 a 4 camadas de células, representando o endosperma. Estes autores se referem a esta membrana como endosperma/perisperma, a qual é permeável à água, mas representa uma barreira à difusão de solutos.

2.2. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes é fundamental e importante para os diversos segmentos que compõem um sistema de produção, pois a identificação de fatores que possam afetar a qualidade dessas sementes, depende diretamente, da eficiência dos métodos utilizados para determiná-la (MARCOS FILHO et al., 1987).

A avaliação da qualidade das sementes é feita tradicionalmente pelo teste de germinação, porém, este apresenta limitações por fornecer resultados que, muitas vezes, superestimam o potencial fisiológico das sementes, devido ao fato de ser conduzido sob condições ótimas. Diante disto, foram desenvolvidos testes de vigor com a finalidade de fornecer informações complementares às obtidas no teste de germinação e que permitissem estimar o potencial de emergência de plântulas em campo, sob ampla faixa de condições ambientais. Assim, a viabilidade e o vigor são as características fundamentais utilizadas para avaliar a qualidade fisiológica das sementes.

O teste de germinação é considerado padronizado, com possibilidade de repetição dos resultados, desde que sejam seguidas as instruções estabelecidas nas Regras para Análise de Sementes (RAS). Por isso, este teste não é conduzido em condições de campo, onde os resultados dificilmente seriam reproduzidos.

A ausência de uma estreita relação entre a germinação, obtida em laboratório, e a emergência das plântulas em campo, levou ao desenvolvimento do conceito de vigor. Existem vários conceitos de vigor de sementes, segundo CARVALHO & NAKAGAWA (2000) “Vigor de sementes compreende um conjunto de características que determinam o potencial para a emergência e o rápido desenvolvimento de plântulas normais, sob ampla diversidade de condições de ambiente”.

A avaliação do vigor das sementes é realizada com o objetivo básico de identificar possíveis diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes que apresentem poder germinativo semelhante e com padrão para comercialização.

McDONALD JUNIOR (1975) dividiu os testes de vigor em físicos, fisiológicos e bioquímicos. Os físicos estariam relacionados com características de tamanho, peso e densidade das sementes; os fisiológicos utilizam alguns parâmetros vinculados à germinação e ao crescimento de plântulas, enquanto os bioquímicos avaliam alterações bioquímicas/moleculares associadas ao vigor das sementes.

Atualmente, uma das principais exigências para a avaliação da qualidade das sementes, refere-se à rapidez na obtenção dos resultados, para que as tomadas de decisões nas empresas possam ser agilizadas, principalmente durante as operações de colheita, processamento e comercialização. Os testes que demandam período de tempo curto estão relacionados com os eventos iniciais da deterioração, conforme sequência proposta por DELOUCHE & BASKIN (1973), baseando-se na integridade das membranas celulares e na redução das atividades enzimáticas e respiratórias das sementes, como o teste de tetrazólio (ABDUL-BAKI & ANDERSON, 1973). Dentre os testes baseados na integridade do sistema de membranas destacam-se os de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio, que têm mostrado se promissores para sementes de soja (DIAS & MARCOS FILHO,

1996; DIAS et al., 1996, CUSTÓDIO & MARCOS FILHO, 1997), e de milho (MIGUEL, 2001).

Algumas pesquisas mais recentes têm sido feitas tentando ajustar metodologias para o uso destes testes em sementes de hortaliças (DIAS et al., 1998 em quiabo e feijão de vagem e PANOBIANCO, 2000 em tomate). Dentre os testes que se baseiam na alteração de atividades enzimáticas, destaca-se o de tetrazólio, que tem mostrado se como alternativa interessante pela rapidez na determinação da viabilidade e do vigor, permitindo obter resultados, de modo geral, em menos de 24 horas (DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1988; COSTA & MARCOS FILHO, 1994).

2.3. Teste de Tetrazólio

O teste de tetrazólio é conhecido desde a década de 30, quando Kuhn e Jerchel descobriram que os sais de tetrazólio reduzem-se nos tecidos vivos, resultando em um composto de cor vermelha (trifenilformazan), despertando o interesse de vários cientistas que se dedicaram a estudar o teste (DELOUCHE et al., 1976). Em 1945, Lakon publicou o primeiro trabalho com sementes de milho e de cereais pequenos, descobrindo que o melhor sal para a avaliação da viabilidade das sementes era o 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio. O conhecimento deste princípio e a divulgação de suas aplicações promoveram grande impulso na pesquisa resultando em diversos trabalhos publicados no mundo todo.

Este teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, particularmente a desidrogenase do ácido málico, que reduz o sal de tetrazólio nos tecidos vivos da semente, onde íons de hidrogênio são transferidos para o referido sal que atua como receptor de H (DELOUCHE et al., 1976). Quando a semente é imersa na solução de tetrazólio, esta se difunde através dos tecidos, ocorrendo nas células vivas a reação de redução, resultando na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifenilformazan, indicando haver atividade respiratória nas mitocôndrias e, conseqüentemente, que o tecido é viável (vivo). Por outro lado, não ocorre a reação no tecido morto

que, portanto, não desenvolve a coloração vermelha, conservando-se a sua cor natural (FRANÇA NETO et al., 1988).

De acordo com MOORE (1985), tecidos vigorosos tendem a se colorir gradualmente e uniformemente, desenvolvendo coloração rosa a vermelho brilhante e apresentando-se túrgidos quando embebidos. A ocorrência de vermelho intenso é característica de tecidos em deterioração, que permitem maior difusão da solução de tetrazólio através de suas membranas celulares já comprometidas. Já os tecidos mortos não desenvolvem coloração, porque não apresentam atividade enzimática necessária para a redução do trifenilformazan e geralmente apresentam-se flácidos e com coloração branca opaco ou amarelada. É importante ressaltar que tecidos mortos podem ainda apresentar manchas vermelhas, devido à atividade de fungos ou bactérias. Segundo MOORE (1973), estas diferenças de coloração, juntamente com os conhecimentos de algumas características das sementes, permitem a avaliação da presença, localização e natureza dos distúrbios dos tecidos embrionários, podendo fornecer uma estimativa da viabilidade ou vitalidade do embrião.

No Brasil, resultados de pesquisas desenvolvidas com sementes de soja por FRANÇA NETO et al. (1981, 1985 e 1988) na Embrapa Soja, estão sendo utilizadas com sucesso em muitas regiões. Estes autores desenvolveram uma metodologia que permite não só avaliar a viabilidade e o vigor, como também determinar o grau de deterioração por umidade e por danos mecânicos, e também danos ocasionados por secagem e por picada de percevejo. Desta forma, o teste permite o diagnóstico detalhado das principais causas de perda da qualidade da semente de soja. Assim, conforme Moore (1985), o teste de tetrazólio tem como objetivos principais determinar o potencial de germinação de um lote de sementes sob condições ideais, classificar as sementes em diferentes categorias de viabilidade e diagnosticar as possíveis causas da perda de viabilidade das sementes. Mesmo apresentando estas características tão interessantes, o uso do teste de tetrazólio ainda não apresenta importância proporcional devido à falta de metodologias apropriadas para as diferentes espécies (MARCOS FILHO et al., 1987).

É importante ressaltar que, a principal vantagem do teste de tetrazólio reside na possibilidade de avaliação da qualidade das sementes em poucas

horas. Os dados obtidos podem ser empregados no estabelecimento de bases para a comercialização como ocorre para algumas forrageiras (*Panicum maximum* e *Brachiaria brizantha*), cujo teste de germinação é bastante demorado (28 e 21 dias, respectivamente) e que quando recém colhidas apresentam alto percentual de sementes dormentes. Além disso, é um teste indicado para determinar o ponto de colheita e auxiliar no controle de qualidade pós-colheita, fornecendo uma estimativa do vigor.

Diversos fatores podem interferir na obtenção de resultados satisfatórios no teste de tetrazólio, principalmente aqueles relacionados à metodologia de execução. O uso de solução de tetrazólio na concentração adequada é um deles. As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) recomendam, para a maioria das espécies, concentrações de 0,5 a 1,0 %, o que provoca o desenvolvimento de coloração vermelha muito intensa (grená) dificultando a interpretação, principalmente na identificação visual entre o tecido viável e o tecido em estágio avançado de deterioração. Em virtude disto, mais recentemente, trabalhos realizados com algumas espécies como soja, algodão, amendoim, milho, feijão e café têm indicado o uso de solução a 0,075%, que permite o desenvolvimento de coloração ideal tanto nos tecidos vigorosos como nos não vigorosos.

Além da concentração da solução de tetrazólio, outro aspecto importante é o período de tempo necessário para o desenvolvimento de coloração nas sementes. É importante que as sementes estejam totalmente submersas na solução de tetrazólio e que esta não seja exposta à luz direta para não ocorrer reação de redução (BRASIL, 1992). DELOUCHE et al. (1976) afirmam que sementes de uma mesma espécie ou até de um mesmo lote, podem apresentar velocidade de coloração diferente. Assim, o período de coloração deve ser encerrado quando a intensidade média de coloração for ótima para a interpretação, pois algumas sementes colorem mais rapidamente enquanto outras mais lentamente. Geralmente, sementes velhas e deterioradas se colorem mais rapidamente e desenvolvem coloração vermelho carmim. Um período muito longo de contato das sementes com a solução pode acarretar o desenvolvimento de coloração muito intensa, prejudicando a interpretação do teste.

A definição do período necessário para a coloração está associada à temperatura empregada. Para sementes de cucurbitáceas as Regras para Análise de Sementes recomendam o uso de solução a 1% por 24 horas.

Outro fator importante para a condução do teste é o preparo das sementes antes da coloração. Para facilitar a penetração da solução de tetrazólio o pré-condicionamento das sementes (umedecimento) e corte é necessário para algumas espécies e recomendado para outras (BRASIL, 1992). Sementes pré-embebidas são geralmente menos susceptíveis a danos do que sementes secas e podem ser cortadas ou perfuradas mais facilmente para expor o embrião à solução de tetrazólio. Além disso, o pré-condicionamento auxilia no desenvolvimento de uma coloração mais uniforme, facilitando a interpretação (DELOUCHE et al., 1976).

Assim, o pré-condicionamento tem como finalidade hidratar os tecidos e ativar o metabolismo das sementes e isto ocorre mais rapidamente em temperaturas elevadas. DELOUCHE et al. (1976) comentam que a maioria das sementes são pré-condicionadas satisfatoriamente a 30°C.

De acordo com as Regras para Análise de Sementes dois processos de umedecimento das sementes são mais comuns: o umedecimento lento, entre ou sobre papel, conforme método usado para o teste de germinação e a imersão direta em água. O primeiro método deve ser usado para espécies cujas sementes apresentam tendência de sofrer danos por embebição se imersas diretamente em água. Em sementes muito secas, a imersão direta em água pode ocasionar danos pela hidratação muito rápida dos tecidos, comprometendo a qualidade das sementes. Também um período excessivo de imersão em água pode ocasionar problemas às sementes pela ausência ou baixa disponibilidade de O₂ no meio.

