

TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE *CLITOREA TERNATEA* L.¹

BRUNO BORGES DEMINICIS², HENRIQUE DUARTE VIEIRA³, ROBERTO FERREIRA DA SILVA⁴.

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência de métodos de pré-condicionamento e concentrações da solução de tetrazólio na avaliação da qualidade de sementes de cunhã. Sementes de diferentes lotes obtidos nos municípios de Seropédica (RJ) e Fortaleza (CE) foram submetidas aos métodos de pré-condicionamento: a) escarificação manual com lixa e imersão em água por 14 horas a 25°C, e b) imersão em água a temperatura de 95°C com manutenção das sementes na mesma água por 24 horas a 25°C. Após o pré-condicionamento, os tegumentos das sementes foram retirados e as sementes imersas em soluções de tetrazólio a 0,1, 0,3 e 1% por 2 horas e 30 minutos a 25°C. Para comparação dos resultados obtidos no teste de tetrazólio, foram realizados os testes de germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação. O método utilizando escarificação manual com lixa e posterior embebição em água por 14 horas, a 25°C apresenta maior eficiência no pré-condicionamento de sementes de cunhã e a imersão das mesmas em solução de tetrazólio a 0,3% , por 2 horas e 30 minutos, a 25°C, permite avaliar a qualidade de sementes dessa espécie.

Termos para indexação: germinação, viabilidade, sementes, cunhã.

TETRAZOLIUM TEST FOR EVALUATING *Clitorea ternatea* L. SEEDS QUALITY

ABSTRACT - This research verified different methods of pre-conditioning and concentrations of tetrazolium solutions for quality evaluation of Butterfly pea seed. Seeds collected in Seropédica county (RJ) e Fortaleza county (CE) were submitted to the following methods of pre-conditioning: a) scarification with sandpaper and immersion in water at 25°C for 14 hours; and b) immersion in water at 95°C and left in the same water to rest without heating for 24 hours at 25°C. The teguments of the seeds were removed and the seeds were immersed in 0,1; 0,3 e 1% tetrazolium solution during 2 hours and 30 minutes at 25°C. To verify the reliability of the results through the tetrazolium test, germination test, first counting and index of germination velocity were done. Scarification with sadpaper and immersion in water at 25°C for 14 hours were the most efficient in pre-conditioning Butterfly pea seeds and 0,3% tetrazolium solution for 2 hours and 30 minutes at 25°C allow evaluating seeds of this species.

Index terms: germination, seed, viability, Butterfly pea.

¹Submetido em 26/02/2008. Aceito para publicação em 19/09/2008.

²Zootecnista, Mestre em Produção Animal, Especialista em Gestão Estratégica no Agronegócio, Doutorando em Produção Vegetal LFIT/CCTA/UENF, brunodeminicis@hotmail.com

³Eng. Agr., D.Sc., Prof. Associado, LFIT/CCTA/UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, parque do califórnia, Campos do Goytacazes-RJ, Cep: 28013-602, henrique@uenf.br

