



O TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE SOJA



Embrapa



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

presidente

FERNANDO HENRIQUE CARDOSO

ministro da agricultura e do abastecimento

FRANCISCO SÉRGIO TURRA

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

presidente

ALBERTO DUQUE PORTUGAL

diretores

DANTE DANIEL GIACOMELLI SCOLARI

ELZA ANGELA BATTAGGIA BRITO DA CUNHA

JOSÉ ROBERTO RODRIGUES PERES

Centro Nacional de Pesquisa de Soja

chefe geral

JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO

chefe adunto de pesquisa e desenvolvimento

PAULO ROBERTO GALERANI

chefe adjunto administrativo

VÂNIA BEATRIZ RODRIGUES CASTIGLIONI

chefe adjunto de comunicação e de negócios

AMÉLIO DALL'AGNOL

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas a:

Área de Negócios Tecnológicos da Embrapa Soja

Caixa Postal 231 - CEP 86001-970

Fone (043) 371-6000 - Fax (043) 371-6100

Londrina, PR

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa do Comitê Interno de Publicações da Embrapa Soja.

O TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE SOJA

José B. França Neto, Francisco Carlos Krzyzanowski,
Nilton Pereira da Costa



comitê de publicações

CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO
IVANIA APARECIDA LIBERATTI
FLÁVIO MOSCARDI
JOSÉ DE BARROS FRANÇA NETO
LÉO PIRES FERREIRA
NORMAN NEUMAIER
ODILON FERREIRA SARAIVA

ilustração

DANILO ESTEVÃO

capa

Sementes de soja com diferentes tipos de lesões causadas por percevejos
(Foto: J. B. França Neto)

impressão

2000 exemplares
Maio/1998

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

1. Soja - Semente - Teste de tetrazólio. I. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). II. Título. III. Série.

CDD 631.521

APRESENTAÇÃO

A avaliação da qualidade fisiológica da sementes de soja tem sido um grande desafio para os tecnologistas de sementes, devido à influência dos vários fatores que podem afetar a sua qualidade, nas diversas fases da sua produção. O teste de tetrazólio, por proporcionar o exame detalhado das estruturas essenciais da semente, tem contribuído para identificar esses fatores, apontando o mais importante, responsável pela redução dessa qualidade.

A Embrapa, através do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, tem contribuído para o aperfeiçoamento da metodologia do teste de tetrazólio. Os trabalhos de pesquisas desenvolvidos pela Equipe de Sementes têm como principal objetivo suprir a indústria e os programas de pesquisa em sementes com um teste eficaz que forneça informações confiáveis na avaliação da qualidade de semente.

A presente publicação é editada com a finalidade de compartilhar a utilização desses conhecimentos com toda a comunidade de profissionais de sementes.

PAULO ROBERTO GALERANI

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. HISTÓRICO	9
3. PRINCÍPIOS DO TESTE	12
4. MATERIAL NECESSÁRIO	13
5. INTERPRETAÇÃO	16
5.1. Diagnóstico das Causas da Deterioração da Semente de Soja.....	22
5.2. Identificação dos Níveis de Viabilidade	25
CLASSE 1 (mais alto vigor)	35
CLASSE 2 (alto vigor)	36
CLASSE 3 (vigor médio)	39
CLASSE 4 (vigor baixo).....	44
CLASSE 5 (vigor muito baixo)	49
CLASSE 6 (não viável)	50
CLASSE 7 (não viável)	51
CLASSE 8 (semente morta).....	54
5.3. Utilização da Ficha e Interpretação do Resultados	56
5.3.1. Interpretação dos Resultados	58
6. PRECISÃO DOS RESULTADOS	60
7. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA SOJA .	61
8. QUANDO APLICAR O TESTE DE TETRAZÓLIO	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICE	68



O TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE SOJA

Jose B. França Neto¹
Francisco Carlos Krzyzanowski¹
Nilton Pereira da Costa¹

1

INTRODUÇÃO

A produção e a utilização de sementes de alta qualidade são fatores básicos da maior importância para o sucesso da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Para que tais requisitos sejam alcançados, o sistema de controle de qualidade na indústria de sementes deve ser ágil, versátil e confiável, fornecendo resultados precisos e de maneira rápida. Algumas determinações, como pureza física e varietal, grau de umidade e índice de danos mecânicos podem ser realizadas em apenas alguns minutos, suprimindo, parcialmente, tais exigências.

A demora na obtenção dos resultados de germinação resulta numa séria limitação ao processo de tomada de decisões na indústria de sementes. Além da demora em sua execução, este teste, na sua forma de avaliação tradicional, não fornece informações quanto ao vigor, não permite de maneira precisa a identificação dos fatores que afetam a qualidade das sementes, e seus resultados são freqüentemente mascarados pela ocorrência de danos de embebição (França Neto *et al*, 1997) e pela presença de fungos como *Phomopsis* spp. e *Fusarium semitectum* (Henning & França Neto, 1980; França Neto & West, 1989a, 1989b). Tais limitações podem resultar em sérios prejuízos aos produtores de sementes por afetar negativamente a tomada de decisões relativas à colheita, ao processamento, à armazenagem e à comercialização.

¹ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Soja; Caixa Postal 231; 86001-970 Londrina, PR; endereço eletrônico: franca@cnpso.embrapa.br

Dentre os diversos métodos 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 também pelo grande número de informações fornecidas pelo mesmo. O teste, além de avaliar a viabilidade e o vigor dos lotes de sementes, fornece o diagnóstico das possíveis causas responsáveis pela redução de sua qualidade: danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejo, que são os problemas que mais comumente afetam a qualidade fisiológica da semente de soja. Porém, além desses, os danos de secagem, de estresse hídrico e de geada podem também ser facilmente visualizados pelo teste. Aliás, 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, pode identificar os pontos de origem desses problemas, permitindo que ações corretivas sejam adotadas, resultando na produção de sementes de alta qualidade.

No caso da soja, graças à publicação das primeiras versões do presente manual (França Neto *et al.*, 1985; França Neto *et al.*, 1988) e também devido aos diversos treinamentos oferecidos pelos profissionais da Embrapa Soja e de outras instituições, temos a certeza de que o teste é executado em todos os laboratórios de análise de sementes brasileiros que trabalham com tal espécie. Em consequência, hoje, pode-se dizer que o Brasil é o líder mundial de utilização do teste de tetrazólio a nível de rotina. Alguns números podem ilustrar a significância de tal liderança: para a semeadura dos 12,5 milhões de hectares previstos para a safra 1997/98, foram necessárias cerca de um milhão de toneladas de sementes de soja, ou seja, aproximadamente 20 milhões de sacas de 50 kg, o que representa ao redor de 100.000 lotes. Caso 80% desses lotes, em média, forem analisados pelo menos duas vezes pelo teste de tetrazólio, durante o processo de controle de qualidade, isto resulta em cerca de 160.000 análises realizadas em 1997, 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 bons padrões de qualidade. Isto tem resultado

num sistema de controle de qualidade de alta confiabilidade, assegurando maiores lucros aos produtores de sementes, através da produção de sementes de alta qualidade a menor custo. Segundo informações que constantemente recebemos de diversos produtores de sementes, isto tem resultado em índices próximos de zero de reposição de sementes e de ressemeadura.

2

HISTÓRICO

“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, p. 2). 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). Uma síntese dos principais fatos que contribuíram para o seu desenvolvimento é apresentada a seguir.

O desenvolvimento de testes rápidos, visando a determinação da qualidade fisiológica das sementes, tem sido um dos principais objetivos dos tecnólogos de semente há vários anos, principalmente a partir do final do século passado, quando o sistema de produção de semente começou a ser organizado em diversos países da Europa.

Diversos testes, baseados na observação da coloração, do aspecto, do peso volumétrico e da velocidade de embebição das sementes foram inicialmente utilizados, visando a rápida avaliação da viabilidade das mesmas, porém sem nenhuma precisão. 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 destas enzimas não era realizada em sementes individualizadas. Nessa mesma época, diversos corantes, como o índigo carmine, azul de metileno, vermelho neutro, ácido sulfúrico e verde malaquita

foram testados e a falta de precisão resultou no insucesso da adoção de tais métodos.

Conforme relatado por Moore (1969), as primeiras tentativas que apresentaram sucesso na avaliação da viabilidade das sementes com bio-corantes foram realizadas por Turina, na 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 carmine.

No início dos anos 30, Hasegawa do Japão, trabalhando com sementes arbóreas, aperfeiçoou a aplicação de sais de telúrio e de selênio para a coloração de embriões de sementes. A grande 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 (Associação Internacional de Análise de Sementes) na Europa. Durante esta viagem, Hasegawa revelou alguns detalhes de sua metodologia de análise ao cientista alemão F.E. Eidmann, que, por sua vez, aprimorou o método do selênio (Moore, 1969).

O grego, Georg Lakon, trabalhando em Hohenhein, Alemanha, desde o início da década de 20, vinha dedicando-se com grande interesse por trabalhos na área de fisiologia de sementes. Ele aperfeiçoou o método do selênio, desenvolvido por Hasegawa e Eidmann, 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. Segundo Cottrell (1948) e Isely (1952), após a indicação por Kühn e Jerchel (1941) de que diversos compostos de tetrazólio poderiam se reduzir em tecidos vivos, Lakon testou vários desses sais e concluiu que o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio era o mais apropriado para o teste topográfico. Lakon desenvolveu a metodologia para sementes de várias espécies de cereais e para milho.

Conforme relatado por Moore (1976), 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 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 Flemion e Poole, do Instituto Boyce Thompson de Nova Iorque, por Goodsell, da companhia de sementes de milho Pioneer, de Johnston, Iowa, e por Bennett, da Universidade Estadual de Iowa.

Avanços significativos sobre o teste ocorreram nos anos 50. Vários pesquisadores de diversas universidades Americanas alcançaram resultados básicos importantes. Dentre eles, destacaram-se Isely, Bass, Smith e Throneberry, da Universidade Estadual de Iowa, e Parker, da Universidade de Idaho.

Na década de 60, 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, que abordava a 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 Virginia, também contribuíram com melhorias ao teste.

Em 1970, outro marco importante foi atingido. A utilização do teste foi aceita pela AOSA (Associação Oficial dos Analistas de Sementes), através da publicação do Manual do Teste de Tetrázólio (Grabe, 1970). Em 1983, a AOSA publicou o Manual de Testes de Vigor (AOSA, 1983), que abordava a metodologia do teste para 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 1943 e 1987 ele publicou 230 trabalhos sobre o teste e editou o Manual do Teste de Tetrázólio (Moore, 1985), publicado pela ISTA. Tal publicação contém detalhes sobre a metodologia do teste para mais de 650 espécies.

O teste de tetrázólio foi também adotado com sucesso em diversos países. No Brasil, o teste foi introduzido por diversos profissionais da Área de Sementes, que receberam treinamentos na Universidade Estadual do Mississippi. Através do Convênio AGIPLAN/Ministério da Agricultura com tal Universidade, foram traduzidos pelo Prof. Flávio Rocha, da Universidade Federal de Pelotas, dois

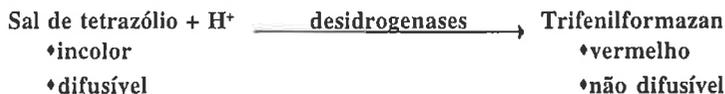
manuais sobre o teste: “O Teste de Tetrazólio para Viabilidade da Semente” (Delouche *et al.*, 1976) e “Manual do Teste de Tetrazólio em Sementes” (Grabe, 1976).

O teste foi aprimorado para a soja pelos pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, da Embrapa, que publicaram, em 1981, o primeiro manual específico para a soja (França Neto, 1981), que foi o embrião para o manual seguinte, “Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Soja” (França Neto *et al.*, 1985). O referido manual foi atualizado e colocado em uma forma mais didática, sendo lançado alguns anos após (França Neto *et al.*, 1988). Tais manuais continuam a classificação de vigor da semente de soja em diferentes classes de viabilidade. Hoje, o teste é rotineiramente utilizado em todos os laboratórios de análise de sementes que trabalham com soja no Brasil.