O pré-condicionamento, além de facilitar o preparo e a penetração da solução de tetrazólio, promove a reativação enzimática necessária para o teste.

Além do período de tempo a temperatura empregada para o pré-condicionamento é outro fator importante. Geralmente temperaturas mais elevadas (30 – 40°C) aceleram o processo de embebição além de reativar o sistema enzimático das sementes. Para a soja FRANÇA NETO et al. (1988) recomendam o pré-condicionamento em papel umedecido por 16 horas a 25°C. Entretanto, como a velocidade de embebição aumenta com a elevação da

temperatura, COSTA et al. (1998, 2001) verificaram que o pré-condicionamento de sementes de soja por 6 horas a 41°C resultou em um adequado padrão de coloração das sementes, permitindo uma interpretação tão segura quanto à obtida no período tradicionalmente recomendado, isto é, 16 horas a 25°C. Já a redução do tempo para 4 horas a 41°C afetou drasticamente o desenvolvimento de coloração nas sementes não permitindo identificar com clareza as diferentes classes de vigor e viabilidade.

Em amendoim, BITTENCOURT et al. (1997) relataram que para o pré-condicionamento são recomendadas condições muito variadas como: embebição por 18h a 29-32°C usando papel toalha umedecido ou imersão direta em água por 4 a 6 horas ou por 18 horas, sem especificar a temperatura, o que dificulta estabelecer qual o padrão a ser seguido. Assim, BITTENCOURT et al. (1997) definiram que para se obter um adequado padrão de coloração das sementes, o pré-condicionamento deve ser feito em papel umedecido por 16 horas a 20°C.

Para cucurbitáceas, as Regras para Análise de Sementes (RAS) também se referem a diferentes opções para o pré-condicionamento das sementes, recomendando a imersão direta em água ou o umedecimento entre papel por 6-18 horas. Além disso, sugerem um preparo adicional antes da coloração fazendo-se um corte longitudinal através da metade distal dos cotilédones ou um corte transversal através dos cotilédones, 1/3 a partir da parte basal da semente. Antes da coloração, o tegumento deve ser removido para a avaliação, podendo também ser feito um corte longitudinal através do eixo embrionário em toda a sua extensão. DELOUCHE et al. (1976) recomendam para sementes de melancia a embebição em água entre 30 e 35°C/1h para remover o tegumento e por mais 1-2 horas para remoção da membrana fina que envolve o embrião.

É importante ressaltar que o sucesso no emprego de testes rápidos para avaliação do vigor depende, dentre outros fatores, das relações entre as informações provenientes do laboratório e o desempenho das sementes em campo, além de permitir diferenciar lotes quanto ao nível de vigor. Neste sentido, diferentes estudos têm indicado que o teste de tetrazólio apresenta boa correlação com outros testes de vigor. COSTA et al., 1988, trabalhando com 10 lotes de sementes de soja, constataram que o vigor, determinado pelo

teste de tetrazólio, apresentou correlação com a emergência em campo e com o teste de envelhecimento acelerado. Também BARROS (1988) detectou que o tetrazólio possibilitou a identificação de lotes de soja com diferentes níveis de qualidade e potencial de emergência das plântulas em campo. Resultados semelhantes foram obtidos por JOHNSON & WAX (1978), e DIAS (1994).

Verifica-se, portanto, que a rapidez na obtenção de informações seguras sobre a qualidade das sementes, correlacionada com a emergência em campo, e a possibilidade de diagnosticar as causas da perda da qualidade são as principais vantagens do teste. Por outro lado, algumas limitações têm sido relatadas por MARCOS FILHO et al. (1987) como: necessidade de pessoal treinado sobre as estruturas embrionárias das sementes, não identificação da presença de sementes dormentes nem de patógenos e não permitir verificar a eficiência de tratamento químico. Entretanto, FRANÇA NETO et al. (1988) argumentam que a grande vantagem do teste reside no fato de ser altamente eficiente na determinação dos principais fatores que podem comprometer a qualidade da semente de soja e de fornecer o diagnóstico das possíveis causas responsáveis pela redução da qualidade. O fornecimento desse diagnóstico tem sido o grande responsável pelo elevado índice de adoção do teste em sementes de soja em nosso país, pois além de apontar os problemas de redução de qualidade das sementes, quando aplicado nas diversas etapas do sistema de produção, pode identificar os pontos de origem desses problemas, permitindo que ações corretivas sejam adotadas, resultando na produção de sementes de alta qualidade.

Segundo MARCOS FILHO et al. (1987) o teste de tetrazólio ainda não tem uso generalizado principalmente pela falta de treinamento de pessoal e ausência de conhecimentos sobre a metodologia mais adequada para as várias espécies. No Brasil, estudos referentes ao desenvolvimento de metodologia e à utilização do teste de tetrazólio já foram feitos para sementes de várias espécies, destacando-se soja (FRANÇA NETO et al., 1988, 1998), feijão (BHERING et al., 1996 e 1999), milho (DIAS & BARROS, 1995 e 1999), algodão (VIEIRA & PINHO, 1999), amendoim (BITTENCOURT et al., 1997, BITTENCOURT & VIEIRA, 1997), café (ARAÚJO et al., 1997 e VIEIRA et al., 1998) e gramíneas forrageiras (DIAS & ALVES, 2001 a,b). As informações até então obtidas sobre o teste de tetrazólio indicam a potencialidade do teste e

sua possível aplicação em maior escala para outras espécies, desde que seja desenvolvida metodologia adequada para as sementes de cada espécie.

Portanto, o teste de tetrazólio mostra-se como uma alternativa eficiente para avaliar a viabilidade, o vigor de muitas espécies e permite, muitas vezes, determinar os principais fatores envolvidos na perda de qualidade de um lote de sementes. Contudo, estes objetivos só serão atingidos, se houver disponibilidade de metodologia eficiente e padronizada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Sementes, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, de janeiro de 2001 a fevereiro de 2002. Foram utilizados lotes de sementes de abóbora (*Cucurbita moschata*) variedade Menina Brasileira e abobrinha (*Cucurbita pepo*) híbrido Atlanta AG 303, híbrido Clarinda AG 135 e variedade Caserta. Os lotes de sementes comerciais foram colhidos nos campos de produção da empresa Horticeres. Após a recepção, as sementes de cada lote foram homogeneizadas e acondicionadas em sacos de papel multifoliado, permanecendo em condições de ambiente de laboratório durante todo o experimento. Cada lote foi devidamente amostrado para a caracterização da qualidade fisiológica das sementes e posterior condução dos estudos do teste de tetrazólio.

3.1. Caracterização da qualidade fisiológica dos lotes

3.1.1. Teste de germinação (TG)

Conduzido conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992); utilizaram-se 200 sementes, em quatro repetições de 50, semeadas em substrato de papel umedecido com água destilada em

quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Foram confeccionados rolos que foram mantidos em germinador a 25°C e cerca de 95% de UR. As avaliações foram efetuadas aos quatro e oito dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais.

3.1.2. Emergência de plântulas em areia (EPA)

Conduzido em casa de vegetação com 200 sementes por lote, quatro repetições de 50, semeadas em bandejas plásticas contendo areia umedecida com quantidade de água equivalente a 70% da capacidade de retenção. As contagens foram efetuadas aos 15 dias após a semeadura, determinando-se a porcentagem de plântulas emergidas.

3.1.3. Envelhecimento acelerado (EA)

Foi adotada a metodologia recomendada pelo Comitê de Vigor de Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1983), e descrita por MARCOS FILHO (1999). As sementes foram colocadas em caixas plásticas de germinação (11 x 11 x 3,5 cm) adaptadas, funcionando como compartimento individual (mini-câmara), possuindo no interior uma bandeja com tela onde as sementes foram distribuídas de maneira a formar uma única camada uniforme. Ao fundo de cada caixa plástica foram adicionados 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas e colocadas em uma câmara de germinação do tipo BOD, regulada à temperatura constante de 41°C, por um período de 48 horas. Ao término deste período, foi conduzido o teste de germinação, sendo a avaliação feita após quatro dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.2. Estudo do teste de tetrazólio (TTZ)

Para a definição da metodologia mais adequada para a condução do teste de tetrazólio em sementes de *Cucurbita* spp. (abóbora e abobrinha) foram conduzidos diversos testes preliminares visando determinar o método de pré-condicionamento e o período de tempo necessário para alcançar a coloração mais adequada.

3.2.1. Preparo da solução

No laboratório, foi preparada, inicialmente, uma solução estoque do sal de tetrazólio a 1%, para que fossem feitas futuras diluições. Para o preparo dessa solução estoque foram misturadas 10 gramas do sal 2, 3,5 trifenil cloreto de tetrazólio em 1000 mL de água destilada com pH neutro. Quando o pH da água não se apresentava na escala neutra, o sal de tetrazólio foi dissolvido em uma solução tampão de fosfato, preparada do seguinte modo:

Solução 1 - Dissolver 9,078 g de KH_2PO_4 em 1000 mL de H_2O .

Solução 2 - Dissolver 11,876 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 1000 mL de H_2O .

Misturam-se 400 mL da solução 1 a 600 mL da solução 2, obtendo-se, assim, 1000 mL de solução tampão. Acrescentou-se a essa solução 10 g de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio conseguindo-se, assim, uma solução de tetrazólio a 1%, com pH igual à 7,0.

Foi utilizada a concentração da solução de tetrazólio a 0,075% (FRANÇA NETO et al., 1988), a qual foi obtida misturando-se 75 mL da solução estoque a 1% com 925 mL de água destilada.

3.2.2. Número de sementes por lote

Utilizaram-se 100 sementes de cada lote (4 subamostras de 25) para cada um dos tratamentos testados, quantas vezes se fizeram necessários para a caracterização completa de coloração, danos e demais detalhamentos.

3.2.3. Pré-condicionamento e preparo das sementes

Para o pré-condicionamento e preparo adequado é fundamental o conhecimento das estruturas básicas das sementes, ilustradas na Figura 1.

