UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

PATRICIA DO ROSARIO RODRIGUES

TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DE SEMENTES DE MUCUNA PRETA

ALEGRE-ES
2011

PATRICIA DO ROSARIO RODRIGUES

TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DE SEMENTES DE MUCUNA PRETA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.
Orientador: Prof.Dr. Bruno Borges Deminicis.

ALEGRE-ES
2011

PATRICIA DO ROSARIO RODRIGUES

TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DE SEMENTES DE MUCUNA PRETA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Aprovado em 29 de junho de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Borges Deminicis
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Henrique Duarte Vieira
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

M.Sc. Tatiana Oliveira da Silva
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

D.Sc. Renata Vianna Lima
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

“Quando não houver saída
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída
Nenhuma idéia vale uma vida...
Quando não houver esperança
Quando não restar nem ilusão
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós
Algo de uma criança...”

Titãs

DEDICATORIA

Dedico essa dissertação a minha avó Maria Anita (*in memorian*) que não terá a oportunidade de viver este momento. Ela que sempre esteve ao meu lado, concordando ou não com minhas decisões, e pronta a me apoiar e socorrer. Hoje não se faz mais presente, mas sinto o apoio espiritual que a senhora me passa.Te amo vovó Anita!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todo-poderoso pelo dom de vida que me concebeu e por ter iluminado o meu caminho durante todos estes anos.

Aos meus pais, Jasson Rodrigues e Maria Odete do Rosario Rodrigues, que mais do que me proporcionar uma vida acadêmica, formaram os fundamentos do meu caráter. Obrigada por serem referência em minha vida e estarem sempre presentes de uma forma indispensável.

A minha madrinha Marluce Freitas Rodrigues, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos bons e difíceis durante toda minha vida, em especial durante a vida acadêmica, acreditando no meu potencial.

A minha irmã Marcely do Rosario Rodrigues que esteve ao meu lado dando forças e apoio.

Aos docentes do departamento de Zootecnia, em especial o Professor Doutor Bruno Borges Deminicis por toda compreensão, apoio, paciência, incentivo, credibilidade e dedicação.

Aos membros D.Sc. Renata Vianna Lima, M.Sc. Tatiana Oliveira da Silva e ao Prof. Dr. Henrique Duarte Vieira, componentes da banca examinadora, pela avaliação do trabalho, orientação e sugestões fornecidas.

Aos meus colegas e amigos pelo companheirismo, pelos momentos agradáveis de convívio e por muito me ajudar durante a graduação.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo, em especial ao Centro de Ciências Agrárias por ser a casa onde um sonho se torna possível.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra possibilitaram a conclusão deste curso, a todos a minha sincera gratidão.

Muito Obrigada.

BIOGRAFIA

PATRICIA DO ROSARIO RODRIGUES, Filha de Jasson Rodrigues e Maria Odete do Rosario Rodrigues, nasceu no dia 15 de abril de 1988, na cidade de Vitória- ES. Em 2005 concluiu o ensino médio na Escola Contec na cidade de Vila Velha – Espirito Santo. No primeiro semestre de 2007 ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo, no curso de Zootecnia (CEDZOO), em Alegre-ES. Em 2007 participou do 1º Ciclo de Estudos Direcionados a Zootecnia, realizado no CCA-UFES, estagiou no Laboratório de Microscopia do CCA-UFES e participou da Jornada da Vida Silvestre e Meio Ambiente. Em 2008 estagiou no Complexo Agroindustrial Pindobas, no mesmo ano participou do 2º CEDZOO. Em 2009 participou da VI Semana do CCA-UFES, participou da XV Reunião Nacional de Ensino de Zootecnia, do Congresso Internacional de Zootecnia, da GRANEXPOES 2009, do 3° CEDZOO. Em 2010 participou do V Simpósio Mineiro de Nutrição de Gado de Leite, do 1° Curso de Noções em Morfologia e Julgamento de Zebuínos com Aptidão Leiteira, publicou 10 trabalhos na II Semana Nacional de Ciências e Tecnologia do IFES – *campus* Alegre, foi Bolsista Voluntária no Programa Institucional de Iniciação Cientifica da UFES, sob orientação da Prof.ª Maristela de Oliveira Bauer. Foi monitora voluntária na disciplina Economia e Administração Agroindustrial. Em 2011 organizou I Ciclo de Palestras da Zootecnia do CCA-UFES, participou da XVII Reunião Nacional de Ensino de Zootecnia, do Congresso Internacional de Zootecnia, publicando 6 trabalhos no evento. Foi Bolsista do Programa Institucional de Iniciação Cientifica da FAPES, sob orientação do Prof. Bruno Borges Deminicis. Em junho de 2011, submeteu-se a defesa do trabalho de conclusão de curso.

