

ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MELANCIA¹

MARIA CARMEN BHERING², DENISE CUNHA FERNANDES DOS SANTOS DIAS³, DANIELLA INÁCIO BARROS⁴

RESUMO – O presente trabalho teve o objetivo de adequar a metodologia do teste de tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes melancia. Na primeira etapa, buscando definir o procedimento mais adequado para a condução deste teste, foram avaliados os seguintes procedimentos para a remoção do tegumento da semente: umedecimento em papel toalha e imersão em água por 16 e 24 h a 25°C; imersão em água, em câmara BOD a 40°C, por 30, 40 e 60 minutos. Para a remoção da membrana remanescente que envolve o embrião, foi feita a imersão em água, em câmara BOD a 40°C, por 40 e 60 minutos. Em seguida, os embriões foram imersos em solução de tetrazólio 0,075% a 40°C, no escuro, por 30, 40 e 60 minutos para coloração. Paralelamente, foram conduzidos testes de germinação e emergência de plântulas em solo, estabelecendo-se critérios para avaliação da viabilidade e do vigor. Na segunda etapa, a metodologia definida como a mais adequada para o teste de tetrazólio foi aplicada a oito lotes de sementes, comparando-se os resultados com os obtidos nos testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado e emergência das plântulas em solo. Os resultados indicaram que o teste de tetrazólio é eficiente para avaliar a viabilidade e o vigor das sementes de melancia. É possível estabelecer cinco classes de viabilidade, sendo vigorosas as sementes das classes 1 e 2, viáveis as das classes 1 a 3 e não viáveis e mortas as das classes 4 e 5, respectivamente. Para a condução do teste, as sementes devem ser imersas em água a 40°C por 40 minutos para retirar o tegumento e por mais 60 minutos para a remoção da membrana interna remanescente; em seguida, devem ser imersas em solução de tetrazólio 0,075%, a 40°C, por 60 minutos para o desenvolvimento de coloração adequada.

Termos para indexação: *Citrullus lanatus*, tetrazólio, viabilidade, vigor.

METHODOLOGY ADJUSTMENT OF THE TETRAZOLIUM TEST FOR PHYSIOLOGICAL QUALITY EVALUATION OF WATERMELON SEEDS

ABSTRACT – This study was conducted with the objective of adjusting the methodology of the tetrazolium test for physiological quality evaluation of watermelon seeds. In the first stage, the most appropriate tetrazolium test procedure was determined. The following procedures were evaluated: seed moistening in wet paper towel for 16 and 24 h and immersion in water at 40°C for 30, 40 and 60 minutes for tegument removal, and for 30, 40 and 60 minutes for removal of embryo surrounding membrane. Then, the seeds were placed in 0.075% tetrazolium solution at 40°C, in the dark, for 30, 40 and 60 minutes. Each sample tested by tetrazolium test was also evaluated for germination and seedling emergence tests establishing criteria for viability and vigor evaluation. In the second stage, the most appropriate tetrazolium methodology was applied to eight seed lots

¹ Submetido em 22/03/2004. Aceito para publicação em 07/12/2004.

² Eng. Agr., M.S., Departamento de Fitotecnia, UFV – 36570-000, Viçosa, MG, mbhering@ufv.br

³ Prof. Adjunto, D.S., Departamento de Fitotecnia, UFV – 36570-000,

Viçosa, MG, dcdias@ufv.br

⁴ Estudante Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, danyinacio@yahoo.com.br

and the results were compared for germination, first count, accelerated aging and seedling emergence tests. Five classes of viability were established: vigorous (classes 1 and 2), viable (classes 1 to 3) and non-viable and dead seeds (classes 4 and 5, respectively). The results indicated that the tetrazolium test was efficient for viability and vigor evaluation of watermelon seeds. The seeds should be immersed in water at 40°C for 40 minutes for removal of the tegument followed by 60 minutes for the removal of the endosperm membrane. The ideal staining was obtained after 60 minutes immersion in a 0.075% tetrazolium solution at 40°C.

