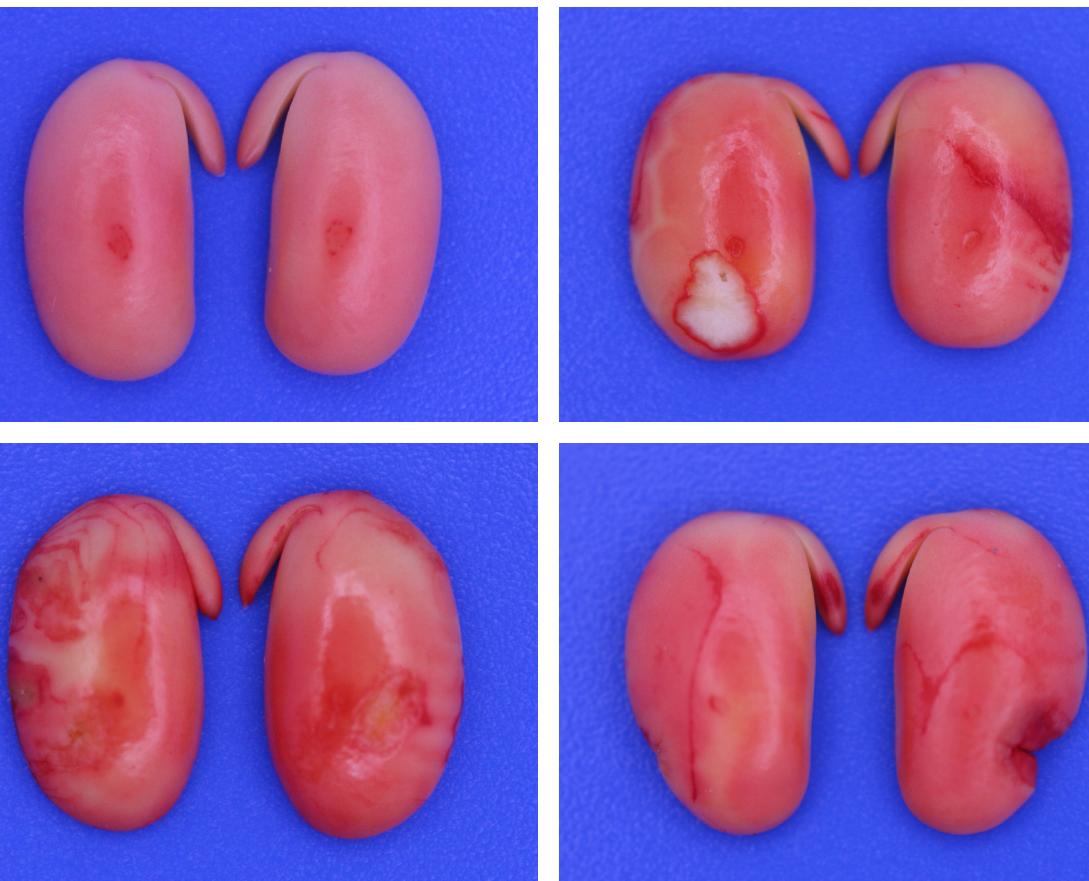


Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 449

Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja

*José de Barros França-Neto
Francisco Carlos Krzyzanowski*

***Embrapa Soja
Londrina, PR
2022***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja
Rodovia Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral. Caixa Postal 4006
CEP 86085-981 , Distrito de Warta, Londrina, PR
www.embrapa.br/soja
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Soja

Presidente
Adeney de Freitas Bueno

Secretária-Executiva
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros
*Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose,
Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros
França Neto, Liliane Márcia Mertz-Henning,
Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani
Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinatto Dall'Agno

Normalização
Valéria de Fátima Cardoso

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Vanessa Fuzinatto Dall'Agno

Fotos da capa:
José de Barros França-Neto

1ª edição
PDF digitalizado (2022).

O conteúdo desta publicação é de inteira responsabilidade dos autores.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Soja

França-Neto, José de Barros

Metodologia do teste de tretrazólio em sementes de soja / José de Barros França Neto, Francisco Carlos Krzyzanowski – Londrina : Embrapa Soja, 2022.
111 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n. 449)

1. Soja. 2. Teste de tetrazólio. 3. Teste de sementes. I. Krzyzanowski, Francisco Carlos. II. Título. III. Série.

CDD: 631.521 (21. ed.)

Autores

José de Barros França-Neto

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Tecnologia de Sementes,
pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR.

Francisco Carlos Krzyzanowski

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Tecnologia de Sementes,
pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR.

Apresentação

A utilização de sementes de soja de alta qualidade fisiológica, com alta germinação e alto vigor, é de fundamental importância para a instalação da lavoura, assegurando uma base sólida para o sucesso da produção. A produção de sementes de elevada qualidade é garantida pela utilização de tecnologias específicas, bem como de um rigoroso sistema de controle de qualidade.

Dentre os diversos testes utilizados na avaliação da qualidade das sementes de soja, o teste de tetrazólio se destaca como um dos mais eficientes e utilizados, visando a determinação da viabilidade, do vigor e dos fatores que podem afetar a qualidade das mesmas, como danos mecânicos, deterioração por umidade e danos causados por percevejos.

O teste de tetrazólio é rotineiramente aplicado em todas as etapas do sistema de produção de sementes de soja, desde a pré-colheita, durante a colheita, na recepção das sementes na indústria de beneficiamento de sementes (IBS), até a avaliação dos processos de secagem, beneficiamento, armazenagem e comercialização.

A Embrapa Soja, tendo o compromisso de oferecer constante aprimoramento das técnicas de produção e análise da qualidade das sementes à indústria brasileira de produção de sementes de soja, tem a satisfação de disponibilizar a 4^a edição do manual “Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Soja”, revisada, atualizada e ampliada em relação à edição anterior. Com o lançamento desta publicação, espera-se que o sistema de controle de qualidade possa disfrutar de suas informações, visando à produção e oferta de sementes de elevada qualidade aos sojicultores que compõem o agronegócio brasileiro.

Alexandre Lima Nepomuceno
Chefe-Geral da Embrapa Soja

Sumário

Introdução	9
Histórico do teste	10
Princípios do teste	16
Equipamentos e materiais necessários	20
Procedimento	21
Preparo das soluções de tetrazólio	21
Solução tampão:	21
Amostragem e número de sementes	22
Pré-condicionamento	23
Desenvolvimento da coloração	28
Lavagem da amostra.....	28
Interpretação	30
Diagnóstico das causas da deterioração da semente de soja.....	36
Danos mecânicos	36
Deterioração por umidade	39
Danos provocados por percevejos	42
Danos por seca e altas temperaturas	45
Danos por secagem excessiva	46
Sementes esverdeadas de soja	46

Identificação das classes de vigor e de viabilidade.....	49
Classe 1: viável; mais alto vigor	49
Classe 2: viável; alto vigor.....	53
Classe 3: viável; vigor médio.....	57
Classe 4: viável; vigor baixo.....	64
Classe 5: viável; vigor muito baixo	71
Classe 6: não viável	75
Classe 7: não viável	78
Classe 8: semente morta	86
Anotação e interpretação dos resultados.....	88
Necessidade de reanálise	92
Interpretação dos resultados.....	92
Precisão dos resultados	98
Vantagens e limitações do teste de tetrazólio para sementes de soja	100
Vantagens	100
Limitações	101
Quando aplicar o teste de tetrazólio.....	101
Áreas para melhorias.....	102
Agradecimentos	103
Referências	103

Introdução

Dentre os diversos métodos utilizados na composição de programas de controle de qualidade adotados pela indústria de sementes no Brasil, o teste de tetrazólio tem se destacado, principalmente para a soja, devido à sua rapidez, precisão e pelo grande número de informações geradas. Esse teste, além de avaliar a viabilidade e o vigor das sementes, fornece o diagnóstico das possíveis causas responsáveis pela redução de sua qualidade fisiológica: danos mecânicos, deterioração por umidade e danos causados por percevejos, problemas que mais comumente afetam o desempenho da semente de soja durante o seu armazenamento e no campo, quando semeadas. Porém, além desses, danos que ocorrem durante a secagem, os causados por estresse térmico e geada podem também ser facilmente identificados por meio do teste. Sem sombra de dúvida, o fornecimento desse diagnóstico tem sido o grande responsável pelo elevado índice de adoção do teste em nosso País, pois, além de apontar os problemas de redução de qualidade das sementes, o teste, quando aplicado nas diversas etapas do sistema de produção, permite identificar os pontos de origem desses problemas, possibilitando a tomada de ações corretivas, resultando na produção de sementes de alta qualidade.

No Brasil, o teste de tetrazólio é amplamente utilizado no controle de qualidade de sementes. No caso da soja, graças à publicação de diversos manuais sobre o teste (França-Neto et al., 1985, 1988, 1998; França-Neto; Krzyzanowski, 2018, 2020a) e devido aos diversos cursos e treinamentos de atualização de conhecimentos oferecidos na Embrapa Soja e outras instituições, é notório que o teste é executado em todos os laboratórios de análise de sementes brasileiros que trabalham com sementes de soja.

Em consequência, hoje, pode-se dizer que o Brasil é o líder mundial de utilização do teste de tetrazólio em nível de rotina. Alguns números podem ilustrar o nível de sua adoção: para a semeadura dos 40,951 milhões de hectares cultivados com soja na safra 2021/22 (Conab, 2022), foram necessárias cerca de um 3,0 milhões de toneladas de sementes de soja, o que representa ao redor de 100.000 lotes. Caso esses lotes sejam analisados pelo menos três vezes pelo teste de tetrazólio, durante o processo de controle de qualidade, isto resulta em cerca de 300.000 análises anuais realizadas apenas com soja.

A utilização do teste de tetrazólio em nosso País repercute não apenas com relação aos aspectos quantitativos, conforme ilustram os números apresentados acima, mas, principalmente, quanto aos qualitativos, pois quando realizado em conjunto com outros testes, tem propiciado a comercialização dos lotes que efetivamente apresentem elevados padrões de qualidade. Isto tem resultado num sistema de controle de qualidade de alta confiabilidade, assegurando maiores lucros aos produtores de sementes, por meio da produção de sementes de alta qualidade a menor custo. Este fato pode resultar em índices próximos de zero de reposição de sementes e de ressemeadura.

Diversos aspectos sobre o teste de tetrazólio em sementes de soja serão abordados no presente manual: sua história e fatos que contribuíram para o desenvolvimento, aprimoramento e padronização do teste; os seus princípios básicos; equipamentos e materiais necessários para a sua execução; procedimentos para o preparo e avaliação das sementes; correta interpretação de seus resultados; vantagens e limitações; e precisão de seus resultados.

Histórico do teste

O desenvolvimento de testes rápidos e precisos, visando à determinação do potencial fisiológico das sementes, tem sido um dos principais objetivos dos fisiologistas e tecnologistas de semente há vários anos, principalmente a partir do início do século 20, quando o sistema de produção de sementes começou a ser organizado em diversos países da Europa. Um dos marcos pioneiros que deram o impulso para a análise de sementes, incluindo o desenvolvimento de métodos rápidos para a determinação da viabilidade, foi a criação da primeira estação de análise de sementes em Tharandt, Saxônia em 1869 por Frederich Nobbe, que também publicou as primeiras regras para a amostragem e análise de sementes (Steiner, 1997a).

Diversos testes, baseados na observação da coloração, do aspecto, do peso volumétrico, da densidade, da velocidade de embebição, da condutividade elétrica e da intensidade respiratória das sementes foram utilizados inicialmente, visando a avaliação rápida da viabilidade das mesmas, porém sem nenhuma precisão (Moore, 1969). No início da década de 1920, a determinação da atividade de certas enzimas, como a peroxidase, catalase, oxidase, redutase e fenolase, recebeu atenção especial; porém, a falta de sucesso de

tais testes deveu-se ao fato de que a atividade das enzimas envolvidas não era avaliada em sementes individualizadas. Nessa mesma época, diversos corantes, como o índigo-carmim, azul de metileno, vermelho neutro, ácido sulfúrico e verde malaquita foram testados e a falta de precisão resultou no insucesso da sua adoção.

Conforme relatado por Moore (1969) e por Steiner e Kruse (2003), as primeiras tentativas bem-sucedidas na avaliação da viabilidade das sementes com bio-corantes foram realizadas por Turina, na antiga Iugoslávia, em 1922, e por Neljubow, na Rússia, em 1925. Turina trabalhou com a redução de sais de telúrio e de selênio nas células das sementes e Neljubow relatou algum sucesso com a utilização de índigo-carmim.

Hasegawa (1935), trabalhando com sementes arbóreas no início dos anos 30, aperfeiçoou a aplicação de sais de telúrio e de selênio para a coloração de embriões de sementes. A maioria de seus trabalhos foi publicada em língua japonesa, tornando os seus avanços inacessíveis à comunidade científica. Alguns de seus estudos foram amplamente divulgados após a publicação de alguns de seus resultados em inglês (Hasegawa, 1935) e em alemão, após uma reunião da ISTA (“International Seed Testing Association”), na Europa. Durante essa viagem, Hasegawa revelou alguns detalhes de sua metodologia de análise aos cientistas alemães F.E. Eidmann e W. Schmidt, que, por sua vez, aprimoraram o método do selênio (Moore, 1969; Steiner, 1997a; Steiner; Kruse, 2003).

O Dr. Georg Lakon, nascido em Atenas, Grécia, trabalhou em Hohenheim, Alemanha, desde o início da década de 1920, dedicando grande parte de sua vida profissional aos trabalhos na área de fisiologia de sementes. Aperfeiçoou o método do selênio, desenvolvido por Hasegawa, Eidmann e Schmidt, culminando com o desenvolvimento do método “topográfico” do selênio para a determinação da viabilidade de sementes (Lakon, 1940). Quando tomou conhecimento dos efeitos tóxicos do selênio aos analistas de sementes, Lakon procurou por um sal similar, porém não tóxico, que poderia ser utilizado com a mesma finalidade. Após a indicação por Kühn e Jerchel (1941), conforme citado por Cottrell (1948) e Isely (1952), de que diversos compostos de tetrazólio poderiam se reduzir em tecidos vivos, Lakon testou vários desses sais e concluiu que o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio era o mais apropriado para o

teste topográfico. Lakon desenvolveu a metodologia para sementes de várias espécies de cereais, com destaque para a semente de milho.

Dentre os diversos conceitos básicos estabelecidos por Lakon, a definição e caracterização de “viabilidade de sementes” teve um forte impacto no desenvolvimento do teste de tetrazólio. Esse pesquisador definia o termo viabilidade como um potencial de germinação e, por conseguinte, entendia que uma semente em repouso possuía potencial para originar plântulas (Steiner; Kruse, 2003).

Conforme relatado por Moore (1976), Steiner (1997a), e Steiner e Kruse (2003), a divulgação da existência e dos méritos do teste de tetrazólio ocorreu pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1945, mediante investigações realizadas pelo Exército Norte-americano, após a II Guerra Mundial, sobre atividades de pesquisa na Alemanha. O primeiro trabalho realizado com o teste nos Estados Unidos foi publicado por Porter et al. (1947), da Universidade Estadual de Iowa. Outros estudos pioneiros, realizados nesse mesmo país, conforme relatado por Moore (1976), foram publicados por Flemon e Poole, do Instituto Boyce Thompson na cidade de Yonkers/Nova Iorque, por Goodsell, da companhia de sementes de milho Pioneer, de Johnston/Iowa, e por Bennett, da Universidade Estadual de Iowa. Em 1949, o teste de tetrazólio foi incorporado às Regras Oficiais Alemãs para Análise de Sementes (Steiner, 1997a).

Avanços significativos para o aprimoramento do teste ocorreram na década de 1950. Vários pesquisadores de diversas universidades Norte-americanas e Alemãs alcançaram resultados básicos importantes. Dentre eles, destacaram-se Isely, Bass, Smith e Throneberry, da Universidade Estadual de Iowa, Parker, da Universidade de Idaho, e Bulat e Steiner, da Universidade de Hohenhein. Em 1956, foi fundado o Comitê de Tetrazólio da ISTA, que contribuiu para desenvolvimento significativo do teste e passou a incentivar a promoção de diversas atividades de treinamento sobre os princípios e execução do teste de tetrazólio (Steiner; Kruse, 2003).

Na década de 1960, progressos significativos relativos à aplicação prática do teste foram obtidos por Delouche, Still, Raspet e Leinhard, da Universidade Estadual do Mississippi, que publicaram o primeiro manual sobre o teste, abordando a sua metodologia para um grande número de espécies (Delouche

et al., 1962). Jensen, Pierpoint, Hayes e Grabe, do Laboratório de Sementes da Universidade Estadual do Oregon, e Copeland, Bruce e Midyette, da Universidade de Virginia, também contribuíram para a evolução do teste. Em 1966, o “Capítulo 6: Teste Bioquímico para Viabilidade - o Teste Topográfico do Tetrazólio” foi incorporado às Regras Internacionais para Análise de Sementes da ISTA (Steiner; Kruse, 2003).

Em 1970, outro marco importante foi atingido. A utilização do teste foi aceita pela AOSA (“Association of Official Seed Analysts”), por meio da publicação do Manual do Teste de Tetrazólio (Grabe, 1970). Em 1983, a AOSA publicou o Manual de Testes de Vigor (AOSA, 1983), que abordava a metodologia do teste para sementes de soja, algodão, milho e trigo.

Reconhecimento especial deve ser dado ao Dr. Robert P. Moore, do Laboratório de Sementes da Universidade Estadual da Carolina do Norte. Entre 1955 e 1985 ele publicou mais de 230 trabalhos sobre o teste e editou o Manual do Teste de Tetrazólio (Moore, 1985), publicado pela ISTA. Tal publicação contém detalhes sobre a metodologia do teste para mais de 650 espécies.

Em 2000, a AOSA completou a primeira revisão do Manual do Teste de Tetrazólio, que foi subsequentemente atualizado em 2001, 2002, 2005, 2006, 2007 (Peters, 2007) e em 2010 (Miller, 2010). Atualizações mais recentes podem ser encontradas no site da AOSA (www.aosaseed.com).

Em 2003, a ISTA publicou as “ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing” (Fichas de Trabalho do Teste de Tetrazólio da ISTA), editadas por Norbert Leist, Stefanie Kramer e Andrea Jonitz (Leist et al., 2003) em dois volumes: Vol. 1 para sementes de espécies agrícolas e olerícolas, e o Vol. 2 para sementes de espécies florestais e arbustivas. Essa publicação é constantemente atualizada, sendo a mais recente realizada em 2011. Essas publicações da AOSA e da ISTA focam suas metodologias para a determinação da viabilidade de sementes por meio do teste de tetrazólio.

No que diz respeito à determinação do vigor, as primeiras tentativas para o desenvolvimento de métodos envolvendo a coloração das sementes foram realizadas na Rússia por Neljubow na década de 1920, que sugeriu o estabelecimento de cinco classes, de acordo com a intensidade da coloração dos

tecidos de sementes (Moore, 1969). Na década de 1930, Eidmann, aprimorando o trabalho de Hasegawa, propôs três classes de avaliação (sementes plenamente germináveis, sementes germináveis fracas e sementes mortas), dependendo da intensidade e extensão da coloração (Steiner; Kruse, 2003). Em 1950, Lakon propôs um método que discriminava as sementes de alto e de baixo vigor, a partir da localização e extensão da coloração, bem como da aparência e textura dos tecidos das sementes (Steiner, 1997b). Estes mesmos princípios foram usados e aprimorados por Moore e Smith (1956), onde as sementes eram classificadas nas classes "A" (vigorosa), "B" (viáveis não vigorosas) e "C" (não viáveis).

Na década de 1960, Moore (1961; 1962a; 1962b; 1967a; 1967b) aperfeiçoou um esquema de classificação do vigor relativo de sementes de milho e de soja. Cada semente era classificada de acordo com a sua classe de vigor, de 1 a 5, se viável, e de 6 a 8, se não viável. A presença, a localização e a natureza da coloração dos tecidos, bem como o estado físico das estruturas do embrião foram utilizados como critérios desse esquema de classificação.

Uma das primeiras propostas em utilizar o teste de tetrazólio para a avaliação do vigor e do diagnóstico das possíveis causas que afetam a qualidade da semente de soja foi realizada pelo ex-pesquisador da Embrapa Soja, Luiz Antônio Geraldo Pereira, em sua tese de Mestrado, realizada na Universidade Estadual do Mississippi (Pereira, 1974). Ele avaliou a qualidade de 39 amostras de sementes de soja, classificando-as por dois métodos de vigor: TZ Energia 1-2 e TZ Energia 1-3. Além disso, em sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, caracterizou e descreveu em detalhes os sintomas característicos dos principais tipos de danos que ocorrem nessas sementes: dano de deterioração por umidade; dano mecânico; e os danos causados por percevejos. Pereira (1974) concluiu que o vigor determinado pela somatória das sementes nas classes de 1 a 3 foi o que melhor correlacionou com os resultados de emergência de plântulas a campo.

A inclusão do teste de tetrazólio para a determinação de vigor em sementes no Manual de Métodos de Testes de Vigor (*Handbook of Vigour Test Methods*) editado pela ISTA (Perry, 1981) e atualizado por Fiala (1987) e por Hampton e TeKrony (1995), e no Manual de Testes de Vigor (*Seed Vigor Testing Handbook*) publicado pela AOSA (1983) contribuiu significativamente para a disseminação e aperfeiçoamento das noções e conceitos de que o teste de

tetrazólio é um método confiável para a determinação do vigor de sementes de diversas espécies.

No caso de sementes de soja, o teste de tetrazólio foi aperfeiçoado para a determinação de vigor pelos especialistas em tecnologia de sementes da Embrapa Soja, que publicaram seis manuais, contendo procedimentos específicos para o teste (França-Neto, 1981, 1989; França-Neto et al., 1985; 1988; França-Neto; Krzyzanowski, 2018), sendo um deles publicado em três idiomas: Inglês (França-Neto et al., 1998b); Espanhol (França-Neto et al., 1998c); e Português (França-Neto et al., 1998d). Na Argentina, o procedimento do teste para determinação de vigor foi aperfeiçoado por Cravietto et al. (1995, 2008a), que também publicou a metodologia em inglês (Cravietto et al., 2008b).

Em 1999, procedimentos detalhados para o teste de tetrazólio visando a determinação do vigor em sementes foram publicados pela Abrates (Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes) no manual “Vigor de Sementes: conceitos e testes” (Krzyzanowski et al., 1999). Nesse livro, foram relatadas as metodologias do teste para sementes de algodão (Vieira; Von-Pinho, 1999), amendoim (Bittencourt; Vieira, 1999), feijão (Bhering et al., 1999), milho (Dias; Barros, 1999) e soja (França-Neto et al., 1999). AAOSA também publicou as metodologias dos testes de tetrazólio para determinação de vigor de sementes dessas mesmas espécies no Manual de Testes de Vigor em Sementes (Seed Vigor Testing Handbook), editado por Baalbaki et al. (2009).

Em 2017, a metodologia do teste para a determinação do vigor em sementes de soja foi incluída nas Regras Internacionais para Análise de Sementes (International Rules for Seed Testing), que são anualmente editadas pela ISTA (2017). A metodologia descrita nessa publicação é um híbrido do procedimento indicado pela Embrapa (França-Neto et al., 1998d) e pelo divulgado na Argentina pelo INTA-Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (Cravietto et al., 2008a).

A Abrates voltou a inovar, por meio da publicação da 2^a edição do manual “Vigor de Sementes: conceitos e testes” (Krzyzanowski et al., 2020a). Nele, foram relatadas as metodologias do teste de tetrazólio para a determinação do vigor e da viabilidade para sementes de algodão (Von Pinho et al., 2020), amendoim (Vieira et al., 2020), feijão (Krzyzanowski et al., 2020b), giras-

sol (Silva et al., 2020), forrageiras tropicais (Custódio; Aguiar, 2020), milho (França-Neto et al., 2020), soja (França-Neto; Krzyzanowski, 2020a), solanáceas (Marcos-Filho, 2020) e trigo (Carvalho et al., 2020).

No Brasil, a Embrapa Soja sempre desempenhou papel de suma importância na adoção do teste de tetrazólio em sementes de soja, em função dos diversos treinamentos oferecidos; desde 1984, até meados de 2022, a instituição ofereceu 98 cursos sobre o teste, que contaram com a participação de 2.425 profissionais envolvidos na Área de Ciência e Tecnologia de Sementes.

“O sucesso do desenvolvimento do teste de tetrazólio é resultado da conquista de várias etapas na história da pesquisa em sementes e da obtenção de novos conhecimentos sobre a vida da semente.” (Moore, 1985). Revisões mais detalhadas sobre o histórico do teste de tetrazólio foram publicadas por Cottrell (1948), Delouche et al. (1962), Gadd (1950), Isely (1952), Lakon (1953), Lindenbein (1965) e Moore (1962a, 1966, 1969, 1976), Steiner (1997a), Steiner e Kruse (2003), França-Neto e Krzyzanowski (2019, 2020b, 2022).

Princípios do teste

O teste de tetrazólio determina indiretamente a atividade respiratória nas células que compõem os tecidos das sementes. O teste baseia-se, portanto, na atividade de enzimas desidrogenases (AOSA, 1983; Bulat, 1961; Copeland et al., 1959; Moore, 1973; Smith, 1952; Smith; Throneberry, 1951) as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise (Figura 1) e o ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs (Figura 2). Na glicólise, ocorre a ação de uma dessas enzimas, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e, no ciclo do ácido cítrico, a de outras cinco: piruvato desidrogenase; isocitrato desidrogenase; α -cetoglutarato desidrogenase; succinato desidrogenase; e malato desidrogenase. Essas enzimas, particularmente a malato desidrogenase, reduzem o sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos. Quando a semente é imersa na solução incolor de TCT, esta é difundida através dos tecidos, ocorrendo a reação de redução nas células vivas, resultando na formação de um composto vermelho, estável e não difusível, conhecido por trifenilformazan (Figura 3).

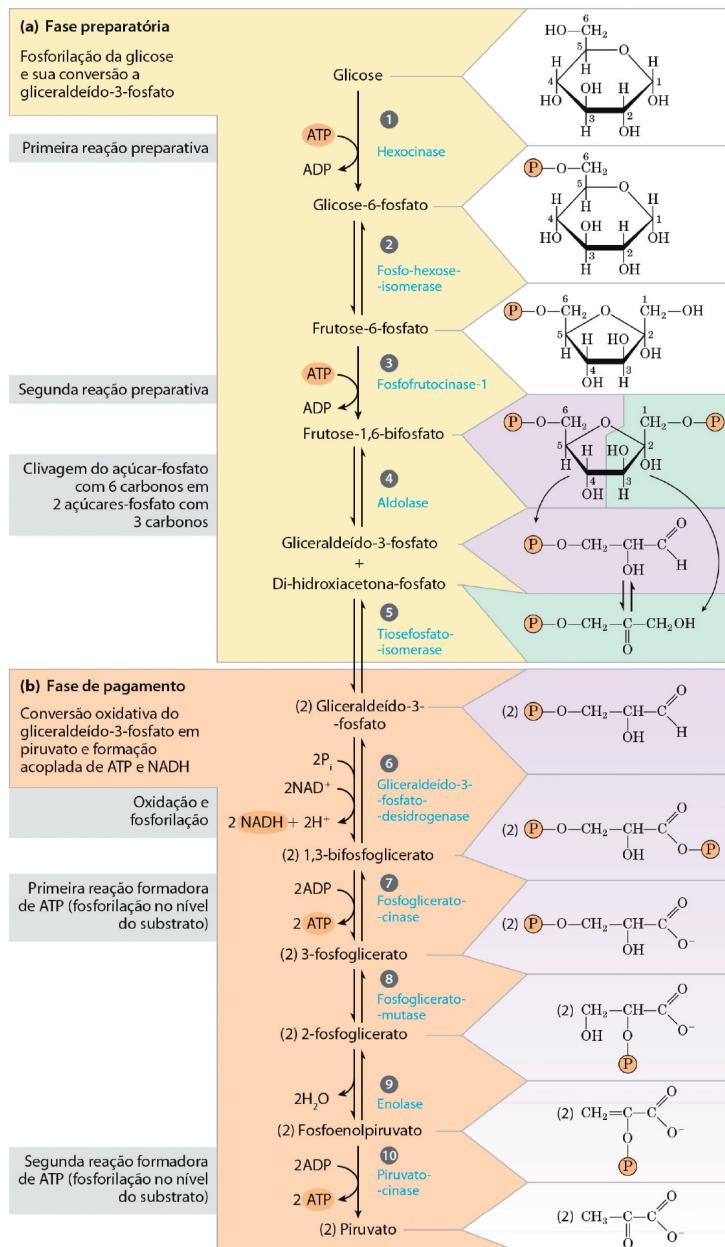


Figura 1. Esquema da glicólise, por meio da qual a glicose será metabolizada em duas moléculas de ATP por molécula de glicose e em piruvato, dando início aos processos oxidativos do ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Fonte: Lehninger et al. (2014).