⁴Eng. Agr., D.Sc., Prof. Titular 1, LFIT/CCTA/UENF, roberto@uenf.br

INTRODUÇÃO

A cada ano se assiste ao avanço da produção e uso de sementes forrageiras no Brasil, provocado pelo aumento da demanda por sementes forrageiras de alta qualidade, em função da necessidade da abertura de novas áreas de cerrado e florestas para formação de pastagens (Vilela de Rezende et al., 2007). Em decorrência desse crescimento, também vem aumentando a demanda pelo aprimoramento das tecnologias para determinação da qualidade de sementes no intuito de melhorar as pastagens, pela utilização de sementes de alta qualidade. Desta forma, um dos pontos mais importantes na formação de pastagens é a aquisição de sementes, pois de nada adianta todo o investimento, se a semente não germina (Almeida, 2007). Assim, o conhecimento da qualidade de um lote de sementes depende da disponibilidade de metodologias precisas, que levem a obtenção de resultados confiáveis (McDonald, 1998). Desta forma, o emprego de testes rápidos torna-se uma ferramenta imprescindível para a avaliação da qualidade fisiológica de um lote de sementes, pois agiliza as decisões quanto ao manejo de lotes de sementes durante as etapas de pré e de pós-colheita. Para isso, a pesquisa em tecnologia de sementes tem atuado, em caráter permanente, no sentido de desenvolver e/ou aprimorar testes que possibilitem a avaliação da qualidade das sementes, principalmente das espécies que requerem um longo período para completar o teste de germinação (McDonald, 1998). Dentre esses, o teste de tetrazólio tem sido considerado como uma alternativa promissora, devido à rapidez e à eficiência na caracterização da viabilidade, do vigor e da deterioração por umidade, de danos mecânicos, de insetos e de secagem isto para soja, não para todas as espécies (Vieira et al., 1994). Os dados obtidos neste teste auxiliam no processo de controle de qualidade durante as etapas de colheita, transporte, beneficiamento e armazenamento de sementes (Carvalho, 1986).

A avaliação do vigor da semente como rotina na indústria sementeira tem evoluído à medida que os testes disponíveis vêm sendo aperfeiçoados, fornecendo maior precisão e reprodutibilidade dos resultados - o que é de extrema importância na tomada de decisão pelo sistema de produção e comercialização (Vieira et al., 1994). Segundo Deswal e Chand (1997), o teste de tetrazólio tem sido usado, não somente como técnica para estimar a viabilidade, mas também o vigor das sementes. O teste de tetrazólio, desenvolvido por Lakon em 1939 e posteriormente aperfeiçoado e divulgado por Moore em 1972, baseia-se na atividade dos tecidos vivos (AOSA, 1983). O teste reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Estas

enzimas catalisam reações respiratórias nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Durante a respiração ocorre a liberação de íons de hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel denominada formazan (França Neto et al., 1998), ou seja, ocorre a hidrogenação do tetrazólio produzindo o trifenil formazan. Isto torna possível distinguir as partes vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor. Para a realização do teste de tetrazólio é indicado um tratamento de pré-condicionamento que visa a penetração da solução nos tecidos de interesse a serem avaliados. Em sementes com tegumento impermeável a água, diversos tratamentos de pré-condicionamento vêm sendo utilizados como corte, escarificação e embebição em água (Davide et al., 1995; Malavasi et al., 1996; Ferreira et al., 2001; Mendonça et al., 2001; Oliveira et al., 2005a). Além do pré-condicionamento, a utilização de solução de tetrazólio em concentração adequada, tempo e temperatura de condicionamento e interpretação correta da coloração das sementes, são fundamentais para que se obtenham resultados confiáveis (Oliveira et al., 2005a).

No entanto, metodologias consolidadas e, por conseguinte mais eficientes, para o teste de tetrazólio estão restritas a poucas espécies como soja, feijão, milho, e algumas gramíneas forrageiras (Bhering et al., 2005). Para sementes de leguminosas forrageiras, como é o caso da cunhã, o teste de tetrazólio ainda não tem metodologia definida, principalmente pela carência de informações sobre a metodologia mais apropriada. Desta forma, este trabalho objetivou verificar a eficiência de diferentes métodos de pré-condicionamento e concentrações da solução de tetrazólio para avaliar a qualidade de lotes de sementes de cunhã.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Setor de Produção e Tecnologia de Sementes do Laboratório de Fitotecnia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, em Campos dos Goytacazes, RJ. As vagens de cunhã, em fase final de maturação, foram colhidas manualmente nos municípios de Seropédica, RJ, nos meses de maio/junho, nos anos de 2004 (Sero 04) e 2005 (Sero 05) e em Fortaleza, CE, no ano 2007 (Fortal 07). Após a colheita, as vagens foram secas à temperatura ambiente (18 - 22°C), sendo então extraídas as sementes. Os lotes foram beneficiados retirando as sementes visualmente danificadas, chochas e fragmentos de sementes e, em seguida, as sementes selecionadas foram armazenadas em sacos de polietileno e mantidas até