Index terms: *Citrullus lanatus*, viability, vigor.

INTRODUÇÃO

A avaliação da qualidade fisiológica é um parâmetro importante a ser considerado em um programa de produção de sementes, e, atualmente, testes que fornecem resultados em período de tempo relativamente curto são os mais demandados para agilizar as tomadas de decisão nas diferentes etapas do processo produtivo, especialmente na fase de pós-colheita.

Neste contexto, o teste de tetrazólio tem se mostrado uma alternativa promissora pela qualidade e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor da semente. É um teste que se baseia na atividade das enzimas desidrogenases, particularmente a desidrogenase do ácido málico que reduz o sal de tetrazólio nos tecidos vivos das sementes, onde íons de H⁺ são transferidos para o referido sal. Quando a semente é imersa na solução de tetrazólio, ocorre a reação de redução nas células vivas resultando na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifenilformazan, indicando haver atividade respiratória nas mitocôndrias e, conseqüentemente, que o tecido é viável (vivo), conforme França Neto et al., (1999). Tecidos mortos (não viáveis) não reagem com a solução conservando a sua cor natural (Delouche et al., 1976). Trata-se de um teste que através da observação da coloração obtida nas diferentes partes da semente permite determinar a presença, a localização e a natureza das alterações nos tecidos das sementes (França Neto et al., 1999), permitindo ainda identificar, muitas vezes, as causas da perda da viabilidade e do vigor.

A eficiência do teste em avaliar o vigor e a viabilidade das sementes está relacionada ao desenvolvimento de metodologia adequada para cada espécie, de modo a definir as condições mais apropriadas para o preparo, pré-condicionamento e coloração das sementes. Assim, o preparo e o pré-condicionamento das sementes antes da coloração são fatores decisivos. Bittencourt et al. (1997) verificaram que o pré-condicionamento de sementes de amendoim em

rolo de papel umedecido, sob temperaturas de 25, 30 ou 35° C por 12 horas, ou 20° C, por 16 horas, permitiu o desenvolvimento de coloração uniforme, não interferindo na avaliação do teste. Em trabalho com soja, Costa et al. (1998) constaram a possibilidade de redução do período de pré-condicionamento das sementes de 16 horas a 25° C, condição até então tradicionalmente usada, para 6 horas a 41° C. Para sementes de melancia, Delouche et al. (1976) recomendam a embebição em água a 30-35° C por 1 hora para remover o tegumento e por mais 1 a 2 horas para retirar a membrana fina que envolve o embrião, já que ambas as estruturas devem ser removidas.

A obtenção de coloração uniforme e adequada para uma interpretação segura e eficiente também é fator de grande importância para o sucesso do uso do teste em determinada espécie. Como regra geral, Moore (1986) recomenda o uso de soluções de tetrazólio nas concentrações de 1,0 a 0,1%, enquanto Grabe (1976) afirma que solução a 1% deve ser utilizada para sementes de leguminosas, que não são seccionadas através do embrião antes da coloração. Para sementes de cucurbitáceas, as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) recomendam o uso de solução a 1% por 24 horas, não se referindo à temperatura que deve ser utilizada nesta etapa. No entanto, estudos específicos com algumas espécies têm indicado o uso de soluções menos concentradas e temperaturas de 35 a 40° C, sem interferir na precisão dos resultados (França Neto et al., 1998; Dias & Barros, 1999; Bhering et al., 1999). Para a obtenção de coloração ideal em sementes de soja, França Neto et al. (1998) recomendam o uso de solução a 0,075%, a 35 ou 40° C, por 150 a 180 minutos.