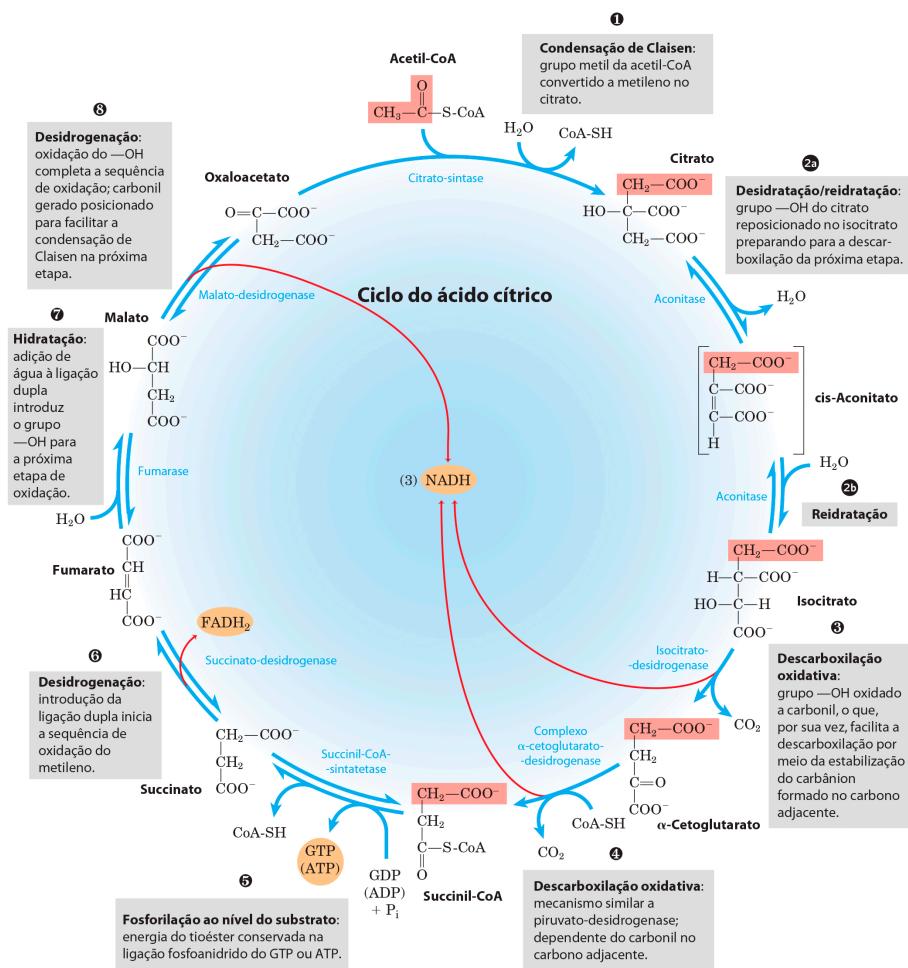


Figura 2. Ilustração do ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs, por meio do qual o piruvato, proveniente da glicólise, é metabolizado sob a ação de diversas enzimas, dentre as quais cinco desidrogenases, em energia (ATP), dióxido de carbono e água.

Fonte: Lehninger et al. (2014).

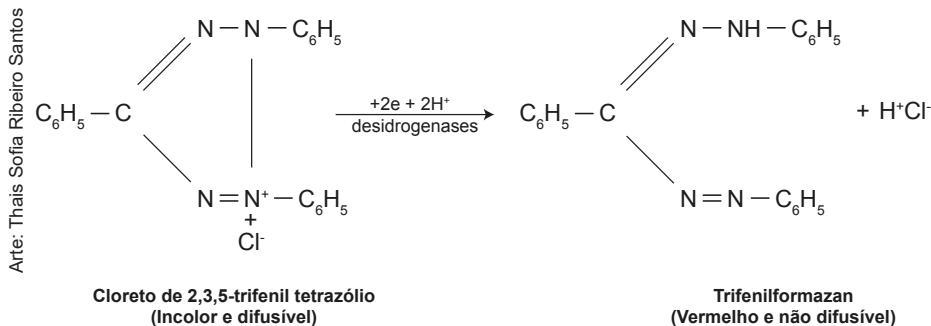


Figura 3. Reação de redução que resulta na coloração do sal de tetrazólio no interior de células vivas de sementes.

Fonte: Adaptado de Peters (2007).

Quando o TCT é reduzido, formando o trifluoromazan, isto indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade celular e do tecido (Peters, 2007). Portanto, a coloração resultante da reação é uma indicação positiva da viabilidade através da detecção indireta da respiração a nível celular. Tecidos não viáveis não reagem e consequentemente não são coloridos.

Tecidos com atividade respiratória podem ser encontrados no embrião de uma semente (cotilédones/escutelo, plúmula, hipocótilo e radícula), em alguns tecidos nutritivos do endosperma, em tecidos do gametófito feminino de gimnospermas e na camada de células da aleurona no endosperma de cariopses de gramíneas (Peters, 2007).

Em tecido vigorosos, haverá a formação de um composto vermelho carmim claro; se o tecido está em deterioração, assume cor vermelha mais intensa, em virtude da maior intensidade de difusão da solução de TCT pelas membranas celulares comprometidas; se o tecido é não viável, a redução do sal não ocorrerá e esse tecido fisiologicamente não viável ("morto") e não colorido contrastará com o tecido colorido viável. A observação de tais diferenças de coloração, juntamente com o conhecimento de diversas características morfológicas e fisiológicas das sementes, permitem a determinação da presença, da localização e da natureza das virtudes e dos distúrbios que podem ocorrer nos tecidos embrionários (Moore, 1973).

Equipamentos e materiais necessários

Para a realização do teste, são necessários os seguintes equipamentos, vidrarias e reagentes:

a) Reagente

- Sal de tetrazólio: cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio, normalmente comercializado em frascos com 10 g;

b) Recipientes de plástico e de vidro:

- Placas de Petri;
- Frasco de vidro (béquer) ou copos de plástico, com volume de 50 mL;
- Frasco de vidro, cor âmbar, para armazenar a solução de tetrazólio, que é fotossensível e se reduz com a luz;

Importante: não utilizar frascos metálicos, para evitar a redução da solução de tetrazólio em trifenilformazan, quando em contato com certos metais, conforme relatado por Bulat (1961).

c) Lâmina de barbear ou de bisturi;

d) Pinças;

e) Estufa ou germinador, com temperatura de 35 °C a 41 °C;

f) Lupa circular com aumento de 4X a 6X, com iluminação fluorescente ou led, de preferência circular;

h) Refrigerador para a armazenagem das amostras coloridas e das soluções de tetrazólio;

i) Papel de germinação.

Procedimento

Preparo das soluções de tetrazólio

Recomenda-se utilizar solução de tetrazólio na concentração de 0,075% (França-Neto et al., 1988, 1998d; França-Neto; Krzyzanowski, 2018, 2020a), permitindo o desenvolvimento de coloração adequada das sementes e a identificação precisa de danos mecânicos recentes, causados por abrasão (danos mecânicos latentes), que normalmente não seriam detectados com o uso de soluções mais concentradas (0,5% a 1,0%), conforme sugere a maior parte das referências mencionadas na literatura internacional (AOSA, 1983; Delouche et al., 1962; Grabe, 1970; Moore, 1985; Leist et al., 2003). Além disso, a utilização de solução nessa concentração (0,075%) é mais econômica, pois com 10 g do sal de tetrazólio pode-se testar a viabilidade de até 200 amostras de sementes. Caso a solução utilizada tivesse a concentração de 1,0%, apenas 15 amostras poderiam ser avaliadas com 10 g do sal.

Nota: a Ficha de Dados de Segurança de Material (MSDS - *Material Safety Data Sheet*) do sal cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio descreve e lista as propriedades toxicológicas do mesmo. Embora o sal de tetrazólio não seja considerado altamente tóxico e não apresente risco (especialmente quando diluído em concentrações líquidas de 1,0% ou menos), há protocolos específicos para o manuseio, uso e descarte de soluções de tetrazólio (Peters, 2007).

Prepara-se, inicialmente, a Solução Estoque a 1,0%, misturando 10,0 g do sal de tetrazólio em 1000 mL de água destilada ou deionizada, que deve ter um pH neutro, na faixa de 6,5 a 7,0. Se o pH da solução de tetrazólio estiver muito ácida, fora dos limites mencionados acima, devido às diferenças existentes entre as diversas marcas do sal disponíveis no mercado (Steiner, 1997c), o sal deverá ser dissolvido em uma solução tampão, preparada conforme as seguintes especificações (Moore, 1985; Brasil, 2009):

Solução tampão:

Solução 1. dissolver 9,078 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4) em 1000 mL da água destilada ou deionizada;

Solução 2. dissolver 11,876 g de fosfato monoácido de sódio bishidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 1000 mL de água destilada, ou dissolver 9,472g de Na_2HPO_4 em 1000mL de água destilada ou deionizada.

Misturar 400 mL da Solução 1 com 600 mL da Solução 2, para obter 1000 mL da solução tampão, e observar o pH, que deve estar entre 6,5 e 7,5.

Preparando-se a Solução Estoque do tetrazólio em água ou na solução tampão, a mesma deve ser armazenada em frasco de vidro ou de plástico de cor âmbar, ou em frascos envolvidos por filme de alumínio em local escuro e fresco, de preferência em refrigerador. Isto deve ser realizado, pois o tetrazólio é degradado pela ação da luz. Segundo o Comitê de Tetrazólio da ISTA (International Seed Testing Association), a solução de tetrazólio, se preparada com os cuidados já mencionados, poderá ser armazenada por um período de até um ano, sem perder as suas características para a realização do teste, se armazenada no escuro, em ambiente com 5 °C a 10 °C (ISTA, 2019).

A Solução de Trabalho, na concentração de 0,075%, deve ser preparada, quando necessário, seguindo as especificações abaixo, enfatizando-se que a mesma deve ser armazenada com os mesmos cuidados da Solução Estoque:

- 1000 mL de Solução de Trabalho a 0,075% = 75 mL Solução Estoque (1,0%) + 925 mL de água destilada ou deionizada (ou solução tampão).

A semente de soja não é muito exigente em relação ao pH final da solução de tetrazólio, que normalmente é ácida, quando preparada com água. Para a avaliação do teste em culturas de cereais de inverno como o trigo, aveia, cevada, centeio e triticale, sugere-se que a solução de trabalho seja preparada com a solução tampão, conforme descrita acima.

Amostragem e número de sementes

A amostra de trabalho deve ser representativa do lote e coletada conforme estabelecido nas Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009). Para o teste, as sementes devem ser obtidas de forma aleatória a partir da fração “Semente Pura” do teste de pureza, de acordo com as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Caso o teste venha a ser realizado para fins oficiais, conforme prescrições das RAS (Brasil, 2009), devem-se utilizar 400 sementes, ou seja, quatro repetições de 100 sementes ou oito repetições de 50. Opcionalmente, o teste poderá ser realizado em duas repetições de 100 sementes ou quatro de 50, totalizando 200 sementes.

No entanto, em análises destinadas ao controle interno de qualidade ou para determinação do vigor, a utilização de 100 sementes (2 subamostras de 50 sementes cada) é suficiente (Moore, 1973; França-Neto, 1981; França-Neto et al., 1985, 1988, 1998d, 1999; França-Neto; Krzyzanowski, 2018).

A razão para a utilização de um número reduzido de sementes para o teste de tetrazólio, em comparação ao teste de germinação, é devida às condições mais homogêneas a que as sementes são submetidas durante o seu preparo e o pré-condicionamento. Os resultados do teste de germinação podem ser afetados por várias fontes de variação, como gradientes de temperatura e de umidade no germinador, pH e textura do substrato (areia ou papel), diferenças na quantidade de água adicionada ao substrato e presença de certos fungos (*Phomopsis* spp. e/ou *Fusarium* spp.) infectando as sementes. Além disso, no teste de tetrazólio, cada semente é cuidadosamente avaliada individualmente, concentrando a atenção em os seus componentes morfológicos internos e externos.

Pré-condicionamento

O pré-condicionamento das sementes é de suma importância, visando a ativação dos mecanismos envolvidos na respiração das sementes. As sementes de soja, quando armazenadas, são organismos vivos e possuem atividades metabólicas, porém não respiram com grande intensidade. O processo de respiração é ativado durante a embebição das sementes, somente após atingirem 25% de água, conforme relatado por Vertucci e Leopold (1987). Devido a isso, é importante que no processo de pré-condicionamento das sementes, o seu grau de umidade atinja valores superiores a esse índice. Costa e Marcos-Filho (1994) e Costa et al. (1998) verificaram que o grau de umidade das sementes após o pré-condicionamento deve atingir valores mínimos de 33% para assegurar a total ativação do processo respiratório dos tecidos vivos das sementes de soja. É muito importante que sementes maiores atin-

jam esse porcentual mínimo de água, para que ocorra uma perfeita coloração após o contato com a solução de tetrazólio. Para essas sementes, pode ser necessário um período maior de pré-condicionamento.

O pré-condicionamento das sementes de soja pode ser realizado em dois sistemas:

a) Sistema tradicional em “pacotinho” (Figura 4A): as sementes devem ser embaladas em meia folha de papel de germinação em camada única, sendo o papel dobrado no formato de “pacotinho”; o papel de germinação deve estar previamente umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso; as sementes devem ser mantidas nestas condições por um período de 16 horas, à temperatura de 25 °C. Essa operação possibilitará a embebição lenta de água pelas sementes, ativando os processos de germinação. Para evitar a perda de umidade, as embalagens devem permanecer em câmara úmida, ou seja, em sacos ou caixas plásticas fechadas (Figura 4B), em dessecador (Figura 4C) com água em lugar de sílica-gel, ou em germinador.

Fotos: José de Barros França-Neto



Figura 4. Ilustração do pré-condicionamento das sementes de soja no sistema tradicional em “pacotinhos”: A. ilustração de dois “pacotinhos” realizados com papel de germinação umedecido dobrado; B. amostras acondicionadas em saco plástico, para evitar a desidratação do substrato; C. amostras acondicionadas em dessecador.

b) Sistema em rolo-de-papel de germinação: as sementes devem serem semeadas sobre uma folha de papel de germinação, com o uso de tabuleiro de semeadura (Figura 5A), sendo posteriormente feito um rolo, conforme tradicionalmente é realizado no teste de germinação (Figura 5B); a quantidade de água adicionada ao papel de germinação também deve ser equivalente a 2,5 vezes o seu peso; as sementes devem ser mantidas nestas condições por

um período de 16 horas, à temperatura de 25 °C. Essa operação possibilitará a embebição lenta de água pelas sementes, atingindo graus de umidade variando de 50% a 56%. Para evitar a perda de umidade, as embalagens devem permanecer em câmara úmida, ou seja, em caixas plásticas (Figura 5C) fechadas, ou em germinador. De acordo com França-Neto et al. (2022), este método de pré-condicionamento resulta em melhor padrão de coloração das sementes, não alterando os resultados estimados de vigor e de viabilidade.

Fotos: José de Barros França-Neto

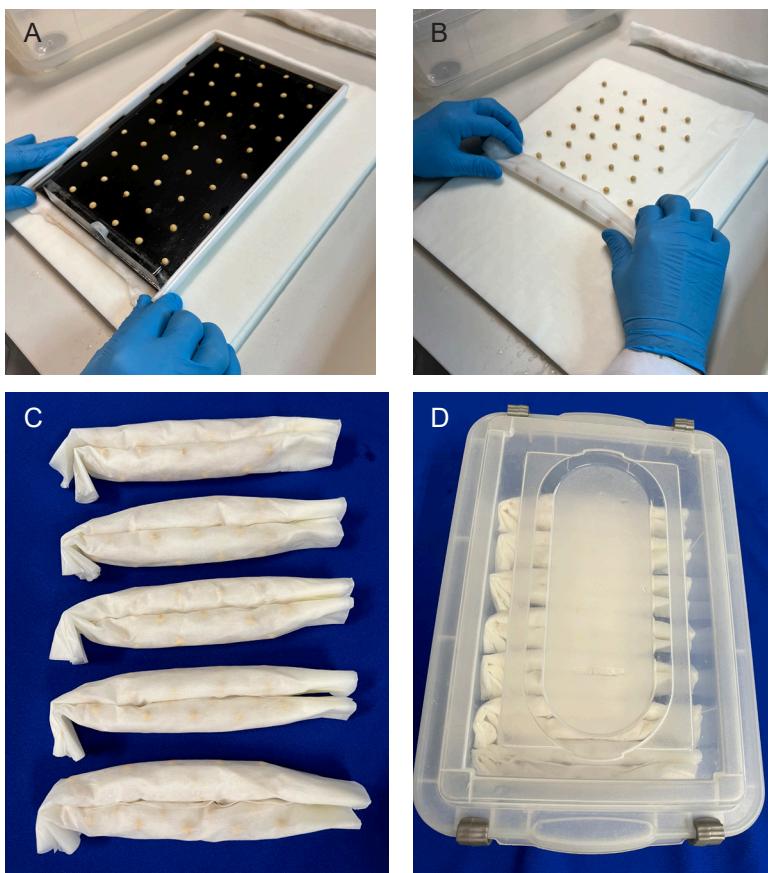


Figura 5. Ilustração do pré-condicionamento das sementes de soja em rolo-de-papel de germinação: A. ilustração das sementes sendo semeadas com o uso de tabuleiro de semeadura; B. feitura do rolo-de-papel de germinação, após a semeadura; C. ilustração de cinco conjuntos de dois rolos realizados; D. rolos acondicionados em caixa plástica, para evitar a dessecação.

Os tegumentos de sementes escuras de soja normalmente não permitem a rápida difusão da solução de tetrazólio. Caso sejam verificados problemas com a difusão da solução de tetrazólio nessas sementes, o tegumento das mesmas deve ser removido antes do processo de coloração.

Caso haja a necessidade de maior rapidez no processo de pré-condicionamento, pode-se utilizar a metodologia alternativa, sugerida por Costa e Marcos-Filho (1994), Costa et al. (1998, 2008), realizando-se o pré-condicionamento durante 6 horas, a 41 °C, o que representa um ganho de 10 horas no preparo das sementes, sem que haja perda de precisão dos resultados.

Procedimentos mais expeditos para o pré-condicionamento, que estejam entre esses dois limites citados, também podem ser utilizados: sob temperaturas entre 30 °C a 35 °C, períodos de 10 a 12 horas de pré-condicionamento poderão ser utilizados com sucesso para o pré-condicionamento adequado das sementes de soja.

Observação importante: os danos por sensibilidade à embebição rápida que podem ocorrer no teste de germinação em plântulas de soja, conforme descritos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), podem também ocorrer durante o preparo das sementes para o teste de tetrazólio. Normalmente esses danos ocorrem quando o grau de umidade das sementes é inferior a 12% (França-Neto et al., 1998a; Toledo et al., 2010). Os sintomas desse tipo de dano são detectados pela presença de anormalidades no sistema radicular das plântulas: raízes encurtadas ou ausentes. Nas sementes coloridas pela solução de tetrazólio, os sintomas ocorrem nas extremidades das radículas, com danos vermelho-escuros, que podem ser confundidos com danos mecânicos latentes ou deterioração por umidade (Figura 6).

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 6. Danos causados pela embebição rápida, detectados em sementes de soja coloridas pelo sal de tetrazólio: note a presença de danos vermelho intenso nas extremidades dos eixos embrionários, atingindo o meristema radicular.

Quando esses sintomas são encontrados nas sementes, sugere-se realizar os mesmos procedimentos descritos na Instrução Adicional número 70, pg. 222 das RAS (Brasil, 2009): realizar o pré-condicionamento das sementes, em “gerbox” com tela (do tipo utilizado no teste de envelhecimento acelerado), contendo 40 mL de água (Figura 7), durante 16-24 horas, a 25 °C; após o pré-condicionamento, as sementes são condicionadas em rolo-de-papel de germinação, ou no sistema tradicional de “pacotinho”.

Foto: José de Barros França-Neto

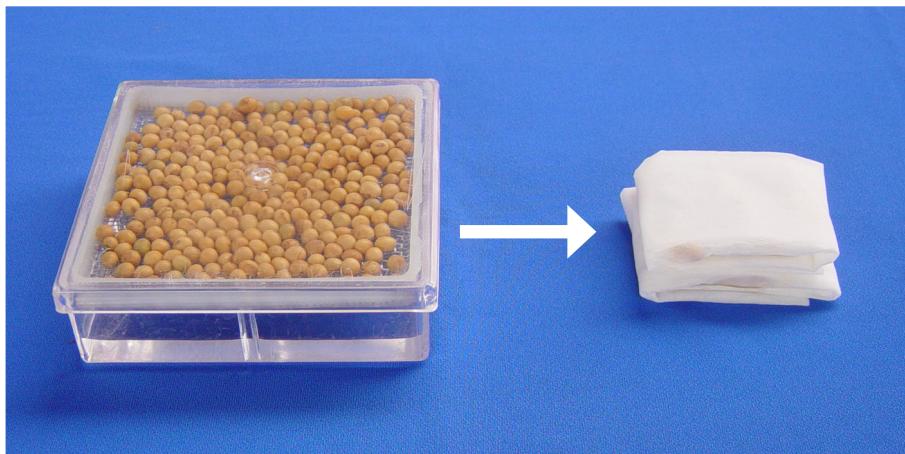


Figura 7. Pré-condicionamento das sementes em “gerbox” com tela, contendo 40 mL de água, durante 16-24 horas, a 25 °C; após o pré-condicionamento, as sementes são condicionadas em rolo-de-papel de germinação ou no sistema tradicional de “pacotinho”.

Desenvolvimento da coloração

Após o pré-condicionamento, as sementes são colocadas em frascos bêquer ou copinhos de plástico, sendo totalmente submersas na solução de tetrazólio (0,075%). As sementes devem permanecer a 35 °C a 40 °C por, aproximadamente, 150 a 180 minutos. Esta temperatura pode ser obtida utilizando-se uma estufa ou germinador. É importante ressaltar que esta operação deve ser realizada no escuro, uma vez que a solução de tetrazólio é sensível à luz (Lakon, 1949).

Lavagem da amostra

Alcançada a coloração ideal, as sementes são lavadas com água corrente comum e devem ser mantidas submersas em água até o momento da avaliação, para evitar sua desidratação (Figuras 8 e 9).

OBSERVAÇÃO IMPORTANTE: caso as amostras não sejam avaliadas de imediato, devem ser mantidas em refrigerador, por até 12 horas. Após esse período, se não avaliadas, devem ser descartadas devido à intensificação da coloração vermelho carmim, podendo levar a erros na avaliação.

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 8. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, após lavagem em água corrente comum, prontas para serem avaliadas.

Foto: José de Barros França-Neto

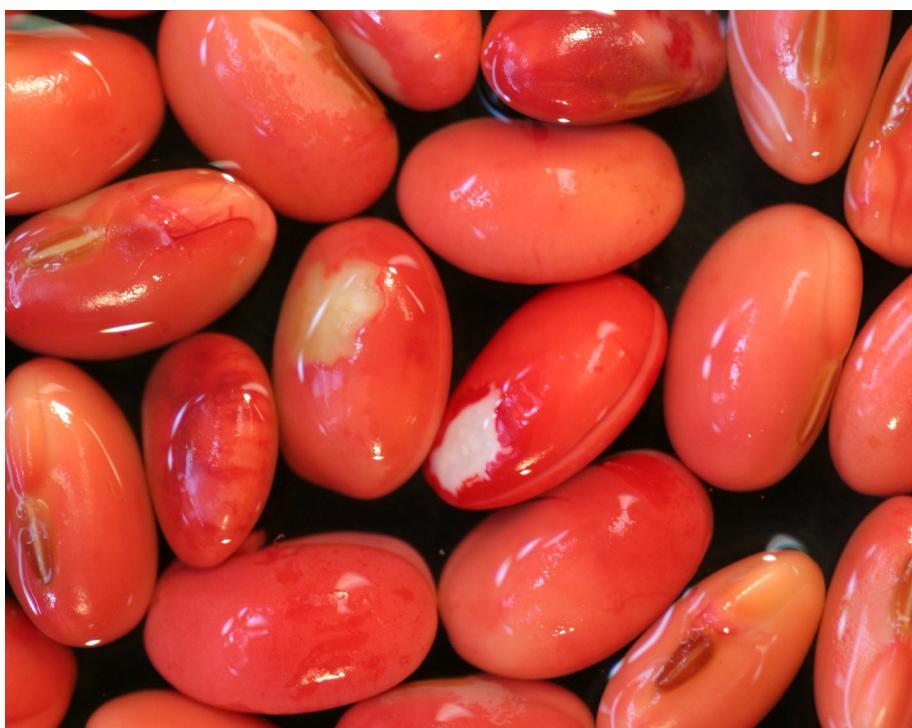


Figura 9. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, após lavagem em água corrente comum, prontas para serem avaliadas.

Interpretação

Apesar de não haver necessidade de utilizar equipamentos e reagentes caros, o teste requer a atuação de analistas de sementes bem treinados, sendo fundamental o conhecimento adequado da estrutura morfológica da semente. Experiência, imaginação e julgamento crítico são também necessários para que o analista possa identificar os tipos de anormalidades de plântulas que podem ser associados aos danos identificados no teste de tetrazólio. A precisão deste teste depende do conhecimento de todas as técnicas e procedimentos envolvidos.

Conforme mencionado por Moore (1985), há três objetivos básicos na avaliação das sementes: a) determinar o potencial de germinação de um lote de sementes sob as condições mais ideais possíveis; b) categorizar as sementes em diferentes classes de viabilidade, visando à determinação da classificação do vigor; e c) diagnosticar as possíveis causas que resultam na perda de viabilidade das sementes. Os dois primeiros objetivos podem ser alcançados pela interpretação de quatro características básicas: condição (firmes ou flácidos) e cor dos tecidos, pela localização e tamanho das lesões nas sementes. A habilidade do analista reconhecer os sintomas típicos dos diferentes tipos de danos que podem ocorrer nas sementes é imperativo para a obtenção do diagnóstico correto das causas de perda de viabilidade.