3

PRINCÍPIOS DO TESTE

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases (AOSA, 1983; Bulat, 1961; Copeland *et al.*, 1959; Moore, 1973; Smith, 1952; Smith e Throneberry, 1951) as quais catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos. Quando a semente de soja é imersa na solução incolor de TCT, esta é difundida através dos tecidos, ocorrendo nas células vivas a reação de redução que resulta na formação de um composto vermelho, estável e não-difusível, conhecido por trifetilformazan:



Quando o TCT é reduzido, formando o trifetilformazan, isto indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade

celular e do tecido. Portanto, a coloração resultante da reação é uma indicação positiva da viabilidade através da detecção da respiração a nível celular. Tecidos não viáveis não reagem e conseqüentemente não são coloridos.

Sendo o tecido vigoroso, haverá a formação de um vermelho carmin claro; se o tecido está em deterioração, um vermelho mais intenso será formado, em virtude da maior intensidade de difusão da solução de TCT pelas membranas celulares comprometidas de tais tecidos; se o mesmo é não viável, a redução do sal não ocorrerá, e o tecido morto contrastará como branco (não colorido) com o tecido colorido viável. A observação de tais diferenças de cor, juntamente com o conhecimento de diversas características das sementes, permitem a determinação da presença, da localização e da natureza dos distúrbios que podem ocorrer nos tecidos embrionários (Moore, 1973).

4

MATERIAL NECESSÁRIO

Para a realização deste teste é necessário o seguinte:

a) reagente:

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

b) vidraria:

- ♦ placas de Petri;
- ♦ frasco de vidro (becker) ou copos de plástico (para cafezinho), volume 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 redução da solução de tetrazólio em trifenílformazan, quando em contato com certos metais, conforme relatado por Bulat (1961).

- c) lâmina de barbear;
- d) estufa ou germinador, com temperatura de 35°C a 40°C;
- e) lupa de seis aumentos (6X) com iluminação fluorescente, de preferência circular;
- f) refrigerador para armazenagem das amostras;
- g) papel de germinação.

Preparo da solução

Recomenda-se utilizar solução na concentração de 0,075%, pois a mesma permite uma coloração adequada das sementes, permitindo a visualização com maior precisão de danos mecânicos recentes, causados por abrasão, que normalmente não seriam detectados com o uso de soluções mais concentradas (0,5 a 1,0%), conforme sugerido na literatura internacional (AOSA, 1983; Delouche *et al*, 1962; Grabe, 1970; Moore, 1985). Além disso, a utilização de solução nessa concentração é mais econômica: com um vidro de 10 g de TCT pode-se testar a viabilidade de até 200 lotes de semente, utilizando a solução a 0,075%. Caso a solução utilizada tivesse a concentração de 1,0%, apenas 15 amostras poderiam ser avaliadas com 10 g do sal.

Prepara-se, inicialmente, a solução estoque a 1,0%, misturando 10,0 g do sal de tetrazólio em 1,0 litro de água destilada. Esta solução deve ser armazenada em frasco de vidro de cor âmbar, em local escuro e fresco, de preferência na geladeira.

Quando necessário, prepara-se a solução de trabalho a 0,075%, que também deve ser armazenada com os mesmos cuidados da solução estoque:

1,0 litro de solução a 0,075% = 75 ml solução estoque (1,0%) + 925 ml de H₂O.

A água utilizada no preparo da solução de trabalho pode ser destilada ou da rede de abastecimento, desde que apresente o pH entre 6 e 7, e não seja salobra.

Preparo das Sementes

❖ Amostragem

A amostra de trabalho deve ser representativa do lote e coletada conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (RAS; Brasil, 1992).

❖ Número de Sementes

Para o teste de germinação (em areia ou rolo de papel) as RAS recomendam a utilização de 400 sementes por amostra, (8 sub-amostras com 50 sementes cada). Para o teste de tetrazólio é sugerida a utilização de 100 sementes (2 sub-amostras com 50 sementes cada), conforme sugerido pela AOSA (1983), Moore (1973), França Neto (1981) e França Neto *et al.* (1985; 1988).

A necessidade de um menor número de sementes para o teste de tetrazólio é devida às condições homogêneas a que são submetidas todas as sementes durante o seu preparo, o que, normalmente, não ocorre durante a execução do teste padrão de germinação. Os resultados desse último teste podem ser afetados por diversos fatores: gradientes de umidade e temperatura comumente encontrados nos germinadores; diferenças do pH e da textura do papel; variação na quantidade de água adicionada ao substrato; e a presença de fungos, como *Phomopsis* spp. e *Fusarium semitectum* nas sementes testadas.

❖ Pré-condicionamento

As sementes devem ser embaladas em papel de germinação umedecido e mantidas nestas condições por um período de 16 horas, na temperatura de 25°C. Para evitar a perda de umidade, as embalagens devem permanecer em câmara úmida, ou seja, em saco plástico, em germinador ou em dessecador com água em lugar de sílica-gel.

Os tegumentos de sementes escuras de soja normalmente não permitem a difusão da solução de tetrazólio. Portanto, os mesmos devem ser removidos das sementes antes do processo de coloração.

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

❖ Coloração

Após o pré-condicionamento, as sementes são colocadas em frascos bequer ou copinhos de plástico, sendo totalmente submersas na solução de tetrazólio (0,075%). As sementes devem permanecer assim a uma temperatura de 35°C a 40°C por aproximadamente 150 a 180 minutos. Esta temperatura pode ser obtida utilizando-se uma estufa ou um germinador.

É bom 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 retiradas do ambiente a 35°C - 40°C e são, em seguida, lavadas com água comum e devem ser mantidas submersas em água até o momento a avaliação. Caso as amostras não sejam avaliadas de imediato, devem ser mantidas em refrigerador, por até 12 horas.

5

INTERPRETAÇÃO

Apesar de não utilizar equipamentos e reagentes caros, o teste requer que o analista de sementes seja bem treinado nas técnicas do teste. É básico o conhecimento das estruturas anatômicas da semente pelo analista. Experiência, imaginação e julgamento crítico são também necessários para que o analista possa visualizar os tipos de anormalidades de plântulas que são revelados pelo teste de tetrazólio. A precisão do 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; 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 e cor

dos tecidos após a coloração, pela localização e pelo tamanho das lesões. A habilidade do analista de sementes em 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 seis aumentos (6 X), com iluminação fluorescente. As sementes devem ser avaliadas uma a uma, seccionando-as longitudinalmente através do centro do eixo embrionário (Fig. 1), com o auxílio de uma lâmina de barbear. 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.

Após o seccionamento da semente, as suas metades são separadas, 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 por todos os tipos de danos.

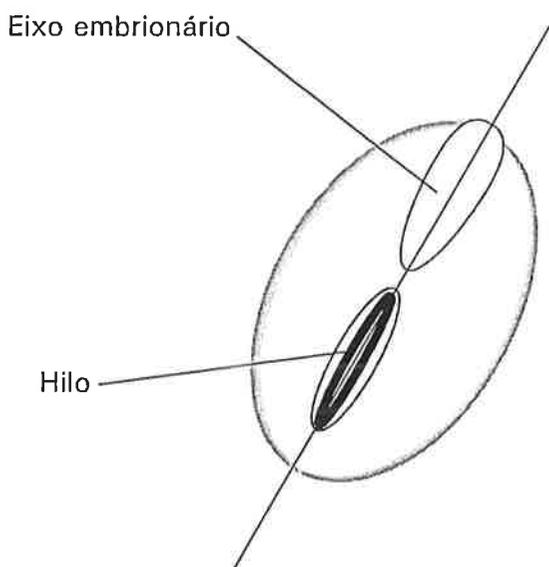


FIG. 1. Ilustração do local de corte da semente de soja, através da parte central do eixo embrionário e do hilo.

Cuidados especiais devem ser tomados durante a avaliação do eixo radícula-hipocótilo, que é composto por dois tipos de tecidos: o **córtex** e o **cilindro central** (Fig. 2). O cilindro central é a estrutura mais crítica do eixo radícula-hipocótilo. Como uma regra geral, caso um dano venha a ocorrer nesse eixo, mas não é suficientemente profundo para danificar o cilindro central, a semente pode então ser considerada viável. Entretanto, se o dano atingir o cilindro central, a semente será considerada não viável (Fig. 3).

Além do cilindro central, outra região crítica na semente de soja, que deve ser observada com muita atenção, é a **região vascular** (Fig. 3 e 4). Através dessa região passam os vasos que conectam o eixo embrionário aos cotilédones, sendo, portanto, de suma importância para o transporte de materiais de reserva dos cotilédones à plântula em desenvolvimento, nas fases iniciais de germinação e emergência. Caso tal 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

De acordo com Moore (1985), tecidos vigorosos tendem a colorir gradualmente e uniformemente e, quando embebidos, apresentam-se túrgidos (Figs. 5 e 6). A ocorrência de vermelho 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. O branco identifica tecidos mortos, que não apresentam a atividade enzimática necessária 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.

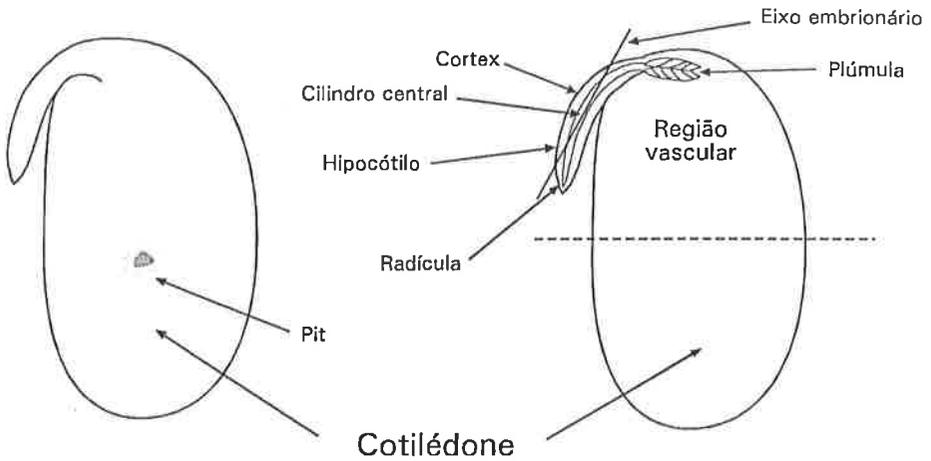


FIG. 2. Corte longitudinal de uma semente de soja, mostrando suas estruturas embrionárias.

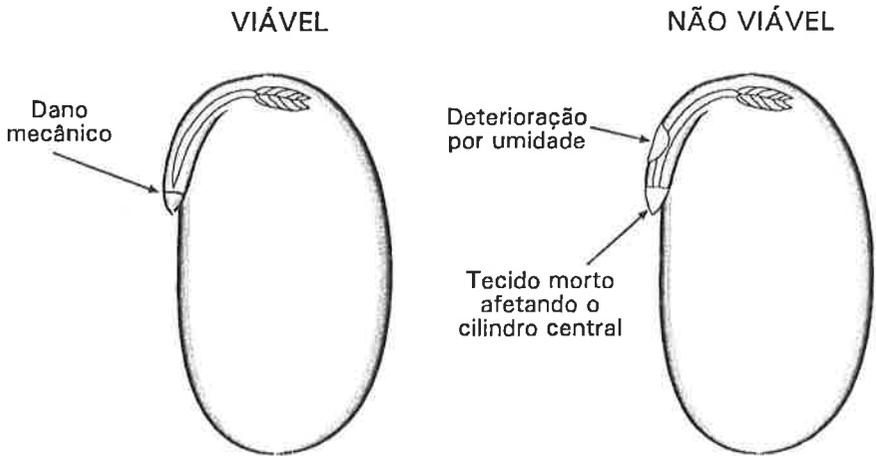


FIG. 3. Corte longitudinal de duas sementes de soja, mostrando a ocorrência de danos no eixo radícula-hipocótilo.