No Brasil, estudos referentes ao desenvolvimento de metodologia e à utilização do teste de tetrazólio já foram feitos para sementes de algumas espécies, destacando-se soja (França Neto et al., 1988 e 1999), feijão (Bhering et al., 1996 e 1999), milho (Dias & Barros, 1999), algodão (Vieira & Pinho, 1999), amendoim (Bittencourt et al., 1997, Bittencourt & Vieira, 1996

e 1999), café (Araújo et al., 1997 e Vieira et al., 1998), gramíneas forrageiras (Dias & Alves, 2001 a,b) e quiabo (Eichelberger & Moraes, 2001).

No entanto, o uso deste teste ainda está restrito a poucas espécies como soja, feijão, milho e gramíneas forrageiras. Para sementes de hortaliças, o teste de tetrazólio ainda não tem uso generalizado, principalmente pela carência de informações sobre a metodologia mais apropriada para as diferentes espécies. Estudos mais recentes foram realizados com sementes de cucurbitáceas como abóbora e abobrinha (Barros, 2002). O objetivo do presente trabalho foi adequar a metodologia do teste de tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia.

MATERIALE MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se sementes de melancia de diferentes lotes. Inicialmente, para retirar a mucilagem que torna o tegumento da semente escorregadio após o seu umedecimento, friccionou-se cal virgem às sementes, que foram, em seguida, lavadas em água corrente.

Na primeira etapa, as sementes foram submetidas aos seguintes métodos de pré-condicionamento para a remoção do tegumento: embebição em papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco em germinador a 25°C por 14 e 16 horas, imersão direta em água em BOD a 40°C por 30, 40 e 60 minutos. Após cada tratamento, o tegumento das sementes foi removido manualmente, fazendo-se um pequeno corte com estilete na extremidade oposta ao eixo embrionário. Em seguida, as sementes foram novamente imersas em água e mantidas em BOD a 40°C por 30, 40 e 60 minutos para a remoção da membrana fina remanescente (endosperma/perisperma), que envolve o embrião. Após a retirada desta membrana, realizando-se um pequeno corte com estilete de modo semelhante ao empregado para a retirada do tegumento, os embriões foram imersos para coloração em solução de 2,3,5 trifetil cloreto de tetrazólio a 0,075% e 0,1% durante 30, 40 e 60 minutos, no escuro, a 40°C, temperatura esta definida em ensaios preliminares. Após cada período, foram, então, lavados em água corrente e imersos em água para a avaliação.

Os embriões foram analisados individualmente, externa e internamente, após o seu seccionamento longitudinal, entre os cotilédones, tomando-se o cuidado para que o eixo embrionário fosse dividido longitudinalmente ao meio.

Observou-se a ocorrência de danos nas faces interna e externa dos cotilédones e do eixo embrionário, dando atenção especial à profundidade e localização de cada dano e à sua distância em relação ao eixo. A interpretação foi feita com auxílio de lupa de seis aumentos (6x), com iluminação fluorescente.

Paralelamente, foram conduzidos testes de germinação, seguindo-se os procedimentos estabelecidos pelas RAS (Brasil, 1992). Os tratamentos foram repetidos tantas vezes quantas necessárias, até que fosse possível elaborar um critério seguro para a interpretação do teste de tetrazólio, quanto à viabilidade e ao vigor da semente, cujos resultados apresentassem coerência com os valores obtidos para plântulas normais e anormais e sementes mortas nos testes de germinação.

Definida a metodologia mais adequada para o pré-condicionamento, preparo e coloração das sementes, foi realizada a segunda etapa do trabalho, utilizando-se oito lotes de sementes, sendo três de cada uma das variedades Crimson Sweet, Charleston Gray e dois do híbrido triplóide Fairfax, os quais foram submetidos aos seguintes testes:

Germinação: conduzido em rolo de papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, utilizando-se quatro subamostras de 50 sementes em germinador à temperatura de 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco e 14 dias após a semeadura, computando-se as plântulas normais, anormais e sementes mortas, conforme as RAS (Brasil, 1992), sendo os resultados expressos em porcentagem.