Para que a interpretação se torne menos cansativa, sugere-se que seja efetuada sob lupa de quatro a seis aumentos (4 a 6 X), com iluminação fluorescente ou led. As sementes devem ser avaliadas uma a uma, seccionando-as longitudinalmente através do centro do eixo embrionário (Figura 10), com o auxílio de uma lâmina de barbear ou bisturi. Antes de seccionar a semente, o analista deve avaliar se existem rachaduras ou rompimentos do tegumento, por onde pode penetrar a solução de tetrazólio; isto pode resultar na coloração da parte interna dos cotilédones e afetar a interpretação do teste, conforme será explanado posteriormente.

Atenção deve ser dada para que se seccione o eixo embrionário exatamente em sua parte central. Porém, caso o corte não seja bem centralizado, a avaliação da condição do eixo embrionário deve ser realizada na metade que contenha a maior parte do eixo, expondo-se o seu cilindro central, após cortes adicionais.

Arte: Thais Sofia Ribeiro Santos

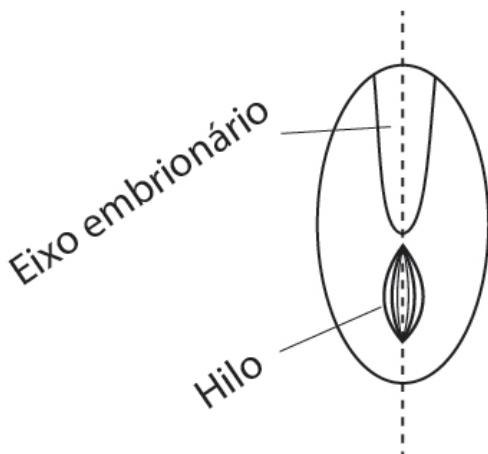


Figura 10. Ilustração do local de corte longitudinal da semente de soja, orientado através da parte central do eixo embrionário e do hilo.

Para aumentar o rendimento na realização das análises no laboratório, sugere-se que o analista já receba as sementes previamente seccionadas por outro laboratorista, mantidas sob uma camada de água para evitar a sua desidratação (Figura 11).

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 11. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, previamente seccionadas.

Após o seccionamento da semente, as suas metades são abertas, sendo o tegumento removido para que a superfície externa dos cotilédones venha a ser exposta. O analista deve observar as superfícies externa e interna dos cotilédones, procurando identificar todos os tipos de danos.

Cuidados especiais devem ser tomados durante a avaliação do eixo embrionário, que é composto por dois tipos de tecidos: o **córtex** e o **cilindro central** (Figura 12). O cilindro central é a estrutura mais crítica do eixo embrionário. Como regra geral, caso um dano venha a ocorrer nesse eixo, mas não é suficientemente profundo para danificar o cilindro central, a semente pode ser considerada viável. Entretanto, se o dano atingir o cilindro central, a semente será considerada não viável (Figura 13).

Foto: José de Barros França-Neto

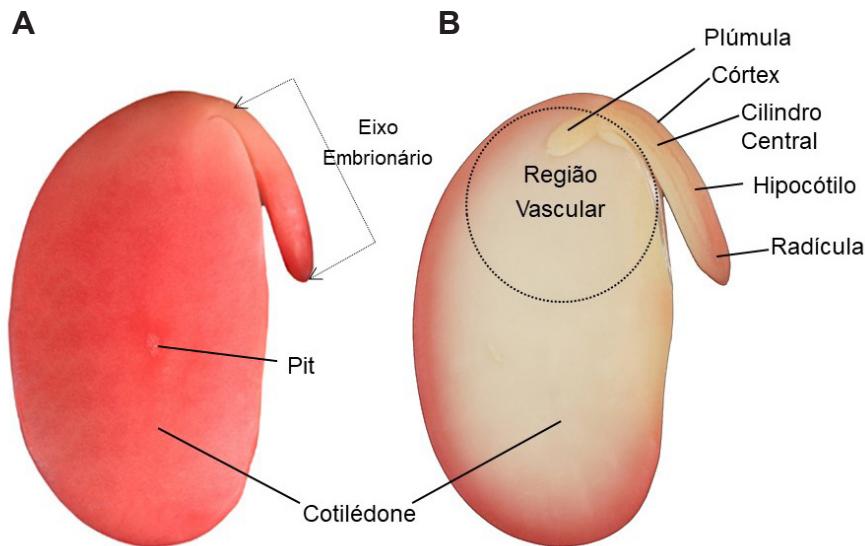


Figura 12. Estrutura de uma semente de soja de alta qualidade, permitindo a identificação de suas partes após embebição e coloração pelo tetrazólio, com o tegumento removido; A. face externa da semente; B. face interna, ilustrando o padrão de difusão da coloração do tetrazólio e a região vascular, circundada por linha pontilhada.

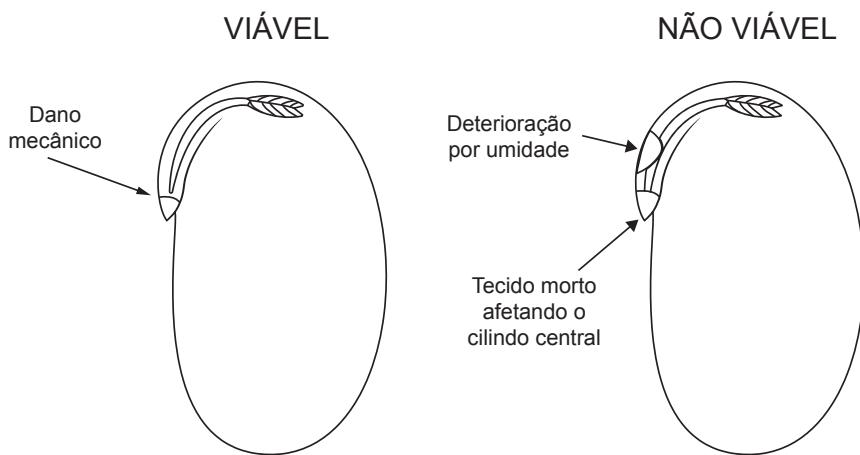


Figura 13. Corte longitudinal de duas sementes de soja, mostrando a ocorrência de danos no eixo embrionário; A. dano mecânico em região crítica, sobre a radícula, sem atingir o cilindro central: semente viável; B. mesmo dano em maior extensão, atingindo o cilindro central da radícula, além de dano no hipocôtilo com profundidade maior que metade da extensão do cilindro central: semente não viável.

Além do cilindro central, outra região crítica da semente de soja, que dever ser observada com muita atenção, é a **região vascular** (Figuras 14 e 15), que se situa no terço superior dos cotilédones, próxima à inserção do eixo embrionário. Através dessa região passam os vasos que conectam o eixo embrionário aos cotilédones (Figura 15), sendo, portanto, de suma importância para o transporte de materiais de reserva dos cotilédones ao eixo embrionário em desenvolvimento, nas fases iniciais de germinação e emergência da plântula. Caso essa região venha a ser afetada por algum tipo de dano, o vigor e/ou a viabilidade da semente poderão ser comprometidos.

Outro fator que deve ser observado é a diferenciação de cores dos tecidos:

- Vermelho carmim: tecido vivo e vigoroso
- Vermelho carmim forte: tecido em deterioração
- Branco leitoso: tecido morto.

Fotos: José de Barros França-Neto

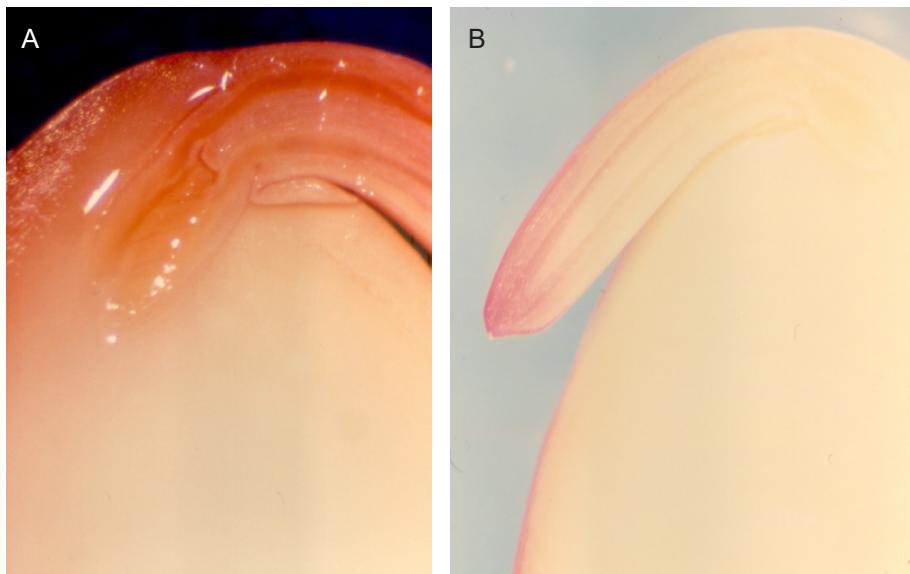


Figura 14. Detalhes da região vascular, eixo embrionário e plúmula; A. note a plúmula e região meristemática apical; B. diferenciação do cilindro central e do córtex no eixo embrionário (radícula-hipocótilo).

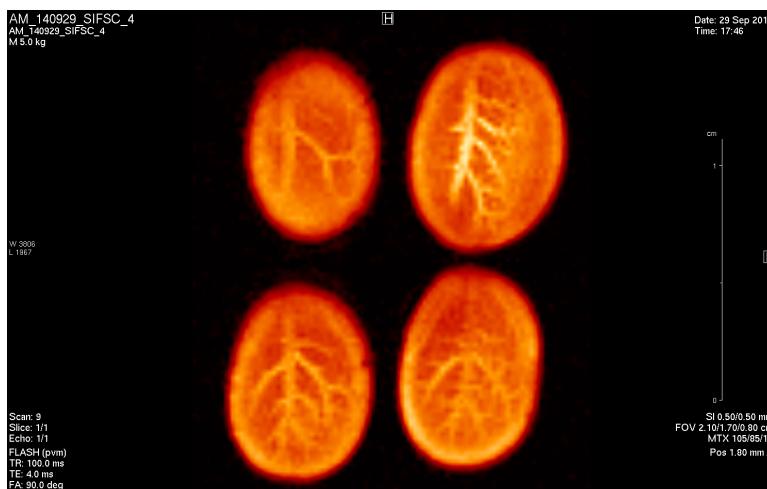


Figura 15. Foto de ressonância magnética de sementes de soja, ilustrando os vasos cotiledonares. Foto: Francisco Guilhien Gomes Junior, USP/ESALQ.

De acordo com Moore (1985), tecidos vigorosos tendem a colorir gradualmente e uniformemente da sua superfície para o interior; quando embebi-

dos, apresentam-se túrgidos (Figuras 16 e 17). A ocorrência de vermelho mais intenso é característica de tecidos em deterioração, que permitem uma maior difusão da solução de tetrazólio através de suas membranas celulares já comprometidas. Quando expostos ao ar, tais tecidos perderão a turgidez mais rapidamente que os tecidos vigorosos. A coloração branca identifica tecidos mortos, que não apresentam atividade enzimática suficiente para a produção do trifenilformazan. Tecidos mortos normalmente são flácidos e apresentam a coloração branco-opaca, mas podem ser amarelados, cinzentos ou esverdeados, principalmente quando sofreram danos causados por percevejos. Em algumas raras situações, tecidos mortos podem apresentar manchas avermelhadas, causadas por atividades de certos fungos ou bactérias. Entretanto, tais tecidos são facilmente diferenciados de tecidos viáveis, por serem extremamente flácidos e friáveis.

Fotos: José de Barros França-Neto



Figura 16. Semente de soja de alto vigor (Classe 1), colorida pela solução de tetrazólio; A. face externa dos dois cotilédones; B. face interna dos cotilédones.

Deve-se enfatizar que, após o seccionamento das sementes, as superfícies internas dos cotilédones são normalmente descoloridas (brancas), devido à falta de difusão da solução de tetrazólio às suas camadas mais profundas, devido à melhor integridade do sistema de membranas dos tecidos (Figuras 12 e 16). Moore (1985) identificou tecidos viáveis, que não coloriram, como normalmente túrgidos, brilhantes, apresentando tonalidades branco-rosadas ou branco-amareladas.

A posição e a extensão dos danos que ocorrem nas sementes são características de importância crucial para a interpretação correta do teste e devem ser consideradas em combinação. Por exemplo, uma pequena lesão causada por percevejo, que danifica o hipocótilo, atingindo o cilindro central, resultará em consequências mais sérias que uma lesão de grande extensão, localizada na metade inferior de um cotilédone, longe do eixo embrionário e da região vascular (Figura 17).

Fotos: José de Barros França-Neto

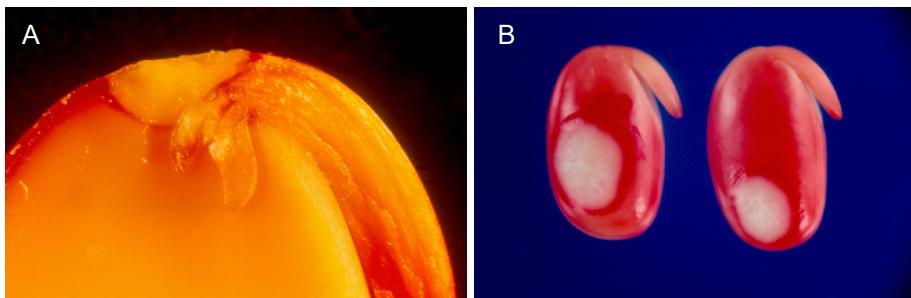


Figura 17. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio; A. ilustra pequeno dano causado por percevejo próximo à região vascular e plúmula; B. danos de grande extensão causados por percevejo em região inferior dos cotilédones.

Diagnóstico das causas da deterioração da semente de soja

Vários fatores afetam a qualidade da semente de soja. Os principais, conforme descrito por Moore (1960, 1962a, 1973) e por França-Neto (1984), França-Neto et al. (1998d, 2016) e Cravietto et al. (1995, 2008a) são danos mecânicos, deterioração por umidade, danos causados por percevejos, danos provocados por seca e altas temperaturas, danos durante a secagem e danos por geada. Cada tipo de dano está associado com lesões características, descritas resumidamente a seguir.

Danos mecânicos resultam de impactos físicos durante as operações de colheita, trilha, secagem, beneficiamento, transporte e semeadura. Há dois tipos de danos mecânicos que são facilmente identificados pelo teste de tetrazólio (França-Neto et al., 2016): danos mecânicos imediatos (Figura 18), caracterizados pela presença de rachaduras e trincas nas sementes, resultantes

de impactos das sementes nos sistemas de trilha e transporte na colhedora quando a semente é colhida muito seca (graus de umidade abaixo de 12%); e danos mecânicos latentes, caracterizados por abrasões e amassamentos nas sementes, resultantes de impactos sofridos pelas sementes mais úmidas (graus de umidade acima de 14%); esse último é identificado pela presença de lesões de coloração vermelho escura, caso tenham ocorrido recentemente, ou por lesões brancas com tecidos flácidos, se não forem recentes. Danos mecânicos latentes podem evoluir durante a armazenagem (Moreano et al., 2011). Um analista inexperiente pode confundir o pit (Figura 12) com lesões provocadas por danos mecânicos latentes. O pit é uma depressão na superfície externa dos cotilédones, composto por um grupo de células especializadas, em oposição direta ao antipit do tegumento, que é uma camada de células na superfície ventral do tegumento (Yaklich et al., 1984, 1986). Sementes com lesões por danos mecânicos imediatos e latentes, conforme caracterizadas no teste de tetrazólio, estão ilustradas nas Figuras 19 e 20.

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 18. Sementes de soja com sintomas típicos de danos mecânicos imediatos.

Fotos: José de Barros França-Neto

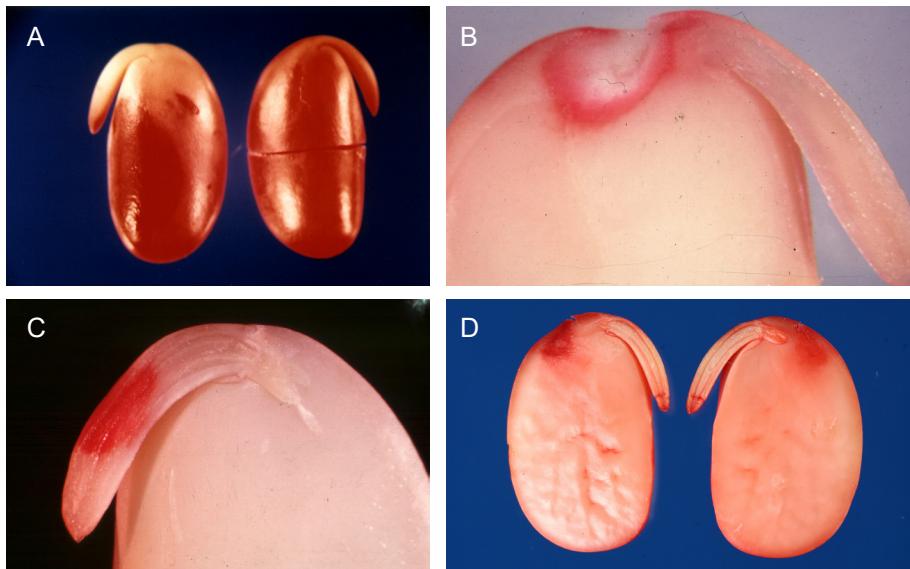


Figura 19. Sementes de soja com sintomas de danos mecânicos após a coloração com a solução de tetrazólio. A. esquerda: dano mecânico latente; direita: dano mecânico imediato; B. dano mecânico imediato na região da plúmula; C. dano mecânico latente no eixo embrionário, atingindo o córtex e o cilindro central; D. dano mecânico latente na região de inserção do eixo embrionário aos cotilédones, afetando a plúmula; e dano mecânico imediato (trinca) na radícula.

Fotos: José de Barros França-Neto

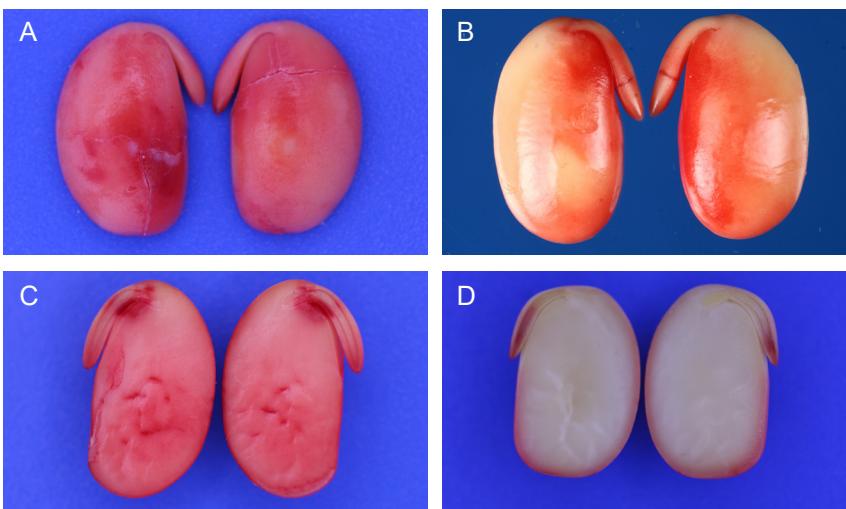


Figura 20. Sementes de soja com sintomas de danos mecânicos após a coloração com a solução de tetrazólio; A. dano mecânico imediato nos cotilédones; B. dano mecânico imediato no eixo embrionário; C. dano mecânico latente na região de inserção do eixo embrionário e hipocôtilo; D. dano mecânico latente no eixo embrionário.

Deterioração por umidade, descrita por Moore (1973), Pereira e Andrews (1976) e França-Neto (1984), resulta da exposição das sementes de soja a ciclos alternados de condições ambientais úmidas e secas na fase final de maturação, antes da colheita (Figura 21). Tais danos apresentam uma maior magnitude, caso ocorram em ambientes quentes, típicos de regiões tropicais e subtropicais. Sementes com deterioração por umidade apresentam rugas características nos cotilédones (Figura 22), na região oposta ao hilo, ou sobre o eixo embrionário. Rupturas (rasgos) no tegumento (Figura 22) também estão associadas com esse tipo de dano. Após a coloração, essas sementes revelarão a presença de lesões de coloração vermelho intensa ou branco leitoso nos tecidos embrionários adjacentes às rugas. Frequentemente, tais lesões estão associadas com a infecção por certos fungos, como *Phomopsis* sp., *Fusarium incarnatum*, sin. (*F. pallidoroseum*, *F. semitectum*) e *Cercospora kikuchii*. As lesões podem ser profundas e, caso o cilindro central esteja danificado ou se mais de 50% dos tecidos dos cotilédones estiverem deteriorados, a semente é considerada não viável. A deterioração por umidade apresenta uma característica muito típica, que é a simetria das lesões em ambos os cotilédones da semente (Figuras 23 e 24).

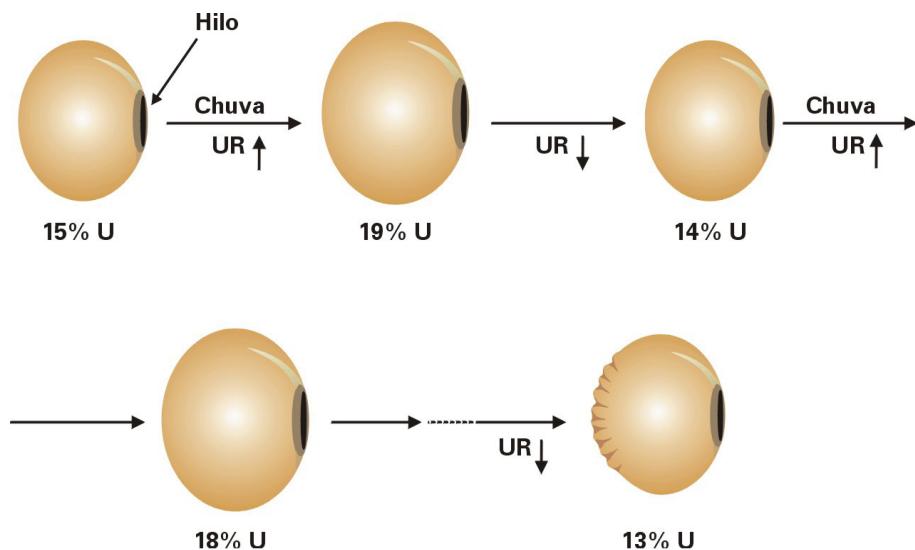


Figura 21. Processo de alterações físicas, devido à oscilação do grau de umidade da semente de soja, em função das condições de umidade ambiental, que resultam no aparecimento de rugas na semente, características da deterioração por umidade.

Fonte: França-Neto et al. (2016).

Fotos: José de Barros França-Neto



Figura 22. Sementes de soja com sintomas típicos de deterioração por umidade; A. sementes secas com enrugamento devido a esse tipo de dano; B. sementes de soja com rupturas (rasgos) no tegumento.

Fotos: José de Barros França-Neto

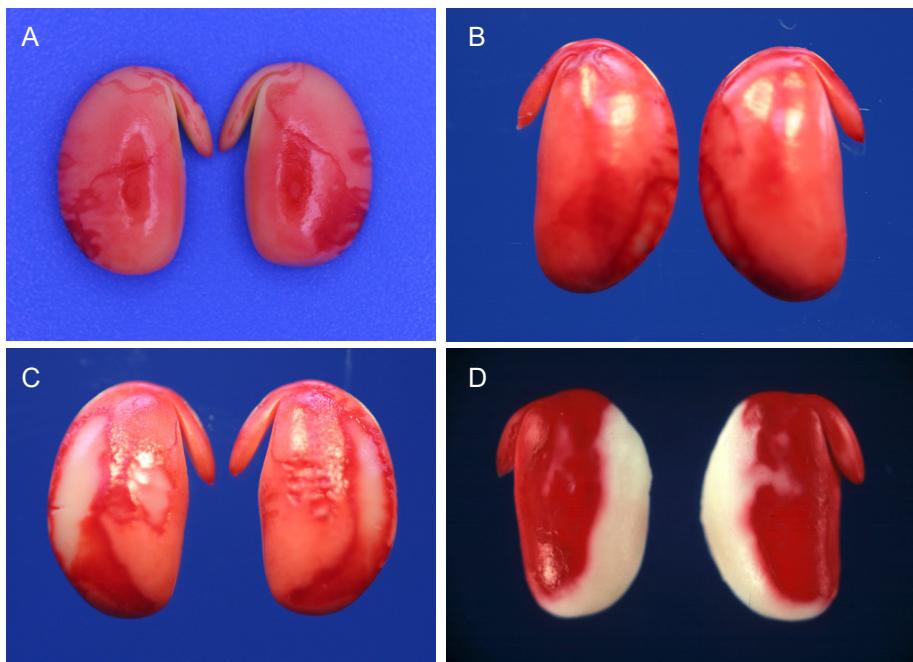


Figura 23. Sementes de soja com sintomas de deterioração por umidade, após a coloração com a solução de tetrazólio; notar a simetria dos danos em ambos os cotilédones. A. e B. lesões recentes; C. e D. lesões mais severas, após evolução na armazenagem.

Fotos: José de Barros França-Neto

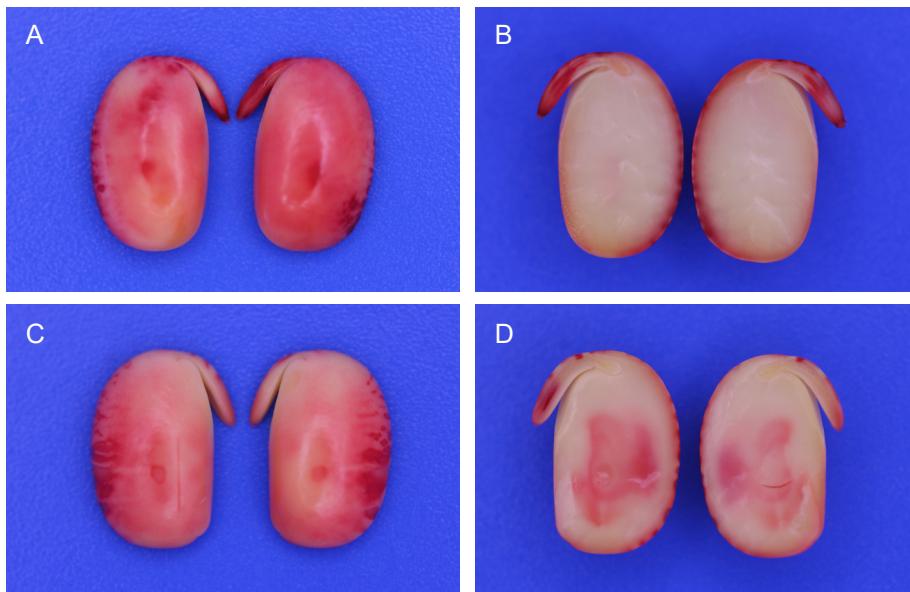


Figura 24. Sementes de soja com sintomas de deterioração por umidade, após a coloração com a solução de tetrazólio; notar a simetria dos danos em ambos os cotilédones. A. face externa de semente com danos por umidade nos cotilédones e eixo embrionário; B. face interna da mesma semente que em “A”, mostrando dano por umidade nos cotilédones e dano severo no eixo embrionário; C. face externa de semente com danos por umidade aparentemente superficiais nos cotilédones e eixo embrionário; D. face interna da mesma semente, mostrando dano severo na parte interna do eixo embrionário. Fotos: José de Barros França-Neto.