SÚMARIO

RESUMO vii

ABSTRACT viii

1. INTRODUÇÃO ii

2. REVISÃO DE LITERATURA 2

2.1. Mucuna Preta (*Stizolobium aterrimum*) 2

2.2. Germinação 2

2.3. Dormência de sementes 3

2.3.1. Tipos de dormência 4

2.3.2. Métodos para quebra de dormência 5

2.4. Avaliação do Vigor de sementes 7

2.5. Teste de Tetrazólio 8

3. MATERIAL E MÉTODOS 10

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 13

5. CONCLUSÕES 17

6. REFERENCIAS 18

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência de métodos de pré-condicionamento e concentrações da solução de tetrazólio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de Mucuna Preta submetidas ao envelhecimento acelerado. Sementes comerciais passaram pelo processo de envelhecimento acelerado para compor os lotes de 0, 24, 48 e 96 horas, e foram submetidas aos métodos de pré-condicionamento: a) escarificação manual com lixa d'água número 100 e imersão em água em temperatura ambiente por 18 horas; b) imersão em água a 95ºC e mantidas na mesma água, fora do aquecimento, por 18 horas. Após o pré-condicionamento, os tegumentos das sementes foram retirados e os embriões imersos em soluções de tetrazólio a 0,25; 0,5 e 1% por 150 minutos, sendo mantidos no escuro e em temperatura ambiente para desenvolvimento da coloração. Para comparação dos resultados obtidos no teste de tetrazólio, foram realizados os testes de germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação. A escarificação manual com lixa e posterior embebição em água por 18 horas em temperatura ambiente apresenta maior eficiência no pré-condicionamento de sementes de Mucuna Preta e a concentração 1,0% da solução de tetrazólio por 150 minutos a 25ºC permite avaliar a qualidade de lotes de sementes dessa espécie.

Palavras-chave: germinação, leguminosas forrageiras, *Stizolobium aterrimum*, vigor

ABSTRACT

This study aimed to verify the efficiency of pre-conditioning methods and concentrations of tetrazolium solution in assessing the quality of seeds of Mucuna Preta. Commercial seed through the process of accelerated aging to make batches of 0, 24, 48 and 96 hours and were subjected to methods of preconditioning: a) manual scarification with sandpaper number 100 and immersion in water at 25 ° C for 18 hours b) immersion in water at 95 ° C and maintained in the same water, away from heat, for 18 hours. After preconditioning, the seed coats were removed and the embryos immersed in solutions of tetrazolium to 0.25, 0.5 and 1% for 150 minutes, being kept in the dark at room temperature for color development. For comparison of results obtained in the tetrazolium test, were performed by standard germination, first count and speed of germination index. The manual scarification with sandpaper and subsequent immersion in water for 18 hours at room temperature is more efficient preconditioning of seeds of Mucuna Preta and the concentration of 1.0% tetrazolium solution for 150 minutes at 25 ° C allows to evaluate the quality of batches of seeds of this species.

Key-words: germination, pasture legumes, *Stizolobium aterrimum*, vigor

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui área de 850 milhões de ha, dos quais pouco mais de 354 milhões são ocupados por atividades agropecuárias. As áreas de pastagens merecem destaque por ocuparem cerca de 174 milhões de ha, sendo 122 milhões ocupados por espécies cultivadas e 52 milhões por espécies nativas, o que corresponde a 48% das áreas destinadas às atividades agropecuárias (IBGE, 2010). Tais problemas aliado a elevação dos preços dos insumos básicos têm contribuído significativamente para o aumento da demanda de sementes de leguminosas utilizadas na recuperação de áreas degradadas. Entre as leguminosas comumente empregadas, a Mucuna Preta (*Stizolobium aterrimum* - Piper e Tracy) anteriormente denominada *Mucuna aterrima*, ocupa lugar de destaque pelo seu uso na recuperação de áreas degradadas e como forrageira na alimentação de animais.

A utilização de testes rápidos torna-se instrumento necessário para avaliação da qualidade fisiológica de um lote de sementes, pois agiliza as decisões quanto ao manejo de lotes de sementes durante as etapas de pré e de pós-colheita.

A avaliação do vigor de sementes, como rotina pela indústria sementeira, tem evoluído à medida que os testes disponíveis vêm sendo aperfeiçoados, permitindo a obtenção de resultados consistentes e reproduzíveis. O método rotineiro para determinar a qualidade das sementes é o teste de germinação, que requer um período relativamente longo para se obter resultados. Neste contexto, segundo Bhering et al. (2005), o teste de tetrazólio tem se mostrado uma alternativa promissora pela qualidade e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor da semente.

Sabendo da importância da utilização de testes rápidos e eficientes para estimar a viabilidade de sementes, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a utilização do teste de tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de Mucuna Preta, definido assim o pré-condicionamento mais adequado, a concentração da solução e o tempo de coloração das sementes submetidas ao envelhecimento acelerado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mucuna Preta (*Stizolobium aterrimum*)

A Mucuna Preta pertence à família das Fabaceas, Sub-família Papilionidae.

É uma leguminosa anual, voluvel (trepadeira) com hastes longas, caules longos e flexíveis, rácemos axilares, flores de coloração violácea ou branca, e grandes; vagens largas, grossas, com poucas sementes, sementes grandes, pretas e com hilo branco (MITIDIERI, 1983). É utilizada para adubação verde, podendo ser empregada na produção de forragem, em pastejo direto, na forma de silagem ou feno, e triturando-se os grãos, como suplemento protéico aos animais (CALEGARI, 1995).

Alcântara e Bufarah (1992) relataram que a Mucuna Preta é uma planta resistente à seca, sombra, altas temperaturas, acidez dos solos e ligeiramente resistente a encharcamento. A época de plantio é de outubro a dezembro e a colheita de junho a julho, tendo um ciclo vegetativo de 180 a 240 dias.