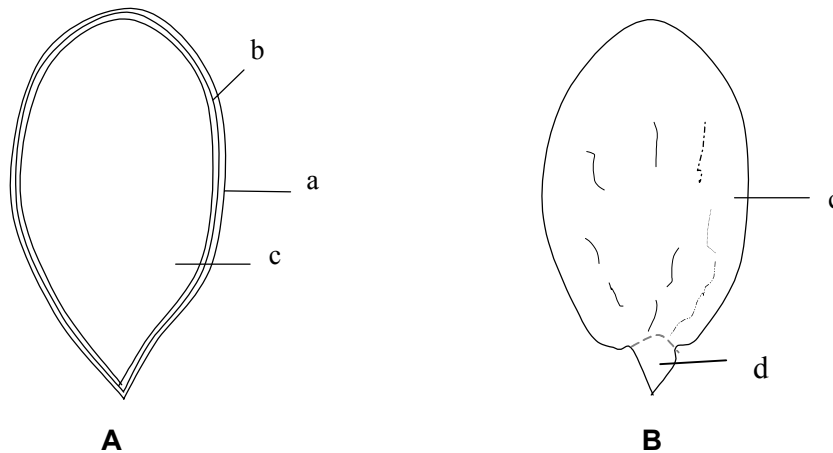


Figura 1 - Estrutura da semente de *Cucurbita* spp.: A – Semente, B – Embrião, a – tegumento; b - membrana fina (endosperma/perisperma); c - cotilédones; d – eixo hipocótilo-radícula.

Foram testados para o pré-condicionamento das sementes os seguintes procedimentos:

- Umedecimento em papel toalha; as sementes foram colocadas entre duas folhas de papel toalha umedecida com quantidade de água igual 2,5 vezes o seu peso, durante 16 e 24 horas, em germinador a 25°C.
- Imersão direta em água; as sementes foram imersas em água em copos descartáveis de 25 mL, em BOD a 40°C, por períodos de 15, 30 e 60 minutos para a remoção do tegumento.
- Para a retirada da membrana fina interna que envolve o embrião (endosperma/perisperma), foi testada a imersão em água por mais 30 e 60 minutos em BOD a 40°C.

Para a retirada tanto do tegumento como da membrana fina, foi feito um pequeno corte bem superficial com o auxílio de um estilete na extremidade lateral da semente para facilitar a remoção e não ocasionar danos ao embrião (Figura 2).

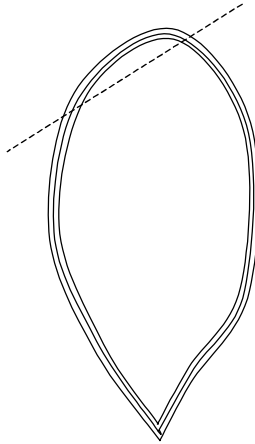


Figura 2 - Método de preparo das sementes de abóbora e abobrinha para o teste de tetrazólio: seccionamento da extremidade superior dos cotilédones para a retirada da membrana fina que envolve o embrião (endosperma/perisperma).

3.2.4. Coloração das sementes

Após o pré-condicionamento, as sementes foram colocadas em copos descartáveis de 25 mL e imersas em solução de 2, 3, 5 trifetil cloreto de tetrazólio a 0,075% durante 30, 60 e 90 minutos em câmara de germinação tipo BOD a 40°C sob escuro. Após cada período, as sementes foram lavadas em água corrente e mantidas submersas em água até o momento da avaliação.

3.2.5. Interpretação do teste

A interpretação foi feita com auxílio de lupa de seis aumentos (6X), com iluminação fluorescente. As sementes foram examinadas individualmente interna e externamente, após o seccionamento longitudinal, observando-se a ocorrência de danos nas faces interna e externa dos cotilédones, dando atenção especial ao eixo embrionário e à profundidade de cada dano, ou seja, se a ocorrência do dano no eixo hipocótilo-radícula foi superficial ou se afetou áreas internas. Além destes aspectos, foi considerada a localização dos danos nos cotilédones, sua distância em relação ao eixo embrionário, se ocorreu em áreas vitais ou críticas das sementes podendo comprometer sua viabilidade ou vigor. Nas sementes de cucurbitáceas, a área vital inclui o eixo hipocótilo-radícula e a região de inserção entre os cotilédones e o eixo.

Observou-se ainda, a diferenciação de cores dos tecidos, de acordo com os critérios estabelecidos por GRABE (1970), ou seja: vermelho brilhante ou rosa brilhante (tecido vivo e vigoroso), vermelho carmim forte (tecido em deterioração) e branco leitoso ou amarelado (tecido morto).

Definiu-se a metodologia mais adequada para o pré-condicionamento e coloração das sementes, a qual foi aplicada às sementes de diferentes lotes, repetindo-se o teste várias vezes para a caracterização correta dos principais distúrbios e sua associação com a viabilidade das sementes. Para tanto, cada amostra de 200 sementes foi dividida em duas subamostras de 100 sendo uma delas submetida ao teste de tetrazólio e a outra avaliada quanto à germinação e ao vigor das plântulas, estabelecendo-se classes de viabilidade e vigor para cada uma das espécies estudadas. Cada semente foi classificada como viável ou não viável conforme a coloração dos tecidos do embrião e a presença e localização dos danos. Aquelas consideradas como viáveis, foram ainda classificadas em vigorosas e não vigorosas; foram consideradas vigorosas as sementes que apresentavam-se sem danos ou com lesões bastante superficiais nos cotilédones, sendo capazes de originar plântulas normais fortes no teste de germinação. As não vigorosas eram sementes que exibiam algum tipo de lesão, e que não eram capazes de originar plântulas normais fortes (perfeitas, intactas e bem desenvolvidas), ou seja, originavam plântulas com

pequenos defeitos, mas que ainda eram classificadas como normais (normais fracas).

Além da definição de diferentes classes de viabilidade e vigor, foram conduzidos ensaios visando a caracterização dos principais danos e lesões apresentados pelas sementes de abóbora e abobrinha no teste de tetrazólio.

Para tanto, duas subamostras foram submetidas as seguintes condições:

- Estufa com circulação de ar por 3 dias, sendo retiradas amostras de sementes a cada 24 horas;
- Câmara de germinação tipo BOD a 41°C e 100% de UR, conforme método descrito para o teste de envelhecimento acelerado (item 3.1.3). As sementes permaneceram nestas condições por 12 dias, sendo retiradas amostras de 20 sementes a cada 24 horas, que eram submetidas ao teste de tetrazólio, de modo a caracterizar as lesões ocasionadas pelo avanço do processo de deterioração provocado pelo envelhecimento acelerado.

3.2.6. Procedimento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Antes da análise estatística, os dados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade de variância que indicaram a não necessidade de transformação dos dados. A seguir os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Calcularam-se os coeficientes de correlação simples de Pearson (r) entre os testes de tetrazólio viabilidade e vigor; a significância dos valores de r foi determinada pelo teste t , a 1 e 5% de probabilidade (GOMES, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento da metodologia do teste

4.1.1. Definição do método de pré-condicionamento e do período de coloração

Dentre os procedimentos testados para a remoção do tegumento das sementes, verificou-se que o umedecimento em papel toalha não mostrou-se adequado, uma vez que as sementes embeberam lentamente e os períodos de tempo adotados (16 e 24 horas) não foram suficientes para permitir a remoção fácil do tegumento. Portanto, períodos de tempo superiores a estes deveriam ser utilizados para que o tegumento fosse retirado com facilidade e sem ocasionar danos às sementes. Considerando que períodos mais longos implicam em maior tempo necessário para a condução do teste e obtenção dos resultados, períodos superiores a 24 h não foram testados.

O pré-condicionamento provoca a hidratação dos tecidos das sementes, facilitando a remoção do tegumento sem causar danos e injúrias ao embrião; além disso, promove a ativação do sistema enzimático, facilitando a penetração da solução de tetrazólio, a ocorrência da reação enzimática e o desenvolvimento de coloração nítida e uniforme. Sementes pré-condicionadas sob condições inadequadas podem ter uma rápida embebição ou uma absorção insuficiente de água, resultando em falta de uniformidade na coloração (DELOUCHE et al., 1976), o que pode prejudicar a interpretação dos

resultados. De acordo com BITTENCOURT et al. (1997), apesar da sua importância, as condições que permitem um satisfatório condicionamento das sementes não têm sido estabelecidas para a maioria das espécies.

O pré-condicionamento das sementes antes da coloração é uma fase crítica que pode ser determinante na eficiência do teste de tetrazólio, pois sementes pré-umedecidas são menos susceptíveis a danos por imersão direta na solução de tetrazólio do que sementes secas. Além disso, elas podem ser cortadas ou perfuradas para expor o embrião à solução de tetrazólio o que se torna muito difícil de ser feito se a semente estiver seca.

Para as sementes de abóbora, no presente trabalho, a imersão direta em água a 40°C/30 minutos mostrou-se mais adequada do que o umedecimento entre papel, permitindo a remoção do tegumento de modo rápido e sem ocasionar danos às sementes. Assim, fazendo-se um pequeno corte superficial numa das extremidades laterais do tegumento, este já se apresentava amolecido suficientemente para que fosse completamente retirado com o auxílio das mãos. O período de 15 minutos foi considerado insuficiente e os resultados obtidos com 30 minutos de imersão em água foram semelhantes aos de 60 minutos. Optou-se, portanto, pelo período de 30 minutos de imersão, já que um dos objetivos do teste é fornecer resultados em curto período de tempo.

É importante ressaltar, contudo, que a imersão direta das sementes em água não deve ser feita por período de tempo excessivo, pois pode acarretar problemas devido à redução na disponibilidade de O₂ para as sementes comprometendo a sua qualidade e conseqüentemente, levando à obtenção de resultados incorretos (COSTA, 1992).

Para o pré-condicionamento de sementes de soja, FRANÇA NETO et al. (1998) recomendam o umedecimento em papel toalha por 16 horas a 25°C. No entanto, caso haja necessidade de maior rapidez, pode se usar a metodologia alternativa sugerida por COSTA et al. (1998), realizando-se o pré-condicionamento por 6 horas a 41°C, o que representa um ganho de 10 horas no preparo das sementes sem que haja perda de precisão dos resultados.

O uso de temperatura mais elevada durante o pré-condicionamento acelera o metabolismo da semente, permitindo que a absorção de água seja mais rápida. Assim, o período de tempo necessário para que a semente atinja

um nível metabólico tal que permita a ativação de seu sistema enzimático é menor sob temperaturas mais altas. Com base neste princípio, para sementes de abóbora, todos os tratamentos de pré-condicionamento testados foram conduzidos a 40°C, buscando obter uma embebição mais rápida e sem danos, considerando que estas sementes apresentam tegumento espesso e que sua embebição não é muito rápida.

De acordo com DELOUCHE et al. (1976), o pré-condicionamento feito de maneira adequada permite que, após a imersão das sementes na solução de tetrazólio, seja desenvolvida a coloração ideal, facilitando a interpretação do teste.

Para a retirada do endosperma/perisperma representado por uma membrana fina interna ao tegumento e que é aderente ao embrião, as sementes foram novamente imersas em água a 40°C por 30 e 60 minutos. Para esta finalidade, o período de 30 minutos foi o mais indicado.