Os danos por umidade nos eixos embrionários (Figuras 24B e 24D) são progressivos, da parte externa para a interna dos tecidos. **Esses danos muitas vezes são confundidos com danos mecânicos latentes, quando as lesões são observadas apenas internamente às sementes; porém a característica de progressão do dano ajuda na correta identificação do tipo do dano.** Ressalta-se a importância de sempre avaliar com atenção ambas as faces das sementes.

Assim como o dano mecânico latente, as lesões de deterioração por umidade também evoluem durante o armazenamento. Entretanto, a deterioração por umidade evolui numa taxa mais acentuada em relação a qualquer outro tipo de dano (Moreano et al., 2011). Tal intensificação depende das condições de temperatura e de umidade relativa do ar durante o armazenamento: condi-

ções quentes e úmidas resultarão em severa deterioração. Como consequência dos processos de evolução desses danos na armazenagem, poderão ocorrer severas reduções de germinação e de vigor, principalmente nos meses finais do armazenamento.

Os sinais de deterioração por umidade podem caracterizar tanto os problemas de intempéries em pré-colheita, quanto problemas de armazenagem inadequada. Quando são observados índices elevados desse dano, para se diagnosticar com precisão se o problema foi originado no campo ou durante o armazenamento, realiza-se um teste de patologia de sementes, por exemplo o teste de papel-de-filtro (“blotter test”). A constatação de altos índices de fungos de armazenagem, como o *Aspergillus flavus* ou o *Penicillium* spp., caracteriza problemas de armazenamento; infecção elevada por fungos de campo, como *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., ou *Cercospora kikuchii*, caracteriza a deterioração no campo.

Danos provocados por percevejos podem afetar seriamente a qualidade fisiológica da semente de soja. Dentre as diversas espécies desse inseto, o percevejo verde *Nezara viridula* (L.) tem ocorrência generalizada na maioria das regiões produtoras de soja (Turnipseed; Kogan, 1976). Outras espécies, como *Piezodorus guildini* (Westwood), *Dichelops melacanthus* (Dallas) e *Euschistus heros* (Fabricius), podem também causar danos sérios às sementes. Ao se alimentar das sementes de soja, o percevejo as inocula com a levadura *Nematospora coryli* Peglion (Sinclair, 1982), que irá, então, colonizar os tecidos das sementes, deteriorando-os, o que resulta em severas reduções de vigor e de viabilidade (Bowling, 1980; Villas Bôas et al., 1982; Bueno et al., 2015). Essa infecção, associada com a ação de enzimas salivares do inseto, resulta em lesões circulares características, muitas vezes enrugadas e profundas (Figura 25).

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 25. Sementes de soja com danos causados por picada de percevejo, com danos típicos mostrando manchas de *Nematospora coryli*. Foto: José de Barros França-Neto.

Os tecidos lesionados são mortos e flácidos, mostrando no teste de tetrazólio a lesão circular típica de dano por percevejo, com tecido morto no centro, de coloração branca leitosa, circundado por um anel vermelho mais escuro (tecido em deterioração) que separa, na maioria dos casos, os tecidos mortos dos vigorosos. As lesões também podem ser também esverdeadas, amareladas ou acinzentadas (Figuras 26 e 27). A extensão das lesões depende do grau de umidade das sementes no momento da ocorrência da picada.

Lesões múltiplas podem ocorrer numa única semente e caso haja sobreposição de ambas, o sintoma circular típico não será distingível. Com frequência, uma pequena perfuração causada pelo inseto pode ser observada no centro das lesões circulares. Puncturas profundas também podem ocorrer, resultando na inoculação dos tecidos centrais das sementes pela levedura *N. coryli*. Tais lesões nem sempre podem ser observadas na superfície externa das sementes.

Foto: José de Barros França-Neto

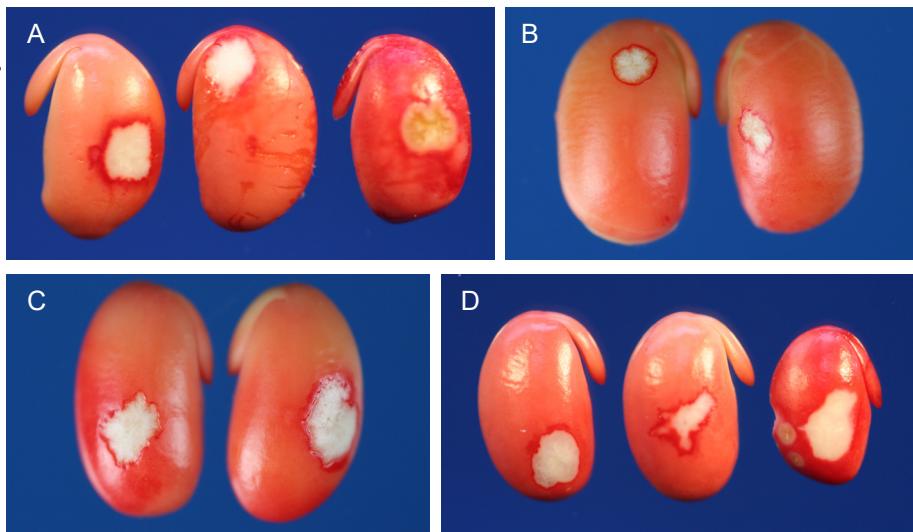


Figura 26. Sementes de soja com lesões típicas de danos causados por percevejos após coloração com a solução de tetrazólio. A. e B. lesões circulares, típicas desse dano; C. duas picadas na mesma semente, uma em cada cotilédone; D. diferentes tipos de lesões.

Foto: José de Barros França-Neto

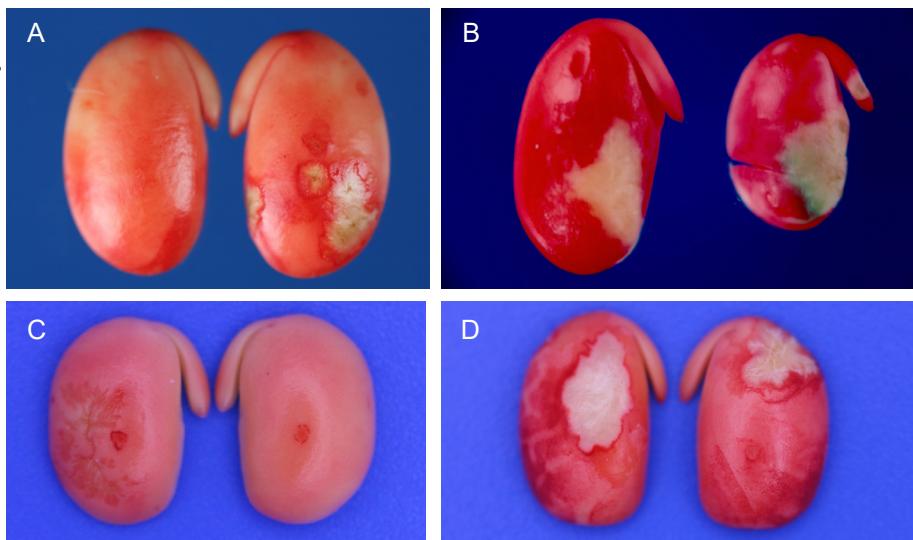


Figura 27. Sementes de soja com lesões típicas de danos causados por percevejos após coloração com a solução de tetrazólio. A e B. lesões amareladas ou esverdeadas; C. lesão recente de percevejo; D. múltiplas picadas de percevejo na mesma semente.

Danos por seca e altas temperaturas (Figura 28) podem ser observados em sementes de algumas cultivares de soja, quando altas temperaturas (acima de 30 °C), associadas com períodos de baixa disponibilidade hídrica (seca), ocorrem durante a fase de enchimento de grãos (França-Neto et al., 1993). Os sintomas são variáveis: a lesão típica pode ser caracterizada pela presença de uma covinha nos cotilédones até o completo enrugamento das sementes. Algumas sementes produzidas sob tais condições de estresse podem tornar-se impermeáveis à água. Sementes com sintomas superficiais desse tipo de dano (covinhas), após a coloração, podem apresentar lesões vermelho escuras ou brancas que podem ser confundidas com deterioração por umidade. A constatação dessas covinhas nas sementes secas pelos analistas evitará que interpretações errôneas desse tipo venham a ocorrer. Sementes enrugadas, após a coloração, podem ser deformadas e apresentam manchas vermelho-escuro e esbranquiçadas espalhadas sobre os cotilédones, com maior concentração na região próxima ao eixo embrionário. Os tecidos mortos são flácidos e friáveis. Sementes severamente enrugadas normalmente não germinam em função da desintegração dos tecidos do eixo embrionário e das regiões superiores dos cotilédones.

Fotos: José de Barros França-Neto



Figura 28. A. sementes de soja com sintomas de enrugamento, causado por estresses de altas temperaturas e seca durante a fase de enchimento de grãos; B. sementes com esses sintomas, após coloração com a solução de tetrazólio; C. idem, associadas com deterioração por umidade.

Danos por secagem excessiva são consequência da secagem das sementes de soja até atingir graus de umidade inferiores a 10,0%. São caracterizados pela constatação de elevados índices de sementes com trincas transversais nos cotilédones, sempre na mesma posição (Figura 29). Quando a semente é secada excessivamente, está sujeita a quebrar preferencialmente nessa posição, quando exposta a um impacto mecânico.

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 29. Sementes de soja com danos característicos de excesso de secagem, após coloração pela solução do sal de tetrazólio.

Sementes esverdeadas de soja (Figuras 30 e 31) são originadas quando ocorre morte prematura das plantas, devido a um estresse abiótico, como a seca, ou biótico, como a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi*) mal controlada ou uma enfermidade de raiz, como podridão de macrofomina ou fusariose. Nessa situação, as sementes sofrem processo de maturação forçada e, quando expostas a temperaturas elevadas ($\geq 30^{\circ}\text{C}$), as enzimas responsáveis pela degradação da clorofila (magnésio quelatase e clorofilase) não são ativadas, resultando na formação de sementes normalmente menores e esverdeadas (França-Neto et al., 2012). Sementes esverdeadas apresentam sérios problemas de qualidade fisiológica, pois seu vigor e germinação são afetados negativamente.

Fotos: Danilo Estevão



Figura 30. A. Sementes esverdeadas de soja, resultantes da ocorrência de seca e altas temperaturas durante a fase final de enchimento de grão; B. sementes de soja esverdeadas e amarelas, com ilustração da coloração das mesmas com o sal de tetrazólio.

Danos por geada em sementes de soja, conforme descritos por Moore (1973), são mais comuns em regiões de clima temperado. A expressão desse tipo de dano depende do estádio de desenvolvimento das sementes, da temperatura e do período de exposição à baixa temperatura. Sementes imaturas geralmente morrem e permanecem verdes (Figura 31) após a exposição a geadas. Por outro lado, sementes secas e já maduras resistem bem a esse tipo de estresse. Os tecidos danificados são identificados no teste de tetrazólio pela coloração de eixos embrionários, apresentando vermelho carmim mais intenso, e pela presença de um precipitado vermelho que se acumula nos tegumentos e na solução de tetrazólio. Tecidos danificados por geadas podem apresentar uma coloração vermelha com tons esverdeados ou marrons (Osorio, 1987).

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 31. Semente de soja com sintomas de danos causados por geada, após coloração pela solução do sal de tetrazólio.

Mais de um tipo de dano pode ocorrer em uma única semente: pode-se ter a combinação de danos causados por deterioração por umidade com dano mecânico, de deterioração por umidade com dano por percevejos, de dano mecânico com dano por percevejo e de deterioração por umidade com dano mecânico e dano por percevejo, numa mesma semente. (Figura 32).

A caracterização dos fatores que afetam a qualidade da semente de soja pode parecer complexa no início. Porém, com um bom treinamento e experiência, o analista de sementes poderá reconhecer e diferenciar com facilidade de tais sintomas.

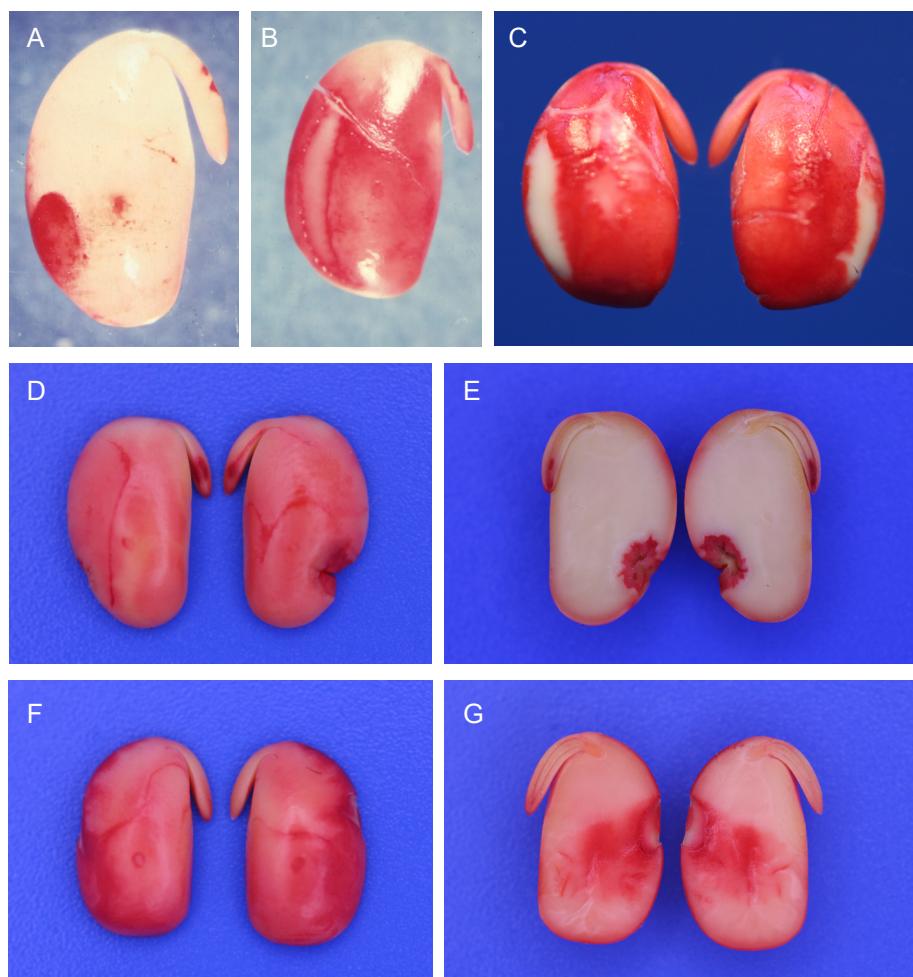


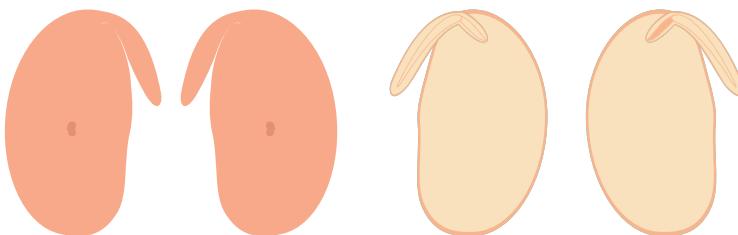
Figura 32. Sementes de soja com lesões de diferentes tipos de danos na mesma semente. A. dano por umidade com dano mecânico latente; B. dano por umidade com dano mecânico imediato; C. dano mecânico imediato com dano por umidade; D. dano por percevejo nos cotilédones, deterioração por umidade nos cotilédones e dano mecânico latente no eixo embrionário; E. face interna da mesma semente com os três tipos de dano; F. dano por umidade e dano mecânico imediato, ambos nos cotilédones; G. face interna da semente anterior com os dois tipos de dano.

Identificação das classes de vigor e de viabilidade

O teste de tetrazólio baseia-se na análise da condição de cada semente individualmente. Cada semente é classificada como viável ou não viável e os tipos de danos são anotados. Moore e Smith (1956) e Moore (1961, 1962b, 1967a, 1967b) definiram um sistema de classificação para sementes de soja, onde cada semente era qualificada nas classes de 1 a 5, caso viáveis, e de 6 a 8, se não viáveis. A presença, a localização e o tipo do dano, além das condições físicas das estruturas embrionárias, são utilizadas nesse sistema de classificação. Tal metodologia foi modificada e descrita em detalhes para sementes de soja por França-Neto et al. (1985, 1988, 1998d, 1999) e por França-Neto e Krzyzanowski (2018, 2020a).

A seguir, é apresentada uma classificação de vigor em sementes de soja. Os aspectos apresentados nas ilustrações são, na experiência dos autores, considerados como os mais comuns. Cada diagrama representa uma semente seccionada longitudinalmente. A superfície externa da semente é ilustrada à esquerda e a interna à direita.

Classe 1: viável; mais alto vigor

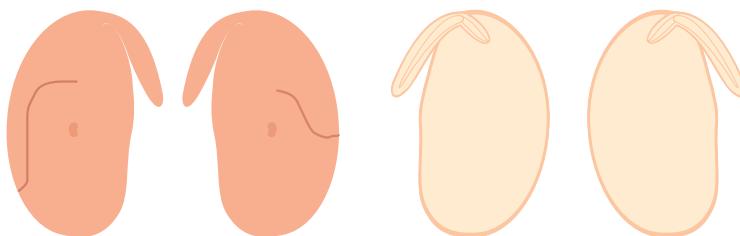


- 1a.** As sementes são caracterizadas pela coloração uniforme e superficial, devido à penetração lenta da solução de tetrazólio; a parte interna (entre os cotilédones) não apresenta coloração, salvo nos bordos; todos os tecidos com aspectos normal e firme (Figuras 12, 16 e 33).

Fotos: José de Barros França-Neto



Figura 33. Semente de soja de alto vigor (Classe 1). A. face externa; B. face interna.



1b. As sementes possuem as mesmas características ilustradas em **1a**, exceto pela ocorrência de uma ou duas estrias coloridas mais intensamente por cotilédone (Figura 34). As estrias são superficiais (um a dois décimos de milímetro de profundidade) e são o resultado dos primeiros estágios de penetração de água durante o processo de deterioração por umidade.

Foto: José de Barros França-Neto

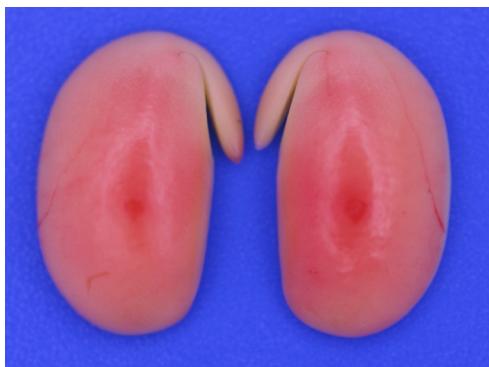
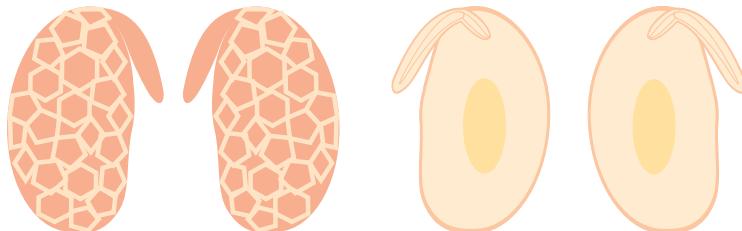


Figura 34. Semente de soja de alto vigor (Classe 1) com a presença de estrias que caracterizam o início de ocorrência do processo de deterioração por umidade.



1c. Semente cuja coloração tem o aspecto de mosaico devido a um processo lento de embebição (Figura 35); os tecidos se apresentam firmes e na face interna dos cotilédones, podendo aparecer uma cavidade central de coloração amarelada, indicando absorção insuficiente de água. Pode ocorrer em sementes semi-permeáveis. Tais sintomas podem também estar relacionados à embebição inadequada durante o pré-condicionamento ou ao uso de sementes com grau de umidade muito baixo.

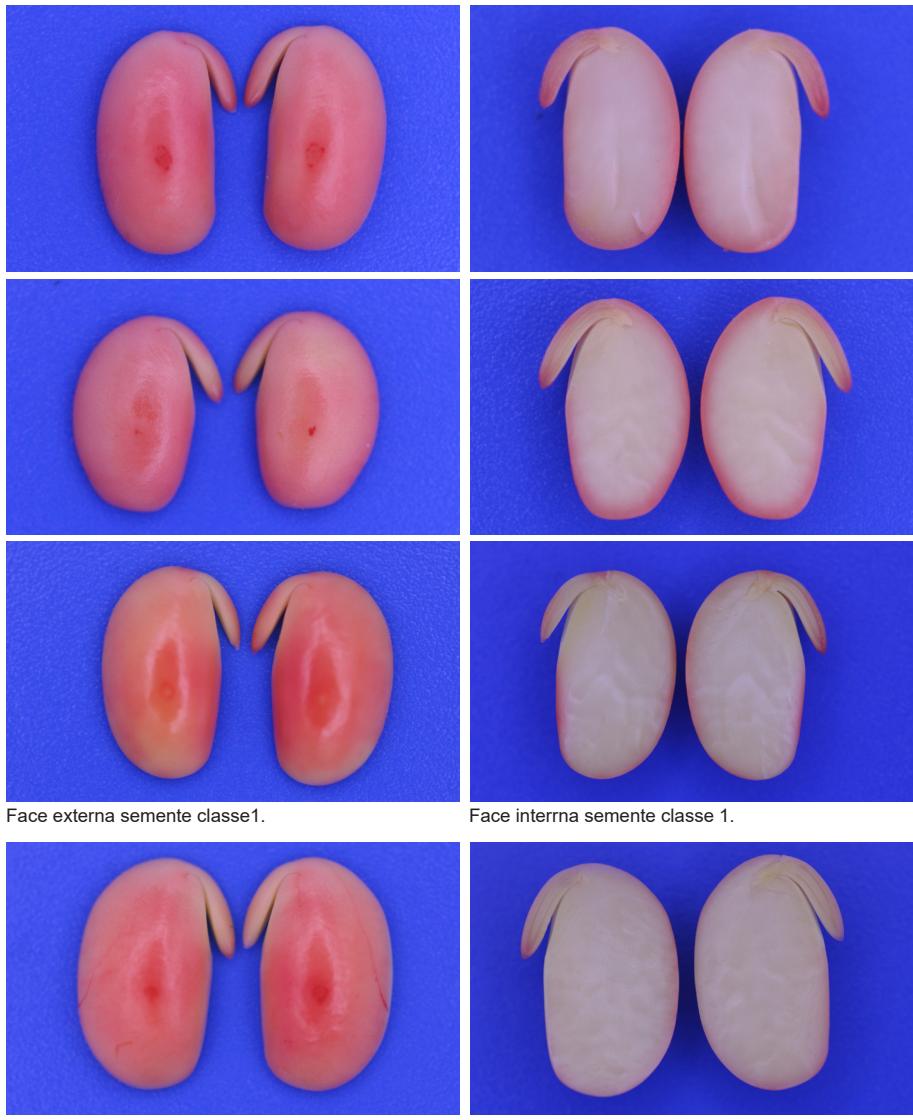
Foto: José de Barros França-Neto



Figura 35. Semente de soja cuja coloração tem o aspecto de mosaico, após coloração pelo tetrazólio, devido à embebição inadequada durante o pré-condicionamento.

Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio classificadas na **Classe 1** constam na Figura 36.

Fotos: José de Barros França-Neto



Face externa semente classe 1.

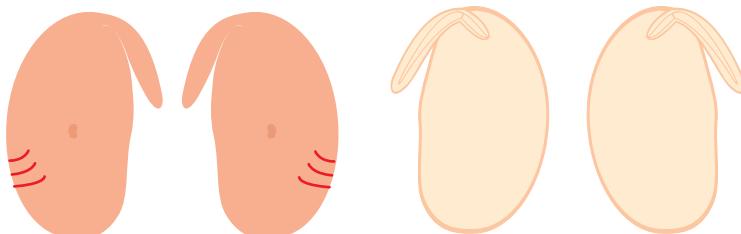
Face interna semente classe 1.

Face externa semente classe 1, com estria de início de dano por umidade

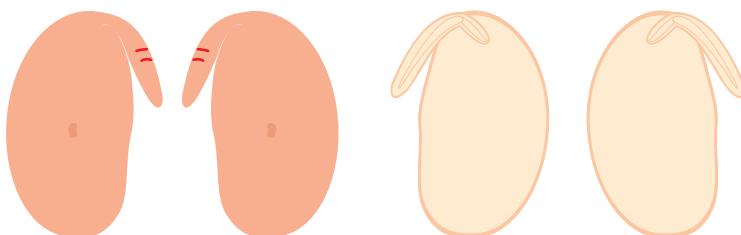
Face interna semente classe 1, sem sinais desse dano.

Figura 36. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 1. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

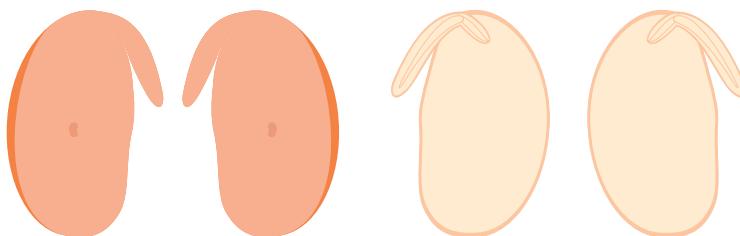
Classe 2: viável; alto vigor



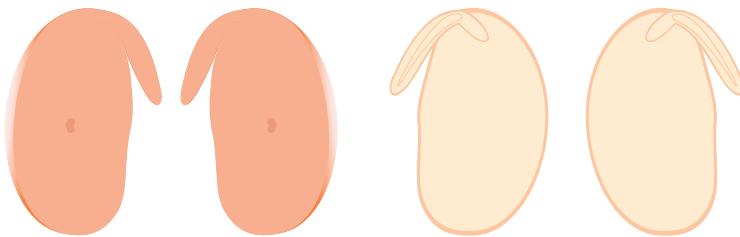
2a. Pequenas estrias localizadas na superfície externa dos cotilédones na região oposta ao eixo embrionário, originadas por pressão do tegumento sobre os cotilédones, causada por sucessivas hidratações (expansão) e desidratações (contração) de ambos, em proporções diferentes. Isto resulta em enrugamento do tegumento e lesão nos cotilédones, onde a respiração e a atividade enzimática são mais intensas, ocasionando a intensificação da cor vermelho carmim forte, caracterizando o dano por umidade. As estrias não devem ter profundidade superior a 0,5 mm; a parte interna dos cotilédones apresenta-se como em **1a**. Danos aos cotilédones são geralmente simétricos.



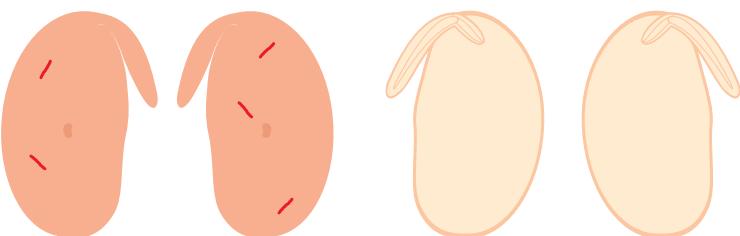
2b. Pequenas estrias devidas ao mesmo problema descrito em **2a.**, mas localizadas sobre o eixo embrionário. Tais lesões são superficiais e não são observadas nos tecidos internos do eixo embrionário, após seccioná-los, conforme ilustrado em **1a**. Danos nos eixos embrionários são geralmente simétricos.



