

Universidade Estadual do Norte do Paraná

Repositório Institucional UENP

<https://repositorio.uenp.edu.br>

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Dissertações

2015-07-29

Teste de tetrazólio em sementes de cenoura

Boaventura, Ana Claudia

Universidade Estadual do Norte do Paraná

BOAVENTURA, Ana Claudia. Teste de tetrazólio em sementes de cenoura. Orientadora: Cristina Batista de Lima. 2015. 32 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Campus Luiz Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2015.

<https://repositorio.uenp.edu.br/handle/123456789/278>

Baixado de Repositório Institucional UENP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ANA CLAUDIA BOAVENTURA

TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE CENOURA

BANDEIRANTES-PR, BRASIL

2015

ANA CLAUDIA BOAVENTURA

TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE CENOURA

Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Batista de Lima

BANDEIRANTES-PR, BRASIL

2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central do Campus Luiz Meneghel da Universidade Estadual do Norte do Paraná.

Boaventura, Ana Claudia

B662t Teste de tetrazólio em sementes de cenoura / Ana
Claudia Boaventura. -- Bandeirantes, 2015.
39f. ilust.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Batista de Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Programa de Mestrado em Agronomia, 2015.

Banca: Dra. Cristina Batista de Lima, Dr. João Tavares Bueno, Dra. Lúcia Sadayo Assari Takahashi, Dr. João Carlos Athanázio, Dr. Hatiro Tashima.

1. Potencial fisiológico. 2. Germinação. 3. Hortaliças. 4. Análise de sementes. I. Universidade Estadual do Norte do Paraná. III. Título.

ANA CLAUDIA BOAVENTURA

TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE CENOURA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*.

Aprovada em: 29 /07 /2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Batista de Lima	UENP
Prof. Dr. João Tavares Bueno	UENP
Profa. Dra. Lúcia Sadayo Assari Takahashi	UEL
Prof. Dr. João Carlos Athanázio	UEL
Prof Dr. Hatiro Tashima	UENP

Profa. Dra. Cristina Batista de Lima
Orientadora
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel

BOAVENTURA, A.C. **Teste de tetrazólio em sementes de cenoura**. 2015. 41p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*, Bandeirantes, 2015.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi estabelecer, com ênfase no corte, concentração, tempo e temperatura para coloração, método rápido, eficiente e confiável para o teste de tetrazólio em sementes de cenoura. Foram utilizadas sementes de oito lotes comerciais de cenoura cultivar 'Brasília', submetidas às análises iniciais de determinação do teor de água, teste de germinação, primeira leitura da germinação, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, envelhecimento acelerado tradicional e com solução saturada de NaCl (41 °C durante 48 horas). No primeiro trabalho para avaliar a metodologia do teste de tetrazólio, após o pré condicionamento as sementes foram seccionadas por dois cortes diferentes, imediatamente imersas em solução de tetrazólio (2, 3, 5 trifênil cloreto) nas concentrações de 0,5 e 1,0% durante 6 e 24 horas na ausência de luz a 30 °C. No segundo experimento as sementes permaneceram imersas na solução de 2, 3, 5 trifênil cloreto a 0,5% e 1,0% durante 6 horas sob as temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C. No terceiro experimento as sementes foram condicionadas através de embebição por 2 horas em rolo de papel sob 25 °C. A seguir, as sementes foram seccionadas, e imersas em solução de tetrazólio a 0,1%, por 1 hora sob 35 °C. Repetiu esta metodologia mais duas vezes, sendo mudado o corte na primeira, e na segunda além do corte a duração na coloração por 2 horas. Após cada metodologia as sementes foram lavadas em água destilada, e avaliadas. Conclui-se o corte efetuado no momento de se expor as sementes de cenoura em contato com o sal de tetrazólio, é o fator de maior influência em sua coloração. O teste de tetrazólio pode ser realizado em sementes de cenoura utilizando-se duas horas no período de pré embebição, corte paralelo e próximo ao embrião retirando-se o máximo de tecido, e imersão em solução a 0,1% durante duas horas, sob 35 °C.

Palavras-chaves: Potencial fisiológico. Germinação. Hortaliças. Análise de sementes.

BOAVENTURA, A.C. **Tetrazolium test in carrot seeds**. 2015. 41p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2015.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish, with an emphasis on cutting, concentration, time and temperature for staining, fast, efficient and reliable method for the tetrazolium test in carrot seeds. Seeds of eight commercial lots of carrots were used cultivar 'Brasilia', subject to the initial analysis for the determination of water content, germination test, first reading of germination, seedling emergence, emergence speed index, traditional accelerated aging and solution saturated NaCl (41 ° C for 48 hours). In the first study to evaluate the tetrazolium test method, after preconditioning the seeds were sectioned by two different cuts immediately immersed in tetrazolium solution (2, 3, 5 triphenylmethyl chloride) in concentrations of 0,5 and 1,0 % for 6 to 24 hours in absence of light at 30 ° C. In the second experiment, seeds remained immersed in the solution of 2, 3, 5 triphenylmethyl chloride at 0,5% and 1,0% for 6 hours at temperatures of 30, 35, 40, 45 and 50 ° C. In the third experiment the seeds were conditioned by soaking for two hours on a roll of paper under 25 ° C. Then, the seeds were sectioned and immersed in tetrazolium 0,1% solution for 1 hour under 35 ° C. This methodology was repeated two more times, with the cut changed in the first and the second cut to length beyond the staining for 2 hours. Following each method, the seeds were rinsed in distilled water and evaluated. We conclude the cut made at the time of exposing the carrot seeds in contact with the tetrazolium salt, it is the most influential factor in their coloring. The tetrazolium test can be performed in carrot seeds using two hours in pre soaking period, parallel cutting and withdrawing the embryo near the maximum tissue and immersed in 0,1% solution for two hours under 35 ° C.

Keywords: Physiological potential. Germination. Vegetables. Analyze seeds.

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Percentuais médios de germinação informado na embalagem, primeira contagem da germinação, germinação, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, envelhecimento acelerado tradicional e com solução salina e coeficientes de correlação de sementes de cenoura	16
Tabela 2. Percentuais médios do teor de água inicial e, pós-envelhecimento acelerado tradicional e com solução salina de sementes de cenoura.....	18
Tabela 3. Percentuais médios de sementes de cenoura, coloridas nos tons de rosa, vermelho e branco, segundo as quatro metodologias da Regras para Análise de Sementes, com duas concentrações e períodos de exposição a solução de tetrazólio sob 30°C, utilizando dois cortes diferentes.....	20
Tabela 4. Percentuais médios observados nas classes segundo as colorações nos tons rosa, vermelho, branco de sementes de cenoura, após permanecerem sob cinco diferentes temperaturas, durante o período de exposição de seis horas em solução de tetrazólio nas concentrações de 0,5% e 1% com o corte 3.....	22
Tabela 5. . Percentuais médios observados nas colorações rosa, vermelho e branco de oito sementes de cenoura, após cinco metodologias do teste de tetrazólio, variando-se o tipo de corte e o tempo de permanência na solução.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas de reprodução sexuada em plantas de cenoura.....	Pág. 4
Figura 2. Temperaturas máxima, média e mínima verificadas no interior da casa de vegetação, durante o teste.....	11
Figura 3. Escala de cores utilizada na classificação dos tecidos de sementes de cenoura , após exposição a solução de tetrazólio.....	12
Figura 4. Colorações observadas em sementes de cenoura após exposição à solução de tetrazólio.....	12
Figura 5. Cortes longitudinais preparativos para imersão de sementes de cenoura, na solução de tetrazólio.....	13
Figura 6. Sementes de cenoura após exposição a solução de tetrazólio durante uma hora e duas horas, usando a metodologia Andrade et al. (1996) com o corte 4.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A área dedicada a produção de raízes de cenoura (*Daucus carota* L.) no Brasil durante 2013, foi de 26.500 ha, com produtividade média de 29,5 t/há. Em 2012 as sementes de cenoura ficaram em terceiro lugar, entre as dez hortaliças de maior consumo, movimentando 42,7 milhões de reais (ABCSEM, 2014).

A semeadura ocorre diretamente nos canteiros de cultivo, pois as plantas são intolerantes ao transplante (Filgueira, 2012), fazendo com que sementes de elevada qualidade, sejam imprescindíveis para garantir a população de plantas desejada pelo produtor (Pereira et al., 2007).

Dentre os testes utilizados para análise de sementes, prioriza-se os eficientes e rápidos para avaliação da qualidade fisiológica, durante o processo produtivo e pós-colheita. Nesse sentido o teste de tetrazólio apresenta vantagens em relação aos demais por avaliar as condições físicas e fisiológicas do embrião e do tecido de reserva de cada semente e permitir a rápida avaliação da viabilidade (Santana, 2013).