É importante ressaltar que a remoção desta membrana deve ser feita cuidadosamente para não provocar danos aos cotilédones. Para tanto, foi feito um pequeno corte superficial na membrana, na extremidade superior ou lateral da semente (posição oposta ao eixo), de modo a permitir a sua retirada completa com o auxílio de uma pinça (Figura 2). Se não for retirada, esta membrana, impede que a solução de tetrazólio penetre na semente, uma vez que segundo WELBAUM & BRADFORD (1990) ela não permite a difusão de solutos.

Com relação ao período de coloração, verificou-se que coloração mais uniforme e coerente com as recomendações de MOORE (1985) foi obtida quando as sementes foram imersas em solução de tetrazólio a 0,075% por 60 minutos a 40°C, no escuro.

As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) e MOORE (1985) recomendam, para a coloração de semente de abóbora, o uso de solução de tetrazólio a 1% por 6-24 horas. No entanto, resultados de pesquisa mais recentes, obtidos com diversas espécies, têm revelado que o uso de solução menos concentrada, em especial a 0,075%, permite o desenvolvimento de coloração menos intensa, ideal para a interpretação correta e precisão dos resultados.

Em sementes de amendoim, BITTENCOURT & VIEIRA (1997) obtiveram valores estatisticamente semelhantes para o teste conduzido com solução de tetrazólio a 0,075% e 0,1%. Os autores recomendaram, portanto, o uso rotineiro de solução a 0,075%, considerando que o sal de tetrazólio é um produto caro e que o uso de solução 0,1% requer maior consumo deste sal e, ainda, que a menor concentração permitiu uma avaliação mais segura em função dos padrões de coloração mais suaves apresentados.

Na Figura 3 estão representadas as sementes de abóbora durante o processo de pré-condicionamento e coloração.



Figura 3 - A: sementes de abóbora, tratadas com fungicida, imersas em água para a remoção do tegumento; B: sementes sem o tegumento, imersas em água para a retirada do endosperma/perisperma (membrana interna); C: sementes imersas em solução de tetrazólio 0,075%, para o desenvolvimento da coloração.

4.1.2. Estabelecimento das classes de viabilidade e vigor

Com base nas observações de intensidade de coloração, profundidade e localização dos danos foram estabelecidas cinco classes de viabilidade e vigor, onde cada semente avaliada foi qualificada em uma das classes. Para auxiliar no estabelecimento destas classes. Para auxiliar no estabelecimento destas classes, foram considerados também os resultados da porcentagem de germinação e o vigor das plântulas obtidas no teste de germinação conduzido paralelamente ao teste de tetrazólio.

Após o desenvolvimento da coloração, cada semente foi avaliada individualmente sendo classificada como viável ou não viável conforme a coloração dos tecidos do embrião e a presença e localização de danos. Foram estabelecidas cinco classes de viabilidade, de 1 a 5. Sendo viáveis as sementes das classes 1 a 3 e não viáveis as sementes das classes 4 e 5. O potencial de vigor foi determinado pelo somatório das sementes das classes 1 e 2 e a viabilidade pela soma das sementes das classes 1 a 3.

Para cada classe são apresentadas três figuras que ilustram as principais características observadas nas sementes, ou seja, os aspectos considerados mais comuns em cada uma das classes.

Cada figura representa uma semente que foi seccionada longitudinalmente. A superfície externa da semente é ilustrada à esquerda e a interna à direita.

Verificou-se, após o desenvolvimento da coloração, que independentemente da classe tecido vivo nas sementes de abóbora apresentava-se com tonalidade vermelho bem mais intenso do que o que foi observado nas sementes de abobrinha. Nestas, os tecidos vigorosos apresentavam coloração róseo claro e os tecidos já em deterioração mostravam-se com coloração róseo intenso.

4.1.2.1. Sementes de abóbora

Classe 1 – sementes viáveis de alto vigor (Figuras 4, 5 e 6)

As sementes incluídas nesta classe apresentam-se com aspecto normal e firme, coloração rosa brilhante a vermelho carmim; podem apresentar alguns pontos de coloração intensa em áreas não críticas. Coloração rósea aparece na face externa dos cotilédones praticamente não ocorrendo penetração da solução de tetrazólio até a face interna. Em alguns casos, a penetração da solução pode chegar até a face interna, que pode apresentar pequenos pontos ou manchas de coloração rósea. Geralmente, a face interna dos cotilédones apresenta-se com a coloração natural dos tecidos da semente, sem se colorir, indicando a vitalidade da semente e boa integridade do sistema de membranas.



Figura 4 - Semente de abóbora pertencente à classe 1. Coloração rósea uniforme e em toda a superfície externa; superfície interna dos cotilédones não se colorindo, apresentando a coloração típica dos tecidos da semente. Tecido com aspecto normal e firme.



Figura 5 - Semente de abóbora pertencente à classe 1. Bastante semelhante à anterior, só que com pequenas manchas superficiais avermelhadas na face externa do eixo embrionário. Face interna dos cotilédones não apresentando coloração, exceto nas bordas.



Figura 6 - Semente de abóbora pertencente à classe 1. Coloração rósea uniforme na superfície externa dos cotilédones e manchas superficiais avermelhadas ocupando cerca de 50% da superfície externa do eixo.

Classe 2 – sementes viáveis de baixo vigor (Figuras 7, 8 e 9)

De modo geral, as sementes desta classe apresentam regiões com coloração vermelho carmim mais forte ou aspecto de mosaico na superfície externa da semente podendo atingir a face interna dos cotilédones e do eixo embrionário. Neste caso, verifica-se que a solução de tetrazólio coloriu mais intensamente algumas regiões da semente, nas quais penetrou com mais facilidade indicando haver já um pequeno comprometimento na integridade das membranas celulares. Nestas regiões, a atividade respiratória um pouco mais intensa também contribuiu para o desenvolvimento de cor mais acentuada nos cotilédones ou na extremidade da radícula.

É importante ressaltar, que as manchas vermelho carmim podem atingir a região de ligação dos cotilédones com o eixo embrionário apenas na superfície externa, não afetando, contudo, a superfície interna da semente, cujos tecidos, nesta área se mostram íntegros. Manchas de coloração vermelha com profundidade máxima de 0,5 mm podem ocorrer na superfície externa dos cotilédones no ponto de ligação destes com o eixo, uma vez que com esta espessura não atingirão os tecidos internos.



Figura 7 - Semente de abóbora pertencente à classe 2. Área com coloração vermelho carmim forte na superfície de ambos os cotilédones cobrindo menos que a metade dos mesmos. Superfície interna dos cotilédones ainda com coloração clara, mas já apresentando um início de coloração vermelho mais forte nas bordas. O eixo embrionário apresenta-se com coloração rósea.



Figura 8 - Semente de abóbora pertencente à classe 2. Área de coloração vermelho carmim forte no centro dos cotilédones semelhante à anterior (Figura 7). Mais de 50% da superfície externa do eixo embrionário com coloração vermelho intenso. Apenas a extremidade interna da radícula apresenta-se com coloração vermelho intenso.

Portanto, próximo ao ponto de ligação com o eixo embrionário os vasos devem estar funcionais, permitindo o transporte de reservas dos cotilédones para o eixo.



Figura 9 - Semente de abóbora pertencente à classe 2. Área de coloração vermelho carmim forte no centro dos cotilédones tanto interna como externamente, afetando mais de 50% da área de um dos cotilédones, não atingindo a região vascular de ligação com o eixo. Eixo embrionário com coloração rósea, não apresentando lesões.

Pelos resultados dos testes de germinação e pelo vigor das plântulas obtidas neste teste, verificou-se que as sementes das classes 1 e 2 podem originar plântulas normais classificadas como fortes, ou seja, plântulas intactas, perfeitas, com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvido conforme ilustrado na Figura 10.

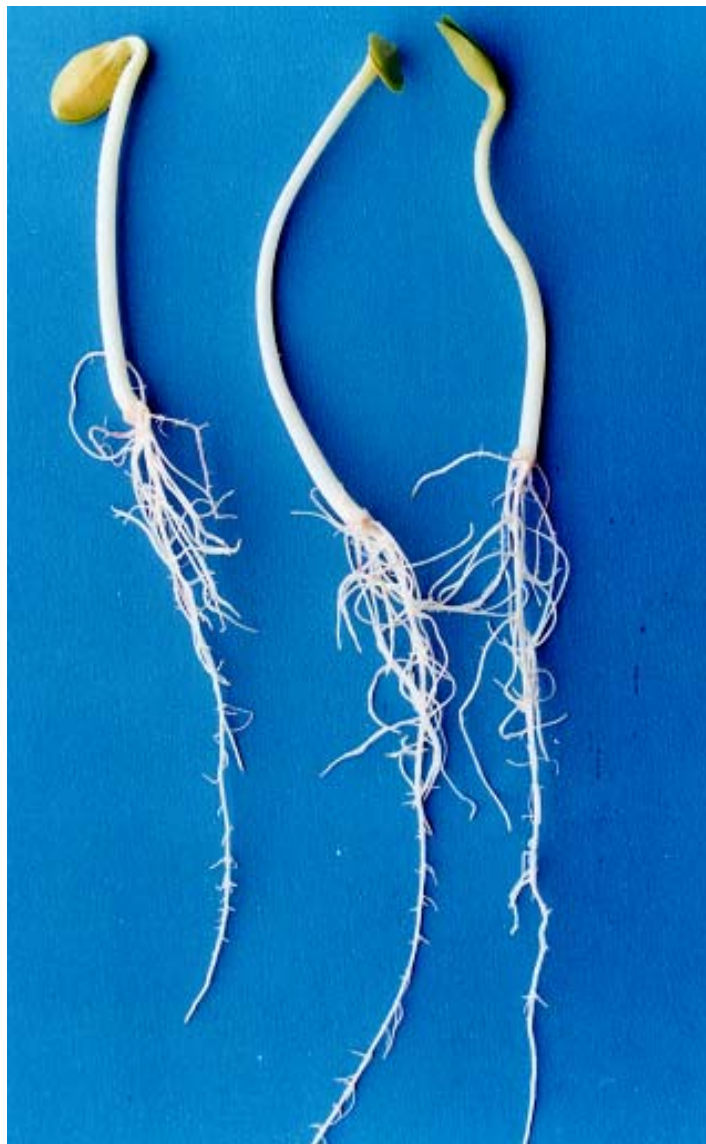


Figura 10 - Plântulas normais fortes de abóbora, com todas as suas estruturas essenciais intactas.

Classe 3 – sementes viáveis não vigorosas (Figuras 11, 12 e 13)

As sementes desta classe apresentam coloração vermelho carmim ou branco leitoso em regiões mais extensas dos cotilédones e, ou, extremidade da radícula. Observa-se que as lesões dos cotilédones apresentam-se bem extensas, tanto na face externa como interna dos cotilédones, indicando um processo de deterioração um pouco mais avançado que aquele observado para as sementes da classe 2.