FIG. 4. Detalhe da região vascular e da plúmula de semente de soja vigorosa. Note a região meristemática e a diferenciação do córtex e cilindro central do hipocótilo. (Foto: J. B. França Neto).

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 (Fig. 6). Moore (1985) caracteriza os 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 correta avaliação das mesmas e devem ser consideradas em combinação. Por exemplo, uma pequena lesão



FIG. 5. Padrão de coloração pelo tetrazólio de semente de soja altamente vigorosa. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 6. Padrão de coloração pelo tetrazólio da face interna de semente de soja altamente vigorosa. (Foto: J. B. França Neto).

causada por percevejo, que danifica o hipocótilo, atingindo o cilindro central, resultará em conseqüências mais sérias que uma lesão de grande extensão, localizada na metade inferior de um cotilédone, longe do eixo embrionário e da região vascular.

5.1. 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) são danos mecânicos, deterioração por umidade, danos causados por percevejos, danos por seca e altas temperaturas, danos de secagem e danos de geada. Cada tipo de dano está associado com lesões características, que são descritas resumidamente a seguir.

❖ **Danos mecânicos** (Figs. 7 a 12) resultam de impactos físicos durante as operações de colheita, trilha, secagem, beneficiamento, transporte e semeadura das sementes de soja. Há três tipos de danos mecânicos que são facilmente identificados pelo teste de tetrazólio: rachaduras, amassamentos e abrasões. O último é identificado pela presença de lesões de coloração vermelho escura, caso tenham ocorrido recentemente, ou por lesões brancas com tecidos flácidos, se não recentes. Um analista inexperiente pode confundir o pit (Fig. 2) com lesões de danos mecânicos. 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).

❖ **Deterioração por umidade** (Figs. 12 a 19), conforme descrita por Moore (1973), França Neto (1984) e por Pereira e Andrews (1976), resulta da exposição das sementes de soja a ciclos alternados de condições ambientais úmidas e secas na fase final de maturação, antes da colheita. Tais danos apresentam uma maior magnitude, caso ocorram em ambientes quentes, típicos de regiões tropicais e sub-tropicais. Sementes com deterioração por umidade apresentam rugas características nos cotilédones, na região oposta ao hilo, ou sobre o eixo embrionário. Após a coloração, essas sementes revelarão a presença de lesões

de coloração vermelho intensa ou branca sobre os tecidos embrionários adjacentes a tais rugas. Frequentemente, tais lesões estão associadas com a infecção por certos fungos. As lesões podem ser profundas e caso o cilindro central esteja danificado, ou se mais de 50% dos tecidos de reserva 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 (Figs. 13 e 14).

❖ **Danos de percevejo** (Figs. 20 a 22) podem afetar seriamente a qualidade 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 e Kogan, 1976). Outras espécies, como *Piezodorus guildini* (Westwood) e *Euschistus heros* (Fabricius), podem também causar sérios danos às sementes. Ao se alimentar das sementes de soja, o percevejo as inocula com a levedura *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). Essa infecção forma lesões circulares características, muitas vezes enrugadas e profundas. Os tecidos lesionados são mortos e flácidos, apresentando a coloração típica esbranquiçada, às vezes esverdeada, amarelada ou acinzentada. Um anel de coloração vermelho intenso separa, na maioria dos casos, os tecidos mortos dos vigorosos (Fig. 22). Lesões múltiplas podem ocorrer numa única semente e caso haja sobreposição das mesmas, o sintoma circular típico não será distinguível. Com frequência, uma pequena perfuração causada pelo inseto pode ser observada no centro das lesões circulares. Puncturas profundas podem ocorrer, resultando na inoculação dos tecidos centrais das sementes pelo fungo *N. coryli*. Tais lesões nem sempre podem ser observadas na superfície externa das sementes.

❖ **Danos por seca e altas temperaturas** (Fig. 23) 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. 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 (covichas), 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 escuras e esbranquiçadas espalhadas sobre os cotilédones, com maior concentração das mesmas na região próxima ao eixo embrionário (Fig. 23). 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.

❖ **Danos de secagem excessiva** são conseqüência da secagem das sementes a graus de umidade abaixo de 10,0%. São caracterizados pela constatação de elevados índices de sementes de soja com trincas transversais nos cotilédones, sempre na mesma posição (Fig. 24). Quando a semente de soja é secada excessivamente, ela está sujeita a quebrar preferencialmente nessa posição, quando exposta a um impacto mecânico.

❖ **Danos por geada** em sementes de soja são mais comuns em regiões de clima temperado. A expressão desse tipo de dano depende do estágio de desenvolvimento das sementes, da temperatura e do período de exposição das mesmas às condições de baixa temperatura (Moore, 1973). Sementes imaturas geralmente morrem e permanecem verdes com exposição a geadas. Por outro lado, sementes secas e maduras resistem bem a esse tipo de estresse. Os tecidos danificados são identificados no teste de tetrazólio pela coloração de eixos embrionários num vermelho 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).

Todas as lesões acima mencionadas podem ser intensificadas durante o armazenamento. Tal intensificação dependerá das condições de temperatura e de umidade relativa do ar no armazém. Danos mecânicos, principalmente os de abrasão, e deterioração por umidade são os tipos de dano que mais comumente progridem em termos de deterioração no armazém, podendo resultar em severas reduções de germinação e de vigor, principalmente nos meses finais do armazenamento.

Mais de um desses tipos de danos podem ocorrer em uma única semente (Fig. 12). Outros tipos de danos podem também ocorrer devido ao envelhecimento da semente ou à ocorrência de condições impróprias durante o armazenamento. Condições quentes e úmidas durante o armazenamento resultarão em severa deterioração. No teste de tetrazólio, os sintomas iniciais de deterioração por armazenamento inadequado podem ser confundidos com sinais de deterioração por umidade. Neste caso, o diagnóstico mais preciso da causa da deterioração pode ser obtido com a execução de 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 armazenagem; elevada infecção por fungos de campo, como *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., ou *Cercospora kikuchii*, caracteriza a deterioração no campo.

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 tais sintomas.

5.2. Identificação dos Níveis 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), citados por Copeland *et al.*, (1959) e Moore (1961, 1962b, 1967) definiram um sistema de classificação para sementes de milho e 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).

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



FIG. 7. Sementes de soja com lesões típicas de danos mecânicos. Esquerda: semente com dano latente (por abrasão). Direita: dano imediato (semente trincada). (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 8. Dano mecânico crítico no eixo radícula-hipocótilo, atingindo o cilindro cenral. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 9. Dano mecânico por abrasão sobre o eixo radícula-hipocótilo, atingindo o cilindro central. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 10. Dano mecânico afetando totalmente os tecidos meristemáticos da região da plúmula. (Foto: J. B. França Neto).

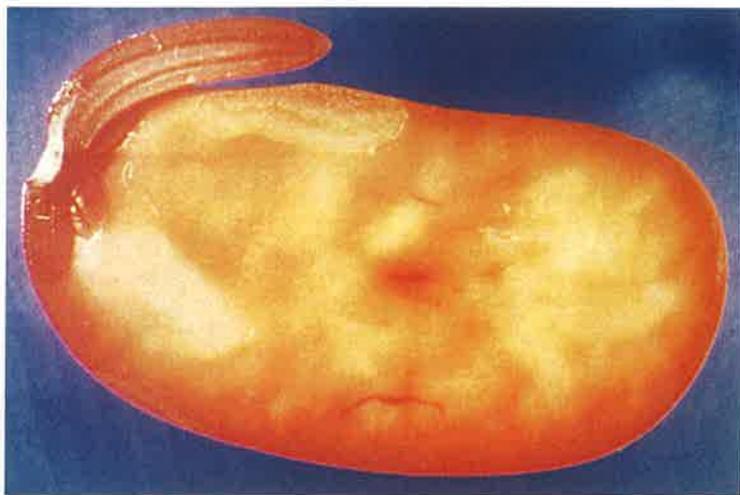


FIG. 11. Pequeno dano mecânico afetando região vital do cilindro central e da região meristemática da plúmula. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 12. Semente de soja com lesões típicas de dano mecânico na radícula e cotilédone e de deterioração por umidade superficial no córtex do hipocótilo. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 13. Semente de soja com lesão típica de deterioração por umidade. Note a simetria das lesões e os sintomas no eixo embrionário. (Foto: J. B. França Neto).

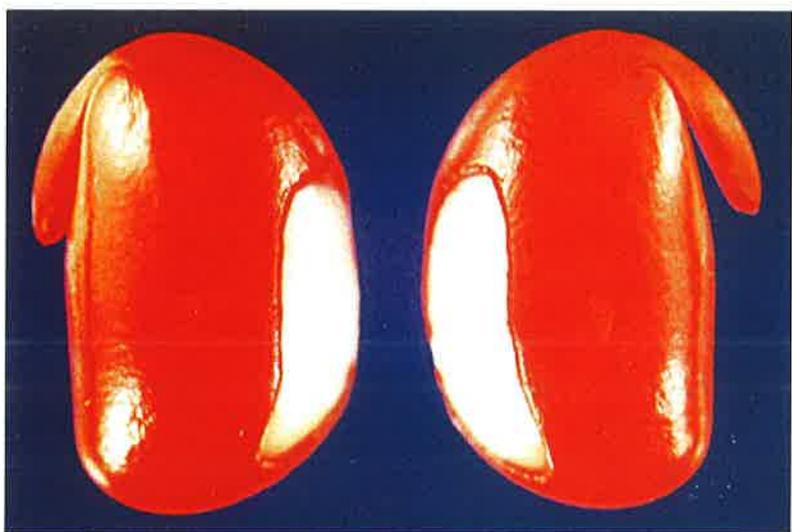


FIG. 14. Semente de soja com lesão típica de deterioração por umidade. Note a simetria das lesões nos cotilédones. (Foto: J. B. França Neto).

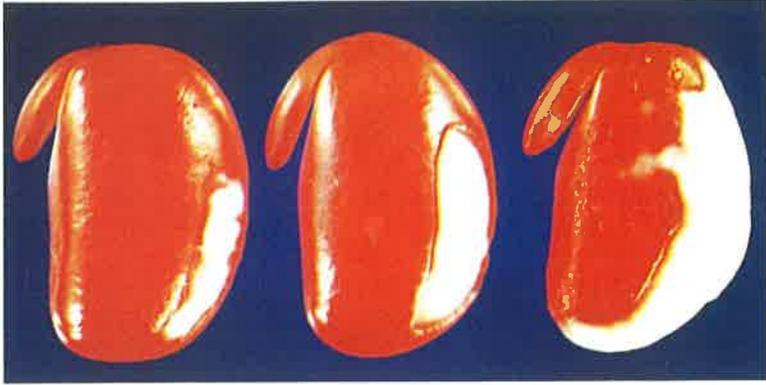


FIG. 15. Sementes de soja com três níveis de deterioração por umidade. (Foto: J. B. França Neto).