O teste de tetrazólio é fundamentado nos eventos iniciais da deterioração, na integridade das membranas celulares e na redução das atividades enzimáticas e respiratórias das sementes (Delouche e Baskin, 1973), permite determinar através da coloração de estruturas internas a presença, a localização e a natureza de possíveis alterações (França Neto et al., 1999), fornecendo diagnóstico para a viabilidade e vigor de sementes em menos de 24 horas (Krzyzanowski et al., 1991). Porém, o uso desse teste está restrito a sementes de soja, feijão, milho e gramíneas forrageiras.

Em se tratando de hortaliças, falta precisão às informações encontradas nas metodologias disponíveis. Do total de 153 espécies com indicações de metodologia para o teste de tetrazólio nas regras para análise de sementes 'RAS' (BRASIL, 2009), apenas oito espécies e oito gêneros são de hortaliças, com indicações que apresentam ampla variação de tempo de preparo, concentração da solução, temperatura e tempo para coloração. Tais fatores influenciam na intensidade e uniformidade de coloração das sementes. Para Lima et al. (2007) a interpretação dos dados do teste de tetrazólio pode variar, dependendo do método escolhido,

podendo-se ter o mesmo lote indicado como vigoroso em uma metodologia e de baixo vigor em outra.

Em sementes de cenoura, testes demonstraram que os procedimentos recomendados necessitam de aprimoramento, para garantir a reprodução e confiabilidade dos resultados. Segundo Barros et al. (2005), o refinamento dessa técnica é determinado por estudos que envolvam a comparação com resultados de outros testes de análise de sementes, como os de germinação, primeira contagem da germinação e emergência de plântulas.

Para sementes de cenoura são necessárias no mínimo 24 horas, seguindo os protocolos do teste de tetrazólio descritos nas regras para análises de sementes (Brasil, 2009). Entretanto, Andrade et al. (1996) reduziram o tempo total do referido teste com alterações significativas em sua metodologia. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi estabelecer, com ênfase no corte, concentração, tempo e temperatura para coloração, método rápido, eficiente e confiável para o teste de tetrazólio em sementes de cenoura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *Daucus carota* L., pertence a família Apiaceae (Tropicos, 2015). Essa espécie conhecida como cenoura, originalmente selvagem em muitas partes da Europa e Ásia, domesticada no Afeganistão, considerado o primeiro centro de diversidade. A seguir propagada na Europa, região Mediterrâneo e Ásia, tendo a Turquia reconhecida como um segundo centro de diversidade (Stolarczyk e Janick 2011). A introdução ao Brasil no século XVI pelas expedições portuguesas, e os primeiros cultivos ocorrerão no século XIX, no Rio Grande do Sul (Vilela e Borges, 2008).

A planta de cenoura é herbácea, com caule pouco perceptível situado no ponto de inserção das folhas, que são formadas por folíolos finamente recortados, com pecíolos longos e afilados. A parte comercializada é a raiz tuberosa alaranjada, succulenta, lisa, sem ramificações laterais e formato variável de cônico a cilíndrico. Na etapa vegetativa do ciclo, apresenta um tufo de folhas em posição vertical que pode atingir 50 cm de altura. O fotoperíodo e a temperatura interagem na indução ao florescimento, quando ocorre a emissão de um pendão floral, que pode ultrapassar 1,5 m de altura apresentando no ápice uma inflorescência tipo umbela composta (Filgueira, 2008).

A haste principal apresenta uma umbela primária, que se ramifica dando origem às de segunda, terceira e quarta ordens. O tamanho e a produção de sementes decrescem, conforme o aumento do número da ordem (Nascimento, 2009). A umbela é formada por um conjunto de pequenas flores (Figura 1A e 1B), hermafroditas ou masculinas (Viggiano, 1984). As flores hermafroditas apresentam protandria, e possuem cinco sépalas verdes, cinco pétalas pequenas e brancas, cinco estames, dois estiletos e ovário ínfero (Casali et al., 1984).

O fruto é esquizocarpáceo bilocular, seco e indeiscente composto por dois aquênios denominados cremocarpos ou cremocarpídios (Figura 1. C e D). Cada aquênio apresenta arestas longitudinais, sulcos, espinhos e glândulas oleíferas, sendo que a semente (Figura 1. E e F) corresponde a um aquênio, e medindo de 2 a 3 mm (Brasil, 2009).

O florescimento ocorre por aproximadamente 30 dias, devido a desuniformidade de maturação das sementes entre umbelas e até mesmo na própria umbela. As sementes atingem a maturidade fisiológica em média 40-50 dias após o florescimento e devem ser secas por 4-5 dias antes do beneficiamento (Nascimento, 2009).



Figura 1. Estruturas de reprodução sexuada em plantas de cenoura: umbela com flores (A), umbela vista lateral (B), umbela com frutos em formação (C) e em ponto de colheita (D), sementes após beneficiamento (E e F).

'Brasília' é uma cultivar nacional, selecionada a partir da população, pelos pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças -Embrapa, em 1976 (Embrapa, 2015). Esta cultivar foi disponibilizada para comercialização em 1981, com destaque para sua adaptação às diferentes condições climáticas brasileiras. É a principal cultivar nacional de cenoura, correspondendo a 40% da área plantada (Grangeiro et al., 2012). Apresenta folhagem vigorosa, com coloração verde escura e porte de 25 a 35 cm de altura. As raízes são ligeiramente cônicas, com coloração laranja, dimensões de 15 a 20 cm de comprimento por 2 a 3 cm de diâmetro. O ciclo da sementeira à colheita de raízes é de 85 a 100 dias (Embrapa, 2015).

O estabelecimento das plântulas em campo depende da qualidade das sementes, considera o insumo agrícola de maior importância por conter as características genéticas responsáveis pelo estabelecimento do estande desejado e de uma produção rentável (Marcos Filho, 2005).

O desenvolvimento e/ou aprimoramento de técnicas padronizadas para análise de sementes é uma necessidade permanente das empresas e laboratórios. Nesse sentido, o teste de germinação, conduzido de acordo com as Regras para Análise de Sementes é confiável e reproduzível, sendo usado rotineiramente na avaliação da viabilidade de sementes. Sendo que este teste fornece condições ideais ao processo, possibilitando com que o lote expresse seu potencial máximo de formação de plântulas normais (Demir et al., 2008).

Porém condições ideais para germinação nem sempre são encontradas no local do cultivo (Ortiz et al., 2014), ocasionando falhas no estande e baixo vigor das plântulas. O teste de germinação, portanto, apresenta limitações quanto a estimar o potencial de emergência de plântulas em campo, especialmente sob condições menos favoráveis de ambiente. Desse modo os testes de vigor são imprescindíveis nos programas de controle de qualidade (Marcos Filho, 2011).

A análise do vigor de lotes de sementes distingue com precisão os de alto e baixo vigor de maneira proporcional à emergência de plântulas em campo. Os testes de vigor devem ser aplicados em lotes de mesma cultivar com percentual de germinação semelhante e, compatível com as exigências mínimas para a comercialização. Deve-se dar preferência aos métodos que atendam aos quesitos de confiabilidade, rapidez, objetividade, reproduzibilidade e que permitam a interseção dos resultados com outros testes e, a associação com a emergência de plântulas em campo (Caliari e Silva, 2001).

O uso de somente um teste de vigor pode gerar informações incompletas., devendo-se combinar resultados de dois ou mais testes, para a correta estimativa de desempenho dos lotes no laboratório, campo e no armazenamento (Nascimento, 2009). Para a obtenção de resultados confiáveis, e passíveis de padronização é necessário seguir fielmente os protocolos minuciosos dos testes de vigor (Marcos Filho, 2011).

A primeira contagem da germinação, é considerada um teste simples, realizada simultaneamente ao teste de germinação. Baseia-se no princípio de que a redução na velocidade da germinação é um dos primeiros eventos que ocorrem após a maturidade fisiológica, antes da completa desativação do metabolismo das sementes (Marcos Filho, 2005).

O envelhecimento acelerado é um dos métodos propostos para avaliar o vigor de sementes e tem como princípio que amostras de sementes vigorosas apresentem germinação superior após o envelhecimento artificial (Marcos Filho, 2011). Em sementes pequenas como às das hortaliças esse teste pode ser feito com soluções salinas saturadas (Jianhua e McDonald, 1996). Tal teste avalia o grau de tolerância das sementes sob umidade relativa entre 76% (solução salina) a 100% (água) e temperaturas entre 41 a 45 °C, que contribuem para acelerar o processo de deterioração (Marcos Filho, 2011).