Figura 11 - Semente de abóbora pertencente à classe 3. Semelhante a (Figura 9) no que se refere à coloração dos cotilédones. Já o eixo embrionário apresenta coloração vermelho carmim intenso tanto na superfície externa como interna, atingindo internamente toda a região da radícula.



Figura 12 - Semente de abóbora pertencente à classe 3. Lesão de coloração vermelho carmim bastante intenso na face externa com profundidade superior a 0,5 mm, ocupando mais de 50% já afetando a região vascular de conexão com o eixo. Região central da lesão tendendo a apresentar coloração branco leitoso. Áreas com coloração vermelho bastante intenso no eixo embrionário tanto interna como externamente, semelhante à anterior (Figura 11).



Figura 13 - Semente de abóbora pertencente à classe 3. Semelhante à anterior (Figura 12) lesões vermelho carmim intenso ocupando mais de 50% da área externa e interna de ambos os cotilédones, chegando a afetar a região vascular de ligação **com o eixo embrionário**.

As sementes da classe 3 foram consideradas viáveis e não vigorosas, sendo capazes de germinar, originando, no teste de germinação, plântulas que ainda são classificadas como normais, mas que são fracas, em virtude da presença de pequenos defeitos ou deformações como: ausência de raiz principal, poucas raízes secundárias resultando em um sistema radicular mais fraco, hipocótilo um pouco menos desenvolvido quando comparado ao das plântulas normais fortes ou hipocótilo com pequenas torções. Nota-se que são plântulas que ainda demonstram potencial para continuar o seu desenvolvimento, mas que não podem ser consideradas vigorosas como as da Figura 10.

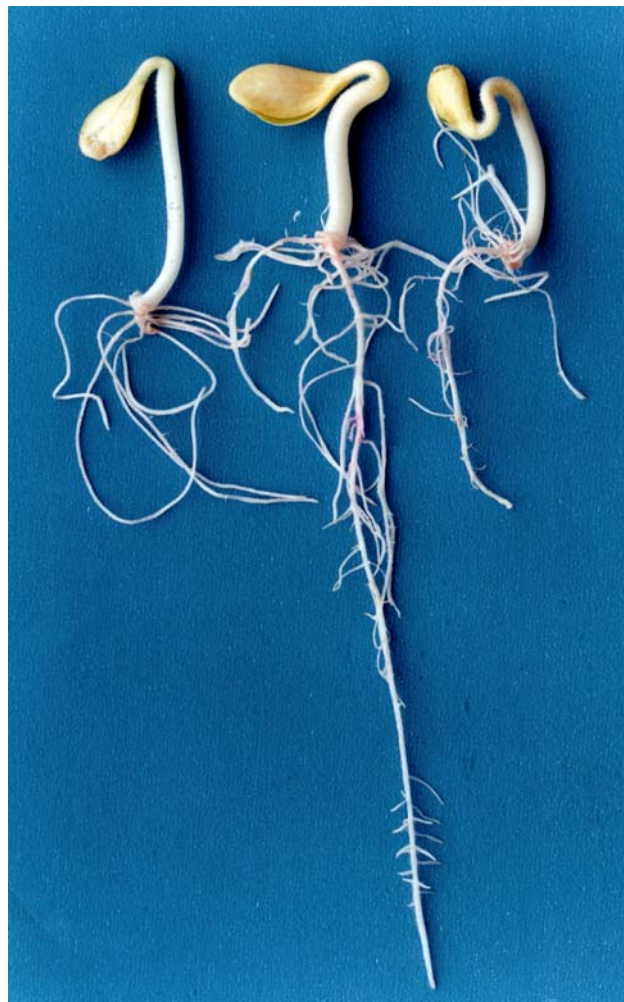


Figura 14 - Plântulas normais fracas de abóbora.

Classe 4 – sementes não viáveis (Figuras 15, 16 e 17)

As sementes incluídas nesta classe apresentaram coloração vermelha intensa ou tendendo a branco leitosa nas partes externa e interna dos cotilédones se estendendo até a região do eixo hipocótilo-radícula; presença de radícula completamente não colorida ou com coloração vermelho carmim intenso, tanto na externa quanto interna. As sementes desta classe podem originar plântulas que são consideradas anormais, devido aos problemas que apresentaram, os quais impedem que as mesmas continuem o seu desenvolvimento e dêem origem a uma planta adulta.



Figura 15 - Semente de abóbora pertencente à classe 4. Ambos os cotilédones mostrando um aspecto de mosaico, com áreas de cor vermelho carmim forte entremeadas com outras mais claras tendendo a branco. Tecidos afetados atingem mais de 50% dos cotilédones. Eixo embrionário totalmente vermelho carmim intenso tanto externamente como internamente.



Figura 16 - Semente de abóbora pertencente à classe 4. Ambos os cotilédones com coloração vermelho intenso tendendo a branco leitoso tanto internamente como externamente. Eixo embrionário totalmente com coloração vermelho intenso, apresentado a extremidade da radícula completamente branco leitoso, indicando tecido morto.



Figura 17 - Semente de abóbora pertencente à classe 4. Semelhante a anterior, mas a coloração vermelho intenso dos cotilédones já tende para o branco leitoso (tecido morto) em ambas as faces dos cotilédones, atingindo a região de ligação com o eixo; mas este apresenta-se totalmente vermelho carmim intenso.

As sementes pertencentes a essa classe podem originar plântulas anormais, ou seja, plântulas que não demonstram potencial para continuar o seu desenvolvimento. Verifica-se, pela Figura 18, que as plântulas classificadas como anormais, apresentam sistema radicular deficiente, representado por uma raiz principal fraca ou ausente e pouquíssimas raízes secundárias. O hipocótilo é curto e grosso comprometendo o desenvolvimento satisfatório da plântula.



Figura 18 - Plântulas anormais de abóbora.

Classe 5 – sementes mortas (Figuras 19, 20 e 21)

Apresentam-se totalmente com coloração branco leitoso ou vermelho carmim forte, ou ainda amareladas com manchas vermelho carmim. Geralmente, os tecidos apresentam-se flácidos, o que é típico de um processo de deterioração já avançado.



Figura 19 - Semente de abóbora pertencente à classe 5. Ambos os cotilédones com aspecto de mosaico com áreas de coloração vermelho forte entremeadas com outras mais claras, tanto na face externa como interna. Os tecidos afetados representam mais de 50% da área dos cotilédones, atingindo inclusive a região de conexão com o eixo, que apresenta-se totalmente branco leitoso (tecido morto), tanto externa como internamente.



Figura 20 - Sementes de abóbora pertencentes à classe 5. Sementes com ambos os cotilédones com coloração vermelho carmim forte em toda a sua extensão. Eixo embrionário completamente branco leitoso, indicando tecido morto.



Figura 21 - Semente de abóbora pertencente à classe 5. Semente com coloração branco leitoso em toda a sua extensão indicando que todos os tecidos estão mortos.

É importante ressaltar que as diferenças de coloração estão relacionadas à vitalidade do tecido. De acordo com MOORE (1985) tecidos vigorosos desenvolvem coloração rósea ou vermelho brilhante, apresentando-se túrgidos. A coloração vermelha muito intensa é sintoma de que o tecido já se encontra em processo de deterioração mais avançado, e, como as membranas já estão comprometidas, a solução de tetrazólio penetra mais facilmente. À medida que o processo de deterioração evolui, estes tecidos vermelho grená passam a exibir coloração branco leitosa o que indica não haver mais atividade enzimática necessária para o desenvolvimento da coloração vermelha.

4.1.2.2. Sementes de abobrinha

Classe 1 – sementes viáveis de alto vigor (Figuras 22, 23 e 24)

As sementes da classe 1 apresentaram-se com aspecto normal e firme, com coloração rosa claro brilhante, podendo exibir alguns pontos de coloração róseo mais intenso em áreas não críticas dos cotilédones, ou seja, distantes do ponto de ligação destes com o eixo embrionário. Quando presentes, as lesões no eixo são superficiais (profundidade inferior a 0,5 mm). Os detalhamentos das características das sementes desta classe estão ilustrados nas Figuras 22, 23 e 24.



Figura 22 - Semente de abóbriinha pertencente à classe 1. Semente apresentando tecidos com aspecto normal, firme e coloração rosa claro brilhante em toda a sua superfície externa. Superfície interna dos cotilédones não se colore, apresentando coloração típica dos tecidos da semente.

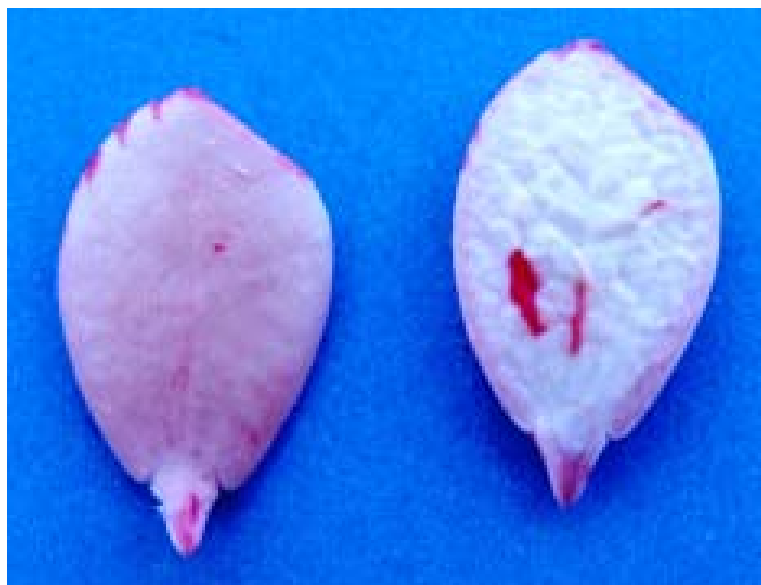


Figura 23 - Semente de abóbriinha pertencente à classe 1. Semelhante à anterior, com lesões superficiais de coloração róseo intenso na face interna e/ou externa dos cotilédones, ocupando área inferior a 10% dos mesmos. Pequena lesão superficial na face externa do eixo embrionário, não atingindo profundidade superior a 0,5 mm.



Figura 24 - Semente de abobrinha pertencente à classe 1. Semelhante à Figura 23, com lesões superficiais apenas na face externa dos cotilédones, com profundidade inferior a 0,5 mm.

Classe 2 – sementes viáveis de baixo vigor (Figuras 25, 26 e 27)

Apresentam áreas com coloração rosa intenso ou com aspecto de mosaico, ocupando menos que 50% da área total dos cotilédones e/ou eixo embrionário.