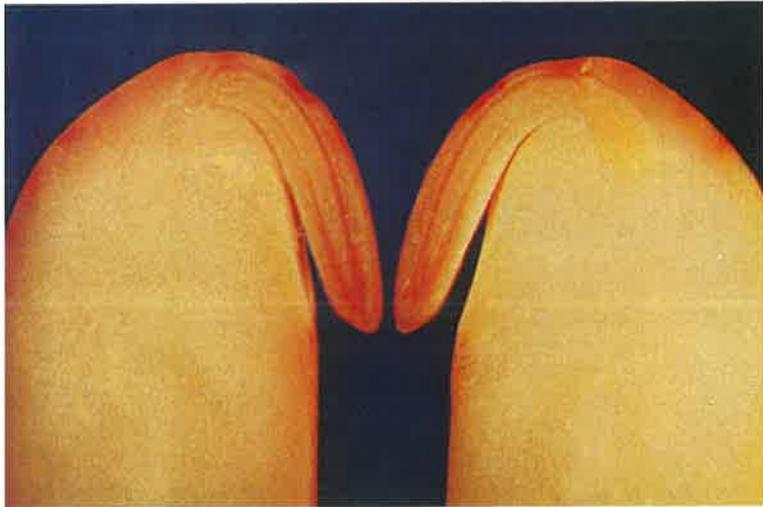


FIG. 16. Semente de soja com lesão superficial de deterioração por umidade no córtex do hipocótilo. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 17. Lesões intensas de deterioração por umidade no campo em sementes de soja. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 18. Sementes de soja com plúmulas coloridas em função de deterioração intensa no campo. (Foto: J. B. França Neto).

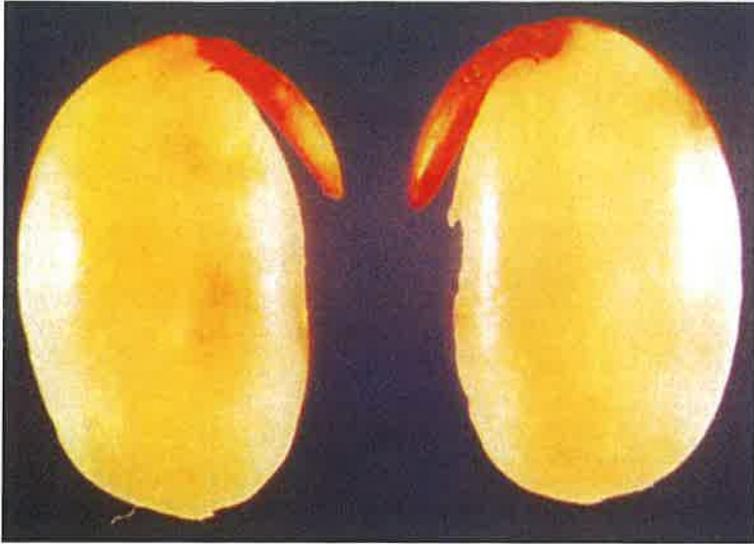


FIG. 19. Sementes de soja classificadas na Classe 8, em função de intensa deterioração por umidade. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 20. Sementes de soja com lesões típicas de danos de percevejo sobre os cotilédones. (Foto: J. B. França Neto).



FIG. 21. Sementes de soja com lesões resultantes de danos por percevejo nos cotilédones e no eixo embrionário. (Foto: J. B. França Neto).

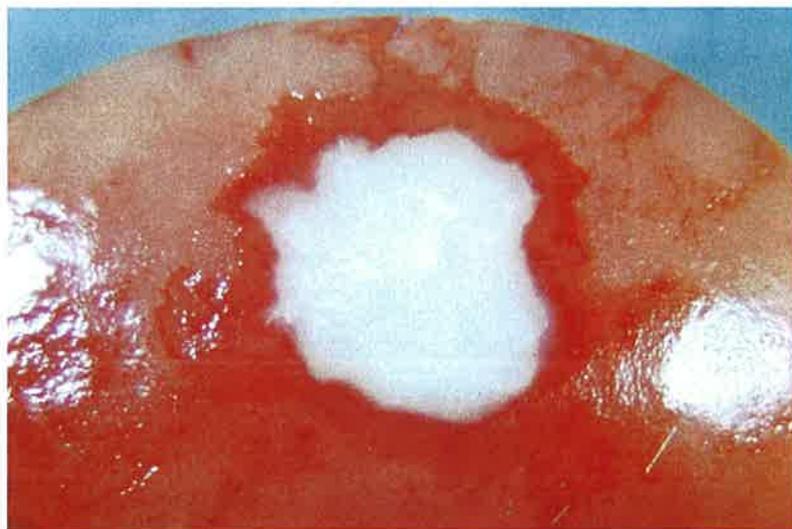


FIG. 22. Lesão típica de dano de percevejo no cotilédone. Note a forma circular da lesão e o anel de tecido em deterioração (vermelho intenso) ao redor do tecido morto. (Foto: J. B. França Neto).

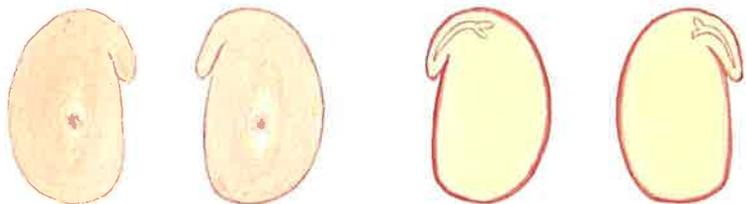


FIG. 23. Sementes de soja com lesões causadas pela ocorrência de altas temperaturas e deficiência hídrica durante a fase de enchimento de grãos. Topo: sementes secas; abaixo: sementes coloridas. (Foto: J. B. França Neto).

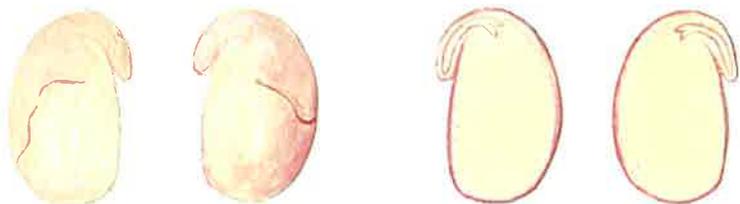


FIG. 24. Sementes de soja com dano característico de secagem excessiva: lotes com tal problema apresentam altos índices de sementes com trincas na mesma posição transversal dos cotilédones. (Foto: J. B. França Neto).

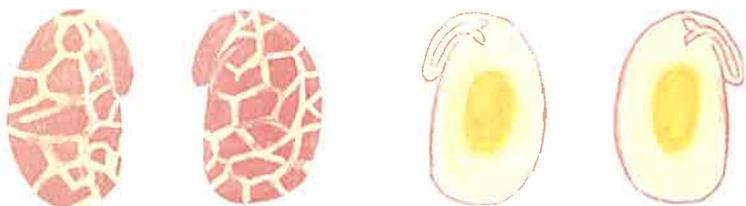
CLASSE 1 (mais alto vigor)



- 1a. Coloração uniforme e superficial, indicando penetração lenta do sal de tetrazólio; parte interna (entre os cotilédones) não apresentando coloração, salvo nos bordos; todos os tecidos com aspectos normal e firme.



- 1b. Quase igual à anterior, exceto a ocorrência de faixas ou estrias mais intensamente coloridas, uma a duas por cotilédone devido à deterioração por umidade, as quais são superficiais (um a dois décimos de milímetro de profundidade).

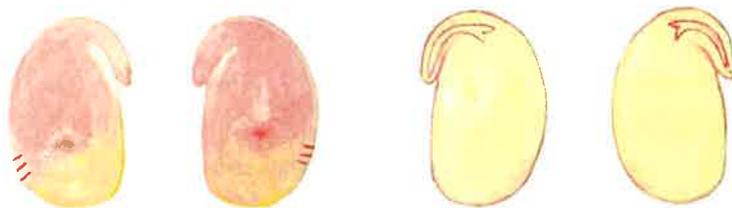


- 1c. Semente com aspecto de mosaico devido a um processo lento de embebição (Fig. 25); os tecidos se apresentam firmes e na face interna dos cotilédones geralmente aparece uma cavidade central de coloração amarelada, indicando insuficiente absorção de água. Pode ocorrer em sementes semi-permeáveis. Tais sintomas podem também estar relacionados a uma embebição inadequada durante o pré-condicionamento, ou devido ao uso de sementes com grau de umidade muito baixo.

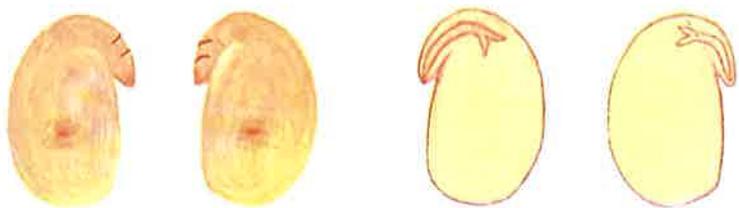


FIG. 25. Semente de soja com aspecto de mosaico devido a um processo inadequado de embebição. (Foto: F.C. Krzyzanowski).

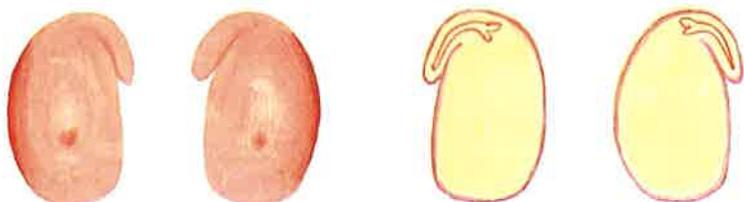
CLASSE 2 (alto vigor)



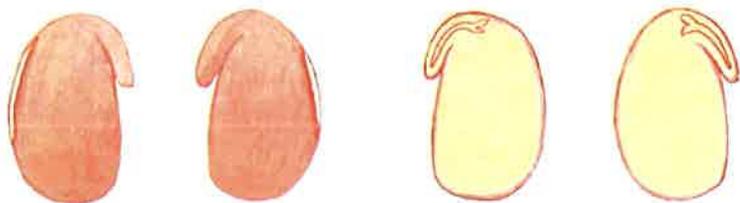
- 2a. Pequenas estrias localizadas nos cotilédones na região oposta ao eixo embrionário, as quais são originadas por pressão do tegumento sobre os cotilédones causado por sucessivas hidratações (expansão) e desidratações (contração) de ambos em proporções diferentes. Isto resulta em enrugamento do tegumento e lesão nos cotilédones, onde a respiração e a atividade enzimática são mais intensas, ocasionando a evidência da cor vermelho carmin forte. As estrias não devem ser superior a 0,5 mm de profundidade; a parte interna dos cotilédones apresenta-se como em 1a. Danos nos cotilédones são geralmente simétricos.



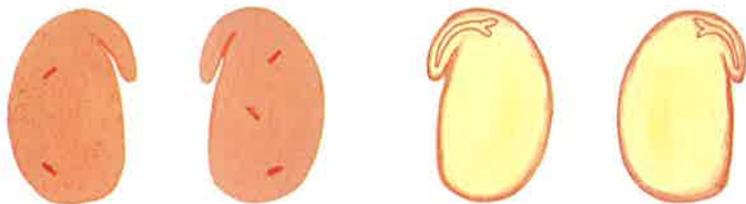
- 2b. Pequenas estrias devidas ao mesmo motivo referido em 2a., mas localizadas sobre o eixo embrionário. Tais lesões devem mostrar-se apenas superficialmente, não apresentando qualquer alteração interna, como em 1a. Danos nos cotilédones são geralmente simétricos.



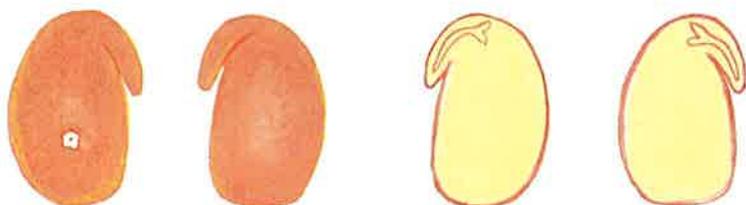
- 2c. Área de coloração mais intensa, não maior do que da ilustração, provavelmente devido à junção de pequenas estrias (2a), formando uma faixa contínua. A parte interna dos cotilédones apresenta-se como em 1a. Danos nos cotilédones são geralmente simétricos.