A determinação do grau de umidade das amostras após o envelhecimento e a verificação da amplitude de sua variação é uma das “etapas-chave” do procedimento, sendo possível considerar que a variação entre o grau de umidade das amostras, ao final do envelhecimento, não deve superar 2% (Marcos Filho, 2005; Marcos Filho 2011).

Embora as espécies olerícolas possuam rápido período de germinação, a cenoura leva quatorze dias (Brasil, 2009), necessitando de acompanhamento durante o período de execução, impedindo a obtenção de resultados rápidos. Neste sentido, o teste de tetrazólio é uma alternativa viável, passível de gerar informações precisas e rápidas, que vem sendo empregada, rotineiramente na avaliação da viabilidade de sementes (Cervi e Mendonça, 2009).

O teste de tetrazólio reflete a alteração da coloração de tecidos vivos da semente, em contato com a solução de cloreto de 2, 3, 5 - trifênil tetrazólio, a atividade de sistemas enzimáticos intimamente relacionados ao desempenho de funções vitais pela alteração (Marcos Filho, 2011).

Em 1922 o pesquisador Turina verificou que células vivas de sementes viáveis eram capazes de reduzir soluções incolores de sais de selênio e telúrio para tons avermelhados ou cinza-escuros. A partir dessa pesquisa, autores como Nelbujow, Hasegawa e Eidmann dedicaram-se ao aprimoramento de testes bioquímicos para estimar a germinabilidade de sementes (Marcos Filho, 2005).

O pesquisador grego Georg Lakon aperfeiçoou o método do selênio, que diferenciava não somente as sementes vivas das mortas, mas também as capazes de originar plântulas anormais e pouco vigorosas. Devido sua toxicidade para os analistas, Lakon substituiu o selênio por sais de tetrazólio, após a descoberta de Kühn e Jerchel, concluindo que o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio era o mais apropriado para o teste em sementes de milho e cereais. Tecidos vivos em contato com o referido sal coloriam de vermelho carmim brilhante e o produto era reduzido a “formazans” um pigmento insolúvel. Os tecidos mortos permaneciam incolores, por não reagir com a solução (Delouche et al., 1976).

Em 1962 Delouche, Still, Raspet e Leinhard publicaram o livro ‘O teste de tetrazólio para viabilidade da semente’, descrevendo a metodologia de execução para avaliação de 36 espécies. Em 1970 a utilização do teste foi aceita pela Associação Oficial dos Analistas de Sementes (AOSA), através da publicação do Manual do Teste de Tetrazólio (Grabe, 1970). Em 1983, a AOSA publicou o Manual de Testes de Vigor, que abordava a metodologia do teste para soja, algodão, milho e trigo (França Neto, 1999).

No Brasil, o teste de tetrazólio chegou na década de 1960, com ampla divulgação somente dez anos depois. A partir de 1980 com o aprimoramento dos procedimentos para avaliação do vigor de sementes de soja os pesquisadores da EMBRAPA popularizaram esse teste no Brasil (Marcos Filho, 2005). A metodologia também foi aperfeiçoada para utilização em sementes de milho, algodão, amendoim, feijão vagem e café (Marcos Filho, 2011).

A técnica teste de tetrazólio é dividida em pré-condicionamento, preparo para coloração, imersão em solução de tetrazólio e avaliação da semente. Na primeira etapa, as sementes são embebidas diretamente em água ou entre folhas de papel-toalha previamente umedecidas, para ativar o metabolismo enzimático, facilitar o preparo e a coloração durante o contato com a solução de tetrazólio. A embebição ocorre durante 12 a 16 horas, sob 30 °C (Marcos Filho, 2011).

Em seguida, as sementes são preparadas através do corte longitudinal, punção ou remoção do tegumento. Estes procedimentos são necessários para facilitar o contato entre os tecidos da semente e a solução de 2,3,5 trifenil de tetrazólio, permitindo uma rápida e uniforme coloração da semente (Santana, 2013). Entretanto, deve-se ter cuidado no preparo para que não ocorra danos ao embrião e resultados distorcidos (ZUCARELI et al., 2001).

Na etapa seguinte, as sementes são embebidas em uma solução incolor de 2, 3, 5 trifenil cloreto ou brometo de tetrazólio, usada como indicador de processo de redução que acontece dentro das células vivas. Os íons de H⁺ liberados durante a respiração dos tecidos vivos são transferidos por um grupo de enzimas desidrogenases e interagem com o tetrazólio, reduzindo-o a um composto vermelho, estável e não difusível chamado de trifenil formazan (Brasil, 2009).

A coloração é indicadora da viabilidade celular dos tecidos, de modo que, rosa brilhante ou vermelho brilhante indica tecido vivo e vigoroso, vermelho carmim forte tecido em deterioração, e a ausência de cor indica tecido não viável. Em tecidos mortos onde não há respiração celular e conseqüentemente redução do sal de tetrazólio, não é formado o formazan e os tecidos das sementes permanecem com coloração branca (Vieira e Von Pinho, 1999). O vermelho carmim forte é formado, em virtude da maior intensidade de difusão da solução de Tetrazólio, pelas membranas celulares comprometidas (França Neto, 1999). Entretanto, o desvio da coloração normal pode ser devido ao período excessivo ou insuficiente de contato com a solução do sal (Marcos Filho, 2005). A rapidez, intensidade e profundidade de coloração dos tecidos estão relacionados à qualidade das sementes (Vieira e Von Pinho, 1999).

A eficiência do teste de tetrazólio está relacionada ao desenvolvimento de uma metodologia que defina condições precisas para o pré-condicionamento, preparo e coloração das sementes de cada espécie (Cervi e Mendonça, 2009). Segundo Marcos Filho, (2005) para a coloração, as sementes devem ficar expostas a solução de tetrazólio, sob temperatura entre 30 °C a 40 °C, utilizando-se concentração do sal de 0,05% a 1,0%, e o tempo de coloração variando de 60 a 240 minutos, sendo que sementes de diferentes espécies ou mesmo entre sementes da mesma amostra a coloração se desenvolve com velocidade variável.

Para realização do teste de tetrazólio são necessárias, aproximadamente 24 horas no procedimento tradicional. Esse período embora relativamente curto, quando comparado ao do teste de germinação, pode ser excessivo e impedir a tomada de decisões urgentes (Marcos Filho, 2005). Informações precisas são necessário as para o aprimoramento do teste de tetrazólio em sementes de hortaliças (Barros et al., 2005).

Nesse sentido foram conduzidos estudos com sementes de quiabo (Eichelberge e Moraes, 2001), abobrinha (Barros et al., 2005), melancia (Bhering et al., 2005; Nery et al., 2007), melão (Lima et al., 2007), tomate (Santos et al., 2007) pepino (Lima et al., 2010), sendo que em todos os casos conseguiu-se reduzir o tempo de execução do teste ou da concentração da solução.

Em sementes de cenoura o teste de tetrazólio, conforme Brasil (2009) requer no mínimo 24 horas. Entretanto Andrade et al., (1996) utilizou metodologia que diminuiu esse período para três horas, através de uma menor concentração da solução. Desta maneira, o teste possibilitou estimar os limites do potencial fisiológico dos lotes, em um período de tempo significativamente menor.

O analista do teste de tetrazólio precisa de treinamento sobre a estrutura embrionária da semente e a interpretação da coloração. A execução do teste é exaustiva, pois as sementes são analisadas individualmente, requerendo experiência e paciência (Delouche et al., 1976; França-Neto, 1999). A consistência dos resultados do teste depende do nível de treinamento do analista para a interpretação, pois o reconhecimento e a avaliação correta dos diferentes níveis de atividade dos tecidos determinam qualidade das informações fornecidas (Marcos Filho, 2005).

Apesar da subjetividade o aprimoramento da metodologia, com uso de ilustrações detalhadas para a identificação das diferentes categorias de sementes e, a intensificação do treinamento de analistas, permitirão aprimorar os procedimentos, ampliar a abrangência das espécies envolvidas e a diversificação de uso desse teste (Marcos Filho, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de análise de sementes da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel (UENP-CLM), Bandeirantes/PR, com oito lotes de sementes de cenoura 'Brasília' adquiridas de empresa certificada, em pacotes longa vida hermeticamente fechados. Os percentuais de germinação, informados nos rótulos das embalagens, variaram entre 80 a 86%.

3.1 - Procedimentos para análise da qualidade fisiológica

Teor de água - determinado pré e pós procedimentos do teste de envelhecimento acelerado, em estufa a 130 °C durante 1 hora, com duas sub-amostras de duas gramas de sementes de cada lote (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em percentual, servindo para caracterização inicial dos lotes e monitoramento, durante os procedimentos de envelhecimento acelerado.