Figura 25 - Semente de abobrinha pertencente à classe 2. Semente apresentando róseo intenso em cerca de 50% da superfície externa do cotilédone sem atingir a superfície interna. Extremidade interna da radícula com coloração rosa intenso.



Figura 26 - Semente de abóbriha pertencente à classe 2. Área com coloração róseo bastante intenso em ambos os cotilédones, afetando menos que 50% dos mesmos. A superfície interna também apresenta área róseo intenso. A região vascular de ligação dos cotilédones com o eixo, no entanto, não deve estar afetada. Lesões com coloração róseo intenso também no eixo embrionário, atingindo internamente a região da extremidade da radícula.

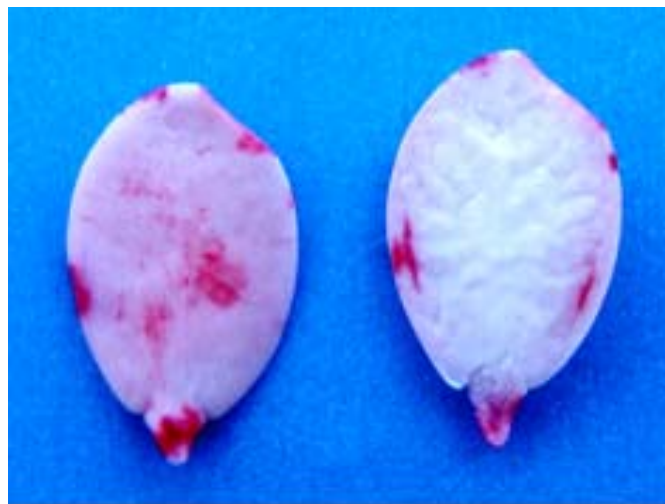


Figura 27 - Semente de abóbriha pertencente à classe 2. Áreas com coloração róseo intenso na superfície externa e interna dos cotilédones e eixo embrionário, ocupando área inferior a 50% dos mesmos.

Pelos resultados dos testes de germinação e pelo vigor das plântulas obtidas neste teste, verificou-se que as sementes das classes 1 e 2 podem originar plântulas normais fortes, ou seja, plântulas intactas e perfeitas (Figura 28).

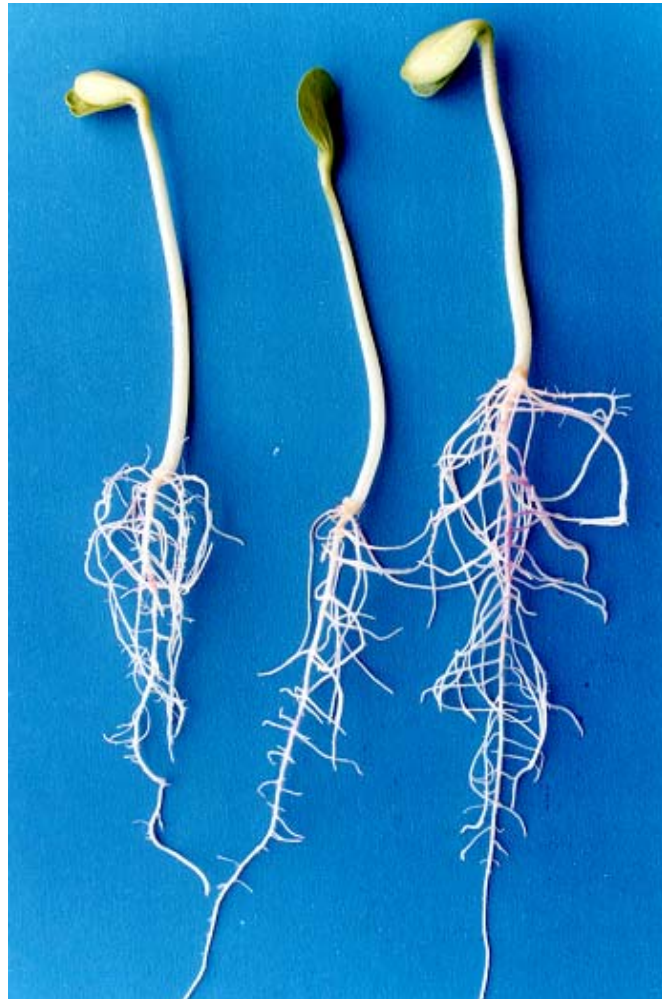


Figura 28 - Plântulas normais fortes de abobrinha, com todas as suas estruturas essenciais intactas.

Classe 3 – sementes viáveis não vigorosas (Figuras 29, 30 e 31)

Foram incluídas nesta classe as sementes que apresentaram coloração róseo intenso podendo tender a branco leitoso nos cotilédones e/ou eixo embrionário, ocupando área igual ou superior a 50% dos mesmos, mas não atingindo a região de ligação dos cotilédones com o eixo.



Figura 29 - Semente de abóbriha pertencente à classe 3. Cotilédones apresentando lesões rosa intenso na superfície externa e interna, em área inferior a 50% dos mesmos. Eixo embrionário com coloração róseo intenso em toda a superfície externa. Internamente, a metade inferior do eixo apresenta-se com coloração róseo intenso.



Figura 30 - Semente de abóbriinha pertencente à classe 3. Ambos os cotilédones com lesões róseo intenso tendendo para o branco leitoso, ocupando extensão equivalente a 50% da área total dos mesmos. As lesões ocorrem na região central dos cotilédones, tanto externa como internamente, mas não atingem a região vascular de ligação com o eixo embrionário. Este apresenta-se com lesão róseo intenso tanto externa como internamente, ocupando 50% de sua área total.

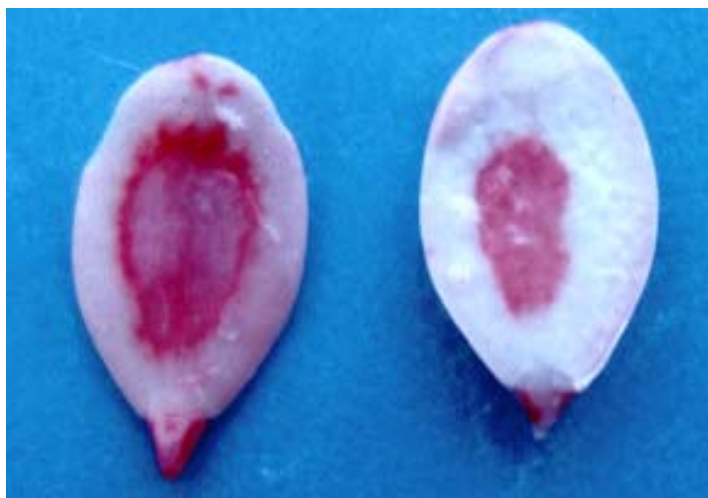


Figura 31 - Semente de abóbriinha pertencente à classe 3. Semelhante à anterior, só que as lesões do eixo embrionário atingem 50% da sua superfície externa e, internamente, apenas a extremidade da radícula. No teste de germinação, as sementes da classe 3 podem originar plântulas normais que ainda demonstram potencial para continuar o seu desenvolvimento, mas que são fracas em virtude da presença de pequenos defeitos ou deformações (Figura 32).

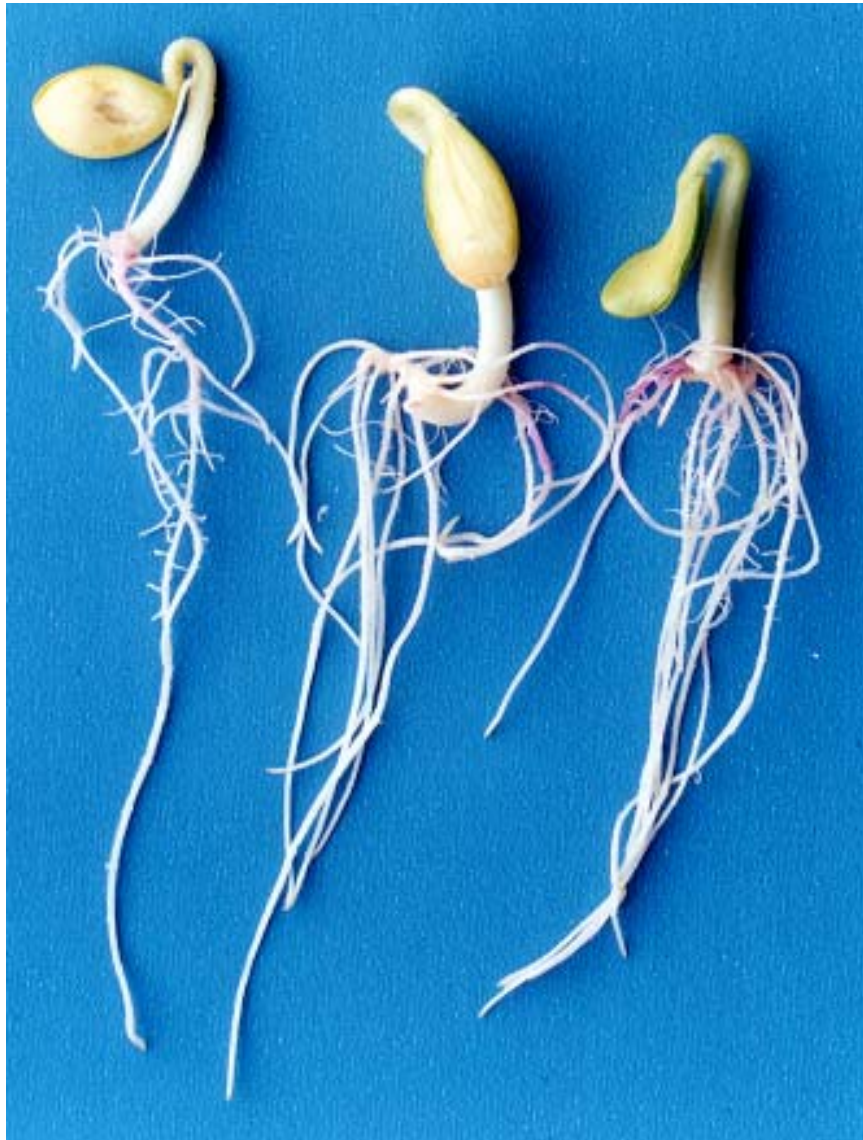


Figura 32 - Plântulas normais fracas de abobrinha.

Classe 4 – sementes não viáveis (Figuras 33, 34 e 35)

Apresentam coloração róseo intenso tendendo a branco leitoso nas superfícies externa e interna dos cotilédones se estendendo até a região de ligação destes com o eixo hipocótilo-radícula; presença de radícula completamente não colorida (branco leitoso) ou eixo embrionário totalmente róseo intenso.