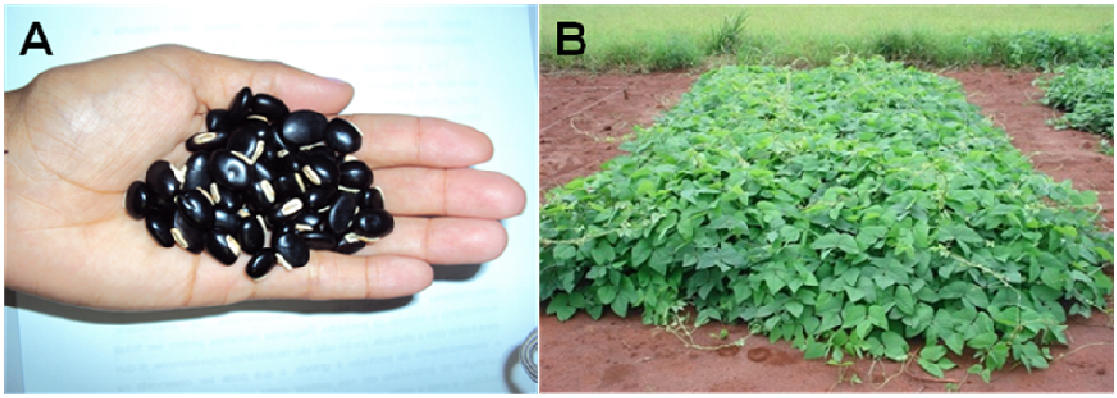


Figura 1. A- Sementes de Mucuna Preta. B- Mucuna Preta

2.2. Germinação

O teste de germinação determina a porcentagem de sementes capazes de germinar normalmente, com base nas características morfológicas das plantas. Sendo assim, tanto as Regras para Analise de Sementes nacionais

(BRASIL, 2009) como as internacionais (ISTA, 1993) indicam o substrato, a temperatura, os limites de tempo, e, no caso de sementes dormentes, tratamentos especiais para a condução do teste. A necessidade de tal padronização advém principalmente do fato de que a intensidade da resposta das sementes ao ambiente é variável entre as espécies (MACHADO, 2002). Deste modo, as condições de execução do teste estão estabelecidas nas Regras para Análise de Sementes (RAS) para um grande numero de espécies vegetais, das quais as sementes de leguminosas e gramíneas forrageiras nativas constituem uma pequena parcela (BRASIL, 2009).

Os eventos principais que ocorrem na germinação de sementes são: embebição, ativação de enzimas, iniciação do crescimento do embrião, rompimento do tegumento, emergência da plântula (RODRIGUES, 1988).

Em tecnologia de sementes, o critério para definir a germinação baseia-se no desenvolvimento da plântula. Nesse caso, é levada em consideração a presença de todas as estruturas essenciais do embrião (MARCOS FILHO, 2005; BRASIL, 2009). No entanto, Carvalho e Nakagawa (2000) defendem a idéia de que se deva considerar apenas as fases que antecedem o crescimento do eixo embrionário como caracterizando o processo de germinação.

Segundo Brasil (2009), a realização de testes de germinação em condições de campo não é geralmente satisfatória, pois dada à variação das condições ambientais os resultados nem sempre podem ser fielmente reproduzidos.

Toledo e Marcos Filho (1997) citaram que a germinação é afetada por uma série de condições intrínsecas e extrínsecas, cujo conjunto é essencial para que o processo se realize normalmente. Alguns desses fatores são: disponibilidade de água, temperatura, pH do substrato, luz, oxigênio, maturidade fisiológica da semente, mecanismo de dormência entre outros.

2.3. Dormência de sementes

Dormência é um período no ciclo de vida de um organismo no qual o desenvolvimento é temporariamente suspenso. Ela minimiza o gasto energético, por reduzir a atividade metabólica, e pode auxiliar um organismo a conservar energia.

Pela definição de Carvalho e Nakagawa (2000), dormência é o fenômeno pelo qual sementes de uma determinada espécie, mesmo sendo viáveis e tendo todas as condições ambientais para tanto, deixam de germinar.

Segundo Toledo e Marcos Filho (1997), o período de dormência pode ser temporário ou estender-se durante muito tempo até que certa condição especial seja preenchida.

Para Carvalho e Nakagawa (2000), o fenômeno da dormência é tido como um recurso pelo qual a natureza distribui a germinação no tempo e no espaço. Seguem relatando que a utilização desses dois fatores garantiu às plantas, que se reproduzem por sementes, uma quase infinidade de combinações ecológicas.

A dormência abriga vantagens para as plantas como sobrevivência e preservação das espécies; disseminação de estruturas propagativas; tolerância à condições ambientais diversas, ou seja, de passarem o inverno na condição de sementes e para o homem o de evitar que embriões continuem a crescer e germinem ainda na planta mãe (viviparidade), por outro lado apresentam determinadas desvantagens como sendo necessários longos períodos para que um lote de sementes supere a dormência, a germinação se distribuindo no tempo, contribuir para a longevidade das plantas invasoras, interferir com o programa de plantio e apresentar problemas de avaliação da qualidade da semente (TOLEDO e MARCOS FILHO, 1997)

2.3.1. Tipos de dormência

São conhecidos dois tipos de dormência sendo elas denominadas natural ou primária e secundária ou induzida. A primária sempre ocorre, ainda que com intensidade variável de ano para ano e de local para local, pois é um tipo de dormência que se instala na fase de maturação da semente. É, pois, uma característica da espécie (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Em alguns casos esta é superada por simples armazenamento da semente seca por algum tempo. Assim, imediatamente após a colheita, as sementes não germinam (POPINIGIS, 1977).

Já a secundária, ou induzida, é um tipo de dormência que nem sempre ocorre. Quando isto acontece, é por efeito de uma condição ambiental especial.