Emergência de plântulas em solo: conduzido em casa de vegetação, utilizando-se bandejas plásticas de 50 cm de comprimento por 28 cm de largura contendo areia e solo na proporção de 1:1. As sementes foram semeadas em sulcos longitudinais, com 2,0 cm de profundidade, distanciados de 5,0 cm entre si, sendo colocadas 25 sementes em cada sulco, utilizando-se 100 sementes por lote. A avaliação foi realizada aos 12 dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem, computando-se o total de plântulas normais emergidas por lote.

Envelhecimento acelerado: adotou-se a metodologia recomendada pelo Comitê de Vigor da Association of Official Seed Analysis (AOSA, 1983), seguindo-se as condições estabelecidas por Bhering et al. (2003). Uma camada única de sementes foi colocada sobre uma tela metálica acoplada a uma caixa plástica gerbox contendo 40 mL de água ao fundo. As caixas tampadas foram levadas à incubadora BOD, onde permaneceram à temperatura de 42°C, durante 48 horas. Após esse período, quatro subamostras de 50 sementes por lote foram colocadas para germinar, conforme o método descrito

para o teste de germinação. A avaliação foi realizada cinco dias após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais.

Tetrazólio: quatro subamostras de 25 sementes de cada lote foram imersas em água e mantidas em uma incubadora BOD à temperatura de 40°C por 40 minutos. A seguir, em cada semente foi feito um corte superficial com auxílio de um estilete na extremidade oposta ao eixo embrionário e o tegumento foi removido manualmente. As sementes sem o tegumento foram então novamente imersas em água em BOD a 40°C por 60 minutos. Após este período, foi feito um pequeno corte na extremidade superior da semente (de modo semelhante ao que foi feito para a retirada do tegumento) e a membrana fina (endosperma/perisperma), que envolve o embrião, foi removida com o auxílio de uma pinça. Em seguida, os embriões foram imersos na solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio a 0,075% e mantidas no escuro em BOD a 40°C por 60 minutos para coloração. Na sequência, foram lavados em água corrente e analisados individualmente externa e internamente após o seu seccionamento longitudinal, utilizando-se os critérios de interpretação definidos na primeira etapa.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. A comparação das médias obtidas em cada teste foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados em porcentagem foram submetidos a testes de normalidade, que indicaram a não necessidade de transformação. Foram calculados, ainda, os coeficientes de correlação simples de Pearson (r) entre os resultados dos testes de tetrazólio e os obtidos nos demais testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes. A significância dos valores de r foi determinada pelo teste t a 1% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa da pesquisa foram definidos os procedimentos mais indicados para o preparo e coloração das sementes de melancia no teste de tetrazólio. Verificou-se que, quando umedecidas, as sementes apresentavam a superfície externa do tegumento bastante escorregadia dificultando o manuseio. A utilização de cal virgem mostrou-se uma alternativa adequada para a remoção rápida desta mucilagem, facilitando o preparo das sementes.

Dentre os procedimentos testados para a remoção do tegumento, a imersão das sementes em água a 40°C por 40 minutos foi o método mais eficiente. O umedecimento em papel toalha, bem como a imersão em água a 25°C por 16 e

24 horas, não se mostraram adequados, uma vez que não permitiram a remoção do tegumento com facilidade. Considerando que períodos mais longos que este implicariam em maior tempo gasto para a condução do teste, ficou, então, definido que períodos superiores a 24 horas não seriam testados.

Para a remoção da membrana (endosperma/perisperma), que envolve o embrião, o procedimento mais adequado foi a imersão das sementes em água a 40°C por 60 minutos. Delouche et al. (1976) recomendam para sementes de melancia a embebição em água entre 30°C e 35°C por uma hora para remover o tegumento e por mais uma a duas horas para remoção da membrana fina que envolve o embrião. Como alternativa opcional para o pré-condicionamento, verificou-se que o umedecimento em papel toalha ou imersão em água por 16 horas, a 25°C, além de possibilitar a remoção do tegumento, permitiu também a retirada da membrana que envolve o embrião com um único umedecimento, ou seja, sem a necessidade de uma segunda embebição.