Teste de germinação - realizado com quatro repetições de 50 sementes de cada lote, distribuídas de modo equidistante sobre uma folha de papel filtro, previamente umedecida com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, dentro de recipientes plásticos transparentes, mantidos em câmara de germinação, sob temperaturas de 20 °C durante oito horas e 30 °C durante dezesseis horas. As avaliações foram realizadas no sétimo e décimo quarto dia após a instalação (Brasil, 2009), registrando-se o número de plântulas normais (folhas cotiledonares expandidas).

Primeira contagem da germinação - contabilizou-se o número de plântulas normais presentes no sétimo dia após a instalação do teste de germinação.

Emergência de plântulas - quatro repetições de 36 sementes de cada lote foram semeadas em bandejas de polipropileno (72 células), preenchidas com substrato comercial Carolina®, próprio para produção de mudas de hortaliças. As bandejas foram mantidas em estufa plástica, modelo arco, com monitoramento diário da irrigação pela manhã e à tarde. As contagens foram realizadas, pela manhã, do primeiro ao décimo quarto dia após a instalação, registrando-se o número de plântulas com folhas cotiledonares expandidas. As temperaturas internas diárias foram verificadas as 10:00 e 16:00 horas através de aparelho termo higrômetro (HIGHMED®), obtendo-se as medições de máxima e mínima para o cálculo da temperatura média, conforme Figura 2.

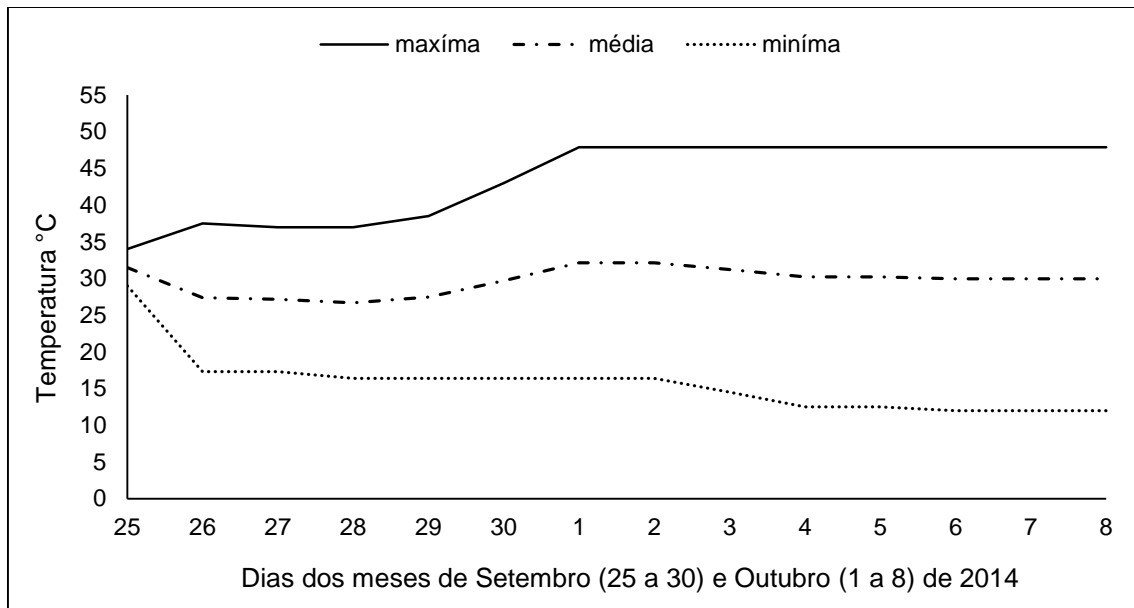


Figura 2. Temperaturas máxima, média e mínima verificadas no interior da estufa plástica, durante o teste de emergência de plântulas, em oito lotes de sementes de cenoura 'Brasília'.

Índice de velocidade de emergência - obtido segundo a fórmula proposta por Maguire (1962), através da contagem diária do número de plântulas emersas.

Envelhecimento acelerado tradicional (100% de umidade relativa) - com 200 sementes de cada lote, colocadas sobre tela metálica acoplada a recipientes plásticos transparentes, contendo 40 mL de água destilada, mantidos sob 41 °C durante 48 horas.

Envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl (76% de umidade relativa) - repetiu-se o procedimento anterior, substituindo-se a água destilada por solução saturada de NaCl (40 g de NaCl em 100 mL de água destilada) (Jianhua e McDonald, 1996).

As amostras que apresentaram proliferação de fungos ao final do envelhecimento foram previamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% e, enxaguadas com água destilada para a instalação do teste de germinação.

3.2 - Procedimentos do teste de tetrazólio

Foram efetuados três experimentos, para aprimoramento da técnica, levando-se em consideração o corte, concentração, tempo (horas) e temperatura. Utilizou-se o sal trifeniltetrazólio - 2,3,5 cloreto (Vetec®), que no preparo das soluções foi dissolvido em água destilada.

Visando padronizar e facilitar a interpretação das cores observadas nas sementes após exposição a solução de tetrazólio adaptou-se uma escala de cores (Figura 3).

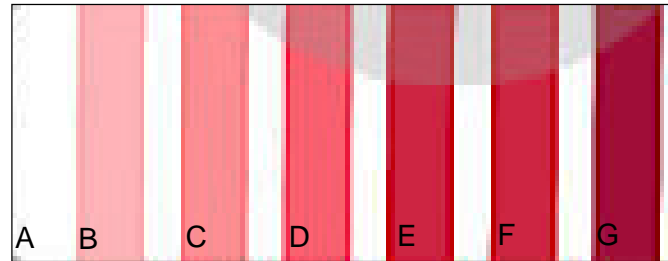


Figura 3. Escala de cores utilizada na classificação dos tecidos de sementes de cenoura, após exposição a solução de tetrazólio: branco (A), rosa (B a D) e vermelho-carmim forte (E a G).

Os critérios utilizados para classificação das cores, na avaliação dos tecidos do embrião e/ou endosperma (Figura 4), foram estabelecidos conforme Moore (1973) e Franca Neto et al. (1999): rosa (tecido viável novo), vermelho-carmim forte (tecido viável em deterioração) e branco-leitoso ou amarelado (tecido morto).



Figura 4. Colorações observadas em sementes de cenoura após exposição à solução de tetrazólio: rosa (A), vermelho carmim (B) e branco (C). Bandeirantes (PR), 2015.

Foram utilizados quatro tipos de corte variando-se a profundidade e a quantidade de tecido retirado da semente (Figura 5).

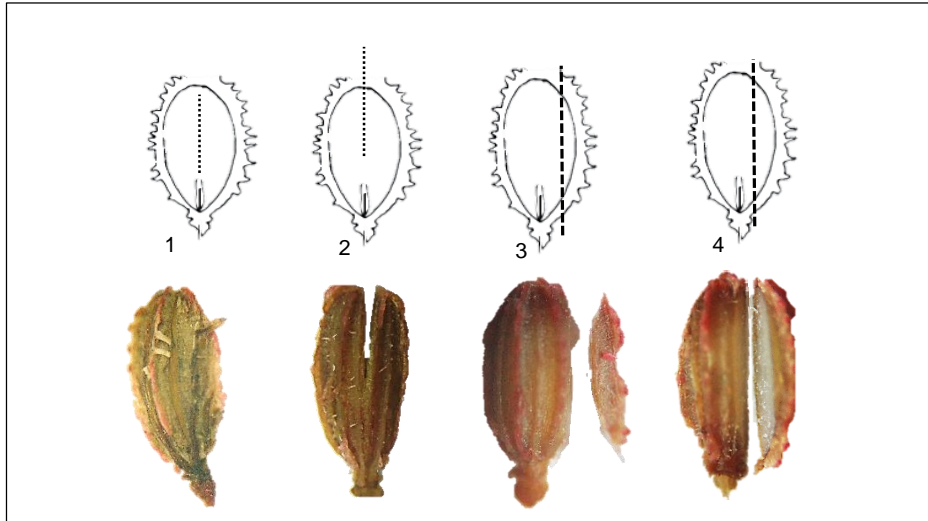


Figura 5. Cortes longitudinais preparativos para imersão de sementes de cenoura, na solução de tetrazólio: superficial sem atingir o embrião e sem retirada de tecido (1); profundo na metade distal ao embrião (2); paralelo ao embrião retirando-se o mínimo de tecido (3); paralelo e próximo ao embrião retirando-se o máximo de tecido (4).

Experimento I. Cortes, concentrações e períodos de permanência na solução de tetrazólio.