É como se a semente possuísse o aparato genético para desencadear o fenômeno da dormência, o que ocorreria, contudo, só sob condições especiais, como temperatura, fotoperíodo, duração da estação, qualidade da luz, nutrientes e umidade do solo (BASKIN e BASKIN, 1973).

2.3.2. Métodos para quebra de dormência

Existem sementes que mesmo viáveis não germinam, embora as condições de água, gases (O_2) e temperatura estejam aparentemente adequadas. Estas sementes são denominadas dormentes e precisam de tratamentos especiais para germinar.

Entre os processos mais comuns para superação da dormência de sementes estão a escarificação química, escarificação mecânica, estratificação fria e quente-fria, choque térmico, exposição à luz intensa, imersão em água quente e embebição em água fria (KRAMER e KOZLOWSKI, 1972; FOWLER e BINCHETTI, 2000).

Escarificação química

Esse tipo de processo para superação de dormência é feito geralmente com ácido (sulfúrico, clorídrico etc.), que possibilita as sementes executar trocas com o meio, água e/ou gases.

Galindo et al. (2002), em pesquisa realizada com sementes de Mucuna Preta (*Styzolobium aterrimum*), utilizaram tratamentos de origem mecânicas e químicas para quebra da dormência e evidenciaram que a escarificação ácida por 5 minutos favorece a absorção de água, acelera o processo germinativo e ao mesmo tempo alcança 95,8% de sementes germinadas. Porém, estes mesmos autores, já haviam relatado que sementes de Mucuna Preta quando tratadas com ácido sulfúrico concentrado por variados tempos de imersão (5, 10, 15 e 20 minutos), no intuito de superar sua dormência tegumentar, obtiveram a promoção da germinação e da sua velocidade, mas causaram prejuízo na produção de fitomassa, indicando com isso possíveis interferências negativas do ácido sulfúrico no vigor fisiológico das sementes ou danos ao embrião.

Apesar da eficiência comprovada, o método de escarificação química com ácido sulfúrico concentrado não deve ser usado indiscriminadamente para sementes de quaisquer espécies, haja visto que os resultados obtidos por Maeda e Lago (1986) demonstraram que esse tratamento danifica seriamente as sementes, como ocorrido com sementes de Mucuna Preta.

Escarificação mecânica

A escarificação mecânica é uma técnica frequentemente utilizada e constitui a opção mais prática e segura para pequenos agricultores (HERMANSEN et al., 2000), além de ser um método simples, de baixo custo e eficaz para promover uma rápida e uniforme germinação. No entanto, deve ser efetuada com muito cuidado para evitar que a escarificação excessiva possa causar danos ao tegumento e diminuir a germinação (MCDONALD e COPELAND, 1997)

Para sementes de Mucuna Preta o tratamento de escarificação mecânica com uso de escarificador elétrico recoberto internamente por lixa de parede número 120 mostrou ser prejudicial, ocasionando sérios danos, com grande perda de massa e interferindo negativamente no percentual de germinação (GALINDO et al., 2002).

Choque de temperatura

O choque de temperatura é feito com alternância de temperaturas variando em aproximadamente 20°C, em períodos de 8 e 12 horas.

Escarificação via calor úmido

A utilização de água aquecida visa promover o amolecimento dos tecidos e acelerar as reações fisiológicas do tegumento das sementes, favorecendo a absorção de água, trocas gasosas e a germinação (MARTINS et al., 1997).

O tratamento com água fervendo tem muitas vantagens, podendo ser utilizado em quantidades pequenas e grandes, é simples, prático, fácil de

reproduzir e não requer equipamento especial, conforme McIvor e Gardener (1987).

Mesmo sendo um método vantajoso, de baixo custo e eficiente para superar a dormência de sementes de leguminosas, a água fervente tem apresentado resultados inferiores aos de outros tratamentos (RODRIGUES et al.,1990).

2.4. Avaliação do Vigor de sementes

A avaliação do vigor de sementes, como um componente da qualidade fisiológica de um lote, tem sido uma realidade na grande maioria dos laboratórios de analise de sementes, como componente do controle de qualidade de empresas produtoras de sementes (MARCOS FILHO, 1999).

O vigor de uma semente é definido como a soma daquelas propriedades que determinam o nível potencial de atividade e desempenho de uma semente ou de um lote de sementes durante a germinação e emergência da plântula (ISTA, 1981).

A AOSA (1983) define: “vigor de sementes compreende aquelas propriedades que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais em uma ampla faixa de condições ambientais”.

As sementes apresentam maior viabilidade e vigor por ocasião da maturação fisiológica. A partir deste instante, vão ocorrer mudanças fisiológicas e bioquímicas graduais que ocasionam a deterioração e a perda do vigor (POPINIGIS, 1977; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Segundo Carvalho e Nakagawa (2000) a redução do nível de vigor afeta a capacidade de germinação das sementes, emergência e crescimento das plântulas de três maneiras distintas: reduzindo a velocidade de germinação; aumentando a heterogeneidade de desenvolvimento das plântulas oriundas de uma amostra de sementes e aumentando a porcentagem de plântulas anormais, bem como o grau dessas anormalidades.

Perry (1972) afirma que vigor é uma característica fisiológica determinada pelo genótipo e modificada pelo ambiente, que governa a capacidade de uma semente originar rapidamente uma plântula no campo e

tolerar significativas variações do ambiente; a influencia do vigor da semente pode persistir toda a vida da planta e afetar a produção.