Verificou-se, ainda, que coloração mais uniforme e coerente com as recomendações de Moore (1985) foi obtida quando as sementes foram imersas em solução de tetrazólio a 0,075% por 60 minutos a 40°C no escuro. Os tecidos vigorosos coloriram-se de róseo brilhante, enquanto os tecidos em deterioração ou lesionados apresentavam-se vermelho carmim intenso. O uso de solução de tetrazólio a 0,1% não se mostrou adequado, uma vez que os tecidos vigorosos ao invés de róseos apresentaram-se com coloração vermelha um pouco menos intensa que a tonalidade de vermelho observada nos tecidos com lesões, o que dificultou a observação dos danos, especialmente em regiões vitais do embrião.

Nas sementes de cucurbitáceas, a área vital inclui o eixo hipocótilo-radícula e a região de inserção entre os cotilédones e o eixo. Com base nas observações de intensidade de coloração, profundidade e localização dos danos foram estabelecidas as cinco classes de viabilidade e vigor, descritas na Figura 1. O potencial de vigor foi determinado pelo somatório do número de sementes das classes 1 e 2 e a viabilidade pela soma do número de sementes das classes 1 a 3.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados de germinação e vigor obtidos para as sementes dos oito lotes. Verifica-se que as maiores porcentagens de germinação foram obtidas para as sementes dos lotes 1, 2, 3, 4, 7 e 8, enquanto as menores foram observadas nos lotes 5 e 6. Estes resultados foram semelhantes à viabilidade determinada pelo teste de tetrazólio (classes 1-3), que também identificou os lotes 5 e 6 como os de menor viabilidade, incluindo também nesta

CLASSE 1. Sementes viáveis de alto vigor: com aspecto normal e firme, coloração uniforme rosa brilhante a vermelho carmim não muito intenso na superfície externa do embrião. Coloração interna do embrião rosa claro.



Classe 2. Sementes viáveis de médio vigor: apresentam coloração externa rosa claro a vermelho carmim mais forte e já aparecem pequenas manchas com profundidade inferior a 0,5 mm em áreas não críticas dos cotilédones, ocupando menos de 1/3 da área dos mesmos. As manchas podem ter aspecto de mosaico (bordas vermelho intenso e centro branco leitoso). Superfície interna dos cotilédones ainda com coloração rosa claro, podendo também apresentar um início de coloração vermelho ou pequenas manchas de coloração vermelho. Eixo embrionário pode apresentar coloração vermelho intenso na metade inferior, tanto externa como internamente. A extremidade externa da radícula pode se apresentar com coloração branco leitoso no córtex, sem atingir o câmbio vascular.



Classe 3. Sementes viáveis não vigorosas: coloração rosa claro ou vermelho, apresentando manchas vermelho intenso com profundidade superior a 0,5 mm em ambas as faces dos cotilédones. As manchas podem se apresentar com aspecto de mosaico, não devendo atingir mais de 50% da área dos cotilédones, nem a região de ligação destes com o eixo embrionário. Áreas com coloração vermelho intenso ocupando mais de 50% do eixo embrionário, tanto interna como externamente.



CLASSE 4. Sementes não viáveis: ambos os cotilédones com a metade superior branco leitoso. Manchas vermelho intenso mescladas de branco leitoso, ocupando mais de 50% da área total dos cotilédones, podendo ou não atingir a região de ligação com o eixo embrionário, o qual apresenta-se vermelho intenso. Eixo embrionário apresentando mais de 50% da área descolorida (branco leitoso), tanto interna como externamente, indicando tecido morto