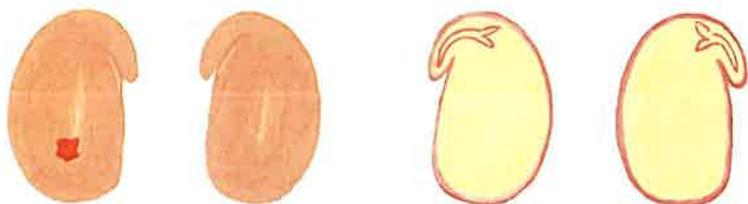
- 2d. Área de tecido sem coloração (branco leitoso) portanto, morto, não maior do que a da ilustração. A parte interna dos cotilédones como em 1a. Todas as lesões referidas de 2a e 2d, em geral, se apresentam simetricamente nos dois cotilédones, sendo esta uma característica utilizada para diferenciar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



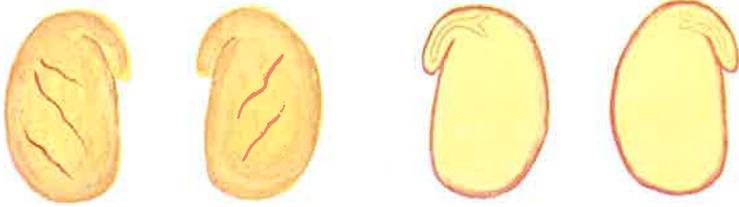
- 2e. Pequenos danos mecânicos sobre a superfície externa dos cotilédones e com uma profundidade máxima de 0,5 mm. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se como em 1a.



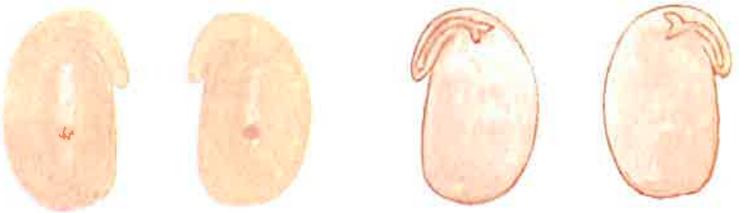
- 2f. Dano(s) devido(s) à picada de percevejo, com uma área total não maior do que a mostrada na ilustração e profundidade máxima de 0,5 mm. A localização deve ser afastada da região vascular (isto é, abaixo de uma linha imaginária, passando transversalmente pela metade do cotilédone). A região afetada 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 estágio mais avançado da maturação, quando a semente já está em fase adiantada de desidratação.

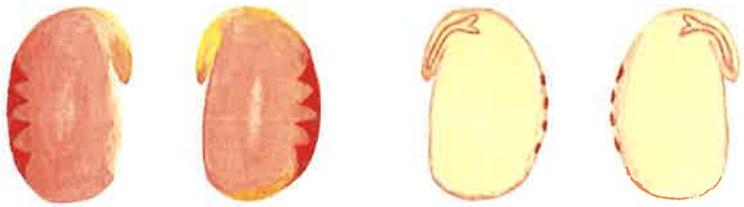


2h. Mais do que duas estrias por cotilédone (não profunda, como em 1b). Superfície interna dos cotilédones como em 1a.

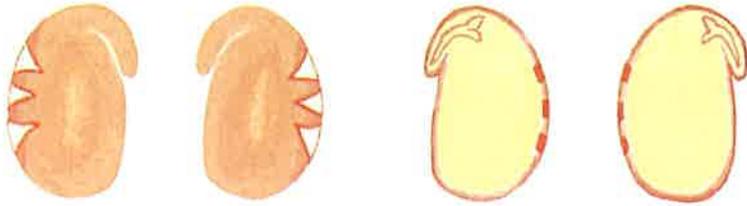


2i. Coloração da superfície externa dos cotilédones como em 1a. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se também com coloração uniforme devido à penetração da solução de tetrazólio através de um rompimento no tegumento.

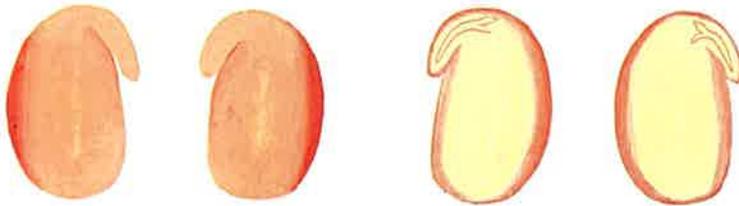
CLASSE 3 (vigor médio)



3a. Estrias de coloração vermelho carmin fortes localizadas nos cotilédones, na região oposta ao eixo embrionário, com uma área total não maior do que à 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.



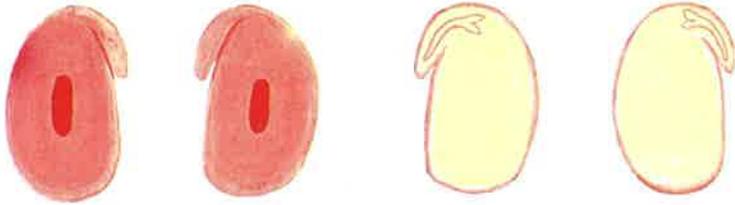
- 3b. Dano quase idêntico ao anterior, mas com as estrias podendo apresentar algumas áreas de coloração branco-leitosa, indicando tecidos mortos. Superfície interna dos cotilédones como em 3a.



- 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.



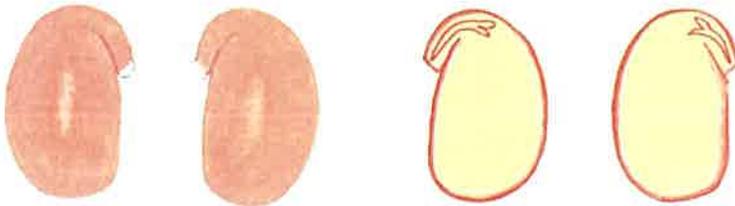
- 3d. Dano quase idêntico ao anterior, mas a faixa pode ser de tecido de coloração branco-leitosa (tecido morto) numa área não maior do que a da ilustração. Superfície interna com uma faixa de tecido morto numa espessura máxima de 0,5 mm.



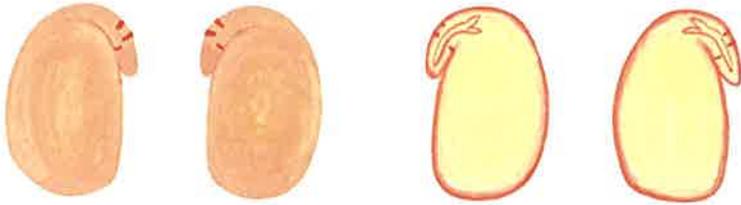
- 3e. Área de coloração vermelho intenso na superfície externa de ambos os cotilédones não maior do que a da ilustração e com profundidade máxima de 0,5 mm (dano mecânico). Superfície interna como em 1a.



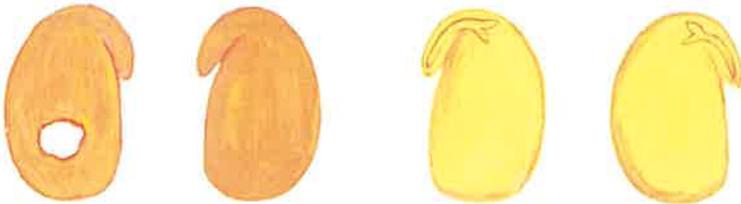
- 3f. Estrias localizadas na superfície do eixo embrionário não se aprofundando além do córtex, ou seja, sem afetar o cilindro central.



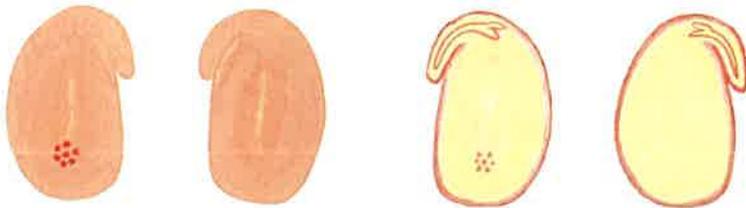
- 3g. Extremidade da radícula mostrando coloração branco-leitosa, indicando tecido morto, sem no entanto afetar o cilindro central.



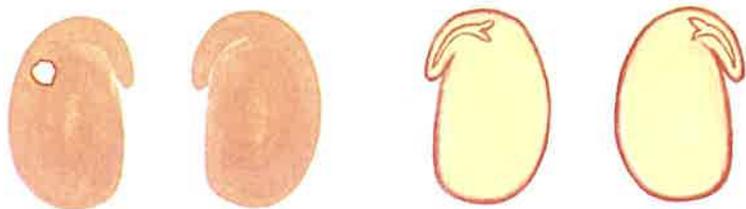
- 3h. Pequenas fraturas localizadas no eixo embrionário não afetando, porém, o cilindro central.



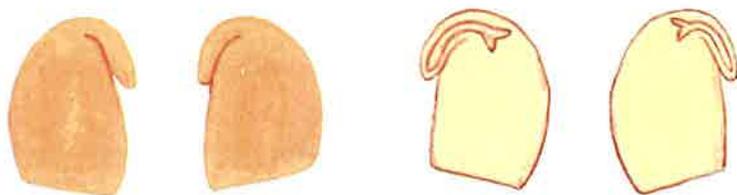
- 3i. Picada(s) de percevejo, com a parte central necrosada (tecido morto, ou seja, coloração branco-leitosa, com aspecto pulverulento) ou não, com área total não maior do que a mostrada na ilustração. A área lesionada não deve ter profundidade superior a 0,5 mm e deve estar localizada na região abaixo de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone (região não vascular). Superfície interna dos cotilédones como em 1a.



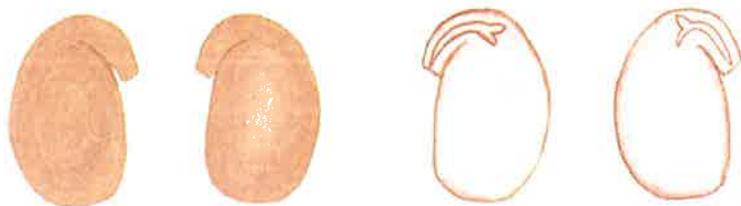
- 3j. Picada(s) de percevejo, com área total não maior do que a mostrada na ilustração, sem áreas necrosadas (mortas), localizada(s) abaixo de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone. Picada(s) afetando a superfície interna de um dos cotilédones que se mostra enrugado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



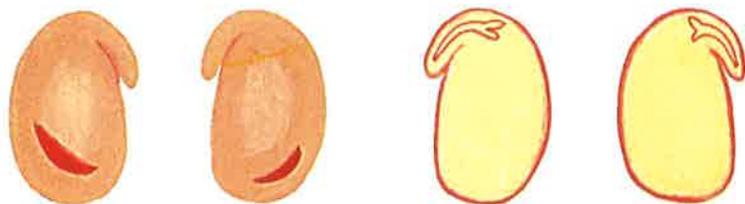
- 3k. Picada(s) de percevejo, com área total não maior do que a representada na ilustração, localizada acima de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone. A região lesionada não deve ser superior a 0,5 mm de profundidade e localizada de tal maneira a não afetar a região acima da linha imaginária (região vascular).



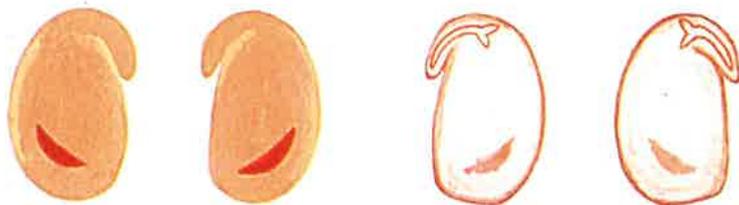
- 3l. Fratura dos cotilédones na região oposta ao ponto de ligação do eixo embrionário numa extensão máxima como a mostrada na ilustração. A superfície interna dos cotilédones pode se apresentar como em 1a ou 2i.