2.5. Teste de Tetrazólio

É um teste adotado para avaliar a qualidade fisiológica das sementes. O objetivo desse teste é determinar rapidamente a viabilidade, que é uma estimativa da germinação das sementes, particularmente de espécies que germinam lentamente em testes normais ou que não germinam quando submetidas aos métodos comumente utilizados, por se encontrarem dormentes (BRASIL, 2009).

O teste de tetrazólio é rápido e estima a viabilidade das sementes, com base na alteração da coloração de tecidos vivos em presença de uma solução de sal de tetrazólio. Essa alteração na coloração reflete a atividade de sistemas enzimáticos específicos, intimamente relacionados com a viabilidade das sementes (MARCOS FILHO et al., 1987). Esse teste é caracterizado bioquimicamente pela redução de um indicador, no interior das células vivas da semente. O indicador usado é uma solução incolor e difusível preparada com o sal de 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio, a qual é absorvida pela semente (BRASIL, 2009).

O sistema enzimático, do qual as enzimas hidrogenases fazem parte, atuam no processo da respiração quando em presença de oxigênio, umidade, substrato e temperaturas favoráveis. Neste processo ocorre, além da produção de gás carbônico, água e energia, a formação de substâncias intermediárias, que são responsáveis pela transferência dos íons de hidrogênio para o sal de tetrazolio, que atua como receptor dos mesmos. O tetrazólio é então reduzido a formazan, um produto insolúvel e vermelho. Como essa reação se processa no interior da célula e o pigmento formazan não é difusível, há uma nítida separação dos tecidos vivos e coloridos daqueles mortos, que mantém a sua cor natural (BRASIL, 2009).

A coloração dos tecidos da semente é um indicativo da sua sanidade, onde o vermelho carmin representa o tecido vivo e vigoroso, o vermelho carmin mais forte representa o tecido em deterioração e o branco leitoso, o tecido morto (FRANÇA NETO et al., 1998).

De acordo com Krzyzanowski et al. (1999), a busca por metodologia adequada na utilização do teste de tetrazólio deve ser fundamentada para a simples distinção de tecidos viáveis e inviáveis e na aptidão de diferenciar lotes de qualidade fisiológica distintas. As informações gerais para a realização do teste de tetrazólio, para um grande número de espécies, estão indicadas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e têm sido aprimoradas nos últimos anos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Tecnologia e Análise de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, no período de janeiro a abril de 2011.

Para a realização deste experimento, foram utilizadas sementes comerciais de Mucuna Preta (*Styzolobium aterrimum*) produzidas no ano de 2010. As sementes comerciais foram previamente selecionadas, descartando aquelas visivelmente danificadas, e em seguida, submetidas ao envelhecimento acelerado por 0, 24, 48 e 96 horas para obtenção de novos lotes. O envelhecimento acelerado foi realizado para simular o armazenamento de sementes.

Para o envelhecimento, as sementes foram acondicionadas em caixas plásticas (“gerbox”) e mantidas em estufa com umidade relativa do ar de 100% (40 mL de água destilada no fundo), sob temperatura constante de 45ºC por 0, 24, 48 e 96 horas.

Perfazendo-se esses períodos, as sementes de Mucuna Preta foram submetidas ao teste de tetrazólio, sendo testadas duas metodologias para o pré-condicionamento: a) escarificação manual com lixa d’água nº 100 para pequena exposição dos cotilédones com posterior imersão em água temperatura ambiente por 18 horas, e b) imersão em água a 95ºC e deixadas em repouso na mesma água, fora do aquecimento, por 18 horas. A seguir, o tegumento de cada semente foi cuidadosamente retirado com um corte superficial na extremidade oposta ao eixo embrionário com auxílio de uma Lâmina de Bisturi Aço Inóx nº 15 e colocadas em copos plásticos contendo solução de tetrazólio nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1% por 150 minutos, sendo mantidas em temperatura ambiente e no escuro (OLIVEIRA et al., 2005).

Após o desenvolvimento da coloração, as sementes foram seccionadas longitudinalmente entre os cotilédones de modo que o eixo embrionário fosse dividido ao meio permitindo uma análise individual das duas metades. e, de acordo com a extensão, intensidade dos tons avermelhados, presença de áreas brancas leitosas, aspecto dos tecidos e localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento, as sementes foram

individualmente separadas em categorias de viáveis e inviáveis de acordo com os padrões (figura 2) para análise.

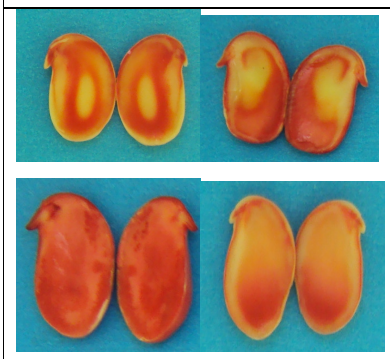
	1-Todas as estruturas do embrião intactas e coloração superficial e uniforme indicando lenta penetração da solução de tetrazólio (Viável).
	2- Sementes com pequenos danos superficiais dos cotilédones. A face interna dos cotilédones e o eixo embrionário não apresentam sinais de danos (Viável).
	3- Sementes com pequenas fraturas nos cotilédones, áreas brancas ou vermelho carmim na face interna dos cotilédones e eixo embrionário intacto (Viável).
	4- Os danos são caracterizados por fraturas ou estrias visíveis na superfície interna dos cotilédones. Apresentam áreas vermelhas-carmim forte. Os danos podem afetar o eixo embrionário (Inviável).
	5- Os danos são mais severos, como fraturas nos cotilédones ou no eixo embrionário, porém mais da metade dos cotilédones permanecem viáveis (Inviável).
	6- Região dos cotilédones descolorido afetando o eixo-embrionário (Inviável).
	7- Tecidos descolorido ou branco-leitoso, textura flácida (Inviável).