As sementes foram pré embebidas em água destilada, durante 18 horas a 25 °C e seccionadas de acordo com os esquemas (1) e (3) representados na Figura 5.

Na sequência, foram submetidas aos tratamentos com solução de tetrazólio, nas concentrações de 0,5 e 1,0% durante 6 e 24 horas (Brasil, 2009), na ausência de luz a 30 °C. Após cada procedimento as sementes foram retiradas da solução, lavadas e mantidas em água destilada, até finalizar a classificação das cores dos tecidos do embrião e/ou endosperma (Figura 4).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 cortes x 2 concentrações x 2 tempos), contendo 5 repetições com vinte sementes, para cada lote.

Experimento II. Temperatura durante a permanência na solução de tetrazólio.

As sementes foram pré embebidas em água destilada, durante 18 horas a 25 °C, seccionadas conforme a ilustração (3) da Figura 5, e expostas a solução de tetrazólio a 0,5% e 1% durante 6 horas (AOSA, 2002), na ausência de luz, sob as temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C. Após cada procedimento, as sementes foram retiradas da

solução, lavadas e mantidas em água destilada, até finalizar a classificação das cores dos tecidos do embrião e/ou endosperma conforme a Figura 4.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 concentrações x 5 temperaturas), contendo 5 repetições com vinte sementes, para cada lote.

Experimento III. Avaliação da metodologia de Andrade et al., (1996), com adaptações no corte e tempo de permanência na solução de tetrazólio.

As sementes foram condicionadas através de embebição por duas horas, em rolos de papel filtro umedecidos com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o seu peso seco, sob 25 °C. A seguir, as sementes foram seccionadas conforme ilustrado na Figura 5 tipo 2, e imersas em solução de tetrazólio a 0,1%, por 1 hora sob 35 °C (Andrade et al., 1996). Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, na primeira alterando-se apenas o corte, para o descrito na Figura 5-4. Na segunda, além do corte (Figura 5-4), modificou-se o tempo de permanência na solução de tetrazólio para 2 horas.

Após cada procedimento, as sementes foram retiradas da solução, lavadas e mantidas em água destilada, até finalizar a classificação das cores dos tecidos do embrião e/ou endosperma conforme a Figura 4.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 5 repetições com vinte sementes, para cada lote.

Na análise estatística, os dados obtidos nos experimentos para verificação da qualidade fisiológica, e os procedimentos do teste de tetrazólio foram submetidos a análise de variância, e as médias em percentuais, agrupadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, com o software estatístico Sisvar® (Ferreira, 2011). Para o grau de associação entre os testes de análise da qualidade fisiológica foi aplicada a correlação simples de Pearson (r). Os dados do teste de tetrazólio foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Procedimentos para análise da qualidade fisiológica

Os resultados do teste de germinação em laboratório (Tabela 1) demonstraram que os percentuais verificados para todos os lotes, ficaram abaixo do informado nos rótulos, sendo que as médias dos lotes 1, 2, e 4 foram inferiores a 75%, exigido pelo Mapa (2012), para comercialização de sementes de cenoura. No teste de emergência de plântulas apenas os lotes 2 e 6 superaram 75%, explicando a necessidade de aumentar a quantidade de sementes na semeadura, para atingir o stand de plantas desejado pelo produtor. Tal constatação parece ser comum, pois, Rentschler (2014) obteve resultado semelhante em sementes de cenoura 'Brasília'.

O percentual de germinação indicado na embalagem de determinado lote de sementes de hortaliças, nem sempre irá corresponder à emergência de plântulas em campo obtida pelo produtor, porque as sementes são analisadas sob condições ótimas, dificilmente verificadas no solo do local da semeadura (Pereira et al., 2005).

Tabela 1. Percentuais médios de germinação informado na embalagem (GE), primeira contagem da germinação (PCG), germinação em laboratório (GL), emergência de plântulas (EP), índice de velocidade de emergência (IVE), envelhecimento acelerado tradicional (100%) e com solução salina (76%) e coeficientes de correlação (r) de oito lotes de sementes de cenoura. Bandeirantes (PR), 2015.

Lote	GE	PCG	GL	EP	IVE	100%	76%
1	80	50,50 a	74,00 a	69,44 b	3,04 b	23,50 c	52,50 c
2	84	46,00 a	72,00 a	81,94 a	3,86 a	25,00 c	52,50 c
3	86	13,50 c	78,50 a	67,36 b	2,96 b	30,50 c	43,50 c
4	80	29,50 b	66,50 a	67,36 b	3,04 b	42,50 b	64,00 b
5	80	49,50 a	75,50 a	63,19 b	3,10 b	22,00 c	62,50 b
6	83	28,00 b	81,00 a	84,72 a	4,00 a	62,50 a	62,00 b
7	86	54,00 a	79,50 a	72,22 b	3,40 b	58,50 a	72,00 a
8	83	40,50 a	81,00 a	68,75 b	3,20 b	50,00 b	78,00 a
CV(%)	---	25,42	10,21	14,18	15,21	20,94	10,71
Correlação (r)							
Envelhecimento	76%	0,42	0,27	-0,08	0,08	0,64	----
	100%	-0,14	0,49	0,40	0,41	----	

*Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%; CV= coeficiente de variação.

Quanto à eficiência dos testes na separação dos lotes em níveis de viabilidade e vigor (Tabela 1), enquanto no teste de germinação não se verificou distinção entre os lotes, a primeira contagem da germinação (PCG) coincidiu com os procedimentos de envelhecimento acelerado ao indicar três classes, inclusive a intermediária que, de acordo com Marcos Filho (2005), é difícil de ser identificada, pois dependendo do teste utilizado os lotes podem apresentar comportamento próximo aos de alto vigor ou aos de desempenho insatisfatório.

Conforme Nascimento (2009), a PCG tem sido utilizada como teste de vigor por sua simplicidade e facilidade de execução, ao mesmo tempo que o teste de germinação. Segundo Marcos Filho (2005) a redução na velocidade da germinação é um dos primeiros eventos que ocorrem após a maturidade fisiológica e, antes da completa desativação do metabolismo das sementes. Lima e Athanázio (2009), obtiveram sucesso na utilização desse teste na separação de lotes de sementes de cenoura população 'Londrina', em níveis de vigor indicando três classes para

sementes grandes e quatro para sementes pequenas. Todavia, conforme Martinelli-Seneme et al. (2004), os resultados obtidos com a PCG devem ser analisados cuidadosamente pois, esse teste pode não apontar diferença sutis entre lotes.

Os coeficientes de correlação (Tabela 1) não foram suficientemente fortes para estabelecer uma correspondência entre os resultados dos testes de primeira contagem da germinação, germinação, emergência de plântulas e envelhecimento acelerado, inclusive, entre os que possibilitaram visualizar mesmo número de níveis para separação dos lotes. Segundo Andrade et al. (1995), o grau de associação verificado entre os resultados de cada método empregado para análise de sementes de cenoura, indica as melhores perspectivas de sua adoção. Porém, Nascimento (2009) relatou que a capacidade de classificação dos lotes, baseada na comparação de médias é eficiente e oportuna, para estabelecer a sensibilidade de testes de vigor em indicar o potencial fisiológico, alertando que, o uso exclusivo da análise de correlação para essa finalidade pode induzir a falsas interpretações, pois os dados podem se correlacionar positiva ou negativamente apenas por apresentarem tendências de variação comparáveis entre si.

A discordância de resultados reforça a necessidade da comparação com o maior número possível de testes, antes de classificar os lotes quanto ao potencial fisiológico, pois cada teste tem um princípio diferente, e fornece informações complementares para a decisão a respeito da finalidade de cada lote de sementes.

A variação inicial do teor de água entre os lotes foi de 1,04% (Tabela 2), atingindo 13,26% após o envelhecimento acelerado tradicional (100%) e 1,96% no procedimento com solução de NaCl (76%). Desse modo, o procedimento com solução salina pode ser indicado, pois permitiu menor absorção de água pelas sementes permanecendo com percentual de umidade dentro do limite recomendado ao final do período. Segundo Marcos Filho (2005), a segurança dos resultados obtidos no teste de envelhecimento acelerado é medida pelo grau de umidade das sementes pré e pós o teste, devendo ser assegurado o uso de amostras cujo teor de água inicial e pós o envelhecimento não apresente variação superior a 2,0%, pois quanto maior a umidade maior a sensibilidade às condições do teste, ficando propensas à intensa deterioração. Variações superiores ao estabelecido comprometem os resultados obtidos, devendo-se repetir o teste.

Tabela 2. Percentuais médios do teor de água inicial e, pós-envelhecimento acelerado tradicional (100%) e com solução salina (76%) de oito lotes de sementes de cenoura. Bandeirantes (PR), 2015.