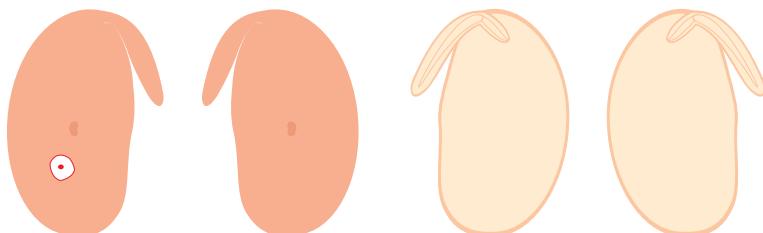
2c. Área de coloração mais intensa, não maior do que da ilustração, provavelmente devido à junção de pequenas estrias (**2a**), formando uma faixa contínua. A parte interna dos cotilédones apresenta-se como em **1a**. Danos nos cotilédones são geralmente simétricos.



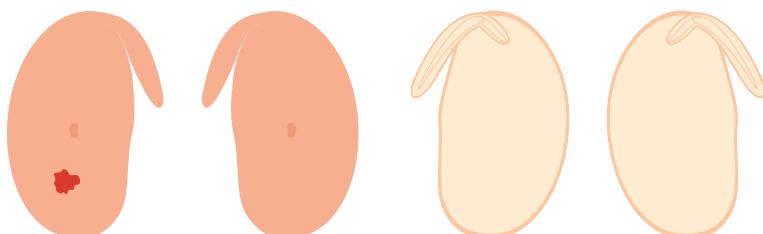
2d. Área de tecido sem coloração (branco leitoso) portanto, morto, não maior do que a da ilustração. A parte interna dos cotilédones permanece como em **1a**. Todas as lesões ilustradas de **2a** e **2d**, em geral são simétricas nos dois cotilédones, sendo esta uma característica utilizada para diferenciar dano devido ao enrugamento do tegumento (deterioração por umidade) de outros tipos de dano.



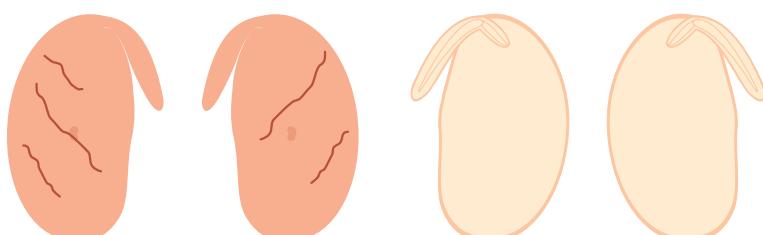
2e. Pequenos danos mecânicos sobre a superfície externa dos cotilédones. As lesões não devem exceder a profundidade máxima de 0,5 mm. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se como em **1a**.



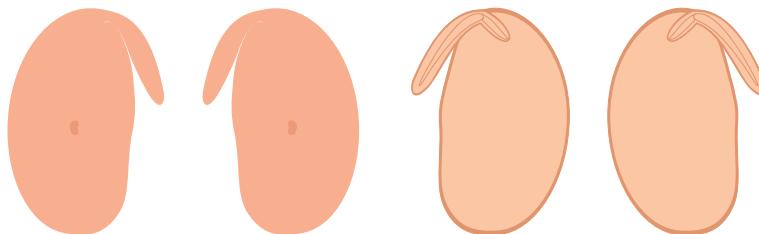
2f. Dano(s) devido(s) à picada de percevejo, com uma área total não maior à mostrada nesta ilustração e profundidade máxima de 0,5 mm. A lesão deve ser afastada da região vascular, isto é, abaixo de uma linha imaginária, passando transversalmente pela metade do cotilédone. A região afetada apresenta-se mais ou menos necrosada (tecido morto, coloração esbranquiçada, de aspecto pulverulento, às vezes com o sinal da punctura bem visível, outras vezes não). Superfície interna dos cotilédones como em **1a**.



2g. Dano idêntico ao anterior, mas com a região da(s) punctura(s) sem necrose. O aspecto é enrugado, de coloração vermelho carmim forte, sem partes esbranquiçadas. Este tipo de lesão é característico de picada que provavelmente ocorre em um estádio mais avançado da maturação, com a semente em fase adiantada de desidratação.



2h. Mais do que duas estrias por cotilédone (não profunda, como em **1b**). Superfície interna dos cotilédones como em **1a**.



2i. Superfície externa dos cotilédones apresenta coloração normal como em **1a**. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se também com coloração uniforme devido à penetração da solução de tetrazólio através de ruptura no tegumento.

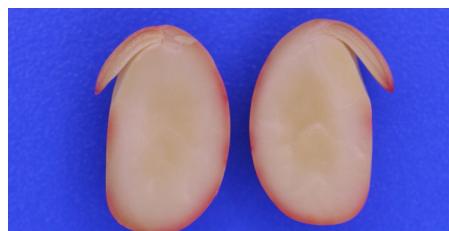
Nota: as sementes classificadas nas Classes 1 e 2 não apresentam qualquer tipo de dano nas superfícies internas dos cotilédones.

Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio classificadas na **Classe 2** constam na Figura 37.

Fotos: José de Barros França-Neto



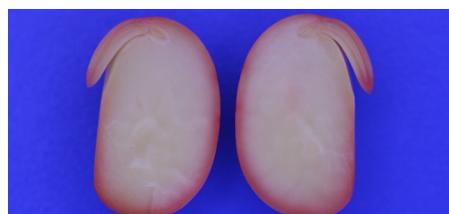
Face externa semente classe 2, com dano por umidade.



Face interna semente classe 2, sem sinais desse dano.



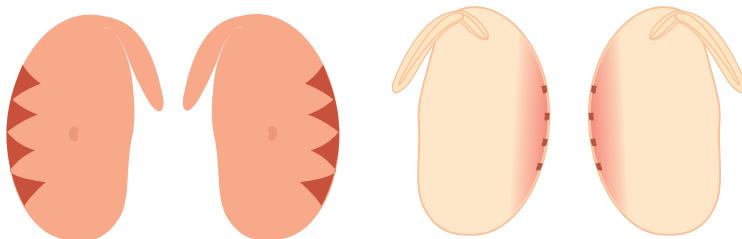
Face externa semente classe 2 , com dano por umidade na lateral e leve dano mecânico latente na parte central do cotilédon.



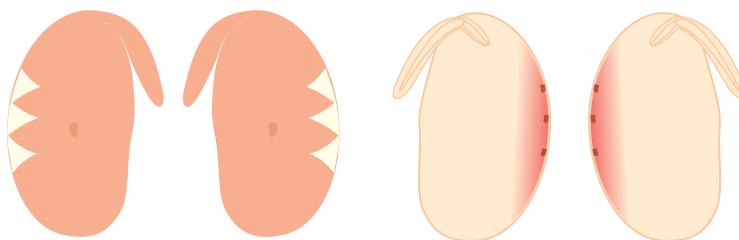
Face interna semente classe 2, sem sinais desse dano.

Figura 37. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 2. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

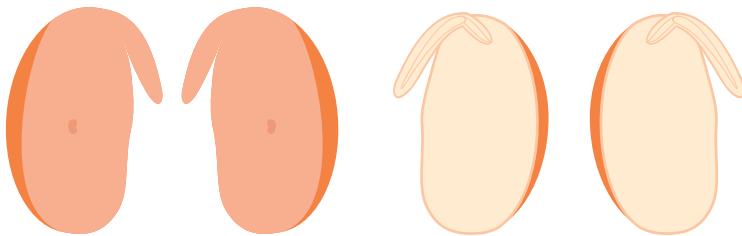
Classe 3: viável; vigor médio



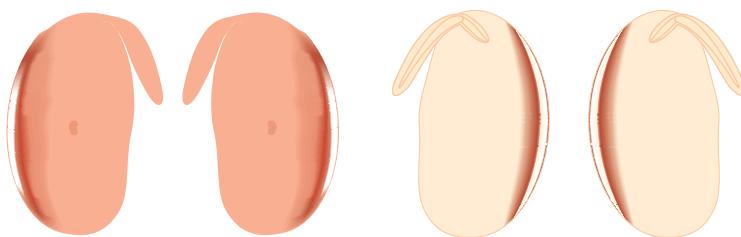
3a. Estrias de coloração vermelho carmim forte localizadas nos cotilédones, na região oposta ao eixo embrionário, com área total não maior que a mostrada na ilustração. A superfície interna dos cotilédones pode apresentar pequenas áreas mais escuras, correspondentes às estrias externas e com uma espessura máxima de 0,5 mm.



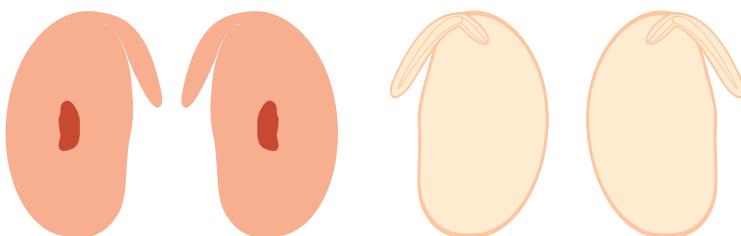
3b. Dano quase idêntico ao anterior, mas com as estrias podendo apresentar algumas áreas de coloração branco-leitosa, indicando tecidos mortos. Superfície interna dos cotilédones como em 3a.



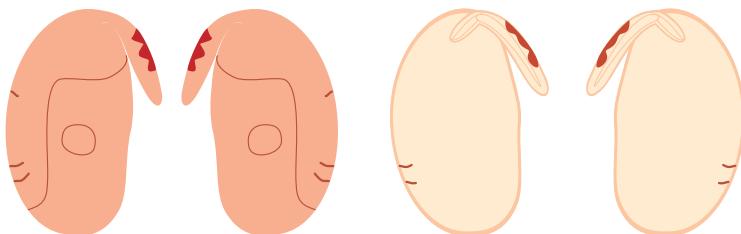
3c. Áreas de coloração mais intensa, não maiores que as mostradas na ilustração, provavelmente devido à junção de estrias formando uma faixa contínua. A superfície interna dos cotilédones pode apresentar, correspondentemente, uma faixa mais escura com espessura máxima de 0,5 mm.



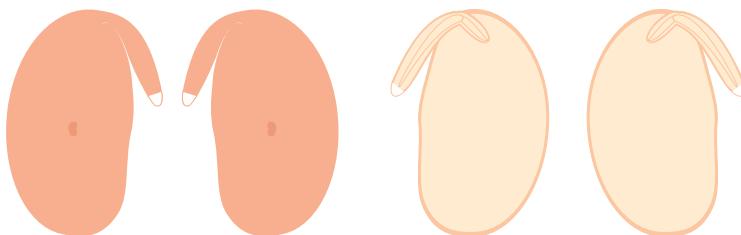
3d. Dano quase idêntico ao anterior, mas a faixa pode ser formada por tecido de coloração branco-leitosa (tecido morto), ocupando área não maior do que a da ilustração. Superfície interna com uma faixa de tecido morto, com espessura máxima de 0,5 mm.



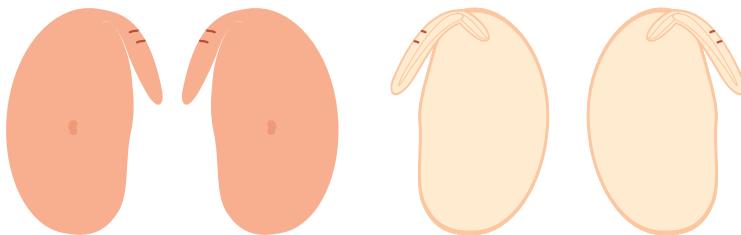
3e. Área de coloração vermelho intenso na superfície externa de um ou ambos os cotilédones. Danos característicos de abrasão, ocasionando dano mecânico latente. O dano é superficial e com profundidade máxima de 0,5 mm. Superfície interna permanece como descrita em **1a**.



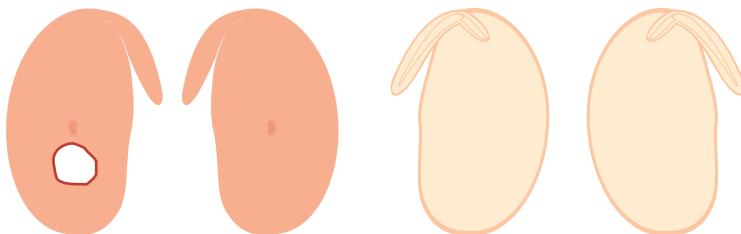
3f. Estrias localizadas na superfície do eixo embrionário, devidas à deterioração por umidade, não se aprofundando além do córtex, ou seja, sem afetar o cilindro central.



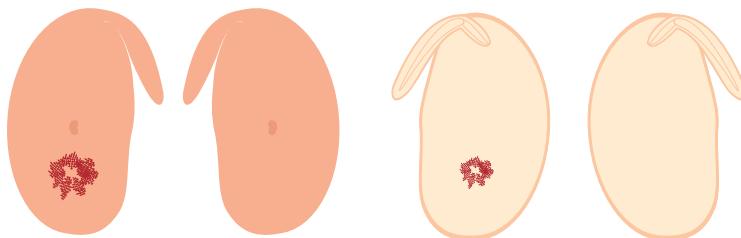
3g. Extremidade da radícula mostrando coloração branco-leitosa, indicando tecido morto, sem, no entanto, afetar o cilindro central.



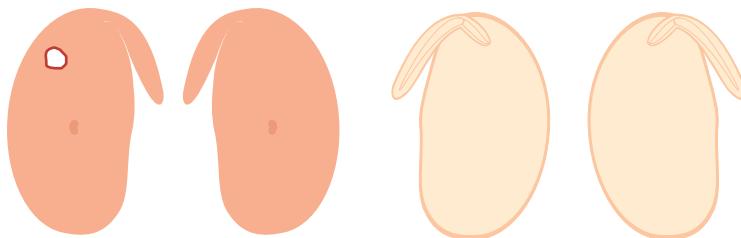
3h. Pequenas fraturas localizadas no eixo embrionário, não afetando, porém, o cilindro central.



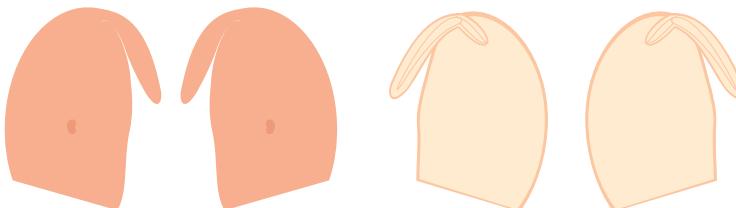
3i. Picada(s) de percevejo, com a parte central necrosada (tecido morto, ou seja, coloração branco-leitosa, com aspecto pulverulento) ou não. Esse dano é maior do que o ilustrado em **2f**, com área total não maior do que a mostrada na ilustração. Deve estar localizado na região abaixo de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone (região não vascular). O dano é superficial e não deve ter profundidade superior a 0,5 mm. Superfície interna dos cotilédones como descrita em **1a**.



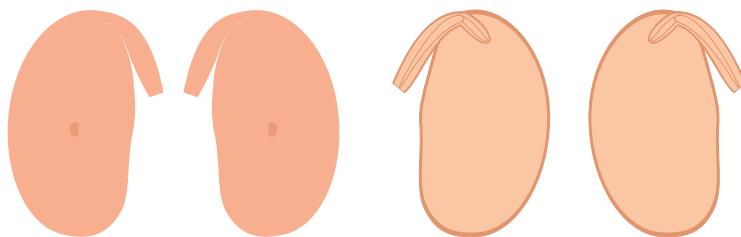
3j. Picada(s) de percevejo, com área total não maior do que a mostrada nesta ilustração, sem áreas necrosadas (mortas), localizada(s) abaixo de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone. Picada(s) afetando a superfície interna de um dos cotilédones que se mostra enrugada com pequenas pontuações vermelhas (áreas contínuas de coloração vermelho carmim forte ou áreas necrosadas). Um dos cotilédones com coloração superficial como em **2i**.



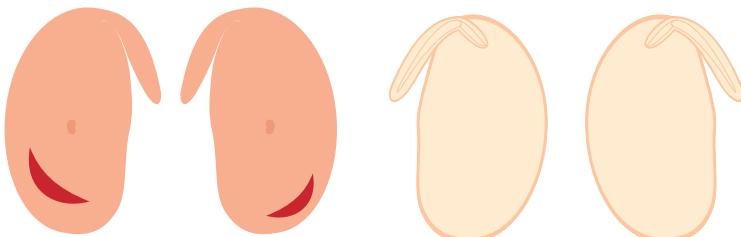
3k. Picada(s) de percevejo, com área total não maior do que a representada nesta ilustração, localizada na região vascular do cotilédone. A região lesionada não deve ser superior a 0,5 mm de profundidade e localizada de tal maneira a não afetar a região a região vascular.



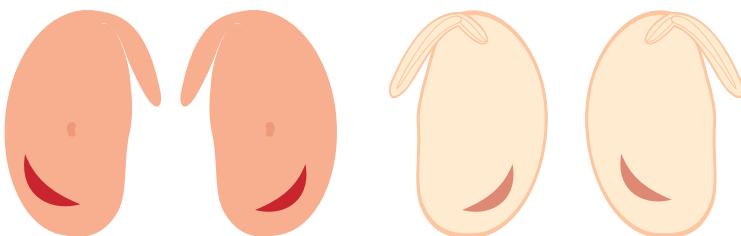
3l. Fratura dos cotilédones na região oposta ao ponto de ligação com o eixo embrionário numa extensão máxima como a mostrada nesta ilustração. A superfície interna dos cotilédones pode se apresentar como em **1a** ou **2i**.



3m. Extremidade da radícula fraturada, porém, sem afetar o cilindro central. A superfície interna dos cotilédones pode se apresentar como em **1a** ou **2i**.



3n. Dano(s) de origem mecânica com ou sem tecido morto, com profundidade máxima de 0,5 mm, sem afetar a região vascular. A superfície interna dos cotilédones como em **1a** ou **2a**.



3o. Dano(s) de origem mecânica localizado(s) abaixo da região vascular, aferando a superfície interna dos cotilédones, como mostrado nesta ilustração.

Subclasse 3R: existe a opção de registrar uma subclasse adicional, conforme descrito por Zorato et al. (2001): identificada quando observada a presença de danos mais intensos nos cotilédones, que abrangem mais tecidos de reserva e/ou danos localizados no eixo embrionário (plúmula, hipocôtilo e radícula), situação essa que pode oferecer mais risco à qualidade fisiológica das sementes; pode-se acrescentar uma “restrição” (R), estabelecendo-se a Subclasse 3R, que potencialmente, ao longo do período de armazenamento, evoluirá para a Classe 4. Essa Subclasse pode ser incluída na ficha de ano-

tação ou nos programas de computadores e de aplicativos utilizados para a anotação dos resultados.

Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio classificadas na **Classe 3** constam nas Figura 38 e 39.

Fotos: José de Barros França-Neto

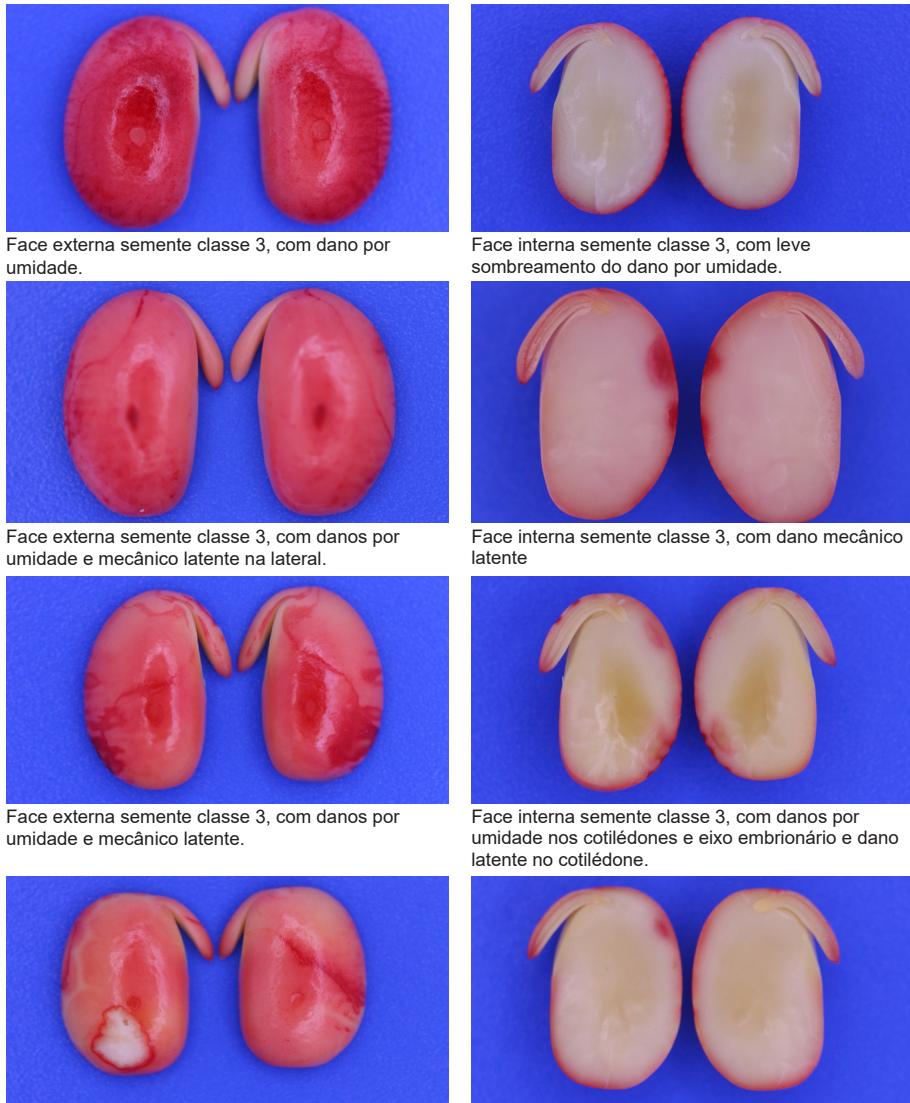


Figura 38. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 3. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Fotos: José de Barros França-Neto

Fotos: José de Barros França-Neto



Face externa semente classe 3, com danos mecânicos latentes e por umidade.



Face interna semente classe 3, com dano mecânico latente e leve sombreamento de dano por umidade.



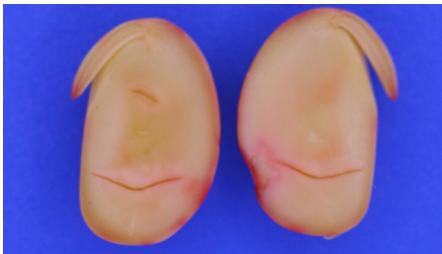
Face externa semente classe 3, com dano por umidade.



Face interna semente classe 3, com dano mecânico latente



Face externa semente classe 3, com danos por percevejo e umidade.



Face interna semente classe 3, com dano por percevejo e dano por imersão.

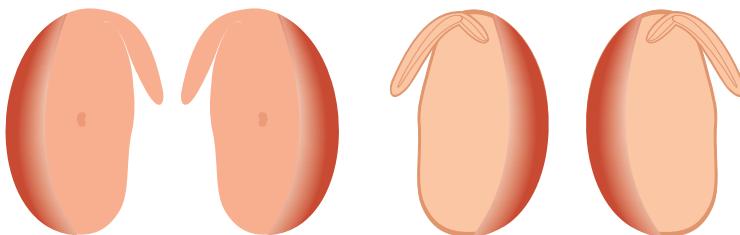


Face externa semente classe 3, com estria de dano por umidade e dano por percevejo.

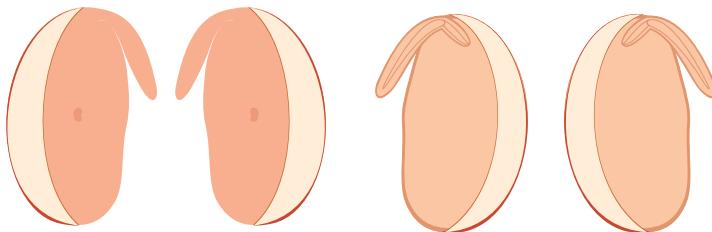


Face interna semente classe 3, com dano por percevejo e leve sombreamento de dano por umidade.

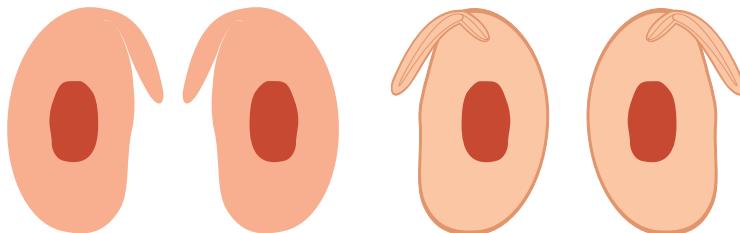
Figura 39. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 3. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Classe 4: viável; vigor baixo

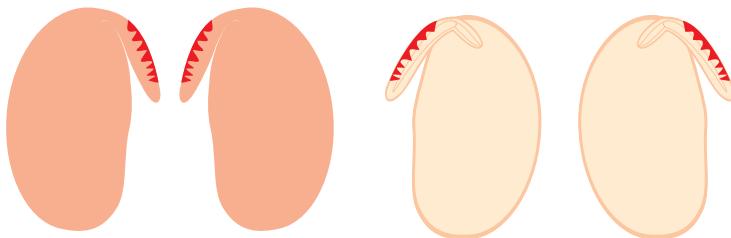
4a. Área de coloração vermelho carmim forte em ambos os cotilédones, cobrindo menos do que a metade dos mesmos. A superfície interna também apresenta área de coloração vermelho carmim forte. A região vascular, porém, não deve estar afetada.



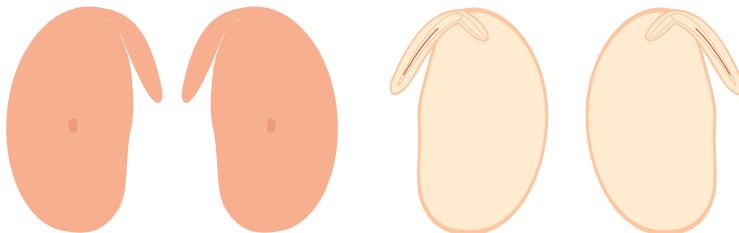
4b. Dano quase idêntico ao anterior, apresentando, porém, tecidos mortos (coloração branco-leitosa).



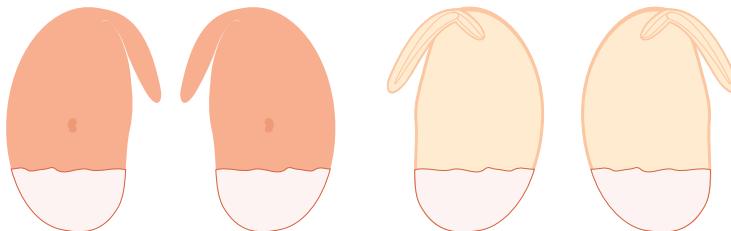
4c. Dano mecânico latente, caracterizado por área de coloração vermelho carmim forte no centro dos cotilédones (externa e internamente), afetando parte da região vascular. No entanto, próximo ao ponto de ligação com o eixo embrionário, os vasos devem estar funcionais, permitindo o transporte das reservas dos cotilédones para o eixo embrionário.