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

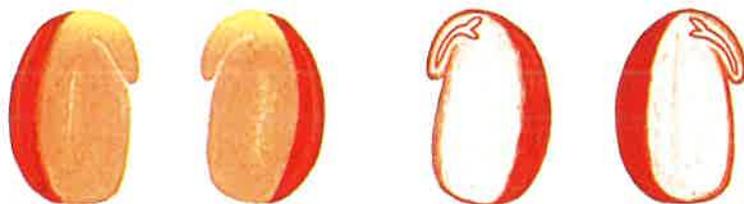


- 3n. Dano(s) de origem mecânica com ou sem tecido morto, com profundidade máxima de 0,5 mm ou sem afetar a região vascular. A superfície interna dos cotilédones como em 1a ou 2a.

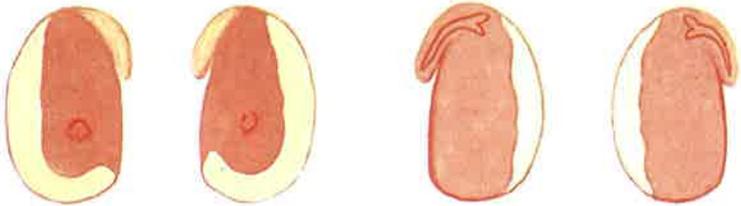


- 3o. Dano(s) de origem mecânica localizado(s) abaixo da região vascular, afetando a superfície interna dos mesmos como mostrado na ilustração.

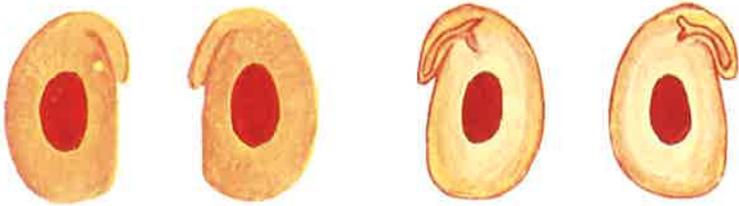
CLASSE 4 (vigor baixo)



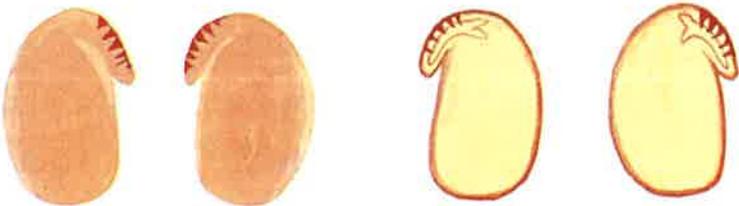
- 4a. Área de coloração vermelho carmin forte em ambos os cotilédones, cobrindo menos do que a metade dos mesmos. A superfície interna também apresenta área de coloração vermelho carmin forte. A região vascular, porém, não deve estar afetada.



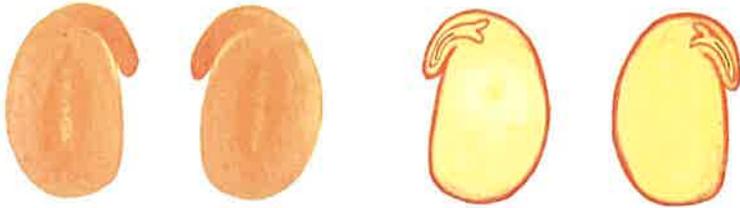
4b. Dano quase idêntico ao anterior, apresentando, porém, tecidos mortos (coloração branco-leitosa).



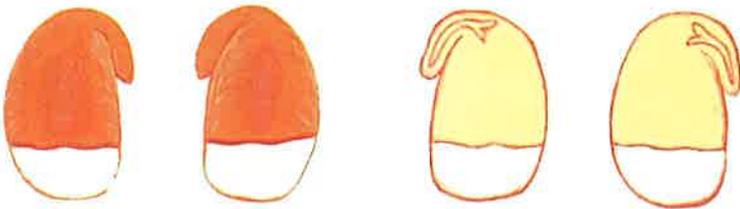
4c. Área de coloração vermelho carmin forte no centro dos cotilédones (externa e internamente), afetando parte da região vascular. No entanto, próximo ao ponto de ligação, os vasos devem estar funcionais, permitindo o transporte das reservas dos cotilédones para o eixo embrionário.



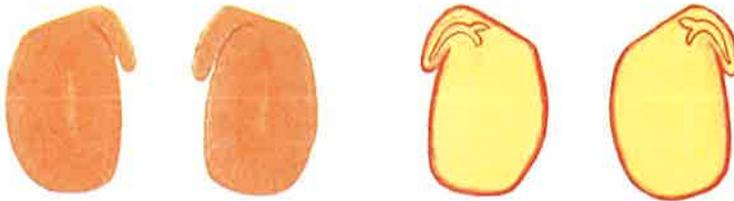
4d. Estrias localizadas sobre o eixo embrionário afetando inclusive o cilindro central, porém, numa extensão menor do que a metade de sua espessura.



- 4e. Área de coloração vermelho carmin forte no eixo embrionário mas com as estrutura do cilindro central e do córtex ainda perfeitamente definidas.



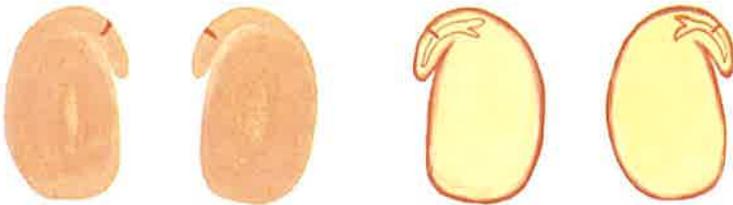
- 4f. Área de tecido morto numa extensão menor do que a metade da área total dos cotilédones.



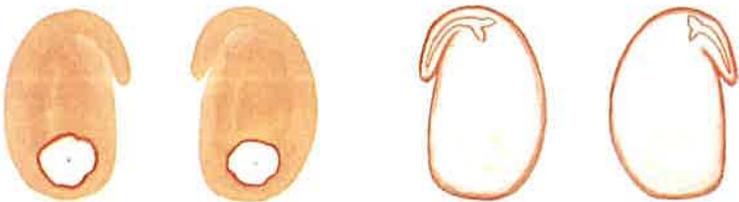
- 4g. Fratura de um ou ambos os cotilédones na região próxima ao ponto de ligação, mas deixando a região vascular em grande parte intacta.



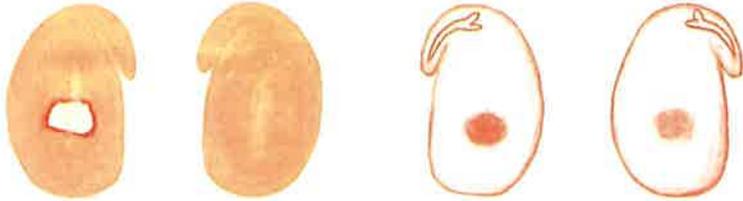
4h. Dano(s) de origem mecânica na região vascular dos cotilédones afetando a face interna e parte da região vascular. Os vasos, porém, devem permanecer funcionais próximos ao ponto de ligação dos cotilédones com o eixo embrionário.



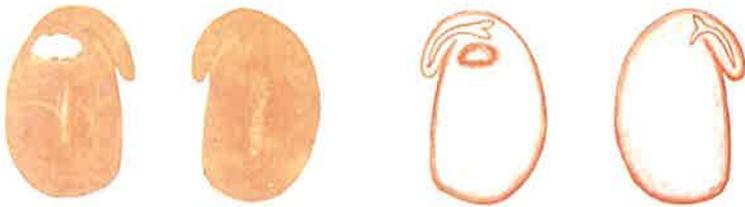
4i. Fraturas sobre o eixo embrionário, afetando o córtex e o cilindro central, porém, numa extensão menor do que a metade de sua espessura.



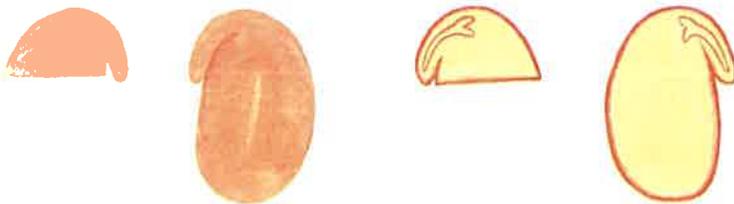
4j. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo com área necrosada (tecido morto), atingindo a parte interna dos cotilédones mas localizado(s) abaixo da região vascular.



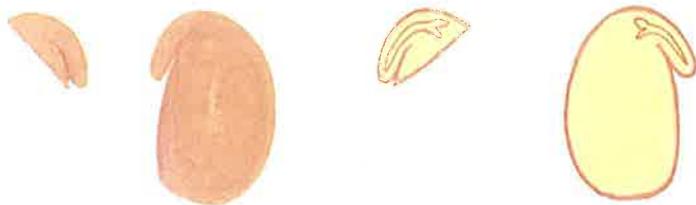
- 4k. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo localizado(s) em apenas um cotilédone, tornando-o praticamente não funcional e afetando apenas levemente o segundo cotilédone na face íterna, e o qual se mantém quase integral.



- 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).



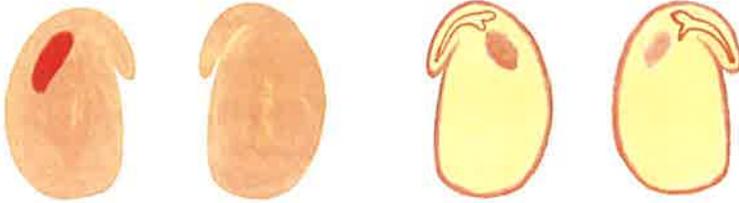
- 4o. Fratura de ambos os cotilédones, porém, numa extensão inferior à metade dos mesmos.

CLASSE 5 (vigor muito baixo)

As classes de vigor 5 e 6 (esta última não viável) são as de interpretação mais problemática. Quando a amostra analisada comporta uma elevada porcentagem de sementes nessas classes, os resultados variam e discrepâncias são esperadas.



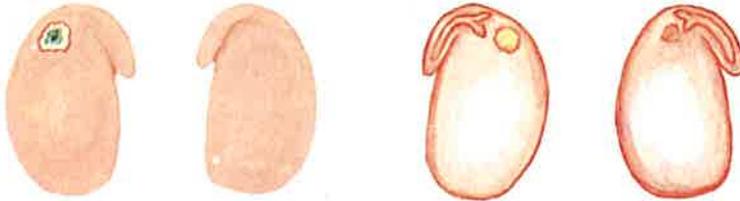
- 5a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando um aspecto de mosaico, com áreas de um colorido vermelho carmin forte entremeadas de áreas mais claras e até mortas. Os tecidos afetados atingem uma profundidade superior a 1 mm, mas inferior à metade da espessura dos cotilédones. A superfície interna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

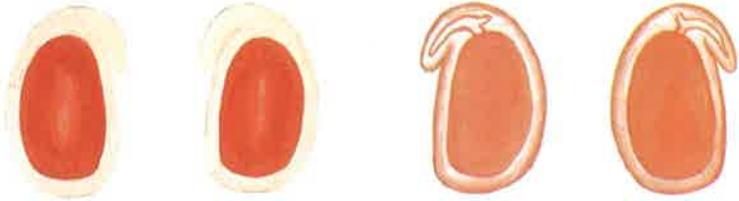


- 5d. Dano(s) devido(s) à picada de percevejo, afetando a região do ponto de ligação como em 5b.