Figura 2: Categorias de viabilidade de sementes de *Styzolobium aterrimum* submetidas ao teste de tetrazólio.

Paralelamente ao teste de tetrazólio, sementes dos quatro lotes de envelhecimento acelerado foram submetidas ao teste de germinação, realizado em câmara de germinação do tipo BOD à 27ºC com fotoperíodo de 18 horas. O índice de velocidade de germinação foi calculado conforme fórmula proposta por Maguire (1962): IVG=(G1/D1)+(G2/D2)+(Gn/Dn), em que: E= número de plantas germinadas, na primeira, segunda, ..., última contagem e D= número de dias da semeadura à primeira, segunda, ..., última contagem. Os valores da primeira contagem foram obtidos no 4º dia após a montagem do teste de germinação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x3x4, sendo pré-condicionamentos, concentrações de tetrazólio e lotes respectivamente, com quatro repetições de 25 sementes. Os dados obtidos nos testes de tetrazólio, germinação, primeira contagem, índice de velocidade de germinação foram transformados em arcsen $\sqrt{x}/100$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que não houve diferença significativa entre os testes de germinação e tetrazólio para o lote de 96 horas, contudo, nos lotes 0, 24 e 48 horas em todas as concentrações o teste de tetrazólio subestimou o vigor das sementes

Tabela 1. Resultados dos testes de tetrazólio e germinação (TG), primeira contagem do teste de germinação (1ªC) e índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de *Styzolobium aterrimum* (TZ 0,25 = 0,25% da solução de tetrazólio, TZ 0,5 = 0,5% da solução de tetrazólio e TZ 1,0 = 1,0% da solução de tetrazólio).

	Lotes				
Testes	0 horas	24 horas	48 horas	96 horas	CV%
TZ 0,25	80,00 Aa	19,00 Cb	10,12 Bb	27,00 Ab	28,92
TZ 0,5	59,00 BCa	54,00 Bab	15,00 Bc	32,00 Abc	30,62
TZ 1,0	55,00 CDab	72,79 Aa	20,00 Bb	27,67 Ab	39,42
TG	74,00 ABa	70,00 Aba	79,00 Aa	63,00 Aa	13,85
1ªC	38,00 Dbc	56,00 ABab	61,00 Aa	32,00 Ac	20,03
IVG	5,05 a	5,56 a	5,35 a	3,50 a	30,79
CV%	13,86	15,3	24,54	52,33	

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

Quanto ao método de pré-condicionamento das sementes com escarificação manual, apesar de promover uma descoloração ou coloração vermelho-intenso na região escarificada, este método garante coloração mais uniforme das sementes de Mucuna Preta quando comparado a imersão em água quente, uma vez que os danos causados pela lixa afetam apenas a parte externa dos cotilédones, não prejudicando a interpretação dos resultados, já que os mesmos são verificados internamente.

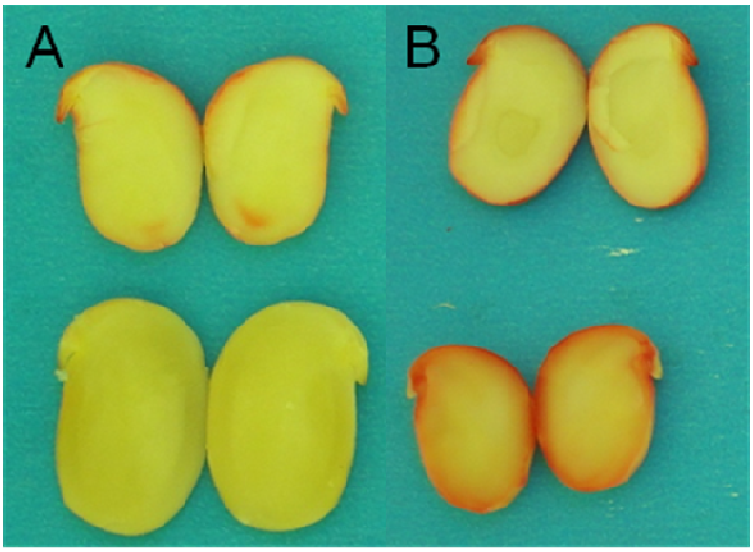


Figura 3. A- sementes descoloridas após pré-condicionamento de imersão em água aquecida. B- sementes com coloração uniforme após pré-condicionamento com escarificação manual

Segundo Oliveira et. al. (2009), sementes pequenas de leguminosas e de alguns outros gêneros não requerem preparo, podendo ser colocadas diretamente na solução de tetrazólio (FRANÇA NETO et al., 1998). Outras espécies, no entanto, possuem sementes com tegumento espesso e duro, que deve ser removido antes da coloração. É o caso de algumas espécies florestais como a sucará (*Gleditschia amorphoides* Taub) (FOGAÇA et al., 2006) e o guapuruvu (*Schizolobium parahyba* Vell. Blake) (FERREIRA et al., 2007).