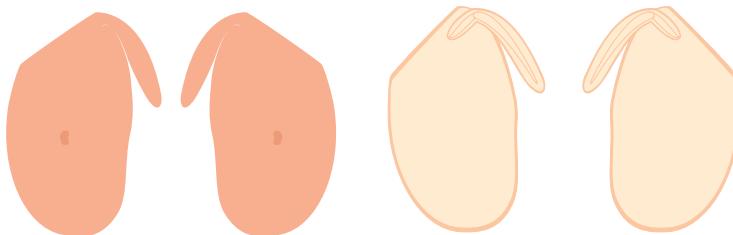
4d. Estrias oriundas de deterioração por umidade localizadas sobre o eixo embrionário, afetando inclusive o cilindro central, porém, numa extensão menor do que a metade de sua espessura.



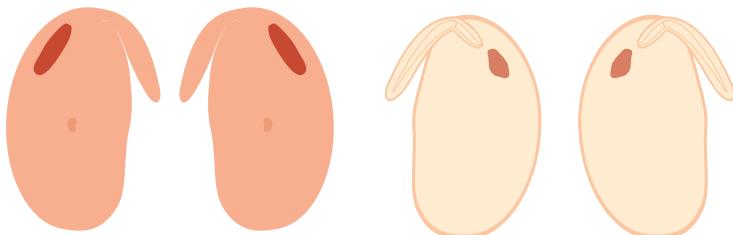
4e. Área de coloração vermelho carmim forte no eixo embrionário, mas com as estruturas do cilindro central e do córtex ainda perfeitamente definidas, devido a dano mecânico latente.



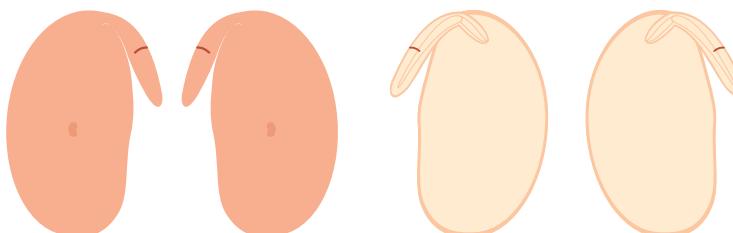
4f. Área de tecido morto numa extensão menor do que a metade da área total dos cotilédones.



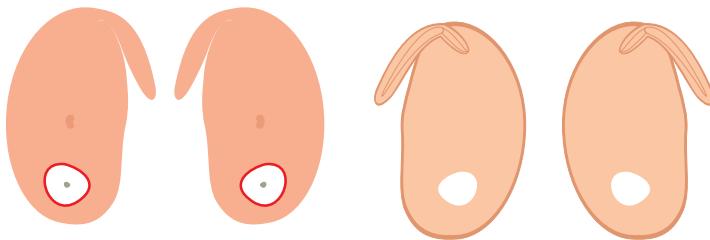
4g. Fratura de um ou ambos os cotilédones na região próxima ao ponto de ligação, mas deixando a região vascular em grande parte intacta.



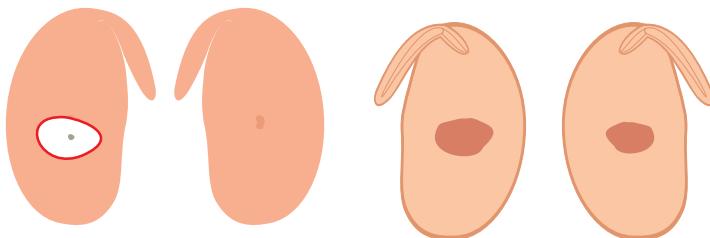
4h. Dano(s) de origem mecânica na região vascular dos cotilédones afetando a face interna e parte da região vascular. Os vasos, porém, devem permanecer funcionais próximos ao ponto de ligação dos cotilédones com o eixo embrionário.



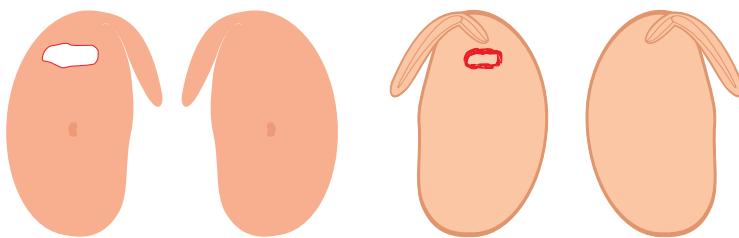
4i. Fraturas sobre o eixo embrionário, devido à ocorrência de dano mecânico imediato, afetando o córtex e o cilindro central, porém, numa extensão menor do que a metade de sua espessura.



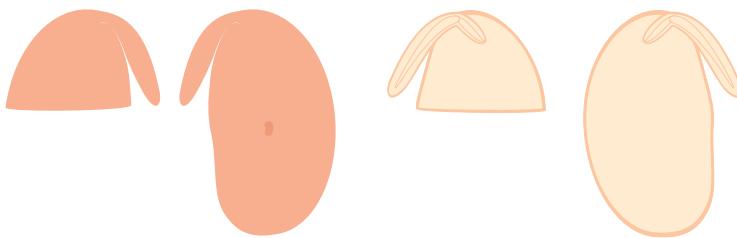
4j. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo com área necrosada (tecido morto), atingindo a parte interna dos cotilédones, mas localizado(s) abaixo da região vascular. As lesões são profundas e podem ser detectadas na parte interna dos cotilédones.



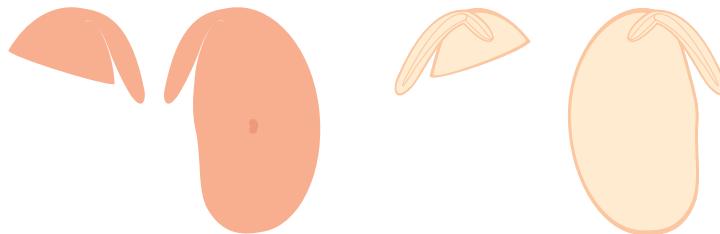
4k. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo localizado(s) em apenas um cotilédone, tornando-o praticamente não funcional e afetando apenas levemente a face interna do segundo cotilédone na face interna, e o qual se mantém quase integral.



4l. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo localizado(s) em um dos cotilédones, bloqueando completamente a região vascular, tornando-o não funcional. A plântula dependerá, para o seu estabelecimento, das reservas de apenas um cotilédone.



4m. Fratura de mais da metade de um dos cotilédones.



4n. Fratura de um dos cotilédones, deixando, porém, intacto o eixo embrionário (inclusive a plúmula).



4o. Fratura de ambos os cotilédones, porém, numa extensão inferior à metade dos mesmos.

Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio classificadas na Classe 4 constam nas Figuras 40 e 41.



Face externa semente classe 4, com danos por umidade nos cotilédones e mecanico latente na radícula.



Face interna semente classe 4, com sombreamento de dano por umidade e dano mecanico latente na radícula.



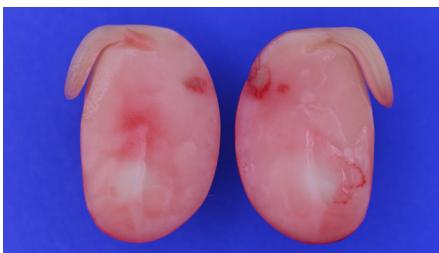
Face externa semente classe 4, com dano por umidade e dano por percevejo na região vascular.



Face interna semente classe 4, com leve sombreamento de dano por umidade.



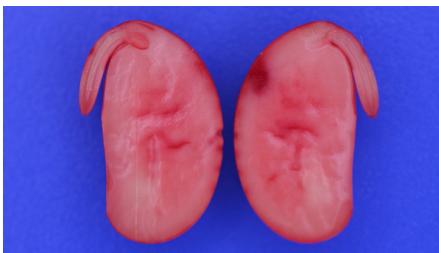
Face externa semente classe 4, com danos por percevejo.



Face interna semente classe 4, com danos por percevejo.



Face externa semente classe 4, com estria de dano por umidade e dano por percevejo.



Face interna semente classe 4, com danos por umidade e mecanico latente.

Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 40. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 4. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Fotos: José de Barros França-Neto



Face externa semente classe 4, com danos por umidade nos cotilédones e mecânico imediato



Face interna semente classe 4, com dano mecânico imediato e sombreamento de dano por umidade.



Face externa semente classe 4, com danos por umidade e mecânico latente.



Face interna semente classe 4, com coloração interna dos cotilédones, devido ao dano mecânico



Face externa semente classe 4, com danos por umidade e mecânico latente na parte superior do cotilédone.



Face interna semente classe 4, com danos mecânico latente e sombreamento por dano por umidade...

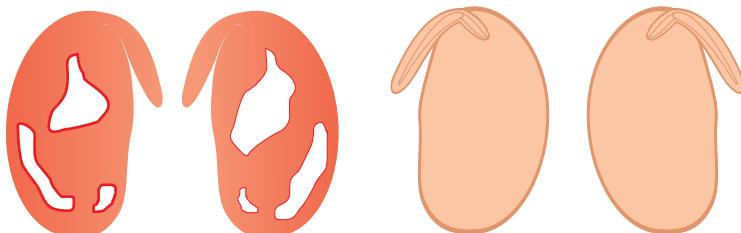


Face externa semente classe 4, com danos por percevejo e por umidade.



Face interna semente classe 4, com danos por percevejo e sombreamento devido ao dano por umidade.

Figura 41. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 4. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Classe 5: viável; vigor muito baixo

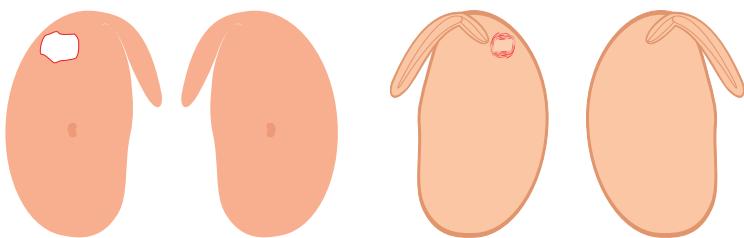
5a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando aspecto de mosaico, com áreas coloridas de vermelho carmim forte entremeadas com áreas mais claras e até mortas. Os tecidos afetados atingem profundidade superior a 1 mm, mas inferior à metade da espessura dos cotilédones. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se também com algumas áreas de colorido mais intenso. O eixo embrionário apresenta-se bem definido com as estruturas do córtex e do cilindro central bem visíveis.



5b. Dano(s) de origem mecânica, afetando totalmente a região vascular próxima ao ponto de ligação de um dos cotilédones e lesionando, parcial e inter-namente, a área correspondente do segundo cotilédone.



5c. Cotilédones fraturados de tal forma que é difícil saber se a parte remanescente é maior ou menor do que a metade do total da semente.



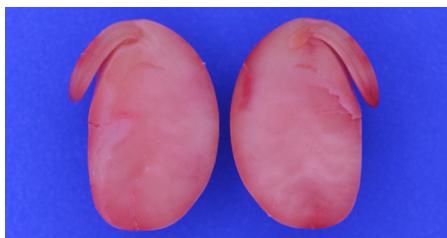
5d. Dano(s) devido(s) à picada de percevejo, afetando a região vascular como em **5b**.

Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio classificadas na Classe 5 constam na Figura 42 e 43.

Foto: José de Barros França-Neto



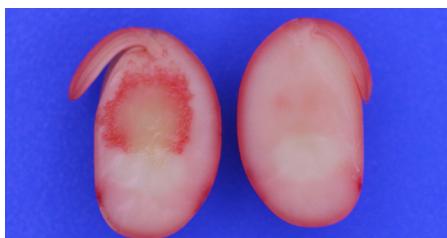
Face externa semente classe 5, com danos por mecanico imediato e por umidade.



Face interna semente classe 5, com coloração interna dos cotilédones e sombreamento dos danos macânico e por umidade.



Face externa semente classe 5, com danos por percevejo, umidade mecanico latente.



Face interna semente classe 5, com dano por percevejo na região vascular e sombreamento por dano mecanico.



Face externa semente classe 5, com danos por umidade, percevejo e mecanico latente.



Face interna semente classe 5, com danos por percevejo, mecanico na radícula e sombreamento do dano por umidade.



Face externa semente classe 5, com danos por percevejo e por umidade.



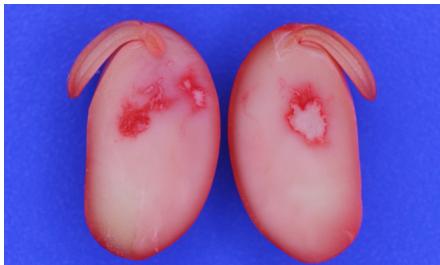
Face interna semente classe 5, com danos por percevejo e sombreamento do dano por umidade.

Figura 42. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 5. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Fotos: José de Barros França-Neto



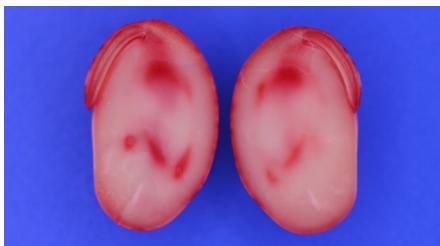
Face externa semente classe 5, com danos por percevejo na região vascular e por umidade.



Face interna semente classe 5, com dano por percevejo.



Face externa semente classe 5, com danos por umidade e percevejo.



Face interna semente classe 5, com sombreamento devido aos danos por umidade e percevejo.



Face externa semente classe 5, com danos por umidade e mecânico imediato e latente.



Face interna semente classe 5, com danos mecânico e estrias de dano por umidade.



Face externa semente classe 5, com danos por percevejo, umidade e mecânico latente.

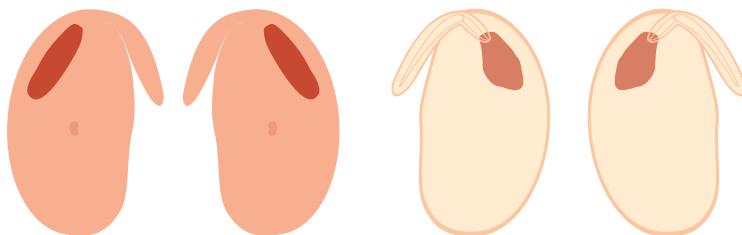


Face interna semente classe 5, com danos por percevejo e coloração dos cotilédones devido a todos os danos.

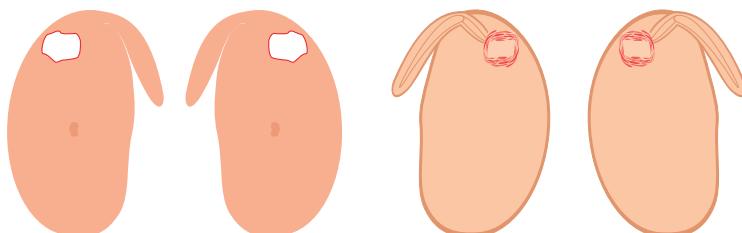
Figura 43. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 5. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Classe 6: não viável

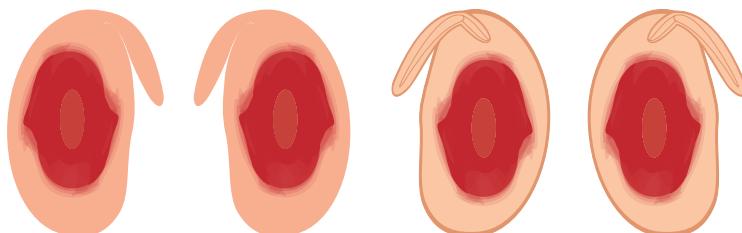
Sementes classificadas como Classe 6 exibem lesões semelhantes às da Classe 5 (vide ilustrações), porém, com maior extensão das áreas afetadas, o que as torna inviáveis.



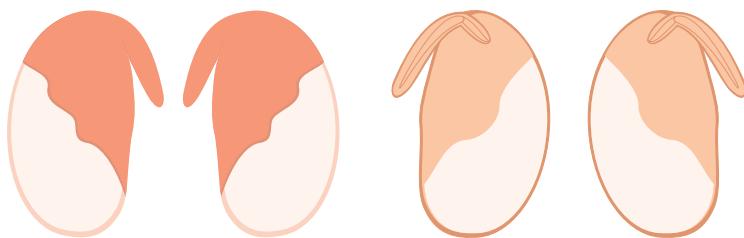
6a. Dano mecânico afetando ambos os cotilédones externamente e internamente, alcançando a região vascular e parte da plúmula.



6b. Danos causados por percevejo, afetando os cotilédones externamente e internamente, atingindo a região vascular e parte da plúmula.



6c. Dano mecânico latente afetando ambos os cotilédones externamente e internamente, bloqueando parcialmente a região vascular. Área de tecidos lesionados nos cotilédones alcança mais da metade dos mesmos.



6d. Área de tecidos mortos por deterioração por umidade nos cotilédones alcança mais de 50% dos tecidos de reserva.

Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio classificadas na Classe 6 constam na Figura 44.

Fotos: José de Barros França-Neto



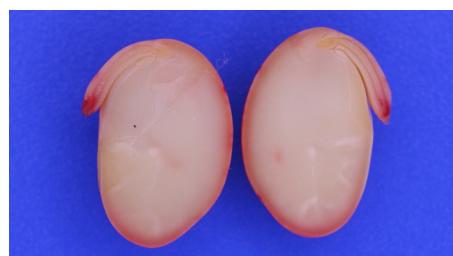
Face externa semente classe 6, com danos por umidade e mecânico latente.



Face interna semente classe 6, com dano mecânico latente e coloração na plúmula



Face externa semente classe 6, com danos por umidade e mecânico latente.



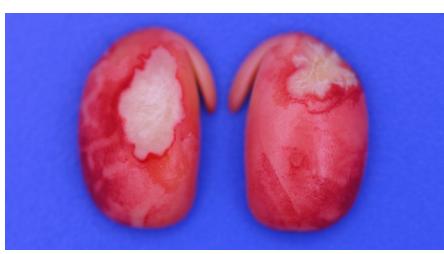
Face interna semente classe 6, com dano mecânico na radícula e sombreamento do dano por umidade.



Face externa semente classe 6, com danos por umidade e mecânico latente na radícula.



Face interna semente classe 6, com dano mecânico na radícula.



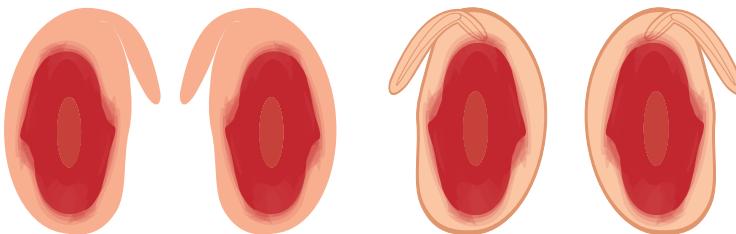
Face externa semente classe 6, com danos por percevejo e umidade.



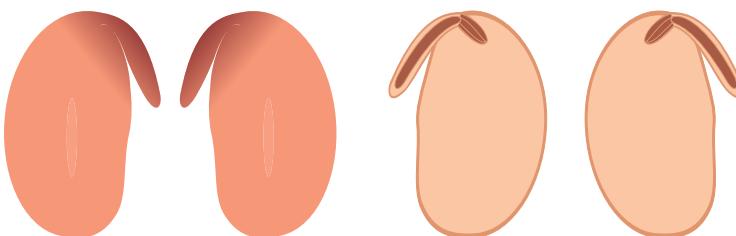
Face interna semente classe 6, com danos severos de percevejo e sombreamento devido ao dano por umidade.

Figura 44. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 6. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

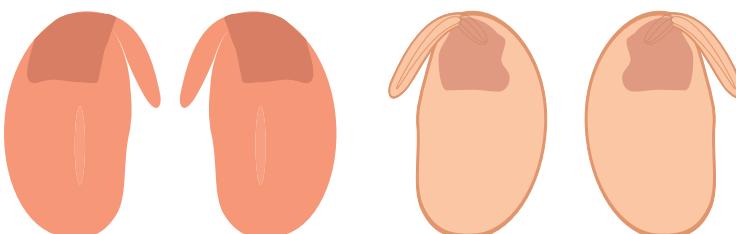
Classe 7: não viável



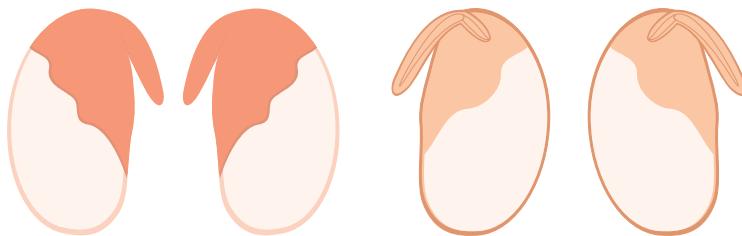
7a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando aspecto de mosaico com áreas de um colorido vermelho carmim forte entremeadas por outras mais claras e mortas (dano mecânico latente). Os tecidos afetados atingem a metade (ou mais) da espessura dos cotilédones, bloqueando completamente a região vascular.



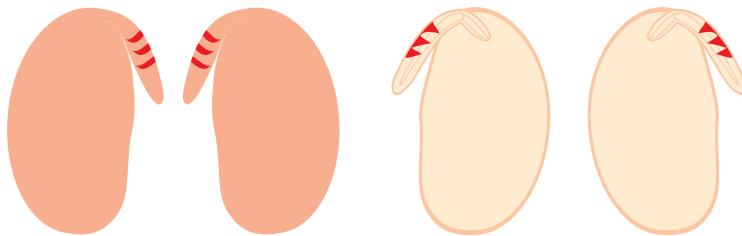
7b. Eixo embrionário apresentando uma coloração vermelho carmim forte, distribuída por toda a sua extensão, devido ao dano mecânico latente.



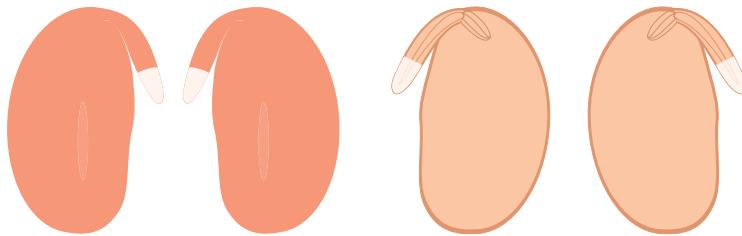
7c. Tecidos dos cotilédones com coloração vermelho carmim forte (ou branco leitoso) no ponto de ligação de ambos os cotilédones, atingindo a região vascular, devido a dano mecânico latente. Coloração branco-leitosa (indicativo de tecidos mortos) também pode ocorrer.



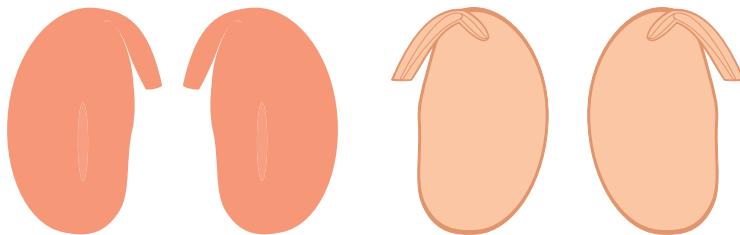
7d. Tecidos mortos por deterioração por umidade, com coloração branco-leitosa numa extensão superior à metade da superfície total da semente.



7e. Estrias de coloração vermelho carmim forte sobre o eixo embrionário, devido a dano por umidade, atingindo uma profundidade superior à metade da espessura do cilindro central.



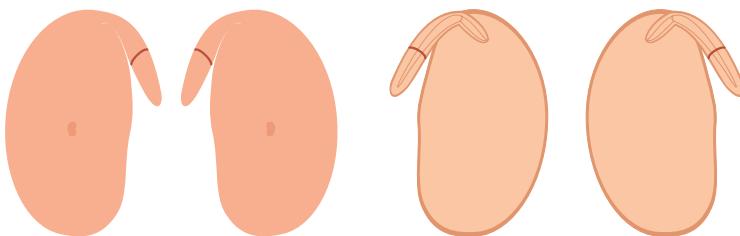
7f. Extremidade do eixo embrionário apresentando coloração branco-leitosa (tecido morto), atingindo não só o córtex, mas também o cilindro central.



7g. Fratura da extremidade do eixo embrionário, afetando não só o córtex, mas também o cilindro central.



7h. Fratura dos cotilédones com a parte remanescente sendo inferior à metade da superfície total da semente.



7i. Fratura do eixo embrionário, seccionando o cilindro central e córtex.

Existe uma exceção a essa Classe 7i: quando ocorrem danos mecânicos imediatos com fraturas recentes que seccionam apenas o cilindro central, sem lesionar o córtex e o tegumento da semente (Figura 45A), devendo-se considerar essa semente na Classe 4 (viável, baixo vigor). Nessa situação, durante o processo de germinação, poderá haver regeneração dos tecidos lesionados, formando uma calosidade no hipocótilo, resultando na produção de uma plântula normal, de médio/baixo vigor (Figuras 45B e 45C); porém, no caso de fraturas que seccionem totalmente o córtex e cilindro central no hipocótilo (Figura 45D) ou na radícula (Figura 45E), deve-se considerar a semente como não viável (Classe 7), pois resultará na produção de plântula anormal (Figura 45F).