Lote	Inicial	100%	76%
1	7,37	50,35	9,88
2	6,70	44,37	9,94
3	7,42	41,09	9,58
4	6,38	48,87	10,51
5	6,83	44,29	10,51
6	7,38	40,61	9,58
7	6,50	40,61	9,58
8	6,61	36,36	10,30
Variação Média	1,04	13,26	1,96

4.2- Procedimentos do teste de tetrazólio

No corte 1, superficial sem retirada de tecido (Figura 5), os percentuais médios de sementes viáveis (rosas e vermelhas) foram inferiores aos verificados nos testes de germinação e emergência de plântulas, em todas as combinações de concentração e tempo de permanência na solução de tetrazólio (Tabela 3), e as sementes brancas, consideradas mortas, ocorreram com maior frequência.

O corte profundo paralelo ao embrião retirando-se o mínimo de tecido (Figura 5-3), mesmo no menor período de contato com a solução, aumentou consideravelmente os percentuais de sementes rosas, diminuiu os de brancas e manteve os de vermelhas, possivelmente em função da maior área de contato dos tecidos internos (embrião e endosperma), com o sal de tetrazólio. Lembrando que, a coloração vermelha aparece somente no período de 24 horas. Portanto, o corte 3 da Figura 5, reduziu em 75% o tempo de coloração das sementes, e se somados os percentuais de sementes rosas e vermelhas, obtém-se resultado próximo aos obtidos nos testes de germinação e emergência.

Conforme Dias e Barros (1999), diferenças na coloração dos tecidos podem significar alterações na sua permeabilidade. Sementes vigorosas precisam de maior tempo para colorir, apresentando um tom rosa brilhante, independentemente do período de permanência no tetrazólio, pois a solução teve dificuldade de penetrar nos tecidos devido a maior integridade das membranas celulares. Também pode indicar tempo insuficiente de contato com o tetrazólio ou concentração inadequada da solução.

O maior tempo de contato com a solução, provocou o desenvolvimento da coloração vermelho forte, indicando tecido viável em deterioração. Conforme Añez et al. (2007), sementes em contato com a solução de tetrazólio por longos períodos, colorem intensamente. Nesse sentido, Marcos Filho et al. (1987) relataram que, quanto mais escura a cor da semente, maior a dificuldade de visualização dos tecidos e a identificação das injúrias, podendo-se confundir tecidos vivos com deteriorados.

Segundo Fogaça et al. (2011) a solução de tetrazólio menos concentrada irá promover maior rapidez na obtenção dos resultados, ficando a escolha entre as concentrações, a critério do analista. Entretanto, no presente estudo não foi possível evidenciar o efeito da concentração, na velocidade de reação das sementes ao sal de tetrazólio. Porém, considerando-se o custo de aquisição, seria prudente que se utilizasse a menor concentração possível no preparo da solução de tetrazólio.

Os resultados revelaram a forte influência, que o tipo de corte empregado no preparo das sementes de cenoura para a exposição à solução de tetrazólio, exerce sobre a coloração e conseqüente classificação de viabilidade, podendo gerar resultados incorretos, em relação a real qualidade dos lotes avaliados.

Tabela 3. Percentuais médios de sementes de cenoura, coloridas nos tons de rosa, vermelho e branco, segundo as quatro metodologias da Regras para Análise de Sementes, com duas concentrações e períodos (tempo) de exposição a solução de tetrazólio sob 30°C, utilizando dois cortes diferentes. Bandeirantes (PR), 2015.

Metodologia	Lote							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Corte 1 (Superficial sem atingir o embrião e sem retirada de tecido)								
Rosa								
6h / 0,5%	11,0 C	33,0 A	10,0 B	4,0 A	10,0 A	5,0 B	26,0 A	0,0 C
6h / 1%	27,0 B	25,0 A	5,0 B	6,0 A	1,0 B	6,0 B	14,0 B	0,0 C
24h / 0,5%	52,0 A	21,0 A	48,0 A	7,0 A	9,0 A	11,0 A	40,0 A	33,0 A
24h / 1%	49,0 A	30,0 A	35,0 A	7,0 A	15,0 A	19,0 A	36,0 A	18,0 B
CV (%)	27,9							
Vermelho								
6h / 0,5%	0,0 C	0,0 B	0,0 C	0,0 B	0,0 C	0,0 B	0,0 B	0,0 B
6h / 1%	0,0 C	0,0 B	0,0 C	0,0 B	0,0 C	0,0 B	0,0 B	0,0 B
24h / 0,5%	18,0 A	8,0 A	15,0 A	4,0 A	13,0 A	9,0 A	25,0 A	20,0 A
24h / 1%	10,0 A	2,0 B	4,0 B	5,0 A	4,0 B	2,0 B	3,0 B	0,0 B
CV (%)	53,2							
Branco								
6h / 0,5%	27,0 A	8,0 B	17,0 A	14,0 A	13,0 A	35,0 A	14,0 B	37,0 A
6h / 1%	16,0 A	21,0 A	15,0 A	5,0 B	15,0 B	44,0 A	32,0 A	43,0 A
24h / 0,5%	6,0 B	5,0 B	12,0 A	1,0 B	2,0 B	12,0 B	3,0 C	8,0 B
24h / 1%	11,0 B	19,0 A	19,0 A	8,0 B	11,0 B	18,0 B	18,0 B	20,0 B
CV (%)	51,62							
Corte 3 (Paralelo ao embrião retirando-se o mínimo de tecido)								
Rosa								
6h / 0,5%	69,0 A	71,0 A	66,0 A	69,0 A	65,0 A	77,0 A	76,0 A	74,0 A
6h / 1%	64,0 A	81,0 A	65,0 A	71,0 A	78,0 A	70,0 A	75,0 A	76,0 A
24h / 0,5%	63,0 A	70,0 A	61,0 A	60,0 A	70,0 A	71,0 A	67,0 A	67,0 A
24h / 1%	66,0 A	67,0 A	54,0 A	57,0 A	66,0 A	73,0 A	79,0 A	68,0 A
CV (%)	6,98							
Vermelho								
6h / 0,5%	0,0 B	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 B	0,0 B	0,0 B
6h / 1%	0,0 B	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 B	0,0 B	0,0 B
24h / 0,5%	13,0 A	14,0 A	9,0 B	24,0 A	5,0 B	20,0 A	12,0 A	11,0 A
24h / 1%	11,0 A	7,0 B	22,0 A	6,0 B	20,0 A	16,0 A	4,0 B	17,0 A
CV (%)	37,9							
Branco								
6h / 0,5%	7,0 A	3,0 B	6,0 B	6,0 B	5,0 A	5,0 B	6,0 A	7,0 A
6h / 1%	6,0 A	9,0 A	17,0 A	3,0 B	5,0 A	12,0 A	5,0 A	7,0 A
24h / 0,5%	6,0 A	4,0 B	7,0 B	2,0 B	8,0 A	0,0 B	6,0 A	7,0 A
24h / 1%	4,0 A	1,0 B	5,0 B	23,0 A	2,0 A	3,0 B	6,0 A	8,0 A
CV (%)	45,10							

*Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

As temperaturas de 45 e 50 °C exerceram efeito significativo sobre as sementes de cenoura, diminuindo o percentual de rosas, ao mesmo tempo em que aumentou o de vermelhas, tanto na solução a 0,5% quanto na de 1,0% (Tabela 4). O percentual de sementes brancas permaneceu próximo em todas as temperaturas e concentrações. Sendo assim, as temperaturas de 30, 35 e 40 °C, durante 6 horas, podem ser empregadas para a coloração das sementes de cenoura, sem favorecer interpretações equivocadas.

No presente estudo não foi observado o efeito do acréscimo de 5 °C, nas temperaturas de 30 a 40 °C para a coloração, sobre a velocidade de reação do sal de tetrazólio, corroborando com o resultado descrito por Añez et al. (2007) em sementes de *Jatropha elliptica* (planta medicinal). Entretanto Vieira e Pinho (1999) afirmaram que, temperaturas superiores a 30 °C durante a exposição das sementes a solução de tetrazólio, podem duplicar a velocidade de reação e diminuir o período necessário para avaliação, porém ao mesmo tempo, aumentam a quantidade de sementes consideradas inviáveis. Delouche (1976) considera 40 °C como 'alta temperatura', capaz de acelerar a reação do sal de tetrazólio.