o momento de sua utilização, em câmara com controle de temperatura e umidade (5 a 10°C; 70% UR). O experimento foi realizado entre maio de 2004 (colheita do lote Sero 04) e Janeiro de 2008 (montagem dos testes), portanto, o lote Sero 04 foi armazenado por 43 meses, o lote Sero 05 por 31 meses e o Fortal 07 por 6 meses. Além disso, parte das sementes do lote Fortal 07 foi utilizado para a obtenção do lote Fortal 07-1, cujas sementes foram submetidas ao envelhecimento acelerado a 45°C e 100% UR, por 120 horas (Santos e Paula, 2007).

As sementes de cada lote foram avaliadas pelos seguintes testes:

Teor de água: retiradas da câmara de armazenamento, as sementes foram mantidas por 24 horas em condições ambientais e tiveram seu teor de água determinado pelo método de estufa a 105±3°C por 24 horas com quatro repetições de quatro gramas (Brasil, 1992). As sementes foram quebradas dentro de um saco plástico fechado, com o auxílio de um alicate e colocadas em recipientes de alumínio com peso pré-determinado, pesadas e colocadas em estufa (Oliveira et al., 2005b). Os resultados da determinação dos teores de água foram calculados com base no peso das sementes úmidas (base úmida).

Teste de tetrazólio: foram testadas duas metodologias para o pré-condicionamento das sementes de cunhã: a) esscarificação manual com lixa d'água nº 100: as sementes foram lixadas até pequena exposição dos cotilédones com posterior imersão em água por 14 horas, a 25°C; e b) água quente: as sementes foram imersas em água a temperatura de 95°C e deixadas em repouso na mesma água, fora do aquecimento, por 24 horas, a 25°C. Decorrido estes períodos, os tegumentos das sementes foram cuidadosamente retirados com Lâmina de Bisturi Aço Inóx nº 15 e as sementes foram colocadas em copos plásticos, sendo totalmente submersas em solução de tetrazólio (pH 6,5) nas concentrações de 0,1; 0,3 e 1%, mantidas no escuro à temperatura de 25°C, por 2 horas e 30 minutos (Oliveira et al., 2005b). Após o desenvolvimento da coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e deixadas submersas em água até o momento da avaliação. As sementes submetidas ao teste de tetrazólio foram cortadas no sentido longitudinal ao centro, abrangendo os cotilédones e o eixo embrionário. As duas metades foram individualmente examinadas e, de acordo com a extensão, intensidade dos tons avermelhados, presença de áreas brancas leitosas, aspecto dos tecidos e localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento, as sementes foram individualmente colocadas em categorias de viáveis e inviáveis (Figura 1), de acordo com padrões publicados por

ISTA (1993), seguindo modelos descritos por Moore (1972) e Grabe (1976) para diversas espécies agrícolas e florestais.



Todas as estruturas do embrião intactas e coloração superficial e uniforme indicando lenta penetração da solução de tetrazólio (Viável).



Sementes com pequenos danos superficiais na face externa dos cotilédones. A face interna dos cotilédones e o eixo embrionário não apresentam sinais de danos (Viável).



Sementes com pequenas fraturas nos cotilédones, áreas brancas ou vermelho carmim na face externa e interna dos cotilédones e eixo embrionário intacto (Viável).



Os danos são caracterizados por fraturas ou estrias visíveis na superfície interna dos cotilédones. Apresentam áreas vermelhas-carmim forte, ou branco leitoso. Os danos podem afetar o eixo embrionário (Inviável).



Os danos são mais severos, como fraturas nos cotilédones ou no eixo embrionário, porém mais da metade dos cotilédones permanecem viáveis (Inviável).