Fotos: José de Barros França-Neto

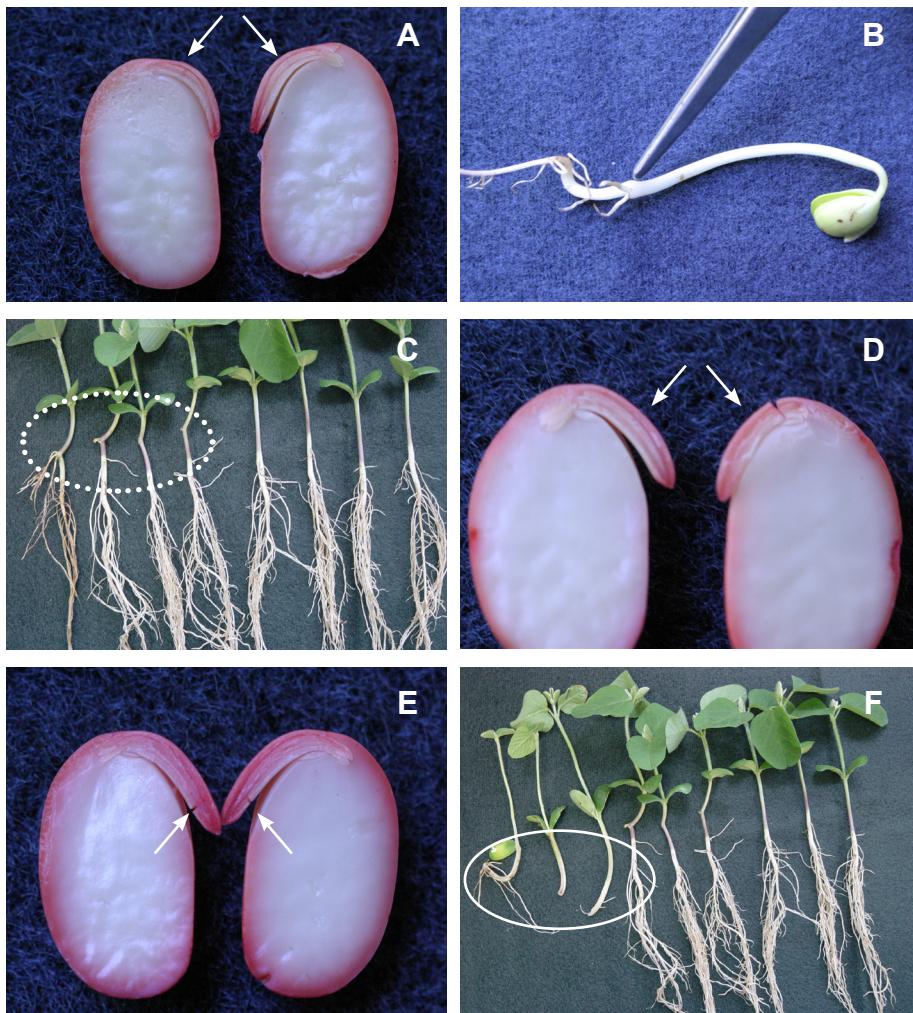
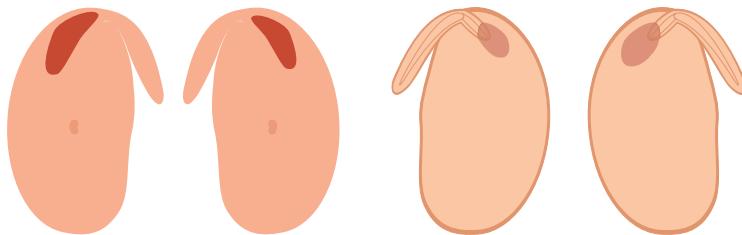
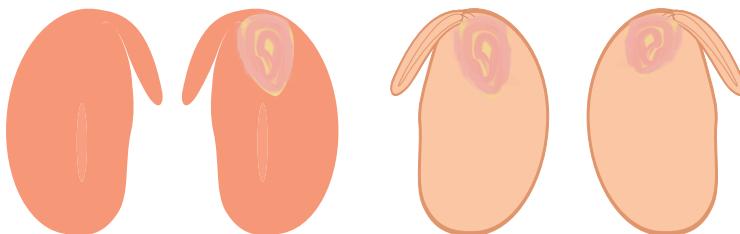


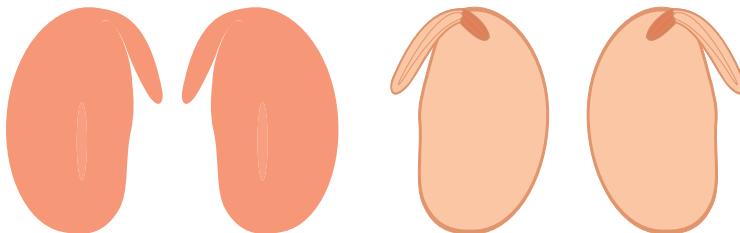
Figura 45. Ocorrência de fratura recente em eixos embrionários de sementes de soja. A. dano mecânico imediato, com fratura recente que secciona apenas o cilindro central, sem lesionar o córtex; B. e C. formação de calosidade no hipocôtilo, devido à regeneração dos tecidos lesionados, resultando na produção de uma plântula normal de médio/baixo vigor; D. fratura total do córtex e cilindro central no hipocôtilo; E. fratura total do córtex e cilindro central na radícula; F. plântulas anormais devido aos problemas ilustrados em D e E.



7j. Dano(s) de origem mecânica, afetando a região vascular de ambos os cotilédones, próximo(s) ao ponto de ligação cotilédones/eixo embrionário.



7k. Dano(s) devido à picada de percevejo, afetando a região vascular de ambos os cotilédones, próximo(s) ao ponto de ligação cotilédones/eixo embrionário.



7l. Plúmula de coloração vermelho carmim forte (deteriorada), devido à deterioração por umidade (Figura 46).

Foto: José de Barros França-Neto

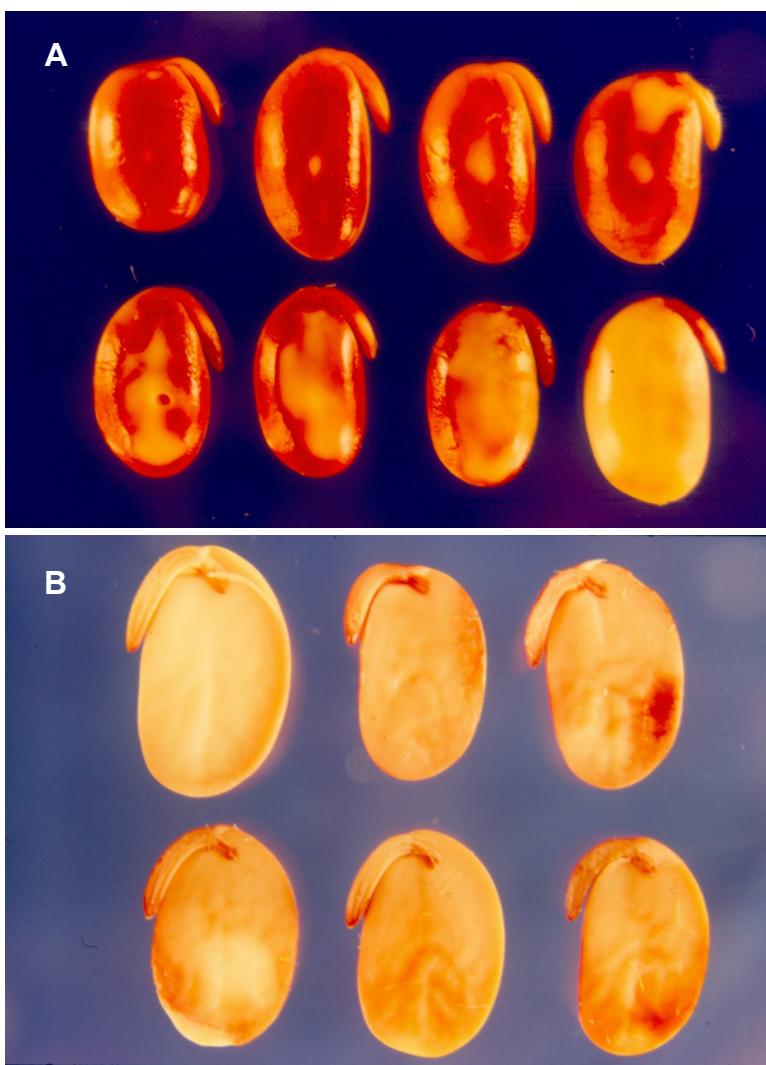


Figura 46. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, com sintomas de intensa deterioração por umidade na parte lateral dos cotilédones. A. ilustração da evolução dessas lesões nos cotilédones, da semente superior esquerda até a semente morta, inferior direita; B. face interna de sementes com deterioração por umidade, com as plúmulas coloridas de vermelho intenso, caracterizando a não viabilidade das sementes (Classe 7).

Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio classificadas na Classe 7 constam nas Figuras 47 e 48.

Fotos: José de Barros França-Neto



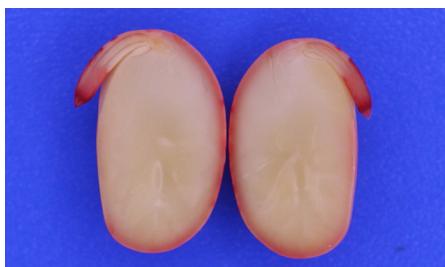
Face externa semente classe 7, com dano por umidade intenso.



Face interna semente classe 7, com dano por umidade intenso no eixo embrionário.



Face externa semente classe 7, com danos por umidade e mecanico latente no eixo embrionário.



Face interna semente classe 7, com dano mecânico no eixo embrionário e sombreamento devido ao dano por unidade.



Face externa semente classe 7, com dano por umidade e por percevejo no eixo embrionário.



Face interna semente classe 7, com dano por percevejo no eixo embrionário e sombreamento devido ao dano por unidade.



Face externa semente classe 7, com dano por umidade e mecanico latente no hipocótilo.



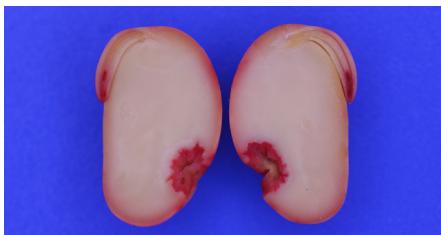
Face interna semente classe 7, com dano mecânico no hipocótilo e sombreamento devido ao dano por unidade.

Figura 47. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 7. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Fotos: José de Barros França-Neto



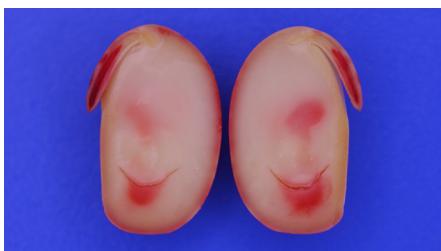
Face externa semente classe 7, com dano por percevejo, por umidade e mecânico latente na radícula.



Face interna semente classe 7, com dano por percevejo e mecânico na radícula.



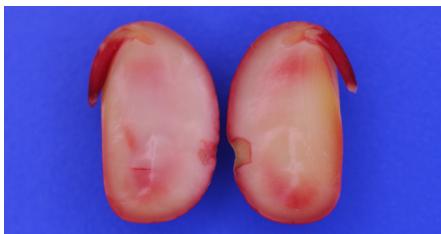
Face externa semente classe 7, com danos intensos por umidade.



Face interna semente classe 7, com danos intensos por umidade no eixo embrionário e fissuras nos cotilédones por dano de embebição.



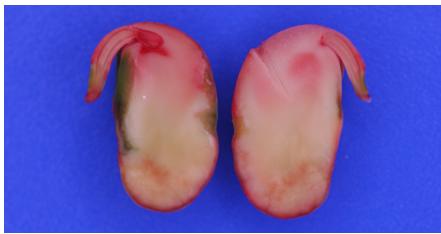
Face externa semente classe 7, com danos por umidade e precevejo.



Face interna semente classe 7, com dano intenso de umidade no eixo embrionário e por precevejo nos cotilédones.



Face externa semente classe 7, com danos por umidade e precevejo (semente esverdeada).



Face interna semente classe 7, com danos por precevejo e umidade.

Figura 48. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 7. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

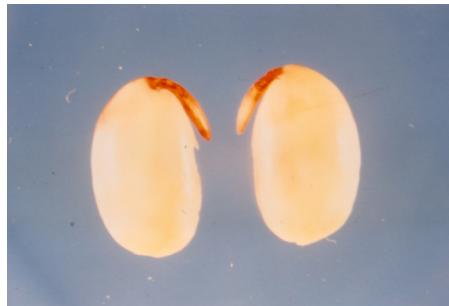
Classe 8: semente morta

Semente totalmente morta, usualmente branca e às vezes com tonalidade rosa. Os tecidos das sementes são friáveis e flácidos (Figura 49).

Fotos: José de Barros França-Neto



Face externa de sementes mortas (classe 8), devido ao dano por umidade.



Face externa semente morta (classe 8) devido ao dano por umidade.



Face externa de semente morta (classe 8), devido ao dano por umidade.



Face interna de semente morta (classe 8) devido ao dano por umidade.

Figura 49. Ilustrações de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio, classificadas na Classe 8: sementes fisiologicamente mortas. As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Sementes duras (SD): a ocorrência de sementes duras (impermeáveis à água) em lotes de sementes de soja é um aspecto genético, ou seja, depende da cultivar, e depende também das condições climáticas durante a fase de pré-colheita e maturação: déficit hídrico na fase final do enchimento de grãos e em pré-colheita podem resultar na produção de sementes duras (França-Neto e Potts, 1979). Esse fenômeno deve-se à deposição de suberina no tegumento da semente, deixando-a impermeável à água. Essas sementes não embebem água no processo de pré-condicionamento, conforme descrito anteriormente. A constatação da presença de sementes duras na amostra pode requerer procedimentos especiais. Quando uma amostra apresentar

um baixo índice de sementes duras, ou seja, de 1% a 5%, as mesmas podem ser consideradas como viáveis e vigorosas, podendo ser anotadas na Classe 1. Porém, caso o índice de sementes impermeáveis seja superior a 5%, as mesmas devem ser escarificadas com lixa “fina”, sendo novamente pré-condicionadas e coloridas, realizando-se, a seguir, a leitura das mesmas. Mesmo realizando a escarificação das sementes duras, é importante anotar o porcentual das mesmas na ficha da amostra, uma vez que essas sementes têm uma menor velocidade de germinação e de emergência no campo.

Anormalidades embrionárias: alguns tipos de malformações embrionárias podem ser constatados no teste de tetrazólio (Figura 50). É comum a constatação da presença de três ou mais cotilédones, cotilédones deformados ou dobrados e o posicionamento do eixo embrionário em local inadequado. A maioria dessas sementes não produzirá plântulas normais, conforme exemplificado na Figura 50A. Entretanto, sementes com a anormalidade ilustrada na Figura 50B podem resultar em plântulas normais, desde que não apresentem danos sérios em seus componentes vitais.

Fotos: José de Barros França-Neto

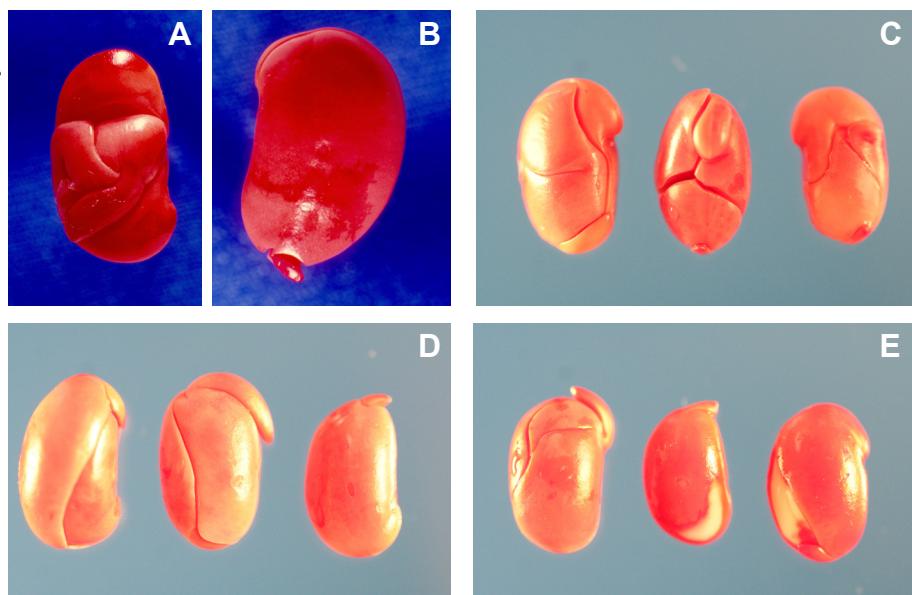


Figura 50. Sementes de soja com anormalidades embrionárias; A. sementes com cotilédone retorcido/dobrado; B. observar a localização inapropriada do eixo embrionário. C, D e E. Anormalidades embrionárias.

Anotação e interpretação dos resultados

Cada semente da amostra é classificada na classe de viabilidade apropriada e o(os) tipo(s) de dano(s) de cada semente é(são) registrado(s), utilizando-se ficha de resultados apropriada (Figura 51). Sugere-se utilizar a seguinte simbologia:

- X : sem dano
- L : dano mecânico (DM)
- / : dano causado por percevejo (DP)
- P : dano por umidade (DU)
- [: DM + DP
- P : DM + DU
- P : DU + DP
- E : DU + DM + DP

OBS.: P = umidade L = dano mecânico F = percepção

Figura 51. Ficha para anotação dos resultados do teste de tetrazólio para semente de soja.

Observação importante: conforme já mencionado, pode ocorrer mais de um tipo de dano na mesma semente (Figura 32). Caso isso ocorra em sementes classificadas como não viáveis (Classes 6 a 8), e apenas um tipo de dano for responsável pela perda de viabilidade, tal dano deve ser marcado na ficha com um traço mais forte. Por exemplo: uma semente apresenta um dano mecânico que provocou fratura total do eixo embrionário, suficiente para causar a perda de viabilidade; esta mesma semente apresenta também uma deterioração por umidade nos cotilédones, longe das zonas vitais, dano este não suficiente para que a semente seja classificada como não viável (Figura 52). Ao anotar esta semente na ficha como Classe 7 (não viável), deve-se marcar a simbologia de dano mecânico com maior intensidade que o símbolo de deterioração por umidade. Isto deve ser realizado sempre que situações semelhantes ocorrerem, marcando-se os danos que efetivamente forem responsáveis pela perda de viabilidade com maior intensidade na ficha e os danos mais superficiais, não suficientes para resultar em perda de viabilidade, em intensidade normal, conforme ilustram as fichas de resultados no final desta seção por exemplo (Figuras 53, 54 e 55).

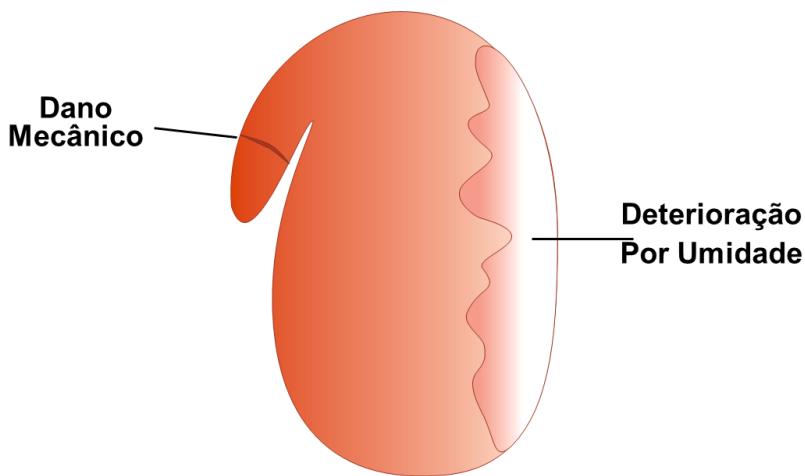


Figura 52. Esquema de semente de soja com deterioração por umidade nos cotilédones e com dano mecânico severo, que fraturou o eixo embrionário.

Após a avaliação de todas as 100 sementes (2 repetições de 50 sementes) da amostra, determina-se a porcentagem das sementes classificadas em cada Classe (1 a 8). A viabilidade (potencial de germinação) é calculada pelo

somatório dos valores porcentuais classificados nas Classes 1 a 5. O nível de vigor é estimado pelo somatório dos valores porcentuais das sementes das Classes 1 a 3, conforme ilustrados nas fichas preenchidas (Figuras 53, 54 e 55).

No rodapé da ficha, anotam-se os resultados das duas subamostras, calculando-se as médias do vigor e da viabilidade. Calculam-se também os porcentuais de todos os tipos de danos (mecânico, deterioração por umidade e de percevejo) anotados para os níveis (1-8) e (6-8). Para o nível (1-8), calcula-se, em cada subamostra, o número de sementes que apresentaram sinais de danos mecânicos, por exemplo; multiplica-se o total por “2”, para obter-se o valor porcentual. Faz-se o mesmo para a segunda subamostra, calculando-se a seguir a média desses dois valores. O mesmo procedimento deve ser seguido para os outros tipos de danos.

Para os níveis de classificação (6-8), faz-se o mesmo; porém, no caso de sementes que apresentem mais de um tipo de dano, deve-se computar apenas aquele(s) dano(s) que efetivamente contribui(íram) para a perda de viabilidade, ou seja, que foram marcados com maior intensidade. Veja as fichas contidas nas Figuras 53, 54 e 55.

Além disso, pode-se calcular os porcentuais dos danos em quaisquer outras combinações de classes. Por exemplo, o somatório em porcentagem dos danos de deterioração por umidade nas Classes 4 e 5 (DU 4-5) são muito úteis para estimar a intensidade de deterioração que poderá evoluir durante a armazenagem das sementes de soja, conforme comprovado por Moreano et al. (2011), principalmente em sementes esverdeadas dessa espécie (Zorato et al., 2007).

Os resultados podem também ser registrados utilizando o teclado de computadores, que dispõem de programas específicos para essa finalidade, ou mesmo em “tablets” ou por aplicativos disponíveis no mercado. Cada semente será registrada com as anotações de classe de viabilidade e tipo(s) de dano(s). A vantagem desses sistemas é que todas as estimativas de viabilidade, vigor e dos índices de danos mecânicos, de deterioração por umidade e dos danos causados por percevejos são calculados instantaneamente e sumarizados para cada amostra.

Necessidade de reanálise

A amostra deverá ser reanalisada quando os resultados de viabilidade obtidos para as duas subamostras diferirem entre si em 10% ou mais.

Interpretação dos resultados

O nível de vigor pode ser interpretado por meio da seguinte classificação:

- Vigor muito alto: igual ou superior a 90%;
- Vigor alto: entre 85% a 89%;
- Vigor médio: entre 75% a 84%;
- Vigor baixo: igual ou inferior a 74%.

Esses valores foram estabelecidos com base nos resultados de avaliações do vigor, determinado pelo teste de tetrazólio, em 1.847 lotes provenientes da avaliação da qualidade de sementes de soja produzidas no Brasil em três safras (2014/15, 2015/16 e 2016/17), conforme França-Neto et al. (2018).

Os valores obtidos para viabilidade devem receber a mesma interpretação dos alcançados no teste de germinação.

O diagnóstico da(s) causa(s) da baixa qualidade fisiológica da semente pode ser obtido pela determinação da porcentagem de sementes afetadas por cada tipo de dano, tal como danos mecânicos, deterioração por umidade e danos por percevejo, nas Classes 6 a 8. Esses números indicam a porcentagem de redução da viabilidade ocasionada pela ocorrência de cada tipo de dano. Deve-se atentar que os danos aqui computados são os que efetivamente causaram perda de viabilidade da semente, conforme anotado na ficha de resultados. Esses níveis de danos podem ser interpretados de acordo com a seguinte classificação, também estabelecida com base nas avaliações mencionadas acima, realizadas por França-Neto et al. (2018):

- Sem problema sério (aceitável): inferior a 4%;
- Problema sério: entre 5% a 8%;
- Problema muito sério: superior a 8%.

Vale destacar que essa classificação dos níveis de danos nas Classes 6 a 8, deve ser utilizada para o diagnóstico de cada um dos tipos de danos individualmente. Com base nesse diagnóstico, medidas corretivas poderão ser adotadas visando minorar a ocorrência desses problemas, conforme relatado a seguir.

Se um problema sério ou muito sério é diagnosticado pelo analista de sementes por meio do teste de tetrazólio, por exemplo, um alto nível de ocorrência de danos mecânicos, ou danos por percevejos, uma ação corretiva pode ser adotada, para melhorar a qualidade fisiológica das sementes produzidas. O produtor de sementes pode ser orientado, por exemplo, a ajustar o sistema de trilha da sua máquina colhedora ou melhorar o sistema de controle de percevejos.

Exemplos de resultados obtidos pelo teste de tetrazólio estão ilustrados na Tabela 1. O lote nº 1 apresenta viabilidade de 96% e vigor muito alto, de 91%, não apresentando problemas sérios relativos a nenhum dos tipos de danos (mecânico, percevejo ou umidade). O lote nº 2 tem viabilidade de 88%, sendo o vigor (78%), classificado como médio, devido principalmente à ocorrência de problemas sérios (8%) com danos mecânicos. O lote nº 3 tem 81% de viabilidade e vigor baixo (70%), com problemas muito sérios (10%) de deterioração por umidade e sérios de danos de percevejo (7%). As fichas utilizadas para anotar os resultados para estes três lotes estão ilustradas nas Figuras 53, 54 e 55.

Tabela 1. Resultados do teste de tetrazólio obtidos em três lotes de sementes de soja. Adaptado de França-Neto e Krzyzanowski (2018).

Parâmetro	Lote nº 1	Lote nº 2	Lote nº 3
Viabilidade	96	88	81
Vigor ¹	91	78	70
Danos Mecânicos ²	1	8	2
Deterioração por Umidade ²	2	2	10
Danos de Percevejo ²	1	2	7

¹Nível de vigor: muito alto: $\geq 90\%$; alto: 85 a 89%; médio: 75 a 84%; baixo: $\leq 74\%$.

² Porcentagem de perda de viabilidade (TZ 6-8) causada pelo respectivo tipo de dano.

O ideal é que esses níveis de danos (mecânicos, deterioração por umidade e os causados por percevejos) sejam mínimos e, consequentemente, os valores de viabilidade e de vigor sejam os maiores possíveis.

Existe um conjunto de tecnologias de produção de sementes, que, quando adotados, propiciam a produção de lotes de sementes de soja nos maiores patamares de qualidade (França-Neto et al., 2016). Dando suporte a essa afirmativa, França-Neto et al. (2017) relataram em levantamentos de qualidade das sementes de soja produzidas na safra 2015/16 diversos lotes que, próximo da época de semeadura, apresentaram 100% de viabilidade, 100% de vigor, com 0% de danos mecânicos, 0% de deterioração por umidade e 0% de danos causados por percevejos, nas Classes 6 a 8.

Embrapa		FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO									
AMOSTRA: LOTE N° 1						LOCAL: LONDRINA - PR					
Nº DE SEMENTES TESTADAS: 2 x 50						PROJETO: QUALIGRÃOS					
DATA: 11/10/2018						ANALISTA: VILNA					
1.	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	X//	///	///	///	///	///	x2 42
2.	PPPPPL	PPPPP	P PPPP	P PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	x2 32
3.	PPPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	PPPP	x2 18
4.	B//	///	///	///	///	///	///	///	///	///	x2 2
5.	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	x2 0
DURAS	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	x2 0
6.	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	x2 0
7.	B/B	///	///	///	///	///	///	///	///	///	x2 6
8.	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	x2 0
Nível de vigor 1-3:	92			(%)	Viabilidade (1-5):			94	(%)		

REPETIÇÕES	DANO MECÂNICO		UMIDADE		PERCEVEJO		DURAS x2	VIGOR (1-3)	VIAB. (1-5)
	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2			
I	12	2	52	2	4	2	0	92	94
II	6	0	50	2	8	0	0	90	98
MÉDIAS	9	1	51	2	6	1	0	91	96

OBS.: P = umidade L = dano mecânico F = percevejo

Figura 53. Resultados do teste de tetrazólio para o Lote no. 1 de sementes de soja.

Embrapa		FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO						
AMOSTRA: LOTE N° 2		LOCAL: LONDRINA - PR						
Nº DE SEMENTES TESTADAS: 2 x 50		PROJETO: QDAVIGRAOS						
DATA: 11/10/2018		ANALISTA: George						
1. XXXXX X //// // //// // //// // //// // //// // //// // //// // //// x2 12 (%) 2. PPLPP PLLPP PPPPP P // // // // // // // // // // // // x2 32 3. PPPLP PPPPP PPPP // // // // // // // // // // // x2 36 4. PPPPP // // // // // // // // // // // // // // // x2 10 5. // // // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0 DURAS // // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0 6. // // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0 7. PPPLP // // // // // // // // // // // // // // // x2 10 8. // // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0								
Nível de vigor 1-3: 80 (%) Viabilidade (1-5): 90 (%)								
1. YYYYYY // // // // // // // // // // // // // // // // x2 10 (%) 2. PPLPT PPPPP PPPPL // // // // // // // // // // x2 28 3. LPPPL PPPPP PPPPP PLPPI // // // // // // // // // x2 38 4. PPLPP // // // // // // // // // // // // // // x2 10 5. // // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0 DURAS // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0 6. // // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0 7. PPPLP LPL // // // // // // // // // // // x2 14 8. // // // // // // // // // // // // // // // // x2 0								
Nível de vigor 1-3: 76 (%) Viabilidade (1-5): 86 (%)								

REPETIÇÕES	DANO MECÂNICO		UMIDADE		PERCEVEJO		DURAS x2	VIGOR (1-3)	VIAB. (1-5)
	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2			
I	30	6	80	2	10	2	0	80	90
II	28	10	76	2	12	2	0	76	86
MÉDIAS	29	8	78	2	11	2	0	78	88

OBS.: P = umidade L = dano mecânico F = percevejo

Figura 54. Resultados do teste de tetrazólio para o Lote no. 2 de sementes de soja.