No momento da realização dos testes de tetrazólio, com as sementes que foram submetidas ao método de pré-condicionamento com água quente, houve dificuldade de rompimento do tegumento para a retirada do embrião, pois o tegumento não hidratou completamente em todas as sementes. Além disso, foram observadas manchas escuras nos cotilédones das sementes de todos os lotes após a imersão na solução de tetrazólio, o que dificultou a interpretação do teste, estes resultados corroboram com os verificados por Oliveira et al. (2005), que estudando a eficiência de métodos de pré-condicionamento e concentrações da solução de tetrazólio na avaliação da qualidade de sementes de Canafístula (*Peltophorum dubium*), observaram que o pré-condicionamento com água quente forma manchas mais escuras nas sementes.

Mendonça et. al. (2006) verificaram que a absorção de água em sementes de mangaba-brava (*Lafoensia pacari)* no período de 48 horas por meio de imersão direta em água, foi suficiente para amolecer as sementes e proceder a retirada manual do tegumento sem que ocorresse fragmentação ou amassamento. De forma contrária, Mendonça et al. (2001) observaram que o pré condicionamento em imersão direta em água proporciona uma absorção rápida e provoca o amolecimento excessivo das sementes de louro-pardo (*Cordia trichotoma*), dificultando o posterior preparo dos diásporos para exposição à solução de tetrazólio

Costa et. al. (2010), verificaram que o pré-condicionamento, seguido de corte lateral e imersão das sementes de Leucena em água, a 30 ºC, por uma hora, facilita a remoção do tegumento. De forma semelhante, a imersão direta das sementes em água a 40 ºC por 30 minutos é prática recomendável para facilitar a remoção do tegumento de sementes de abobrinha a serem submetidas ao teste de tetrazólio (Barros et al., 2005).

O teste de tetrazólio, nas diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1,0%), não possibilitou distinguir todos os lotes utilizados (0, 24, 48 e 96 horas).

Souza et al.(2009), verificaram que a hidratação de sementes de aveia preta (*Avena stringosa*) por 18 horas, a 20 ℃, utilizando imersão direta em água, seguida de coloração das duas metades da semente sobre papel por duas horas, a 40 ℃, apresenta resultados semelhantes aos do teste de germinação, tanto na concentração a 0,5 % quanto a 1,0%. Sendo assim, concluiu que somente na coloração de 1,0 % foi possível identificar as diferenças na viabilidade dos lotes testados, da mesma maneira que foi observado no presente estudo.

Zucareli et al. (2001) destacaram que, sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii*) embebidas em água por 24 horas a 25ºC, com retirada do tegumento, em reação com solução de tetrazólio 0,1% por cinco horas, apresentaram coloração adequada permitindo a identificação e diferenciação de tecidos, com todas as sementes coloridas de forma uniforme.

Segundo Costa et al. (2010), para a coloração de sementes de Leucena, a combinação entre concentração da solução de tetrazólio e período que permite a obtenção dos melhores resultados, em termos de intensidade e uniformidade, é a concentração de 0,15% e o período de coloração de duas

horas, tanto para a cultivar (Cunningham) quanto para o híbrido (*L. leucocephala* x *L. diersifolia*). Este mesmo autor, afirma ainda que sementes submetidas à solução de tetrazólio a 0,075%, por quatro horas, apresentaram intensidade razoável de coloração, porém menos uniforme, comparativamente à solução de tetrazólio a 0,15%, por duas e quatro horas. A solução de tetrazólio a 1% promoveu coloração muito intensa das sementes, dificultando a interpretação do teste.

Para Mendes et. al. (2009), a concentração de 0,5% da solução do tetrazólio permitiu uma coloração mais uniforme dos embriões das sementes de *Parkia velutina* Benoist, o que facilita a análise visual da viabilidade. As sementes submetidas à concentração de 1% mostraram coloração vermelho intenso, dificultando a interpretação.

Já Añez et al. (2007), observou que a concentração da solução de tetrazólio a 0,5%, em temperatura de incubação de 30°C e tempo de desenvolvimento de coloração de 90 minutos é indicada como metodologia adequada para a avaliação da viabilidade de sementes de *Jatropha elliptica*. Oliveira et al. (2005) relataram que a concentração 0,1% da solução de tetrazólio por 150 minutos a 25°C permitiu avaliar a qualidade de lotes de sementes de *Peltophorum dubium*.

Costa et al. (2010) verificaram que sementes de Leucena submetidas ao corte lateral, seguido da imersão em água e posterior remoção do tegumento, apresentaram padrões variados de coloração, dependendo da combinação entre a concentração da solução de tetrazólio e período de coloração. Muitas sementes de espécies da família Fabaceae apresentam o tegumento impermeável à água, o que dificulta a penetração da solução de tetrazólio durante o teste e determinam a necessidade de sua remoção para que a coloração das sementes ocorra uniformemente, conforme observado em sementes de farinha-seca (ZUCARELI et al., 2001), guapuruvu (FERREIRA et al., 2007) e coração-de-negro (PINTO et al., 2008)

5. CONCLUSÕES

O método de escarificação com lixa e embebição em água por 18 horas a 25°C, apresenta maior eficiência no pré-condicionamento de sementes de Mucuna Preta. A concentração de 1,0% da solução de tetrazólio por 150 minutos em temperatura ambiente permite avaliar com clareza a viabilidade de sementes de *Styzolobium aterrimum*.

6. REFERENCIAS

ALCÂNTARA, P.B.; BUFARAH, G. **Plantas Forrageiras**: gramíneas e leguminosas. São Paulo: Prol Editora Gráfica Ltda., 1992. ed.4., 162p.