Tabela 4. Percentuais médios observados nas classes segundo as colorações nos tons rosa, vermelho, branco de oito lotes de sementes de cenoura, após permanecerem sob cinco diferentes temperaturas (°C), durante o período de exposição de seis horas em solução de tetrazólio nas concentrações de 0,5% e 1% com o corte 3. Bandeirantes (PR), 2015

Temperatura °C	Lote							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração 0,5%								
Rosa								
30	69,0 A	71,0 A	66,0 A	69,0 A	65,0 A	77,0 A	76,0 A	74,0 A
35	64,0 A	70,0 A	72,0 A	73,0 A	67,0 A	71,0 A	64,0 A	62,0 A
40	70,0 A	60,0 A	72,0 A	75,0 A	79,0 A	74,0 A	70,0 A	75,0 A
45	44,0 B	10,0 B	29,0 B	3,0 B	21,0 B	16,0 B	0,0 C	6,0 C
50	9,0 C	14,0 B	3,0 C	4,0 B	19,0 B	16,0 B	8,0 B	13,0 B
CV(%)	14,0							
Vermelho								
30	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 D	0,0 C	0,0 D	0,0 C
35	4,0 C	1,0 C	2,0 C	2,0 C	6,0 C	1,0 C	14,0 C	9,0 B
40	2,0 C	17,0 B	3,0 C	6,0 B	2,0 D	7,0 B	11,0 C	3,0 C
45	38,0 B	77,0 A	49,0 B	74,0 A	61,0 A	64,0 A	86,0 A	78,0 A
50	63,0 A	63,0 A	71,0 A	62,0 A	46,0 B	67,0 A	67,0 B	63,0 A
CV(%)	19,7							
Branco								
30	7,0 A	3,0 A	6,0 A	6,0 A	5,0 A	5,0 A	6,0 A	7,0 A
35	1,0 A	3,0 A	5,0 A	0,0 A	3,0 A	3,0 A	1,0 A	4,0 A
40	7,0 A	1,0 A	3,0 A	2,0 A	0,0 A	2,0 A	2,0 A	3,0 A
45	6,0 A	2,0 A	2,0 A	1,0 A	1,0 A	2,0 A	2,0 A	2,0 A
50	3,0 A	2,0 A	3,0 A	3,0 A	4,0 A	3,0 A	1,0 A	2,0 A
CV(%)	67,3							
Concentração 1,0%								
Rosa								
30	65,0 A	81,0 A	65,0 A	84,0 A	78,0 A	70,0 A	79,0 A	76,0 A
35	48,0 B	67,0 A	68,0 A	74,0 A	67,0 B	67,0 A	81,0 A	85,0 A
40	68,0 A	72,0 A	64,0 A	73,0 A	79,0 A	72,0 A	75,0 A	76,0 A
45	59,0 A	52,0 B	57,0 A	45,0 B	64,0 B	56,0 B	56,0 B	62,0 B
50	37,0 C	42,0 B	46,0 B	34,0 C	51,0 C	58,0 B	55,0 B	36,0 C
CV(%)	7,8							
Vermelho								
30	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 D	0,0 C	0,0 C	0,0 C	0,0 C
35	3,0 C	1,0 C	0,0 C	0,0 D	0,0 C	0,0 C	0,0 C	1,0 C
40	5,0 C	12,0 B	17,0 B	17,0 B	9,0 B	12,0 B	19,0 B	16,0 B
45	10,0 B	18,0 B	13,0 B	7,0 C	7,0 B	12,0 B	2,0 C	6,0 C
50	44,0 A	45,0 A	38,0 A	57,0 A	31,0 A	34,0 A	33,0 A	50,0 A
CV(%)	33,4							
Branco								
30	6,0 A	9,0 A	17,0 A	7,0 B	5,0 A	12,0 A	5,0 A	7,0 A
35	10,0 A	2,0 A	13,0 A	5,0 B	3,0 A	3,0 B	5,0 A	5,0 A
40	9,0 A	9,0 A	5,0 B	2,0 B	2,0 A	5,0 B	0,0 A	2,0 A
45	11,0 A	8,0 A	9,0 B	12,0 A	6,0 A	4,0 B	1,0 A	6,0 A
50	3,0 A	11,0 A	3,0 B	4,0 B	6,0 A	1,0 B	2,0 A	6,0 A
CV(%)	49,9							

*Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

A adaptação da metodologia Andrade (1996), para o corte representado na Figura 5-4, com duas horas de permanência na solução de tetrazólio demonstrou eficiência, permitindo a obtenção de resultados significativamente superiores aos do experimento I (Tabela 5), e próximos aos verificados nos testes de germinação e emergência. Demonstrando que, o corte próximo ao embrião, pode diminuir drasticamente os custos com o teste de tetrazólio, (concentração da solução e tempo de execução) com resultados seguros e eficientes similares aos que serão verificados, posteriormente a campo, pelo produtor.

Conforme Delouche (1976) e Marcos Filho (2005), o período de pré embebição é necessário para facilitar o corte e ativar o metabolismo enzimático, devendo ser tão curto quanto possível. A metodologia do teste de tetrazólio, descrita por Andrade et al. (1996) para sementes de cenoura, reduz esse período de dezoito (Brasil, 2009), para duas horas. Essa redução foi eficiente, possivelmente em função das sementes pequenas absorverem água em menor tempo (Rodo et al., 2000).

A precisão em interpretar os resultados do teste de tetrazólio é conseguida pela comparação com testes de germinação. Segundo Dias e Barros (1999), admite-se diferenças de até 5% entre seus resultados. Diferenças maiores, indicam problemas na execução ou na avaliação de um dos testes. Nesse caso, os testes devem ser repetidos até que os resultados sejam equiparáveis (Delouche, 1976).

Tabela 5. Percentuais médios observados nas colorações rosa, vermelho e branco de oito lotes de sementes de cenoura, após cinco metodologias do teste de tetrazólio, variando-se o tipo de corte e o tempo (horas) de permanência na solução. Bandeirantes (PR), 2015.

Metodologias	Cortes	Tempo	Lotes							
			1	2	3	4	5	6	7	8
			Rosa							
Experimento 1	1	---- ¹	34,8 C*	27,2 B	24,6 C	6,0 C	8,8 C	10,2 B	29,0 B	12,8 C
Experimento 1	3	---- ¹	65,6 B	72,2 A	61,6 B	64,2 B	69,8 B	72,8 A	74,2 A	71,2 B
Andrade (1996)	2	1	0,0 D	0,0 C	0,0 D	0,0 C	0,0 D	0,0 C	0,0 C	0,0 D
Andrade (1996)	4	1	0,0 D	0,0 C	0,0 D	0,0 C	0,0 D	0,0 C	0,0 C	0,0 D
Andrade (1996)	4	2	83,0 A	79,0 A	77,0 A	80,0 A	82,0 A	78,0 A	81,0 A	83,0 A
CV(%)			18,3							
			Vermelho							
Experimento 1	1	---- ¹	7,0 A	2,6 A	4,8 A	2,2 B	4,2 A	2,8 B	7,0 A	7,0 A
Experimento 1	3	---- ¹	6,0 A	5,2 A	7,8 A	7,6 A	6,2 A	9,0 A	7,0 A	7,0 A
Andrade (1996)	2	1	0,0 B	0,0 A	0,0 B	0,0 B	0,0 A	0,0 B	0,0 A	0,0 A
Andrade (1996)	4	1	0,0 B	0,0 A	0,0 B	0,0 B	0,0 A	0,0 B	0,0 A	0,0 A
Andrade (1996)	4	2	0,0 B	0,0 A	0,0 B	0,0 B	0,0 A	0,0 B	0,0 A	0,0 A
CV(%)			71,5							
			Branco							
Experimento 1	1	---- ¹	15,0 C	13,2 C	15,8 C	7,0 C	10,2 C	27,2 B	16,8 B	27,0 B
Experimento 1	3	---- ¹	5,8 C	4,2 C	8,8 C	8,6 C	5,0 C	5,0 C	5,8 C	7,2 C
Andrade (1996)	2	1	85,0 A	86,0 A	83,0 A	85,0 A	71,0 A	59,0 A	78,0 A	83,0 A
Andrade (1996)	4	1	28,0 B	30,0 B	44,0 B	37,0 B	22,0 B	34,0 B	21,0 B	33,0 B
Andrade (1996)	4	2	5,0 C	7,0 C	9,0 C	4,0 C	8,0 C	10,0 C	12,0 C	10,0 C
CV(%)			29,5							

¹= médias gerais dos períodos (6 e 24 horas) e concentrações (0,5 e 1 %) do experimento I; *Médias seguidas por mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.; CV= coeficiente de variação.