Região dos cotilédones com coloração vermelho-intenso ou descolorido, afetando o eixo-embrionário (Inviável).



Tecidos coloração original ou branco-leitoso, textura flácida (Inviável).

FIGURA 1. Categorias de sementes de *Clitoria ternatea* L. submetidas ao teste de tetrazólio.

Teste de germinação: inicialmente as sementes, em quatro repetições de 50, foram desinfestadas em solução

de NaClO 1% por 2 min (Teixeira et al., 2005), após cinco lavagens com água destilada as sementes foram secas

em papel toalha descartável e foram escarificadas com lixa d'água nº 100, para provocar pequenas ranhuras no tegumento (Deminicis et al., 2006), para a superação da dormência causada pela impermeabilidade do tegumento à água, sendo colocadas para germinar em papel germitest autoclavado (120°C / 20 minutos) e umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Foram confeccionados rolos que foram mantidos, de acordo com Brasil (1992), em incubadora do tipo BOD, a 25°C, sob luz branca constante. A avaliação do teste de germinação foi realizada diariamente a partir do 4º dia até o 10º dia após a montagem do teste. A classificação das plântulas como normais ou anormais foi realizada de acordo com Brasil (1992), considerando normais, as plântulas com todas as estruturas essenciais em perfeito desenvolvimento.

Primeira contagem do teste de germinação: os valores da primeira contagem foram obtidos no 4º dia após a montagem do teste de germinação (Brasil, 1992).

Índice de velocidade de germinação: foi calculado conforme fórmula proposta por Maguire (1962): $IVE = (E_1/D_1) + (E_2/D_2) + (E_n/D_n)$, em que: E=número de plantas emergidas, na primeira, segunda, ..., última contagem e D=número de dias da sementeira à primeira, segunda, ..., última contagem.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Os dados obtidos nos testes de tetrazólio, germinação, primeira contagem, índice de velocidade de germinação foram transformados em $\sqrt{x}/100$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No momento da realização dos testes de tetrazólio e germinação as sementes que constituíram os lotes de cunhã Fortal 07, Sero 04 e Sero 05 apresentavam teor de água em torno de 25% e o lote Fortal 07-1 apresentou 10%. Nas sementes submetidas ao método de pré-condicionamento com água quente, houve dificuldade de rompimento do tegumento para a retirada do embrião, pois o tegumento não amoleceu completamente em todas as sementes. Além disso, foram observadas manchas escuras nos cotilédones das sementes de todos os lotes após a imersão na solução de tetrazólio, o que dificultou a interpretação do teste concordando com o relatado por Oliveira et al. (2005b), que estudando a eficiência de métodos de pré-condicionamento

e concentrações da solução de tetrazólio na avaliação da qualidade de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium*), observaram que o pré-condicionamento com água quente forma manchas mais escuras nas sementes. De acordo com Copeland et al. (1959) isso se dá provavelmente, porque o pré-condicionamento com água quente antes da coloração pode provocar fraturas de estruturas internas da sementes e estimular atividade enzimática, justamente por causa da rápida absorção de água. Entretanto, Baskin e Baskin (1996) observaram que o tratamento com água quente foi eficiente como pré-condicionamento de sementes de *Senna marilandica* e *Senna obtusifolia* para o teste de tetrazólio. Da mesma forma, Eira et al. (1993) verificaram que a água quente a 100°C, com posterior resfriamento, também não foi eficiente para o pré-condicionamento de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Jacarandá da Bahia). Todas as três espécies acima mencionadas são Fabáceas herbáceas e/ou arbustivas e possuem sementes com dormência tegumentar, por conta da impermeabilidade do tegumento à água, como a *Clitorea ternatea*.