CLASSE 5. Sementes mortas: ambos os cotilédones com manchas vermelho intenso atingindo inclusive a região de ligação com o eixo embrionário, cujo tecido apresenta-se flácido, totalmente vermelho intenso ou com áreas de coloração branco leitoso em mais de 50% da sua extensão. Eixo embrionário completamente branco leitoso, independente do estado dos cotilédones. Embrião com coloração branco leitoso em toda a sua extensão

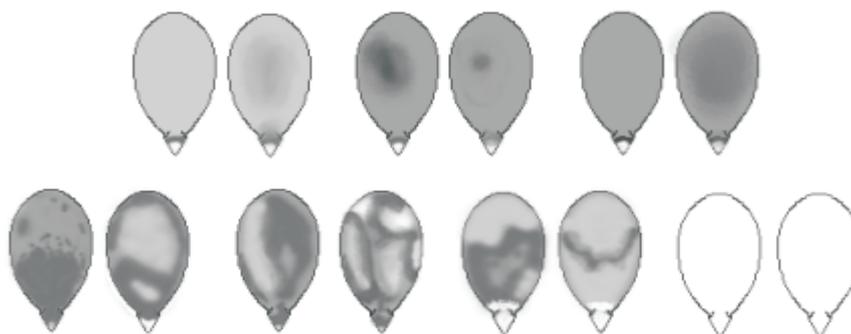


FIGURA 1. Classes para a determinação da viabilidade e vigor de sementes de melancia. Cinza claro – corresponde à coloração rosa; cinza escuro – coloração vermelho carmim; branco – coloração branco leitoso.

categoria o lote 3. Complementado estas informações pela análise de correlação (Tabela 2), nota-se que coeficientes de correlação altamente significativos foram obtidos entre os resultados de germinação e tetrazólio viabilidade (1-3). É importante ressaltar, ainda, que os valores absolutos obtidos para cada lote, em ambos os testes, foram bastante similares (Tabela 1), indicando que o teste de tetrazólio fornece uma indicação segura da viabilidade das sementes de melancia.

Ainda na Tabela 1, verifica-se que os resultados da primeira contagem do teste de germinação indicam melhor desempenho para o lote 7 seguido pelos lotes 1, 4 e 8. Também neste teste, de modo geral, os lotes 5, 6 e 3 tiveram o pior

desempenho. Pelo teste de envelhecimento acelerado, a classificação dos lotes quanto ao vigor foi bastante clara, indicando o lote 6 como o de mais baixo vigor, seguido pelos lotes 5 e 3, semelhantemente ao observado na emergência das plântulas em solo. Comparando estes resultados com o vigor avaliado pelo teste de tetrazólio (1-2), constata-se que houve coerência quanto à separação dos lotes em níveis de vigor, o que foi confirmado pela análise de correlação (Tabela 2), já que correlações positivas e altamente significativas foram observadas entre os resultados de tetrazólio (1-2) e os demais testes de vigor empregados.

TABELA 1. Valores médios (%) obtidos nos testes de germinação, tetrazólio viabilidade (1-3), primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, tetrazólio vigor (1-2) e emergência das plântulas em solo para os oito lotes de sementes de melancia.

Lotes	Germinação (%)	Tetrazólio (1-3) (%)	Primeira contagem (%)	Envelhecimento acelerado (%)	Tetrazólio (1-2) (%)	Emergência em solo (%)
1	90 abc	96 a	80 ab	81 a	87 a	88 abc
2	87 bc	93 abc	70 bc	83 a	81 ab	83 bcd
3	84 bc	84 c	59 cd	67 b	69 bc	76 d
4	93 ab	95 a	80 ab	80 a	88 a	92 ab
5	82 cd	85 bc	52 d	65 c	70 bc	78 cd
6	73 d	74 d	52 d	56 d	66 c	56 e
7	98 a	94 ab	86 a	87 a	89 a	97 a
8	93 ab	97 a	81 ab	83 a	91 a	89 abc
CV (%)	4,98	4,36	9,28	6,42	7,88	6,67

Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 2. Coeficientes de correlação simples (r) entre os dados obtidos nos testes utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de oito lotes de sementes de melancia.