Na metodologia Andrade et al. (1996) em que se utilizou o corte da Figura 5-4, durante 1 hora na solução de tetrazólio, somente o embrião coloriu (Figura 6-A). As sementes preparadas com a referida metodologia, ajustando-se o tempo de permanência na solução, para duas horas coloriram o embrião e o endosperma de maneira uniforme (Figura 6-B). De acordo com Marcos Filho (2005), a absorção de água ocorre com maior velocidade no embrião, em relação ao endosperma, pois os tecidos do embrião utilizam a água para constituição e metabolismo de novas células. Além disso, a composição proteica e a localização periférica do embrião, podem explicar essa variação. Desse modo, a coloração dos tecidos do embrião, em função da reação com o sal de tetrazólio, também ocorre com maior rapidez nos tecidos embrionários.

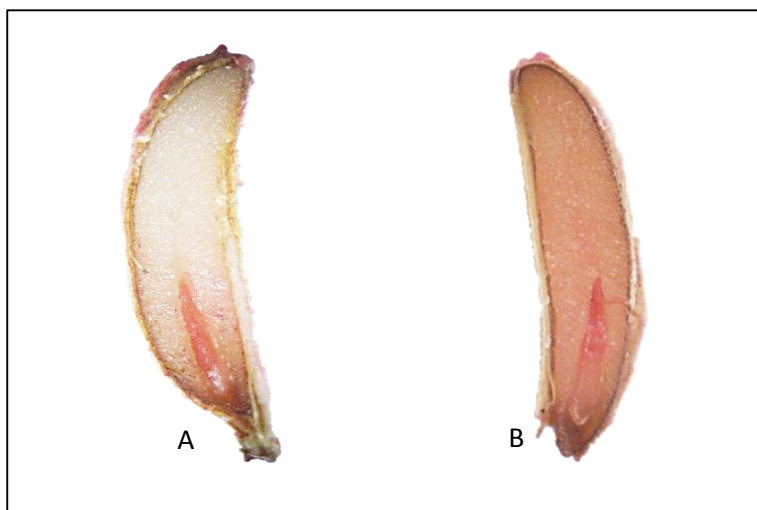


Figura 6. Sementes de cenoura após exposição a solução de tetrazólio durante uma hora (A) e duas horas (B), usando a metodologia Andrade et al. (1996) com o corte 4 (Figura 5). Bandeirantes (PR), 2015.

5. CONCLUSOES

O corte efetuado no momento de se expor as sementes de cenoura em contato com o sal de tetrazólio, é o fator de maior influência em sua coloração.

O teste de tetrazólio pode ser realizado em sementes de cenoura utilizando-se duas horas no período de pré embebição, corte paralelo e próximo ao embrião retirando-se o máximo de tecido, e imersão em solução a 0,1% durante duas horas, sob 35 °C.

6. REFERÊNCIAS

ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. **2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil.** Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%202029MAIO2014.pdf>. Acesso em: 20, fevereiro, 2015.

ANDRADE, R.N.B.; SANTOS, D.S.B.; SANTOS-FILHO, B.G.; MELLO, V.D.C. Testes de germinação e de tetrazólio em sementes de cenoura armazenadas por diferentes períodos. **Revista Brasileira de Sementes**, 18:108-116, 1996.

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 Mediciniais**, 9:82-88, 2007.

AOSA. Association of Official Seed Analysts and Society of Commercial Seed Technologists. **Tetrazolium Testing Handbook.** Washington: Jack Peters, 2002,96.

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

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**. 27:176-182, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 192p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Glossário Ilustrado de Morfologia**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 406p.

CALIARI, M.F.; SILVA, W.R. Interpretação de dados de testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, 23:239-251, 2001.

CASALI, V. W. D.; PINTO, C. M. F.; PÁDUA, J. G. Origem e botânica da cenoura. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, 10:8-9, 1984.

CERVI, F.; MENDONÇA, E.A.F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Revista Brasileira de sementes**, 31:177-186, 2009.

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

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

DEMIR, K; KENANOGLU, B. B.; MATTHEWS, S. Prediction of germination and vigour in naturally aged commercially available seed lots of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) using the bulk conductivity method. **Seed Science and Technology**, 36:509-523,2008.

DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A. S. do R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.8, 1-28.

EICHELBERGER, L; MORAES, D.M. Preparo de sementes de quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, 23:154-158, 2001.

EMBRAPA. Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária. **Brasília - Cenoura para verão** Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/cultivares/cenbsb.htm> Acesso em: 20, fevereiro, 2015.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35: 1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2012. 421 p.

FOGAÇA, C. A.; Krohn, N. G.; Souza, M. A.; Paula, R.C. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. **Floresta**, 41: 895 - 904, 2011.

FRANÇA NETO, J.B Teste de tetrazolio para a determinação do vigor de sementes. In: KRZYANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap.8, 2-7.

GRABE, D.F. **Tetrazolium testing handbook for agricultural seed**. Association of Official Seed Analysts, 1970. 62p.

GRANGEIRO, L.C.; AZEVÊDO, P.E.; NUNES, G.H.S.; DANTAS, M.S.M.; CRUZ, C.A. Desempenho e divergência genética de cenoura 'Brasília' em função da procedência das sementes. **Horticultura Brasileira**, 30:137-142, 2012.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging test for smallseeded crops. **Seed Science and Technology**, 25:123-131, 1996.

KRZYANOWSKI, C.F.; França Neto, J.B.; Henning, A.A. Relato de testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**,1:20-27, 1991.

LIMA, C.B.; ATHANÁZIO, J.C. Testes de vigor para sementes de cenoura. **Scientia Agraria**, 10:455-461, 2009.

LIMA, C.B.; BELLETTINI, N.M.T.; JANANI, J.K.; SILVA, A.S.; AMADOR, T.S.; VIEIRA, M.A.V.; CHEIRUBIM, A.P. Metodologias do Teste de Tetrazólio para Sementes de Melão (*Cucumis melo* L.) **Revista Brasileira de Biociências**, 5:744-746, 2007.

LIMA, L. B.; PINTO, T.L.F.; NOVENBRE, A.D.L.C. Avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de pepino pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, 32:60-68, 2010.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2:176-177, 1962.

MAPA. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Portaria SDA n 111, de 4 de setembro de 2012.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de plantas cultivadas**. 1. ed. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARCOS FILHO, J. Testes de VIGOR: dimensão e perspectivas. **Seed News**, Capa, 2011.

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

MARTINELLI SENEME, A.; MARTINS, C.C.; CASTRO, M.M.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Avaliação do vigor de sementes peliculizadas de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, 26:1-6, 2004.

MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. **Seed ecology**. London: Butterworth, 1973. 347-366.

NASCIMENTO, W. M. **Tecnologia de Sementes de Hortaliças**. 1. ed. Brasília:Embrapa Hortaliças, 2009. 431p.

NERY, M.C.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, L.M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Semina**: 28:365-372, 2007.

ORTIZ, T.A.; LONE, A.B.; UNEMOTO, L.K.; ATHANÁZIO, J.C.; TAKAHASHI, L.S.A. Metodologias para avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de cenoura cultivar londrina armazenados por até dez anos. **Bioscience Journal**, 30:330-337, 2014.

PEREIRA, R.S.; NASCIMENTO, W.M.; VIEIRA, J.V. Germinação e vigor de sementes de cenoura sob condições de altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, 25: 215-219, 2007.

PEREIRA, S.R.; MUNIZ, M.F.B.; NASCIMENTO, W.M. Aspectos relacionados à qualidade de sementes de coentro. **Horticultura Brasileira**, 23: 703-706, 2005.

RENTSCHLER, L.L. **Qualidade fisiológica e uso de extratos e óleos essenciais vegetais no controle de *Alternaria* spp. em sementes de cenoura.** Bandeirantes: Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*, 2014. 49p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

RODO, A.B.; PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agricola**. 57:289-292, 2000.

SANTANA, B.A. **Preparo das sementes de algodoeiro para o teste de tetrazólio.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2013, 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências).

SANTOS, M.A.O.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, 35:213-223, 2007.

STOLARCZYK, J.; JANICK, J. Carrot: History and Iconograph. **Chronica Horticulturae**, 51:13-18, 2011.

TROPICOS.org. **Missouri Botanical Garden.** Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/1701516>. Acesso em: 19, fevereiro, 2015.

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. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999. Cap. 8:1-12.

VIGGIANO, J. Produção de sementes de algumas umbelíferas. **Informe agropecuário**, 10:8-9, 1984.

VILELA, N.J; BORGES, I.O. Retrospectiva e situação atual da cenoura no Brasil. **Embrapa Hortaliças**, (Circular Técnica, 59). 2008.

ZUCARELI, C.; MALAVASI, M.M.; FOGAÇA, C.A.; MALAVASI, U.C. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, 23:186-19, 2001.