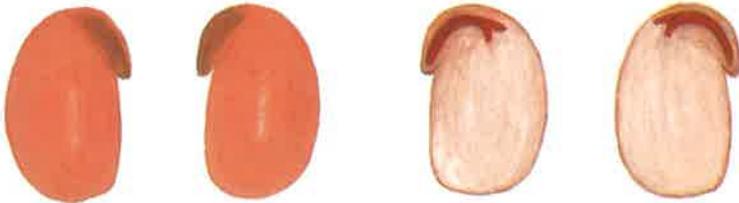
CLASSE 6 (não viável)

Os danos dessa classe são semelhantes aos da classe 5 (vide ilustrações), porém, com maior extensão das áreas afetadas, o que torna a semente inviável.

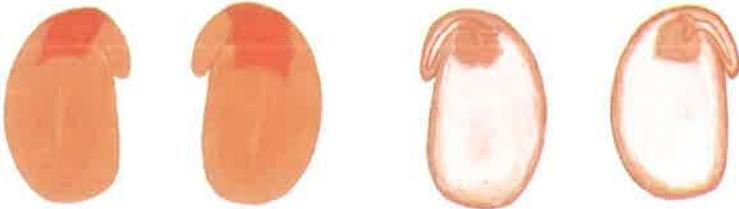
CLASSE 7 (não viável)



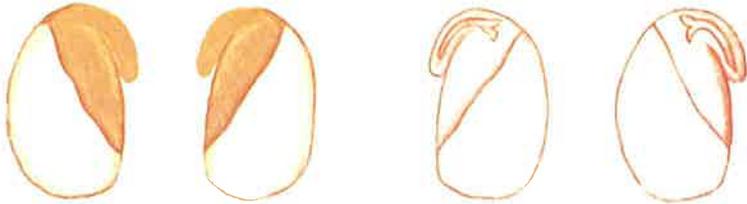
- 7a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando um aspecto de mosaico com áreas de um colorido vermelho carmin forte entremeadas de outras mais claras e mortas. Os tecidos afetados atingem a metade (ou mais) da espessura dos cotilédones, bloqueando completamente a região vascular.



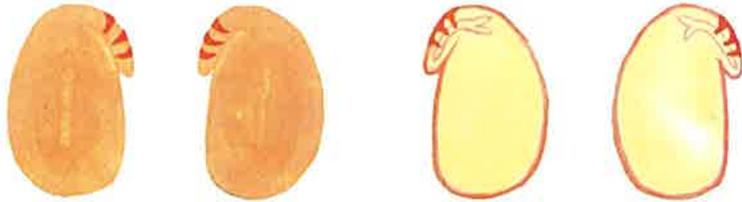
- 7b. Eixo embrionário apresentando uma coloração vermelho carmin forte, distribuída por toda a sua extensão.



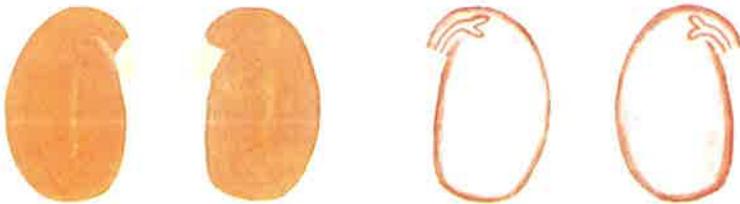
- 7c. Coloração vermelho carmin forte no ponto de ligação de ambos os cotilédones, atingindo a região vascular. Coloração branco-leitosa (indicativo de tecidos mortos) também pode ocorrer.



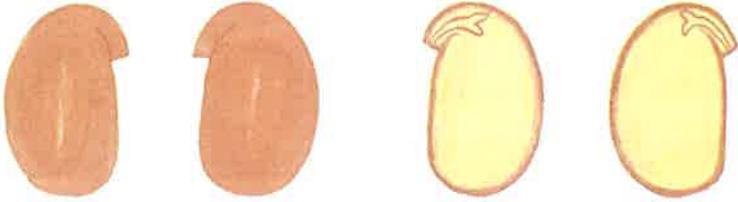
- 7d. Tecidos mortos de coloração branco-leitosa numa extensão superior à metade da superfície total da semente.



- 7e. Estrias de coloração vermelho carmin forte sobre o eixo embrionário, atingindo uma profundidade superior à metade da espessura do cilindro central.



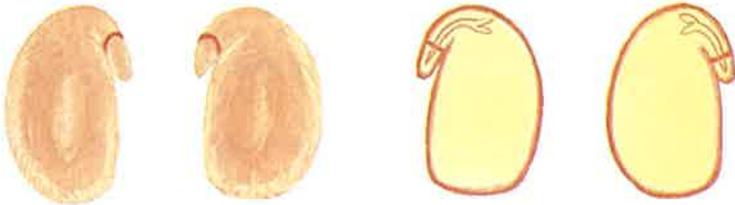
- 7f. Extremidade da radícula apresentando coloração branco-leitosa (tecido morto) atingindo não só o córtex, mas também o cilindro central.



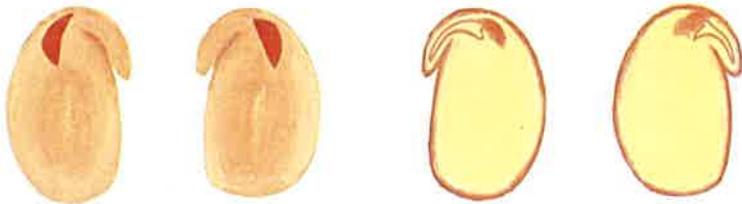
7g. Fratura da extremidade da radícula, afetando não só o córtex, mas também o cilindro central.



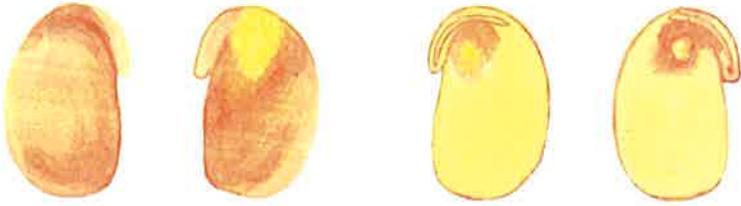
7h. Fratura dos cotilédones com a parte remanescente sendo inferior à metade da superfície total da semente.



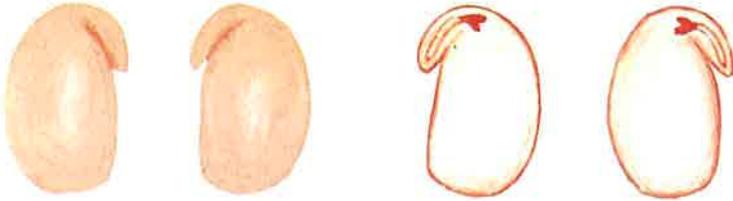
7i. Fratura do eixo embrionário, secionando o cilindro central.



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



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



- 7l. Plúmula de coloração vermelho carmin forte (deteriorada).

CLASSE 8 (semente morta)

Semente totalmente morta (branca, às vezes com tonalidade rósea), apresentando tecidos flácidos.

❖ **Sementes Duras:** a constatação de sementes duras na amostra pode requerer procedimentos especiais. Quando uma amostra apresentar um baixo índice de sementes duras, ou seja de 2% 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 tais valores, as mesmas devem ser escarificadas com lixa “zero”, sendo novamente pré-condicionadas e coloridas, realizando-se a seguir a leitura das mesmas.

❖ **Anormalidades embrionárias:** alguns tipos de embriões anormais podem ser constatados no teste de tetrazólio (Figs. 26 e 27). 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



FIG. 26. Anormalidade de formação embrionária em sementes de soja, detectada no teste de tetrazólio. (Foto: J.B. França Neto).



FIG. 27. Semente de soja com anormalidade embrionária. Note o posicionamento anormal do eixo embrionário. (Foto: J.B. França Neto).

sementes não produzirão plântulas normais, conforme a exemplificada na Fig. 27. Entretanto, sementes com a anormalidade ilustrada na Fig. 26 podem resultar em plântulas normais, desde que não apresentem danos sérios em seus componentes vitais.

5.3. Utilização da Ficha e Interpretação do Resultados

É sugerida a utilização de uma ficha para a avaliação do teste de tetrazólio, (ver apêndice). Após a avaliação de cada semente, deve-se registrar nessa ficha o nível de viabilidade e a identificação do(s) tipo(s) de dano(s) que possa(m) ter determinado o referido nível. Sugere-se utilizar a seguinte simbologia:

- X : sem dano
- L : dano mecânico (DM)
- ∩ : dano causado por percevejo (DP)
- P : dano causado por umidade (DU)
- ∩ : DM + DP
- ℘ : DM + DU
- ℘ : DU + DP
- ℘ : DU + DM + DP

Observação Importante: é comum a ocorrência de sementes classificadas nos níveis de 6 a 8 (não viáveis) com dois ou mais tipos de danos (Fig. 12). Quando isso ocorrer 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 fraturou totalmente o 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 (Fig. 28). 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

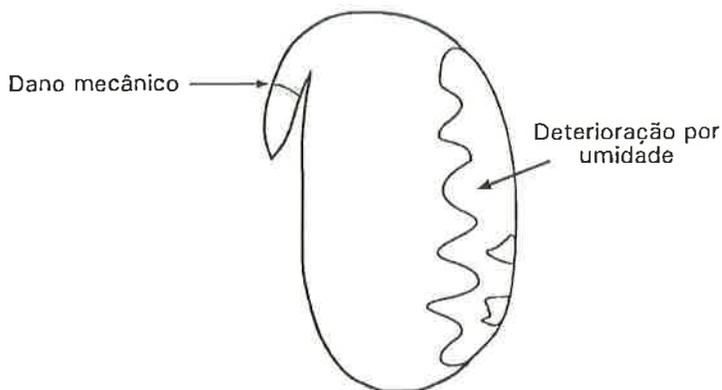


FIG. 28. Esquema de semente de soja com deterioração por umidade nos cotilédones e com dano mecânico que fraturou o eixo embrionário.

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 no Apêndice.

Após a avaliação de todas as sementes (2 X 50), determina-se a porcentagem das classificadas em cada nível de viabilidade, calculando o potencial de germinação (somatório dos valores classificados nos níveis 1 a 5) e o vigor (somatório dos níveis 1 a 3), conforme ilustrados nas fichas preenchidas (ver Apêndice).

No rodapé da ficha anotam-se os resultados das duas sub-amostras, calculando-se as médias do vigor e da viabilidade. Calculam-se também os percentuais 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 sub-amostra, o número de sementes que apresentaram sinais de danos mecânicos, por exemplo; multiplica-se o total por "2", para obter-se o valor percentual. Faz-se o mesmo para a segunda sub-amostra, calculando-se a seguir a média desses dois valores. O mesmo procedimento deve ser seguido para os outros tipos de danos.

Para o nível (6-8), faz-se o mesmo, porém, no caso de sementes que apresentem mais de um tipo de dano, deve-se computar apenas aqueles danos que efetivamente contribuíram para a perda de viabilidade, ou seja, que foram marcados com maior intensidade. Veja as fichas contidas no Apêndice para maiores esclarecimentos.

Necessidade de Reanálise: a amostra deverá ser reanalisada quando ocorrer uma variação igual ou superior a 10% entre os resultados de viabilidade obtidos para as duas sub-amostras.