OBS: P = umidade / I = dano mecânico / F = percepção

Figura 55. Resultados do teste de tetrazólio para o Lote no. 3 de sementes de soja.

Um exemplo do valor do retorno da informação do teste de tetrazólio para o produtor é ilustrado por Costa et al. (1987). Alta porcentagem de dano mecânico foi determinada na semente de soja produzida no estado do Paraná. Após a identificação do problema, os produtores foram orientados como melhorar os ajustes de trilha das colhedoras. Para tanto, foi organizado treinamento através de um grande programa de extensão. Em dois anos o nível de dano mecânico em semente da soja reduziu para níveis aceitáveis.

Essa mesma tendência foi relatada mais recentemente no Brasil (França-Neto et al., 2018) nos levantamentos de qualidade de sementes coordenados pela Embrapa Soja. Mediante o diagnóstico dos problemas de qualidade, e com diversos treinamentos sobre técnicas de produção de sementes de soja realizados por diversas instituições e com a participação das associações estaduais e nacionais de produtores de sementes, verificou-se uma melhoria na qualidade das sementes devido principalmente à redução dos índices de ocorrência de danos mecânicos nas sementes.

Precisão dos resultados

Um bom nível de precisão e confiabilidade do teste de tetrazólio foi demonstrado por França-Neto et al. (1986). Várias amostras de sementes de soja foram enviadas a 41 laboratórios de sementes, com instruções específicas para a execução dos seguintes testes: a) germinação, de acordo com as RAS (Brasil, 1976); b) envelhecimento acelerado através do método de “gerbox” de acordo com o Manual de Vigor de Sementes da AOSA (AOSA, 1983); c) teste de tetrazólio, conforme descrito por França-Neto et al. (1985); e d) emergência de plântulas em areia, de acordo com procedimentos específicos enviados com as amostras. Após o teste de germinação, o teste de tetrazólio foi classificado como o mais preciso, superando os outros dois testes avaliados. França-Neto et al. (2001, 2002) conduziram um teste de referência envolvendo 27 laboratórios, concluindo que o teste de tetrazólio foi tão preciso quanto o teste de germinação na determinação da viabilidade das sementes de soja. Quando comparado com o teste de envelhecimento acelerado foi mais preciso na determinação do vigor.

França-Neto et al. (2003), avaliando 1.117 lotes de sementes de soja no período de 1997 a 2002 no Brasil, concluíram que o valor de vigor (%) determi-

nado pelo teste de tetrazólio se mostrou confiável para estimar o potencial de emergência no campo (PEC), quando o teste é conduzido entre 3 a 4 semanas antes da semeadura. Uma equação foi desenvolvida ($PEC = 0,6165 \times TZ\text{-Vigor} + 35,716$) e testada para 100 lotes em 2002 resultou num coeficiente de regressão de 0,79, o qual foi altamente significativo ($p \leq 0,001$). Esta equação vem sendo avaliada por empresas produtoras de sementes no Brasil.

$$PEC = 0,6165 \times TZ\text{-Vigor} + 35,716$$

Onde PEC = potencial de emergência de plântulas no campo

TZ-Vigor = índice de vigor determinado pelo teste de tetrazólio

A seguir, ilustraremos como utilizar essa equação para um lote cujo índice de vigor determinado pelo teste de tetrazólio foi de 85,0%:

$$PEC = 0,6165 \times 85,0 + 35,716 = 52,403 + 35,716$$

$$PEC = 88,12\%$$

Ou seja, esse lote tem um potencial de emergência de plântulas no campo de aproximadamente 88%.

Essa equação foi testada para 100 lotes em 2002 resultou num coeficiente de regressão de 0,79, o qual foi altamente significativo ($p < 0,001$), indicando haver 79% de probabilidade da estimativa estar correta. A possibilidade da utilização dessa equação vem sendo avaliada por empresas produtoras de sementes no Brasil.

Em condições normais, os resultados de germinação, obtidos nos testes de germinação, e os de viabilidade, obtidos no teste de tetrazólio, devem ser semelhantes, tolerando-se diferenças de até 5% entre eles. Entretanto, discrepâncias maiores entre os resultados podem ocorrer, sendo explicadas por uma das seguintes razões: a) diferenças de amostragem; b) técnicas impróprias no teste de germinação; c) técnicas impróprias no teste de tetrazólio; d) presença de sementes duras nas amostras; e) uso de lotes de sementes com vigor médio ou baixo; f) presença de sementes com elevados índices de danos mecânicos, de deterioração por umidade ou por danos causados por percevejo; g) sementes infectadas por fungos, tais como *Phomopsis spp.*, *Fusarium incarnatum*, sin. (*F. pallidoroiseum*, *F. semitectum*), ou *Colletotrichum truncatum*.

Lakon, conforme citado por Gadd (1950, p. 253), mencionou que sua “longa experiência em comparar os resultados do teste de tetrazólio com os de germinação demonstrou que quando havia diferenças entre os resultados, o problema estava sempre ligado ao teste de germinação.”

Vantagens e limitações do teste de tetrazólio para sementes de soja

Listadas abaixo estão as principais vantagens e limitações do teste de tetrazólio:

Vantagens

As principais vantagens do teste de tetrazólio são:

- Não é afetado por diversas condições que podem afetar o desempenho das sementes em testes como o de germinação, que envolvem o crescimento do embrião;
- Foca atenção às condições físicas e fisiológicas do embrião de cada semente, avaliada individualmente;
- Permite avaliação rápida da viabilidade e do vigor (8 horas para a soja);
- Permite a identificação de diferentes níveis de viabilidade e de vigor;
- Fornece o diagnóstico das possíveis causas da redução do potencial fisiológico das sementes;
- O equipamento necessário é simples e barato;
- Não é influenciado por fatores como dormência; sementes dormentes são coloridas normalmente pela solução de tetrazólio, quando viáveis;
- Um analista experiente pode ter um rendimento de quatro a cinco amostras (2 x 50 sementes) por hora de trabalho.

Limitações

As principais desvantagens do teste de tetrazólio são as seguintes:

- Requer treinamento especial sobre a estrutura embrionária da semente e sobre técnicas de interpretação;
- É relativamente tedioso, uma vez que as sementes são avaliadas uma a uma, requerendo, desta forma, experiência e paciência;
- Embora seja um teste rápido, consome mais tempo para a avaliação de cada amostra do que o teste de germinação; entretanto, o teste de tetrazólio propicia maior diversidade de informações em relação ao teste de germinação;
- Não identifica a eficácia de tratamentos químicos, nem a sua fitotoxicidade potencial;
- Requer maior senso de observação, capacidade de decisão e conhecimento teórico do analista, devido às características do teste.

Mason et al. (1982) reportou que o teste de tetrazólio não foi eficaz na detecção de danos mecânicos recentes. Tal limitação pode ser facilmente superada com a utilização de uma solução de tetrazólio de menor concentração, ou seja, 0,075, conforme sugerida no presente manual.

Quando aplicar o teste de tetrazólio

O teste pode ser aplicado em todas as etapas do sistema de produção de sementes, visando aprimorar o controle de qualidade, ou seja, na colheita, na recepção, antes e depois do beneficiamento e a secagem, durante o armazenamento e antes da semeadura. Deve-se enfatizar que os resultados obtidos no teste refletem o potencial fisiológico atual das sementes.

Tem sido utilizado com sucesso a partir da etapa de pré-colheita: por exemplo, para a soja, sugere-se que cerca de seis a sete dias antes da colheita, diariamente, sejam feitas amostragens de plantas dos campos de produção, trilhando-se as sementes manualmente. Por meio da avaliação dessas se-

mentes pelo teste de tetrazólio, pode-se verificar o nível de vigor, a viabilidade e a ocorrência de danos causados por percevejos e deterioração por umidade. Dependendo dos resultados obtidos, poderá ser decidido com segurança se o referido campo apresenta nível de qualidade para ser destinado à indústria de sementes ou descartado como grão. Isto pode resultar em economia significativa aos produtores de sementes, evitando despesas desnecessárias para o transporte, secagem, beneficiamento, embalagem e armazenamento de lotes de sementes de baixo potencial de desempenho.

Pode ser realizado em amostras de sementes tratadas com agroquímicos, como por exemplo fungicidas, inseticidas, nematicidas, micronutrientes, seguindo-se alguns procedimentos técnicos e de segurança. As sementes tratadas devem ser inicialmente pré-condicionadas em papel para germinação, conforme os procedimentos disponíveis para várias espécies. Em seguida, enxaguam-se as sementes em água corrente, antes de serem colocadas para coloração na solução de trabalho do sal de tetrazólio, visando remover parte dos produtos utilizados no tratamento. Após o desenvolvimento da coloração, enxaguam-se novamente as sementes, não apenas para remover a solução de tetrazólio, mas também para remover os produtos do tratamento. Luvas cirúrgicas, guarda-pó e máscara devem ser utilizados pelo analista. Caso algum dos produtos utilizados no tratamento interfira no padrão de coloração das sementes submetidas ao tetrazólio, a solução de trabalho deverá ser preparada utilizando-se o tampão de fosfato, ao invés de água, conforme já relatado.

Ao realizar o teste de tetrazólio em sementes tratadas com fungicidas, inseticidas ou nematicidas, todos os cuidados devem ser tomados pelos analistas, que deverão utilizar os equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas, máscaras, guarda-pós.

Áreas para melhorias

A utilização dos resultados do teste de tetrazólio, como em qualquer teste de vigor, pode auxiliar na identificação dos níveis de vigor de diferentes lotes de sementes e estimar o desempenho desses lotes no campo sob condições ótimas e desfavoráveis. Testes de aferição para determinar a precisão do método devem ser realizados para verificar a fidelidade dos procedimentos adotados, de conformidade com as recomendações da pesquisa, da interpretação do teste, e consequentemente, garantir a consistência dos resultados.

Agradecimentos

Agradecemos a Srt^a. Claudineia Sussai de Godoy pelo desenho dos esquemas das distintas classes do teste de tetrazólio, constantes neste livro.

Referências

- AOSA - Association of Official Seed Analysts. **Seed vigor testing handbook**. Stillwater: Seed Vigor Test Committee of the Association of Official Seed Analysts, 1983. 93 p. (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 32).
- BAALBAKI, R.; ELIAS, S.; MARCOS-FILHO, J.; MCDONALD, M. B. (ed.). **Seed vigor testing handbook**. Ithaca: Association of Official Seed Analysts, 2009. 341 p. (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 32).
- BHERING, M. C.; SILVA, R. F; ALVARENGA, E. M.; DIAS, D. C. F. S. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B. (ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: Abrates, 1999. p. 8.3-1-8.3.10.
- BITTENCOURT, S. R. M.; VIEIRA, R. D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B. (ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: Abrates, 1999. p. 8.2-1-8.2.8.
- BOWLING, C. C. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the southern green stink bug on soybeans. **Journal of Economic Entomology**, v. 73, p. 1-3, 1980.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/SDA, 2009. 395 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 1976. 188 p.

BUENO, A. de F.; BORTOLOTTO, O. C.; POMARI-FERNANDES, A.; FRANÇA-NETO, J. de B. Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. **Crop Protection**, v. 71, p. 132-137, 2015.

BULAT, H. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 26, p. 686-696, 1961.

CARVALHO, T. C.; KRZYZANOWSKI, F. C.; OHLSON, O. C.; PANOBIANCO, M. Teste de tetrazólio em sementes de trigo. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020. p. 591-601.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, safra 2021/22, 11º levantamento. v. 5, n. 11. Brasília, DF: Conab, agosto 2022. 86 p. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/43838_4f6bd0f1bf74e7d8639e42ec c1ae58b3. Acesso em: 01 set. 2022.

COPELAND, T. G.; BRUCE, C. F.; MIDYETTE, J. W. The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 49, p. 134-141, 1959.

COSTA, N. P. da; FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; OLIVEIRA, M. C. N. de. Procedimento alternativo no teste de tetrazólio em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 869-877, 1998.

COSTA, N. P. da; FRANÇA-NETO, J. de B.; PEREIRA, L. A. G.; HENNING, A. A. Avaliação da qualidade da semente de soja produzida no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 1157-1165, 1987.

COSTA, N. P. da; MARCOS-FILHO, J. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seed. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 9-17, 1994.

COSTA, N. P. da; MARCOS-FILHO, J.; FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. **Teste de tetrazólio em sementes de soja com precondicionamento abreviado** - Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 56).

COTTRELL, H. J. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. **Annals of Applied Biology**, v. 25, p. 123-131, 1948.

CRAVIOTTO, R. M.; FARED, M.; MONTERO, M. **Prueba topográfica por tetrazolio**: patrones para la especie soja. Santa Fé: INTA, Centro Regional Santa Fé, E. E. A. Oliveros, 1995. 20 p.

CRAVIOTTO, R. M.; PEREARNAU, M. A.; GALLO, C. **Prueba topográfica por tetrazolio en soja**. Santa Fé: INTA, Centro Regional Santa Fé, E. E. A. Oliveros, 2008a. 96 p.

CRAVIOTTO, R. M.; PEREARNAU, M. A.; GALLO, C. **Topographic tetrazolium test for soybean**. Santa Fé: INTA, Centro Regional Santa Fé, E. E. A. Oliveros, 2008b. 96 p.

CUSTÓDIO, C. C.; AGUIAR, R. P. Teste de tetrazólio em sementes de gramíneas forrageiras tropicais. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020. p. 485-500.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **The tetrazolium test for seed viability**. Mississippi State: Mississippi State University, 1962. 64 p. (Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 51).

DIAS, M. C. L. L.; BARROS A. S. R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 8.4-1-8.4.10.

FIALA, F. **Handbook of vigour test methods**. 2nd. ed. Zurich: International Seed Testing Association, 1987. 71 p.

FRANÇA-NETO, J. de B. Methodology of the tetrazolium test for soybean seeds. In: COMPLETE diagnosis of soybean quality problems. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Services, USDA-ARS, 1989. p. 6-51.

FRANÇA-NETO, J. de B. Princípios do teste de tetrazólio para a semente de soja. **Boletim LASP**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 1981.

FRANÇA-NETO, J. de B. Qualidade fisiológica da semente. In: FRANÇA-NETO, J. de B.; HENNING, A. A. (ed.). **Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984. p. 5-24. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 9).

FRANÇA-NETO, J. de B.; DIAS, M. C. L. L.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. da. Soybean seed quality referee test in Brazil. **Association of Official Seed Analysts Newsletter**, v. 60, n. 3, p. 17, 1986.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja. 2018. 108 p. (Embrapa Soja. Documentos, 406).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020a. p. 519-580.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019. DOI: 10.1590/2317-1545v41n3223104.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Use of the tetrazolium test for estimating the physiological quality of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 50, n. 1, Suppl., p. 31-44, 2022. DOI: 10.15258/sst.2022.50.1.s.03.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da. **El test de tetrazolio en semillas de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998c. 72 p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 117).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 8.5-1-8.5.28.

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

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da. **The tetrazolium test for soybean seeds**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO. 1998b. 71 p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 115).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da; HENNING, A. A.; PÁDUA, G. P. Adequação de metodologia de testes de vigor para sementes de soja (Subprojeto 04.2000.327-02). In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SARAIVA, O. F. (org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2002: sementes e transferência de tecnologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2003. p. 25-32. (Embrapa Soja. Documentos, 211).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; DIAS, M. C. L.; BARROS, A. S. R. Teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020. p. 501-518.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. da. **Suscetibilidade das principais cultivares de soja utilizadas no Brasil ao dano de embebição no teste de germinação**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998a. 10 p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 60).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. da. Aferição da metodologia dos testes de tetrazólio e de envelhecimento acelerado para a avaliação da qualidade de sementes de soja. In: REUNIAO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIAO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.191-192. (Embrapa Soja. Documentos, 157).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. da. Avaliação da utilização rotineira dos testes de tetrazólio e de envelhecimento acelerado para a semente de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2.; MERCOSOJA 2002, 2002, Foz do Iguaçu. **Perspectivas do agronegócio da soja: resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 363. (Embrapa Soja. Documentos, 181).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PADUA, G. P.; LORINI, I.; HENNING, F. A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82 p. (Embrapa Soja. Documentos, 380).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; WEST, S. H.; MIRANDA, L. C. Soybean seed quality as affected by shriveling due to heat and drought stresses during seed filling. **Seed Science and Technology**, v. 21, p. 107-116, 1993.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; NEGRÃO, I. O.; HENNING, F. A.; CASTILHO, I. M.; PEIXOTO, P. P. Aprimoramento do pré-condicionamento das sementes de soja para a realização do teste de tetrazólio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 21, Curitiba. **Informativo Abrates**, v. 29, n. 4, p. 274, 2022. Disponível em: <https://www.cbsementes.com/files/anais2.pdf>. Acesso em: 01 set. 2022.

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P. Características fisiológicas da semente: vigor, viabilidade, germinação, danos mecânicos tetrazólio, deterioração por umidade tetrazólio, dano por percevejo tetrazólio e sementes verdes. In: LORINI, I. **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil - safra 2015/16**. Londrina: Embrapa Soja, 2017. p. 35-61. (Embrapa Soja. Documentos, 393).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P.; LORINI, I. Características fisiológicas da semente: vigor, viabilidade, germinação, danos mecânicos tetrazólio, deterioração por umidade tetrazólio, dano por percevejo tetrazólio e sementes verdes. In: LORINI, I. **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil - safra 2016/17**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. p. 31-59. (Embrapa Soja. Documentos, 403).

FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; Teste de tetrazólio para a determinação do vigor em sementes. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020b. p. 403-416.

FRANÇA-NETO, J. de B.; PÁDUA, G. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; CARVALHO, M. L. M.; HENNING, A. A.; LORINI, I. **Semente esverdeada de soja**: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico - Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 15p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 91).

FRANÇA-NETO, J. de B.; PEREIRA, L. A. G.; COSTA, N. P. da. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: FRANÇA-NETO, J. de B.; HENNING, A. A. (ed.). **Diagnóstico completo da qualidade da semente de soja - Versão Preliminar**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1985. p. 9-43.

FRANÇA-NETO, J. de B.; PEREIRA, L. A. G.; COSTA, N. P. da; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. **Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1988. 58 p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 32).

FRANÇA-NETO, J. de B.; POTTS, H. C. Efeitos da colheita mecânica e da secagem artificial sobre a qualidade da semente dura em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 1, n. 2, p. 64-77, 1979.

GADD, I. Biochemical tests for seed germination. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 16, p. 235-253, 1950.

GRABE, D. F. **Tetrazolium testing handbook for agricultural seed**. Stillwater: AOSA, 1970. 62 p.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods.** 3rd. ed. Zurich: International Seed Testing Association, 1995. 117 p.

HASEGAWA, K. On the determination of viability in seed by reagents. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 7, p. 148-153, 1935.

ISELY, D. Employment of tetrazolium chloride for determining viability of small grain seeds. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 42, p. 143-153, 1952.

ISTA - **International rules for seed testing.** Bassersdorf: International Seed Testing Association, 2017. 296 p.

ISTA - **International rules for seed testing.** Bassersdorf: International Seed Testing Association. 2019. 300 p.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; DIAS, D.C.F.S. Teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020b. p. 449-473.

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

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020a. 601p.

LAKON, G. Germination potential and germination tendency according to the present state of research. **Saalgutwirtsch**, v. 5, p. 180-183, 205-207, 1953.

LAKON, G. The topographical selenium method, a new method for the establishment of viability of cereal seed without a growth test. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 12, p. 1-18, 1940.

LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. **Plant Physiology**, v. 24, p. 389-394, 1949.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 425 p.

LEIST, N.; KRAMER, S.; JONITZ, A. **ISTA working sheets on tetrazolium testing.** Volumes I e II. Zurich: International Seed Testing Association, ISTA Tetrazolium Committee, 2003.

LINDENBEIN, W. Tetrazolium testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 30, p. 89-97, 1965.

MARCOS-FILHO, J. Teste de tetrazólio em sementes de solanáceas: tomate e pimentão. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J. **Vigor de sementes:** conceitos e testes. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020. p. 581-589.

MASON, S. C.; VORST, J. J.; HANKINS, B. J.; HOLT, D. A. Standard, cold, and tetrazolium germination tests as estimators of field emergence of mechanically damaged soybean seed. **Agronomy Journal**, v. 74, p. 546-550, 1982.

MILLER, A. L. (ed.). **AOSA/SCST Tetrazolium Testing Handbook**, 2010 edition. Moline, IL: AOSA/SCST, 2010. 402 p.

MOORE, R. P. Freeze injury to seed corn as evaluated in tetrazolium and growth tests. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 57, p. 138-140, 1967a.

MOORE, R. P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zurich: ISTA, 1985. 99 p.

MOORE, R. P. History supporting tetrazolium seed testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 34, p. 233-242, 1969.

MOORE, R. P. Seed facts from tetrazolium tests: freeze injury to seed corn as evaluated in tetrazolium and growth tests. In: 1967 SHORT COURSE FOR SEEDSMEN AND SEED TECHNOLOGY LABORATORY. **Proceedings...** Mississippi State: Mississippi State University, 1967b. p. 73-78.

MOORE, R. P. Soybean germination. **Seedsman's Digest**, v. 11, n. 3, p. 12, 52, 54-55, 1960.

MOORE, R. P. Tetrazolium as a universally acceptable quality test of viable seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 27, p. 795-805, 1962a.

MOORE, R. P. Tetrazolium best method for evaluating seed life. **Seedsman's Digest**, v. 17, n. 11, p. 38-40, 1966.

MOORE, R. P. Tetrazolium evaluation of the relationship between total germination and seed quality. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 51, p. 127-130, 1961.

MOORE, R. P. Tetrazolium seed testing developments in North America. **Journal of Seed Technology**, v. 1, p. 17-30, 1976.

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

MOORE, R. P. TZ checks your seed for quality. **Crops and Soils**, v. 15, n. 1, p. 10-12, 1962b.

MOORE, R. P.; SMITH, E. Tetrazolium: a useful research tool in studying causes for seed germination difficulties. [S. I.]: ASSOCIATION OF SEED CONTROL OFFICIALS OF THE SOUTHERN STATES, [1956]. p. 15-22.

MOREANO, T. B.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARQUES, O. J. Changes in the effects of weathering and mechanical damage on soybean seed during storage. **Seed Science and Technology**, v. 39, p. 604-611, 2011.

OSORIO, J. A. **Freezing injury in soybean seeds and relationships to germination and fungal colonization**. 1987. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Iowa State University, Ames.

PEREIRA, L. A. G. **Comparisons of selected vigor tests for evaluating soybean seed quality.** 1974. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Mississippi State University, Mississippi State.

PEREIRA, L. A. G.; ANDREWS, C. H. Comparação de alguns testes de vigor para avaliação da qualidade de sementes de soja. **Semente**, v. 2, n. 2, p. 15-25, 1976.

PERRY, D. A. **Handbook of vigour test methods.** Zurich: ISTA, 1981. 72 p.

PETERS, J. (ed.). **Tetrazolium testing handbook.** Ithaca: AOSA, 2007. 88 p. (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 29).

PORTER, R. H.; DURREL, M.; ROMM, H. J. The use of 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride as a measure of seed germinability. **Plant Physiology**, v. 22, p. 149-159, 1947.

SILVA, R.C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; PANOBIANCO, M. Teste de tetrazólio em sementes de girassol. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes:** conceitos e testes. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020. p. 475-483.

SINCLAIR, J. B. **Compendium of soybean diseases.** 2nd ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1982. 104 p.

SMITH, F. G. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. **Plant Physiology**, v. 27, p. 445-456, 1952.

SMITH, F. G.; THRONEBERRY, G. O. The tetrazolium test and seed viability. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 40, p. 105-109, 1951.

STEINER, A. M. Chemistry of tetrazolium salts and biochemistry of tetrazolium reduction. In: DON, R.; LEIST, N.; STEINER, A. M. (ed.). ISTA Tetrazolium Workshop 1997. **Proceedings...** Edinburgh: ISTA, 1997c. p. 55-68.

STEINER, A. M. History of the development of biochemical viability determination in seeds. In: DON, R.; LEIST, N.; STEINER, A. M. (ed.). ISTA Tetrazolium Workshop 1997. **Proceedings...** Edinburgh: ISTA, 1997a. p. 7-16.

STEINER, A. M. Seed vigour determination by means of the topographical tetrazolium test. In: DON, R.; LEIST, N.; STEINER, A. M. (ed.). ISTA Tetrazolium Workshop 1997. **Proceedings...** Edinburgh: ISTA, 1997b. p. 27-37.

STEINER, A. M.; KRUSE, M. On the origin and rise of topographical tetrazolium testing - a brief historical retrospect. In: LEIST, N.; KRAMER, S.; JONITZ, A. (ed.). **Working Sheets on Tetrazolium Testing**, v. 1. Bassersdorf: ISTA Tetrazolium Committee, 2003. p. 1-5.

TOLEDO, M. Z.; CAVARIANI, C.; FRANÇA-NETO, J. de B.; NAKAGAWA, J. Imbibition damage in soybean seeds affected by initial moisture content, cultivar and production location. **Seed Science and Technology**, v. 38, p. 399-408, 2010.

TURNIPSEED, S. G.; KOGAN, M. Soybean entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 21, p. 247-282, 1976.

VERTUCCI, C. W.; LEOPOLD, C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. *Plant Physiology*, v. 84, p. 1038-1043, 1987.

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. de B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 8.1-1-8.1.13.

VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020. p.431-447.

VILLAS BOAS, G. L.; GAZZONI, D. L.; FRANÇA-NETO, J. de B.; COSTA, N. P. da; HENNING, A. A.; ROESSING, A. C. **Efeito de cinco populações de percevejos sobre diversas características da soja cv. UFV-1**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1982. 13 p. (EMBRAPA-CNPSO. Pesquisa em Andamento, 3).

VON PINHO, E. V. R.; OLIVEIRA, J. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. de B. Teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. de B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2020. p. 417-430.

YAKLICH, R. W.; VIGIL, E. L.; WERGIN, W. P. Scanning electron microscopy of soybean seed coat. *Scanning Electron Microscopy*, v. 2, p. 991-1000, 1984.

YAKLICH, R. W.; WERGIN, W. F.; VIGIL, E. L. Special secretory cells in the soybean seed coat. *Protoplasma*, v. 34, p. 78-87, 1986.

ZORATO, M. F.; FRANÇA-NETO, J. de B.; ASTAFEIF, N. C.; TAKEDA, C. Nova interpretação na metodologia do teste de tetrazólio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., Curitiba. **Informativo Abrates**, v. 11, n. 2, p. 216, 2001.

ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA-NETO, J. de B. Sementes esverdeadas em soja: testes alternativos para determinar sua qualidade. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2007.