AÑEZ, L.M.M.; COELHO, M.F.B.; ALBUQUERQUE, M.C.F.E.; DOMBROSKI, J.L.D.; MENDONCA, E.A.F. Padronização da metodologia do teste de tetrazólio para sementes de *Jatropha elliptica* M. Arg. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, p.82-88, 2007.

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

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

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C**. Plant population differences in dormancy and germination characteristics of seeds; heredity or environment?** The American Midland Natura List, Notre Dame, v.90, n.2, p.493-498, 1973.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: CLAV/DNDV/SNAD, 2009. 365p.

CALEGARI, A. **Leguminosas para adubação verde de verão no Paraná.** Londrina: IAPAR, 1995. 114p. (Circular, 80).

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

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

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

FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, L.M.; TONETTI, O.A.O.; DAVIDE, A.C. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell)

Blake – Leguminosae Caesalpinaceae, pelos testes de germinação e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p. 83-89, 2007.

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

FOWLER, J.A.P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais.** Colombo: EMBRAPA-Florestas, doc. 40, 2000.

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

GALINDO, C.A.M.; LANDGRAF, P.R.C.; PÓLO, M. Avaliação da eficiência de tratamentos para superação de dormência sobre a velocidade de absorção de água e seus efeitos na germinação de sementes de mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*). **Anais**...XI Reunião Latinoamericana de Fisiologia Vegetal/XXIV Reunião Argentina de Fisiologia Vegetal/ I Congresso Uruguaio de Fisiologia Vegetal. ACTAS. Punta Del Lesta, Uruguay. 262p. 2002.

HERMANSEN, L.A.; DURYEA, M.L.; WEST, S.H.; WHITE, T.L.; MALAVASSI, M.M. Pretreatments to overcome seed coat dormancy in Dimorphandra mollis. **Seed Science & Technology**, v. 28, n. 1, p. 581-595, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE divulga crescimento de produção leiteira. 2010. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=34328>. Acesso em: 15 de abril 2011.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 21, p. 363, 1993. Supplement.

KRAMER, P.J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745 p.

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

MACHADO, C.F.; OLIVEIRA, J.A.; DAVIDE, A.C.; GUIMARAES, R.M. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo. **Cerne**, Lavras, v.8, n.2, p.18-27, 2002.

MAEDA, J.A.; LAGO, A.A. do. Germinação de sementes de mucuna preta após tratamentos para superação de impermeabilidade do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.8, n.1, p. 79-84, 1986.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seeding emergences and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.196-197,1962.

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

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, cap. 3, p.1-24.

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

MARTINS, C.C.; MENDONÇA, C.G.; MARTINS, D.; VELINI, E.D. Superação de dormência de sementes de carrapicho-beiço-de-boi. **Planta Daninha**, v.15, n.22., 1997, p.104-113.

McDONALD, M.B. e COPELAND, L.O. Seed production: principles and practices. New Jersey: Chapmam e Hall, 1997. 749 p.

McIVOR, J.G.; GARDENER, C.J. Effect of boiling water treatment on hardseededness and germination in some *Stylosanthes* species. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.27, n.6, p.857-862, 1987.

MENDES, S. da M. A.; BASTOS, A. A. de.; MELO, G. G. da. M.de. Padronização do teste de tetrazólio em sementes de *Parkia velutina* Benoist (Leguminosae – Mimosoideae) **Acta Amazonica**, v.39, n.4, p.823 – 828, 2009.

MENDONÇA, E.A.F.; COELHO, M.F.B.; LUCHESE, M. Teste de tetrazólio em sementes de mangaba-brava (*Lafoensia pacari* St. Hil. - Lythraceae) **Rev. Bras. Pl. Med**., Botucatu, v.8, n.2, p.33-38, 2006.

MENDONÇA, E.A.F.; RAMOS, N.P.; PAULA, R.C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozzo)Arrabida ex Steudel (Louro-pardo) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p. 64-71, 2001.

MITIDIERI, J. **Manual de gramíneas e leguminosas para pastos tropicais**. São Paulo: Nobel: Editora da Universidade de São Paulo, 1983. 198p.

OLIVEIRA, C. M. G.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis L.*) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n.1, p.160-167, 2009.

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

PERRY, D.A. **Seed vigour and field establishment**. Horticultural Abstract, v.42, p. 334 – 342, 1972.

PINTO, T.L.F.; BRANCALION, P.H.S.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; CICERO, S.M. Avaliação da viabilidade de sementes de coração-de-negro (*Poecilanthe parviflora Benth*. – Fabaceae – Faboideae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.1, p.208-214, 2008.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília, AGIPLAN, 1977. 289p.

RODRIGUES, E.H.A.; AGUIAR, I.B. & SADER, R. Quebra de dormência de sementes de três espécies do gênero Cassia. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.12, n.12, p.17- 25, 1990.

RODRIGUES, F.C.M.P. **Manual de Análise de Sementes Florestais.** Campinas: Fundação Cargill, 1988. 100p.

SENEEWONG, A.; BASKIN, C.C.; BATSON JUNIOR, W.E. The relationship between internal disease organisms and germination of gin run cottonseed (*Gossypium hirsutum L.*). **Journal of Seed Technology**, v.15, n.2, p.91-96, 1991.

SOUZA, R.C.; OHLSON, C.O.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia preta pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 3, p.57-62, 2009.

TOLEDO,F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: Tecnologia e Produção**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. p.224.

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

ZUCARELI, C. et al. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.186-91, 2001.