5.3.1. Interpretação dos Resultados

O nível de vigor pode ser interpretado através da seguinte classificação:

- ♦ vigor muito alto: igual ou superior a 85%
- ♦ vigor alto: entre 84% e 75%
- ♦ vigor médio: entre 74% e 60%
- ♦ vigor baixo: entre 59% e 50%
- ♦ vigor muito baixo: igual ou inferior a 49%

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

As porcentagens de danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejo nos níveis 6 a 8, indicam a porcentagem de perda de viabilidade ocasionada pelos referidos danos, sendo consideradas com relação à qualidade de semente como:

- ♦ sem restrição: inferior a 6%
- ♦ problema sério: entre 7% a 10%
- ♦ problema muito sério: superior a 10%

Se um problema sério ou muito sério é diagnosticado pelo analista de sementes através do teste de tetrazólio, por exemplo, um alto nível de ocorrência de danos mecânicos, ou danos de percevejos, uma ação corretiva pode ser adotada, para melhorar a qualidade das sementes produzidas. O produtor de sementes pode ser orientado, por exemplo, a ajustar o sistema de trilha da sua máquina colhedora, ou a 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 altos índices de vigor e de viabilidade, não apresentando problemas sérios relativos a nenhum dos tipos de danos. O lote nº 2 tem viabilidade de 82%, sendo o vigor (65%) classificado como médio, devido principalmente a problemas sérios (10%) com danos mecânicos. O lote nº 3 tem 75% de viabilidade e vigor muito baixo (49%), devido a problemas sérios de danos de percevejo (9,0%) e muito sérios (12,0%) de deterioração por umidade. As fichas utilizadas para anotar os resultados dos lotes 1 a 3 constam do Apêndice.

Um exemplo da praticidade da utilização dos resultados do teste de tetrazólio é ilustrado por Costa *et al.* (1987). Altos níveis de danos mecânicos foram constatados em sementes de soja produzidas no Estado do Paraná. Após a constatação do problema, os produtores foram instruídos em como melhorar a regulagem do sistema de trilha da máquina colhedora. Em dois anos, os níveis de danos mecânicos em sementes de soja foram drasticamente reduzidos a níveis inferiores a 6%.

TABELA 1. Resultados do teste de tetrazólio obtidos em três lotes de sementes de soja.

Parâmetro	Lote nº 1	Lote nº 2	Lote nº 3
Viabilidade	93	82	75
Vigor ¹	86	65	49
Danos Mecânicos	2 ²	10	5
Deterioração por Umidade	4 ²	5	12
Danos de Percevejo	1 ²	4	9

¹ Nível de vigor: muito alto: $\geq 85\%$; alto: 75 a 84%; médio: 60 a 74%; baixo: 50 a 59%; muito baixo: $\leq 49\%$.

² Porcentagem de perda de viabilidade causada pelo respectivo tipo de dano.

6

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 padrão, de acordo com as RAS (Brasil, 1976); b) envelhecimento acelerado através do método de “gerbox”; c) teste de tetrazólio, conforme descrito por França Neto *et al.* (1985); e d) emergência em areia. Após o teste padrão de germinação, o teste de tetrazólio foi classificado como o mais preciso, superando os outros dois testes avaliados.

Em condições normais, os resultados de viabilidade obtidos nos testes de germinação e tetrazólio devem ser semelhantes, permitindo diferenças de até 5% entre os mesmos. 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 ou por danos causados por percevejo; g) sementes infectadas por fungos, tais como *Phomopsis* spp., *Fusarium 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 padrão demonstrou que quando havia diferenças entre os resultados, o problema estava sempre ligado ao teste de germinação.”

7

VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA SOJA

7.1. Vantagens

- a) o teste não é afetado por diversas condições que podem afetar o teste padrão de germinação
- b) foca atenção às condições físicas e fisiológicas do embrião de cada semente individualizada;
- c) permite rápida avaliação da viabilidade e do vigor (8 horas para a soja);
- d) permite a identificação de diferentes níveis de viabilidade
- e) fornece o diagnóstico da causa da queda da viabilidade das sementes;
- f) o equipamento necessário é simples e barato; e
- g) um analista experiente pode ter um rendimento de quatro a cinco amostras (2 x 50 sementes) por hora de trabalho.

7.2. Limitações

- a) requer treinamento especial sobre a estrutura embrionária da semente e sobre técnicas de interpretação;
- b) é relativamente tedioso, uma vez que as sementes são avaliadas uma a uma, requerendo, desta forma, experiência e paciência;
- c) embora seja um teste relativamente rápido, ele consome um maior número de homem-hora que o teste de germinação padrão;
- d) não mostra a eficácia de tratamentos químicos, nem as injúrias que estes possam causar; e
- e) requer do analista capacidade de decisão pelas 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.

8

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 após o beneficiamento e a secagem, durante o armazenamento e antes da semeadura.

Ele tem sido utilizado com sucesso mesmo antes da colheita: cerca de um ou dois dias antes da colheita, faz-se uma amostragem de plantas de um determinado campo de produção, trilhando-se as sementes manualmente. Através da avaliação dessas sementes pelo teste de tetrazólio, pode-se verificar os níveis de vigor, viabilidade e da ocorrência de danos de percevejo e de deterioração por umidade. Dependendo dos resultados obtidos, poderá ser decidido com segurança se o referido campo apresenta qualidade para ser colhido como semente ou como grão. Isto pode resultar em economias significativas aos produtores de sementes, no que se refere a evitar despesas desnecessárias de transporte, secagem, beneficiamento, embalagem e armazenamento de lotes de sementes de baixa qualidade.

OBSERVAÇÃO FINAL

As informações contidas no presente manual estão ilustradas no vídeo “DIACOM: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. 1. Metodologia do teste de tetrazólio” (DIACOM, 1994), que está disponível no Setor de Publicações da Embrapa Soja.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. The Seed Vigor Test Committee. **Seed vigor testing handbook**. [S.l.], 1983. 88p. The Handbook on Seed Testing, Contribution, 32).
- BOWLING, C.C. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the southern green stink bug on soybeans. **Journal of Economic Entomology**, College-Park, v.73, p.1-3, 1980.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1976. 198p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- 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**, Copenhagen, v.26, p.686-696, 1961.
- COPELAND, T.G.; BRUCE, C.F.; MIDYETTE Jr., J.W. The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 49, p.134-141, 1959.
- COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; HENNING, A.A. Avaliação da qualidade da semente de soja produzida no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, p.1157-1165, 1987.
- COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; OLIVEIRA, M.C.N. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília (no prelo). 1998.
- COTTRELL, H.J. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.25, p.123-131, 1948.

- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **The tetrazolium test for seed viability**. Mississippi: Mississippi State University, 1962. 63p. (Technical Bulletin, 51).
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Trad. de Flávio Rocha. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103 p.
- DIACOM: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. 1. Metodologia do teste de tetrazólio. Carlos Magno de Paiva Rola. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. 1 video cassete, son., color., 28 min., VHS NTSC.
- FRANÇA NETO, J.B. **Princípios do teste de tetrazólio para a semente de soja**. Curitiba: TECPAR, 1981. 14p. (Boletim LASP, v.3,n.1).
- FRANÇA NETO, J.B. Qualidade fisiológica da semente. **In: FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984. p.5-24. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 9).
- FRANÇA NETO, J.B.; DIAS, M.C.L.L.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Soybean seed quality referee test in Brazil. **Newsletter of the Association of the Official Seed Analysts**, Fort Collins, v.60, n.3, p. 17, 1986..
- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. **In: FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Diagnóstico completo da qualidade da semente de soja - Versão Preliminar**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1985. p.9-43. 1985.
- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. **Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1988. 58p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 32).
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Avaliação da suscetibilidade de cultivares de soja ao dano de embebição no teste padrão de germinação. **Informativo ABRATES**, Campinas, v.7, n.1/2, p.127, 1997. (Resumo apresentado no X Congresso Brasileiro de Sementes, Foz do Iguaçu).

- FRANÇA NETO, J.B.; WEST, S.H. Problems in evaluating viability of soybean seed infected with *Phomopsis* spp. **Journal of Seed Technology**, Fort Collins, v.13, n.2, p.122-135, 1989a.
- FRANÇA NETO, J.B.; WEST, S.H. Effects of *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii* on viability and quality of soybean seed. **Journal of Seed Technology**, Fort Collins, v.13, n.2, p.136-149, 1989b.
- GADD, I. Biochemical tests for seed germination. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.16, p.235-253, 1950.
- GRABE, D.F. **Tetrazolium testing handbook for agricultural seed**. [S.l.], Association of Official Seed Analysts, 1970. 62p.
- GRABE, D.F. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Trad. de Flávio Rocha. Brasília: AGIPLAN, 1976. 85p.
- HASEGAWA, K. On the determination of viability in seed by reagents. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, East Lansing, v.7, p.148-153, 1935.
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Problemas na avaliação da germinação de semente de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v., n.3, p.9-22, 1980.
- ISELY, D. Employment of tetrazolium chloride for determining viability of small grain seeds. **Proceedings of the Association Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 42, p.143-153, 1952.
- 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**, Copenhagen, v.12, p.1-18, 1940.
- LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v.24, p.389-394, 1949.
- LAKON, G. Germination potential and germination tendency according to the present state of research. **Saalgutwirtsch**, v.5, p.180-183, 205-207. 1953.

- LINDENBEIN, W. Tetrazolium testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v. 30, p. 89-97, 1965.
- MANSON, 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**, Madison, v.74, p.546-550, 1982.
- MOORE, R.P. Soybean germination. **Seedsmen's Digest**, San Antonio, v.11, n..3, p.12, 52, 54-55, 1960.
- MOORE, R.P. Tetrazolium evaluation of the relationship between total germination and seed quality. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 51, p.127-130, 1961.
- MOORE, R.P. Tetrazolium as a universally acceptable quality test of viable seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen , v.27, n.3, p.795-805, 1962a.
- MOORE, R.P. TZ checks your seed for quality. **Crops Soils**, v.15, n.1, p.10-2, 1962b.
- MOORE, R.P. Tetrazolium best method for evaluating seed life. **Seedsmen's Digest** , San Antonio, v.17, n.11, p.38-40, 1966.
- MOORE, R.P. Freeze injury to seed corn as evaluated in tetrazolium and growth tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v. 57, p.138-140, 1967.
- MOORE, R.P. History supporting tetrazolium seed testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen , v.34, p.233-242, 1969.
- MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. **Seed ecology**. London: Butterworth, 1973. p.347-366.
- MOORE, R.P. Tetrazolium seed testing developments in North America. **Journal of Seed Technology**, Beltsville, v.1, p.17-30, 1976.
- MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zurich: International Seed Testing Association, 1985. 99p.

- OSORIO, J.A. **Freezing injury in soybean seeds and relationships to germination and fungal colonization.** Ames: Iowa State University, 1987. 86p. Tese Mestrado.
- PEREIRA, L.A.G.; ANDREWS, C.H. Comparação de alguns teste de vigor para avaliação da qualidade de sementes de soja. **Semente**, Brasília, v.2, n.2, p.15-25, 1976.
- PORTER, R.H.; DURRELL, M.; ROMM, H.J. The use of 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride as a measure of seed germinability. **Plant Physiology**, Bethesda, v.22, p.149-159, 1947.
- SINCLAIR, J.B. **Compendium of soybean diseases.** 2.ed. St.Paul: The American Phytopathological Society, 1982. 104p.
- SMITH, F.G. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. **Plant Physiology**, Bethesda, v.27, p.445-456, 1952.
- SMITH, F.G.; THRONEBERRY, G.O. The tetrazolium test and seed viability. **Proceedings of the Association Official Seed Analysts**, East Lansing, v.40, p.105-109, 1951.
- TURNIPSEED, S.G.; KOGAN, M. Soybean entomology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 21, p.247-282, 1976.
- VILLAS BÔAS, G.L.; GAZZONI, D.L.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A.; ROESSING, A.C. **Efeito de cinco populações de percevejos sobre diversas características da soja cv. UFV-1.** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1982. 13p. (EMBRAPA-CNPSo. Pesquisa em Andamento, 3).
- 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**, New York, v. 134, p.78-87, 1986.

APÊNDICE





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Soja*

Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rod. Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral
Caixa Postal 231 - 86001-970 - Londrina, PR
Fone (043) 371-6000 Fax (043) 371-6100