	Primeira contagem	Envelhecimento acelerado	Emergência em solo	Tetrazólio (1-2) Vigor	Tetrazólio (1-3) Viabilidade
Germinação	0,9432**	0,9112**	0,9794**	0,9298**	0,9201**
Primeira contagem		0,8608**	0,8807**	0,9736**	0,8945**
Envelhecimento acelerado			0,9273**	0,8434**	0,9425**
Emergência em solo				0,8811**	0,9358**
Tetrazólio (1-2) Vigor					0,9357**

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

CONCLUSÕES

O teste de tetrazólio é eficiente para avaliar a viabilidade e o vigor das sementes de melancia.

Para a condução do teste, as sementes devem ser imersas em água a 40°C por 40 minutos para retirar o tegumento e por mais 60 minutos para a remoção da membrana interna

remanescente; em seguida, devem ser imersas em solução de tetrazólio 0,075%, a 40°C por 60 minutos para o desenvolvimento de coloração adequada.

É possível estabelecer cinco classes de viabilidade, sendo vigorosas as sementes das classes 1 e 2, viáveis as das classes 1 a 3 e não viáveis e mortas as das classes 4 e 5, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. 1983. 93p.
- ARAÚJO, R.F.; ALVARENGA, E.M.; LIMA, W.A.A.; DIAS, D.C.F.S.; ARAÚJO, E.F. O uso do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.7, n.1/2, p. 109, 1997.
- BARROS, D.I. **Teste de tetrazólio em sementes de abóbora e abobrinha**. 2002. 62f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D. Use of reduced concentrations of tetrazolium solutions for the evaluation of the viability of peanut seed lots. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.2, n.1, p. 75-82, 1996.
- BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D.; RODRIGUES, T.J.D. Criteria for peanut seed pre-conditioning for the tetrazolium test. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.25, p. 337-342, 1997.
- BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999. Cap. 8.2, p.8.2-1 - 8.2-8.
- BHERING, M.C.; SILVA, R.F.; ALVARENGA, E.M.; DIAS, D.C.F.S.; PENA, M.F. **Avaliação da viabilidade e vigor das sementes de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo teste de tetrazólio**. Viçosa: UFV, 1996. 38p. Boletim técnico.
- BHERING, M.C.; SILVA, R.F.; ALVARENGA, E.M.; DIAS, D.C.F.S.; PENA, M.F. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999. p.8.3-1 - 8.3-10.
- BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.I.; DIAS, L.A.S.; TOKUHISA, D. Avaliação do vigor de sementes de melancia (*Citrullus lunatus* Schrad.) pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.2, p.1-6, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A. A.; PEREIRA, J. E. Avaliação de metodologia alternativa para o teste de tetrazólio para sementes de soja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n.2, p. 305-312, 1998.
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.
- DIAS, D.C.F.S.; VIEIRA, A.N.; BHERING, M.C. Testes de condutividade elétrica e lixiviação de potássio para avaliação do vigor de sementes de hortaliças: feijão e vagem de quiabo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 20, n.2, p. 170-175, 1998.
- DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.11, n.2., p. 317, 2001a.
- DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hoschst. Ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.11. n.2, p.317, 2001b.
- 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.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES. 1999. p.8.4-1 - 8.4-10.
- EICHELBERGER, L.; MORAES, D.M. Preparo de sementes de quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.23, n.1, p.154-158, 2001.
- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1988. 60p.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (eds). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999. p.8.5-1 - 8.5-28.
- GRABE, D.F. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 85p.
- MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zürich: ISTA, 1985. 99p.
- VIEIRA, M.G.G.C.; PINHO, E.V.R.V. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.8.1-1 - 8.1-13.
- VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; PINHO, E.V. R. V.; GUIMARÃES, R.J.; OLIVEIRA, J.A. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34p. Boletim Agropecuário, 26.