Figura 33 - Semente de abóbriinha pertencente à classe 4. Cotilédones com coloração róseo claro tanto na face externa como interna, apresentando lesão róseo intenso na região de ligação com o eixo embrionário, em ambos os cotilédones, tanto externa como internamente. Eixo embrionário róseo intenso em toda a superfície interna da radícula, que externamente apresenta-se com coloração branco leitoso, indicando tecido morto.



Figura 34 - Semente de abóbriinha pertencente à classe 4. Coloração róseo intenso na região central de ambos os cotilédones, tanto externa como internamente, atingindo a região vascular de ligação com o eixo. Eixo embrionário com coloração róseo intenso em toda a sua extensão, externa e internamente.



Figura 35 - Sementes de abobrinha pertencentes à classe 4. Ambos os cotilédones apresentando mais de 50% de sua extensão com coloração róseo intenso, já tendendo a branco leitoso, afetando a região de conexão com o eixo embrionário. Este se apresenta com coloração róseo intenso em toda a sua extensão, tanto externa como internamente.

Na Figura 36 estão ilustradas as plântulas classificadas como anormais no teste de germinação, as quais podem apresentar sistema radicular deficiente, hipocótilo curto comprometendo o seu desenvolvimento satisfatório, estrutura aérea pouco desenvolvida, sendo plântulas fracas, ou seja, pouco desenvolvidas. Estas plântulas são oriundas de sementes da classe 4, quando colocadas para germinar.



Figura 36 - Plântulas anormais de abobrinha.

Classe 5 – sementes mortas (Figuras 37, 38 e 39)

Sementes com coloração branco leitoso ou róseo bastante intenso em toda a sua extensão, ou ainda, amareladas com manchas róseo intenso.



Figura 37 - Semente de abobrinha pertencente à classe 5. Semelhante ao descrito para a classe 4 (Figura 35), apenas com a lesão bem mais evoluída, ocupando quase que a totalidade da área dos cotilédones.



Figura 38 - Sementes de abobrinha pertencentes à classe 5. Cotilédones com coloração róseo intenso, mas com a área central já se mostrando branco leitoso atingindo, inclusive, a região de conexão vascular com o eixo. Eixo embrionário totalmente branco leitoso (tecido morto) tanto externa como internamente.



Figura 39 - Sementes de abobrinha pertencentes à classe 5. Sementes totalmente descoloridas (tecido branco leitoso), indicando não existir mais atividade enzimática necessária para a coloração.

4.2. Aplicabilidade do método

A metodologia considerada mais adequada para a condução de teste de tetrazólio em sementes de abóbora e abobrinha, foi aplicada em três diferentes lotes, para avaliar tanto a viabilidade como o vigor, sendo aferida com os resultados obtidos nos testes de germinação, de envelhecimento acelerado (vigor) e de emergência de plântulas em areia.

4.2.1. Abóbora

O resumo das análises de variância relativo aos resultados obtidos nos testes de germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas em areia e tetrazólio é apresentado no Quadro 1. Observa-se que houve diferenças significativas entre os três lotes de sementes de abóbora para todos os testes realizados.

Quadro 1 - Resumo das análises de variância relativo ao teste de germinação (TG), envelhecimento acelerado (EA), emergência de plântulas em areia (EPA) e tetrazólio viabilidade (TTZ 1-3) e vigor (TTZ 1-2) de três lotes de sementes de abóbora

FV	GL	Quadrados Médios				
		TG	EA	EPA	TTZ 1-3	TTZ 1-2
Lotes	2	209,33 **	255,25 **	85,33 **	176,33 **	254,33 **
Resíduo	9	3,80	16,27	5,44	3,00	1,33
CV (%)		4,69	12,80	5,57	4,10	3,26
Médias		41,58	31,50	41,83	42,16	35,33

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

No Quadro 2, encontram-se os resultados médios obtidos para as sementes de abóbora, nos testes de germinação e vigor. Pode se observar que os resultados obtidos nos testes de germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas em areia e tetrazólio 1-3 (viabilidade) agruparam os lotes em dois níveis de qualidade, sendo os lotes 2 e 3 superiores ao lote 1, classificado como de pior qualidade fisiológica. Os resultados de vigor obtidos pelo teste de tetrazólio 1-2 (vigor) mostram que este foi mais sensível ao indicar diferenças significativas entre os três lotes, classificando o lote 2 como de alto vigor, o lote 3 como intermediário e o lote 1 como o de menor vigor. Assim, o referido teste permitiu detectar diferenças significativas entre os lotes 2 e 3, o que não foi possível utilizando-se os testes de germinação, envelhecimento acelerado e tetrazólio (1-3).

Os coeficientes de correlação entre os resultados dos testes de germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas em areia, tetrazólio (1-3) e (1-2) encontram-se no Quadro 3. Pelos resultados obtidos para a avaliação da viabilidade, verifica-se que houve correlação positiva e altamente significativa ($r = 0.91^{**}$) entre os resultados de germinação (TG) e TTZ (1-3). Resultados semelhantes foram encontrados por PASHA & DAS

Quadro 2 - Percentagens médias obtidas para o teste de germinação (TG), envelhecimento acelerado (EA), emergência de plântulas em areia (EPA) e tetrazólio viabilidade (TTZ 1-3) e vigor (TTZ 1-2), de três lotes de sementes de abóbora

Lotes	TG	EA	EPA	TTZ 1-3	TTZ 1-2
1	67,00 b	45,00 b	73,00 b	69,00 b	53,00 c
2	93,00 a	76,00 a	89,00 a	92,00 a	84,00 a
3	91,00 a	69,00 a	89,00 a	92,00 a	75,00 b

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 3 - Coeficientes de correlação simples de Pearson entre os resultados do teste de germinação (TG), envelhecimento acelerado (EA), emergência de plântulas em areia (EPA) e tetrazólio viabilidade (TTZ 1-3) e vigor (TTZ 1-2), aplicados em três lotes de sementes de abóbora

Testes	TG	EA	EPA	TTZ 1-3	TTZ 1-2
TG	1,00	0,86 **	0,79 **	0,91 **	0,93 **
EA		1,00	0,82 **	0,85 **	0,87 **
EPA			1,00	0,89 **	0,80 **
TTZ 1-3				1,00	0,95 **
TTZ 1-2					1,00

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

(1982) comparando a viabilidade de sementes de soja, obtidas no teste de tetrazólio, com os resultados do teste de germinação. Os autores encontraram uma clara associação entre os dois testes, determinando corretamente o aumento ou a diminuição da germinação.

A análise de correlação realizada entre os testes de vigor indicam correlação positiva e significativa ($r = 0.87^{**}$) entre estes testes de envelhecimento acelerado e TTZ 1-2, ou seja, há uma associação entre os testes. A análise de correlação indicou correspondência entre os resultados do teste de tetrazólio 1-3 e 1-2 e a emergência de plântulas em areia. Assim, de modo geral, observou-se correlação altamente significativa entre os resultados do teste de tetrazólio e aqueles fornecidos pelos demais testes de avaliação da qualidade empregados, indicando que a metodologia testada mostrou-se adequada para a avaliação tanto da viabilidade como do vigor de sementes de abóbora.

4.2.2. Abobrinha

O resumo das análises de variância obtido para os dados de germinação e vigor está apresentado no Quadro 4. Observa-se, neste quadro, que houve efeito significativo para os lotes, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F, para todos os testes realizados.

Quadro 4 - Resumo da análise de variância relativo ao teste de germinação (TG), envelhecimento acelerado (EA), emergência de plântulas em areia (EPA) e tetrazólio viabilidade (TTZ 1-3) e vigor (TTZ 1-2), de oito lotes de sementes de abobrinha

FV	GL	Quadrados Médios				
		TG	EA	EPA	TTZ 1-3	TTZ 1-2
Lotes	7	269,71 **	689,71 **	168,00 **	241,26 **	733,69 **
Resíduo	24	17,89	15,64	14,33	7,20	17,79
CV (%)		10,22	10,87	8,80	6,45	13,25
Médias		41,37	36,37	43,00	41,56	31,81

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

No Quadro 5 encontram-se os resultados médios obtidos para os oito lotes de sementes de abobrinha submetidos aos testes de germinação, envelhecimento acelerado, emergência de plântulas em areia e tetrazólio. Confrontando os resultados do teste de germinação com os de tetrazólio 1-3 (viabilidade) observa-se que houve coerência entre os dois testes, já que ambos indicaram menor qualidade fisiológica para as sementes do lote 2 e agrupando os lotes 1, 4, 6 e 7, como os de maior qualidade, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Examinando os resultados do teste de envelhecimento acelerado e comparando-os com os de tetrazólio 1-2, que avalia o vigor, observa-se que ambos os testes mostraram-se suficientes para classificar os lotes em níveis de vigor. Desta forma, pelo teste de envelhecimento acelerado, os lotes 1, 4 e 7 foram classificados como de alto vigor e o lote 2 como inferior aos demais, enquanto que pelo TTZ 1-2 os lotes 1, 4, 6 e 7 mostraram-se superiores permanecendo o lote 2 como de baixa qualidade fisiológica. Já a emergência de plântulas em areia mostrou-se não diferenciou os lotes em níveis de vigor, indicando o lote 2 como inferior aos demais e o lote 3 como de qualidade intermediária. Os demais lotes foram estatisticamente semelhantes.

Quadro 5 - Percentagens médias obtidas para o teste de germinação (TG), envelhecimento acelerado (EA), emergência de plântulas em areia (EPA) e tetrazólio viabilidade (TTZ 1-3) e vigor (TTZ 1-2), de oito lotes de sementes de abobrinha

Lotes	TG	EA	EPA	TTZ 1-3	TTZ 1-2
1	100,0 a	99,00 a	99,00 a	100,0 a	96,00 a
2	54,00 d	28,00 d	62,00 c	58,00 d	28,00 d
3	73,00 c d	51,00 c	75,00 b c	68,00 c d	49,00 c
4	96,00 a b	98,00 a	94,00 a	98,00 a	98,00 a
5	70,00 c d	54,00 c	82,00 a b	75,00 c	35,00 c d
6	97,00 a b	79,00 b	83,00 a b	97,00 a	81,00 a b
7	94,00 a b	96,00 a b	96,00 a	90,00 a b	73,00 b
8	79,00 b c	78,00 b	97,00 a	79,00 b c	49,00 c

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No Quadro 6, encontram-se os valores dos coeficientes de correlação obtidos para os resultados dos testes TG, EA, EPA, TTZ (1-3) e TTZ (1-2). Destacando os resultados obtidos nos testes para avaliação da viabilidade (teste de germinação e tetrazólio 1-3), verificou-se que houve correlação positiva e significativa ($r = 0.81^{**}$) entre os mesmos. PASHA & DAS (1982) consideraram o teste de tetrazólio seguro, confiável e apropriado para determinar a capacidade de germinação de lotes de sementes de soja.