Quanto ao tratamento escarificação manual com lixa d'água, no momento da interpretação do teste, foi observado que a região com ranhuras estava descolorida ou com coloração vermelho-intenso justamente devido a danos causados pela lixa. Todavia, estes danos afetaram de forma branda apenas a parte externa dos cotilédones, não prejudicando a interpretação dos resultados. Outros autores como Davide et al. (1995), Malavasi et al. (1996) e Oliveira et al. (2005b) também utilizaram este tipo de pré-condicionamento em sementes de espécies florestais, como *Platycamus regnellii*, *Dipteryx alata* e *Peltophorum dubium*, e observaram resultados similares ao verificado neste estudo.

Verificou-se que não houve diferença significativa entre os testes de germinação e tetrazólio para o lote Fortal 07 e Fortal 07-1 (Tabela 1), contudo, nos lotes Sero 05 e Sero 04, a germinação das sementes foi superestimada quando comparada à viabilidade pelo teste de tetrazólio, em todas as concentrações testadas, provavelmente devido ao fato deste teste não detectar a presença de patógenos, que podem ter causado declínio na germinação (Seneewong et al., 1991).

O teste de tetrazólio, tanto na concentração de 0,1 como de 0,3%, possibilitou distinguir os lotes Fortal 07 e os lotes Sero 05 e Sero 04 e o lote Fortal 07-1 quanto à viabilidade, apesar de os três primeiros lotes serem considerados de alta qualidade, já que apresentaram valores de germinação acima de 80% (Tabela 1). Assim, para validar a metodologia

de tetrazólio para determinada espécie devem ser testados lotes com diferentes níveis de qualidade, para se ter mais certeza se o método testado realmente é confiável. Por isso é muito importante que entre os lotes testados esteja

incluído um lote de menor qualidade fisiológica, como é o caso do lote Fortal 07-1, pois nestes é que surgem as maiores dificuldades e dúvidas na interpretação dos tecidos/regiões vivos e não vigorosos.

TABELA 1. Valores médios (%) obtidos para as sementes dos quatro lotes de *Clitorea ternatea* L. nos testes de tetrazólio (TZ 0,1 = 0,1% da solução de tetrazólio, TZ 0,3 = 0,3 % da solução de tetrazólio e TZ 1,0 = 1% da solução de tetrazólio), germinação (TG), primeira contagem de germinação (1^aC) e índice de velocidade de germinação (IVG).

Testes	Lotes				
	Fortal 07	Sero 05	Sero 04	Fortal 07-1	CV (%)
TZ 0,1	91,50 Aa	89,50 Bab	84,80 BCb	13,50 Ac	1,78
TZ 0,3	92,80 Aa	90,50 Ab	90,50 Ab	14,75 Ac	2,01
TZ 1,0	89,70 Bab	91,80 Aa	89,50 ABb	13,70 Bc	1,99
TG	90,50 Aa	86,00 Cb	84,75 Cb	12,31 Ac	0,99
1 ^a C	79,65 Ca	77,40 Cb	76,28 Cb	10,24 Cc	0,94
IVG	17,46 a	5,88 b	5,73 b	1,26c	4,75
CV%	2,00	1,27	1,80	2,35	

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

De acordo com Krzyzanowski et al. (1999), a busca por metodologia adequada na utilização do teste de tetrazólio deve ser fundamentada para a simples distinção de tecidos viáveis e inviáveis e na aptidão de diferenciar lotes de qualidade fisiológica distintas. Quanto à coloração obtida nos embriões das sementes nas diferentes concentrações estudadas, para as sementes do lote Fortal 07, observou-se uma coloração rósea nos tecidos vigorosos quando foi utilizada a concentração de 0,3% da solução de tetrazólio, enquanto para as sementes do lote Sero 05 e Sero 04 foi observada coloração rósea mais fraca. Os tecidos vivos das sementes do lote Sero 05 e Sero 04 apresentaram coloração rósea intensa quando imersos na concentração de 1%, o que não foi observado no lote Fortal 07. No lote Fortal 07-1 os tecidos vivos apresentaram coloração vermelho intensa, vermelhas-carmim forte, mas em sua maioria as sementes apresentaram tecidos com coloração original (verde) ou branco-leitoso e textura flácida.