Quadro 6 - Coeficientes de correlação simples de Pearson entre os resultados dos testes de germinação (TG), envelhecimento acelerado (EA), emergência de plântulas em areia (EPA) e tetrazólio viabilidade (TTZ 1-3) e vigor (TTZ 1-2), aplicados em oito lotes de sementes de abobrinha

Testes	TG	EA	EPA	TTZ 1-3	TTZ 1-2
TG	1,00	0,84 **	0,67 **	0,81 **	0,81 **
EA		1,00	0,78 **	0,86 **	0,82 **
EPA			1,00	0,64 **	0,53 **
TTZ 1-3				1,00	0,92 **
TTZ 1-2					1,00

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Para avaliação do vigor, houve correlação significativa entre os resultados de envelhecimento acelerado e tetrazólio 1-3 e 1-2. Alguns estudos tem mostrado que o tetrazólio apresenta boa correlação com os diferentes testes de vigor. Os resultados da análise de correlação obtidos no presente trabalho indicaram que os testes de tetrazólio (1-2) e (1-3) apresentaram coeficientes de correlação positivos e altamente significativos com praticamente todos os testes empregados. Os menores coeficientes de correlação foram verificados entre os resultados de tetrazólio e a porcentagem de emergência de plântulas em areia.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de desenvolver metodologia apropriada para o uso do teste de tetrazólio em sementes de *Cucurbita moschata* (abóbora) e *Cucurbita pepo* (abobrinha), visando determinar a viabilidade e o vigor, foi desenvolvido o presente trabalho, no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados lotes comerciais de sementes das duas espécies que foram caracterizados quanto à qualidade fisiológica e submetidos a estudos preliminares visando determinar o método de pré-condicionamento e o período de coloração mais adequados para a condução do teste. Cada amostra submetida ao teste de tetrazólio foi também avaliada quanto à germinação e ao vigor das plântulas estabelecendo-se cinco classes de viabilidade e vigor, onde cada semente avaliada foi incluída em uma das classes, e os danos e lesões verificados em cada classe descritos. Desenvolvida a metodologia, ela foi aplicada em diferentes lotes de sementes de abóbora e abobrinha e aferida com os resultados obtidos nos testes de germinação, de envelhecimento acelerado e de emergência de plântulas em areia. Os resultados permitem concluir que o teste de tetrazólio para sementes de abóbora e de abobrinha pode ser usado para avaliar a viabilidade e o vigor, possibilitando a obtenção de informações rápidas e confiáveis. O método de pré-condicionamento mais eficiente foi a imersão direta em água a 40°C, por 30 minutos, para a remoção do tegumento e por mais 30 minutos para a retirada da membrana interna, após corte superior nos cotilédones. Para o desenvolvimento da coloração

ideal, mostrou-se adequada a imersão em solução de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio a 0,075% por 60 minutos, em câmara de germinação tipo BOD a 40°C. Foram obtidas correlações positivas e significativas entre os resultados do teste de tetrazólio, teste de germinação, de envelhecimento acelerado e de emergência de plântulas em areia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A., ANDERSON, J.D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. **Crop Science**, Madison, v. 13, n. 6, p. 630-633, 1973.
- AOSA – Association of Official Seed Analysts. **Seed vigor testing handbook**. 1983. 93p.
- ARAÚJO, R.F., ALVARENGA, E.M., LIMA, W.A.A., DIAS, D.C.F.S., ARAÚJO, E.F. **O uso do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. Informativo ABRATES. Curitiba-PR, v. 7, n.1/2, p. 109, 1997.
- BARROS, A.S.R. **Testes para avaliação rápida da viabilidade e vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1988. 140 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.
- BHERING, M.C., SILVA, R.F., ALVARENGA, E.M., DIAS, D.C.F.S., PENA, M.F. **Avaliação da viabilidade e vigor das sementes de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo teste de tetrazólio**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 27 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- BHERING, M.C., SILVA, R.F., ALVARENGA, E.M., DIAS, D.C.F.S., PENA, M.F. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES. 1999. Cap. 8.3, p. 8.3-8.10.
- BITTENCOURT, S.R.M., VIEIRA, R.D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES, 1999. Cap. 8.2, p. 8.2-8.8.

- BITTENCOURT, S.R.M., VIEIRA, R.D. Use of reduced concentrations of tetrazolium solutions of the viability of peanut seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 1, p. 75-82, 1997.
- BITTENCOURT, S.R.M., VIEIRA, R.D., RODRIGUES, T.J.D. Criteria for peanut seed pre-conditioning for the tetrazolium test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 3, p. 337-342, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNPV/CLAV, 1992. 365p.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. (ed.) **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal-SP: Funep. 2000. 588p.
- COSTA, N. P., MARCOS FILHO, J. **O emprego do teste de tetrazólio na avaliação da qualidade da semente de soja**. Informativo ABRATES. Curitiba-PR, v. 4, n. 2, 1994.
- COSTA, N.M. **Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1992. 132p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1992.
- COSTA, N.P., FRANÇA NETO, J.B., KRZYANOSWSKI, F.C., HENNING, A. A., PEREIRA, J. E. Avaliação de metodologia alternativa para o teste de tetrazólio para sementes de soja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba-SP, v. 55, n.2, p. 305-312, 1998.
- COSTA, N.P., FRANÇA NETO, J.B., KRZYANOSWSKI, F.C., HENNING, A. A., PEREIRA, J. E. Validation of the alternative methodology of the tetrazolium test for soybean seeds. In: International Seed Testing Congress-Seed Symposium, 26., 2001, Angers-France, **Abstracts...** Angers-France: International Seed Testing Association, 2001. p. 40.
- COSTA, N.P., FRANÇA NETO, J.B., OLIVEIRA, M.C.N. Padronização de testes de vigor para sementes de soja. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Londrina- PR. **Resultados de Pesquisa de Soja 1986/87**. Londrina. EMBRAPA - CNPSo, 1988, p.358-359.
- CUSTÓDIO, C.C., MARCOS FILHO, J. Potassium leachate test for the evaluation of soybean seed physiological quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, p. 549-564, 1997.
- DELOUCHE, J.C., BASKIN, N.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p. 427- 452, 1973.

- DELOUCHE, J.C., STILL, T.W., RASPET, M., LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília-DF: AGIPLAN, 1976. 103p.
- DIAS, D.C.F.S. **Testes de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio para avaliação do vigor de sementes de soja *Glycine max* L. Merrill**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1994. 136p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1994.
- DIAS, D.C.F.S., MARCOS FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba-SP, v. 52, n.3, p. 435-443,1996.
- DIAS, D.C.F.S., MARCOS FILHO, J., CARMELLO, Q.A.C. Teste de lixiviação de potássio para avaliação do vigor de sementes de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba-SP, v. 52, n.3, p. 427-434, 1996.
- DIAS, D.C.F.S., VIEIRA, A.N., BHERING, M.C. Testes de condutividade elétrica e lixiviação de potássio para avaliação do vigor de sementes de hortaliças: feijão de vagem e quiabo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n. 2, p. 170-175, 1998.
- DIAS, M.C.L.L., ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Informativo ABRATES**, Curitiba-PR, v. 11, n. 2, p. 317, 2001a.
- DIAS, M.C.L.L., ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hoscst. Ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. **Informativo ABRATES**, Curitiba-PR, v. 11, n. 2, p. 317, 2001b.
- DIAS, M.C.L.L., BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina-PR: IAPAR, 1995. 43 p. (IAPAR, Circular, 88).
- DIAS, M.C.L.L., BARROS, AS.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (eds). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES. 1999. Cap. 8.4, p. 8.4-8.10.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1974. 293p.
- FRANÇA NETO, J.B. **Princípios do teste de tetrazólio para a semente de soja**. Curitiba-PR: TECPAR, 1981. 14 p. (Boletim LASP, v.3, n.1).
- FRANÇA NETO, J.B., KRZYZANOWSKI, F.C., COSTA, N.P. **The tetrazolium test for soybean seeds**. Londrina-PR: EMBRAPA- CNPSo, 1998. 71p. (Documentos, 115).

- FRANÇA NETO, J.B., PEREIRA, L.A.G., COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: FRANÇA NETO, J.B., HENNING, A.A. **Diagnóstico completo da qualidade da semente de soja** – Versão Preliminar. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, p. 9-43. 1985.
- FRANÇA NETO, J.B., PEREIRA, L.A.G., COSTA, N.P., KRZYZANOWSKI, F.C., HENNING, A.A. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina-PR: EMBRAPA-CNPSO, 1988. 60p.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 14 ed., Piracicaba-SP, 2000. 477p.
- GRABE, D. F. **Tetrazolium testing handbook (S.I.)**. Association of Official Seed Analysts. 1970. 62p.
- JOHNSON, R.R., WAX, L.M. Relationship of soybean germination and vigor tests to field performance. **Agronomy Journal**, Madison, v.76, n.2, p.273-278, março/abril. 1978.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina-PR: ABRATES, 1999. cap. 2, p. 1-24.
- MARCOS FILHO, J., CÍCERO, S.M., SILVA, W.R. **Teste de tetrazólio**. Piracicaba-SP: ESALQ - Departamento de Agricultura e Horticultura, 1987. 40p.
- MCDONALD JUNIOR, M.B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proc. Assoc. Off. Seed Analysts**, Lansing, v. 65. p. 109-139, 1975.
- MIGUEL, M.V.C. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho através do teste de lixiviação de potássio**. Piracicaba, SP: ESALQ, 2001. 113p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2001.
- MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zurich: International Seed Testing Association, 1985. 99p.
- MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. (ed.). **Seed ecology**. London-Butterworth, p. 347-366, 1973.
- PANOBIANCO, M. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de tomate**. Piracicaba, SP: ESALQ, 2000. 152p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2000.
- PASHA, M.R., DAS, R.K. Quick viability test of soybean seed by using tetrazolium chloride. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.10, n.2, p.651- 655, 1982.

- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.
- VIEIRA, M.G.G.C., GUIMARÃES, R.M., PINHO, E.V. R. V., GUIMARÃES, R.J., OLIVEIRA, J.A. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras-MG, n.26, p.1-34, 1998. (Boletim Agropecuário, n.26).
- VIEIRA, M.G.G.C., PINHO, E.V.R.V. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina-PR: ABRATES, 1999. Cap. 8.1, p.8.1-8.13.
- WELBAUM, G.E. Cucurbit seed development and production. **Hort Technology**, v.9, n.3, p.341-348, 1999.
- WELBAUM, G.E., BRADFORD, K.J. Water relations of seed development and germination in Muskmelon (*Cucumis melo* L.): Characteristics of the perisperm during seed development, **Plant Physiology**, v.92, p.1038-1045, 1990.