Mendonça et al. (2006) observaram que o pré-condicionamento com imersão em água por 48 horas, com retirada do tegumento, e imersão das sementes em solução de tetrazólio a 0,075% por 60-120 minutos a 35-40°C é o método mais eficiente para determinar a viabilidade de sementes de mangaba-brava (*Lafoensia pacari* St. Hil.). Zucareli et al. (2001) relataram que para as sementes

de *Albizia hasslerri*, a embebição seguida pela retirada do tegumento e solução de tetrazólio com concentração de 0,1% por cinco horas de coloração, mostrou-se como alternativa viável na avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. Nascimento e Carvalho (1998) constataram que o pré-condicionamento por 24 horas, à temperatura de 30°C, expondo os sementes de *Genipa americana* à solução de tetrazólio a 0,25% durante duas horas sob 40°C, foi o procedimento mais eficiente para visualizar as categorias das sementes em análise. Segundo Añez et al. (2007), a concentração da solução de tetrazólio a 0,5%, em temperatura de incubação de 30°C e tempo de desenvolvimento de coloração de 90 minutos é indicada como metodologia adequada para a avaliação da viabilidade de sementes de *Jatropha elliptica*. Oliveira et al. (2005b) relataram que a concentração 0,1% da solução de tetrazólio por 150 minutos a 25°C permitiu avaliar a qualidade de lotes de sementes de *Peltophorum dubium*. Fernandes et al. (2007) verificou que a imersão em água por 24 horas, seguida da retirada do tegumento e posterior embebição em solução de tetrazólio a uma concentração de 0,5% por quatro horas permite a melhor visualização da coloração dos tecidos de sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Becc).

No presente estudo, contrastando com o verificado

pelos autores acima, a concentração de 0,3% da solução de tetrazólio permitiu obter coloração mais nítida quando comparada às demais concentrações, contudo permaneceu dentro da faixa utilizada pelos mesmos (concentração de 0,075 a 0,5%).

CONCLUSÕES

O método de escarificação manual utilizando lixa e posterior embebição em água por 14 horas, a 25°C, apresenta maior eficiência no pré-condicionamento de sementes de cunhã.

No teste de tetrazólio, a concentração de 0,3% da solução de tetrazólio por 2 horas e 30 minutos, a 25°C, permite avaliar com clareza a viabilidade de sementes de *Clitorea ternatea* L..

AGRADECIMENTOS

FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

UFC - Universidade Federal do Ceará.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

PESAGRO-RIO - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P. (2007). **Manejo de pastagens**. Viçosa, MG, CPT, 380p.

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

AOSA - Association of Official Seed Analysts. **Seed vigor testing handbook**. Washington, 1983. 93p.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. Role of temperature and light in the germination ecology of buried seeds of weedy species of disturbed forests. II. *Erechtites hieracifolia*. **Canadian Journal of Botany**, v.74, n.2, p.2002-2005,

1996.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CARVALHO, N.M. Vigor de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO DE SEMENTES, 1, 1986, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, p.207-223, 1986.

COPELAND, T.G.; BRUCE, C.F.; MIDYETT JUNIOR, Y.W. The unofficial application of tetrazolium tests as an AID in checking germination cains. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Oklahoma, v.49, p.134-141, 1959.

DAVIDE, A.C.; BOTELHO, S.A.; MALAVASI, M.M.; OLIVEIRA, L.M. Avaliação da viabilidade de sementes de pau-pereira (*Platycyamus regnellii*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES 5, 1995, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRATES, 1995. 178p.

DEMINICIS, B.B.; ALMEIDA, J.C.C.; BLUME, M.C.; ARAÚJO, S.A.C.; PÁDUA, F.T.; ZANINE, A.M.; JACCOUD, C.F. Superação da dormência de sementes de oito leguminosas forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v.55, n.212, p.401-404, 2006.

DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi e Ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, p.409-417, 1997.

EIRA, M.T.S.; FREITAS, R.W.A.; MELO, C.M.C. Superação da dormência de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong- Leguminosae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.15, n.2, p.177-181, 1993.

FERNANDES, R.C.; MAGALHÃES, H.M.; LOPES, P.S.N.; BRANDÃO JÚNIOR, D.S.; FERNANDES, R.C.; GOMES, J.A.O.; PAULINO, M.A.O.; CARNEIRO, P.A.P. Elaboração da metodologia de aplicação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Becc). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1004-1007, 2007.

- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windons: versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, p. 225-258, 2000.
- FERREIRA, R.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; PINHO, E.V.R.V.; DAVIDE, A.C.; TONETTI, O.A.O. Morfologia de sementes e plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.108-115, 2001.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72p. (EMBRAPA-CNPSo, Documentos, 116).
- GRABE, D. F. **Manual do teste de tetrazólio**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 85p.
- ISTA - International Rules for Seed Testing. **Seed Science and Technology**, 1993. 363p. Supplement.
- KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p. 176-177, 1962.
- MALAVASI, M.M.; DAVIDE, A.C.; OLIVEIRA, L.M.; BOTELHO, S.A.; TONETTI, O.A. Avaliação da viabilidade de sementes de *Dipteryx alata* Voq. - Fabaceae (baru) através do teste de tetrazólio. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 15.; WORKSHOP SOBRE MARKETING EM SEMENTES E MUDAS, 3., 1996, Gramado. **Anais...** Gramado: CISM/FELAS, 1996. 43p.
- McDONALD, M. B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, v.8, p.265-275, 1998.
- MENDONÇA, E.A.F.; COELHO, M.F.B.; LUCHESE, M. Teste de tetrazólio em sementes de mangaba-brava (*Lafoensia pacari* St. Hil. - Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.33-38, 2006.
- MENDONÇA, E.A.F.; RAMOS, N.P.; PAULA, R.C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.64-71, 2001.
- MOORE, R. P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, v.44, n.3, p.22-24, 1972.
- NASCIMENTO, W.M.O.; CARVALHO, N.M. Determinação da viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) através do teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.2, p.470-474, 1998.
- OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; NERY, M. C. . Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley Bignoniaceae.. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 2, p. 169-174, 2005a.
- OLIVEIRA, L.M., CARVALHO, M.L.M., DAVIDE, A.C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert - Leguminosae Caesalpinioideae., **Cerne**, v.11, n.2, p.159-166, 2005b.
- REZENDE, A.V; ALMEIDA, G.B.S.; VILELA, H.H.; LANDGRAF, P.R.; NOGUEIRA, D.A.; CORREA, V.R.S. (2007). Germinação de sementes de gramíneas misturadas ao adubo químico para plantio. In: CONGRESSO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS DA UFLA/NEFOR, 2, **Anais...**Lavras-MG, 1-3.
- SANTOS, S.R.G.; PAULA, R.C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (BRANQUILHO) – EUPHORBIACEAE. **Revista Instituto Florestal**, v.19, n.1, p. 1-12, 2007.
- SENEEWONG, A.; BASKIN, C.C.; BATSON JUNIOR, W.E. The relationship between internal disease organisms and germination of gin run cottonseed (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Seed Technology**, v.15, n.2, p.91-96, 1991.
- TEIXEIRA, H., MACHADO, J.C., ORIDE, D. et al. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infetadas. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.2, 109-114, 2005.
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M.; SADER, R. Testes de vigor e suas possibilidades de uso. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994, p.31-47.

ZUCARELI, C.; MALAVASI, M.M.; FOGAÇA, C.A.; MALAVASI, V.C. Preparação e coloração de sementes de farinha seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Bur.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.186-191, 2001.