



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

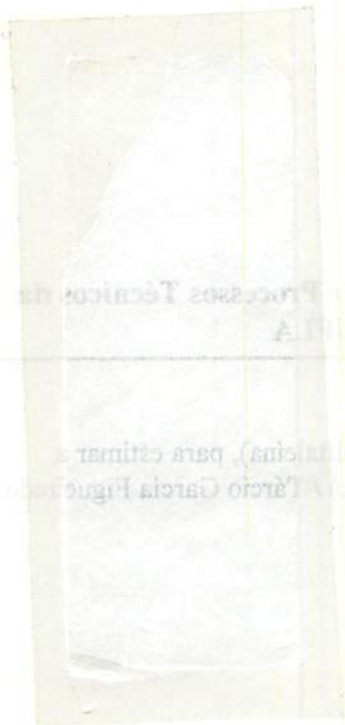
**ADAPTAÇÃO DO TESTE RÁPIDO (pH DO
EXSUDATO - FENOLFTALEÍNA), PARA ESTIMAR A
VIABILIDADE DE SEMENTES DE CAFEIRO (*Coffea
arabica* L.)**

TÁRCIO GARCIA FIGUEIREDO

2000

TÁRCIO GARCIA FIGUEIREDO

**ADAPTAÇÃO DO TESTE RÁPIDO (pH DO
EXSUDATO - FENOLFTALEÍNA), PARA ESTIMAR A
VIABILIDADE DE SEMENTES DE CAFEIEIRO (*Coffea
arabica* L.)**



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof. Dr. Rubens José Guimarães

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Figueiredo, Tércio Garcia

Adaptação do teste rápido (pH do exsudato – fenoltaleína), para estimar a viabilidade de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L) / Tércio Garcia Figueiredo.

-- Lavras : UFLA, 2000.

57 p. : il.

Orientador: Rubens José Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Semente. 3. Análise. 4. Viabilidade. 5. pH do exsudato. 6. Fenolftaleno. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7321

TÁRCIO GARCIA FIGUEIREDO

**ADAPTAÇÃO DO TESTE RÁPIDO (pH DO
EXSUDATO - FENOLFTALEÍNA), PARA ESTIMAR A
VIABILIDADE DE SEMENTES DE CAFEIRO (*Coffea
arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Agronomia,
área de concentração Fitotecnia, para obtenção
do título de “Mestre”.

APROVADA em 02 de fevereiro de 2000

Profa. Dra. Maria das Graças G. C. Vieira UFLA

Prof. MSc. Renato Mendes Guimarães UFLA

Dr. João Almir de Oliveira UFLA


Prof. Dr. Rubens José Guimarães

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

“ É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem sofrem muito, nem gozam muito, porque vivem nesta penumbra cinzenta, que não conhecem nem a vitória nem a derrota. ”

(Franklin Roosevelt)

**Dedicado a DEUS.
A meus pais e esposa.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar a oportunidade de viver sob sua luz e guia.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realizar minha Dissertação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubens José Guimarães, pela orientação, dedicação e compreensão prestados ao longo deste trabalho.

Aos professores Maria das Graças G. C. Vieira, Renato Mendes Guimarães e João Almir de Oliveira, que tanto contribuíram para o bom êxito deste trabalho.

Ao amigo Reginaldo pela companhia, amizade e incentivo.

Aos colegas do curso pelo companherismo.

Aos funcionários, estagiários e bolsistas do Setor de Sementes do Departamento de Agricultura, pelo auxílio nas atividades de laboratório.

BIOGRAFIA

Tárcio Garcia Figueiredo, filho de Nivaldo Garcia de Figueiredo e Nicolina Ferreira Garcia, nascido em São Sebastião do Paraíso, Minas Gerais, em 10 de outubro de 1968.

Em agosto de 1992, graduou-se Engenheiro Agrônomo, pela Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras- MG.

Em março de 1993, iniciou seu trabalho profissional junto à Cooparaíso (Cooperativa Regional dos Cafeicultores de São Sebastião do Paraíso Ltda), prestando assistência técnica a produtores de café da região de São Sebastião do Paraíso – MG, permanecendo até o final de agosto de 1996.

Em Setembro de 1996, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia/Fitotecnia (Setor de Sementes) na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Descrição da semente de <i>Coffea arabica</i> L.	03
2.2 Fatores que afetam o estabelecimento das mudas	04
2.3 Viabilidade e deterioração de sementes	07
2.4 Testes rápidos para a avaliação da qualidade de sementes	13
2.5 Fatores que influenciam os resultados do teste de pH do exsudato	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Aplicabilidade do Teste de pH do exsudato-fenolftaleína para estimar a viabilidade de sementes de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.) .	22
3.2 Avaliação de metodologias para aplicação do Teste de pH do Exsudato-fenolftaleína	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Verificação da aplicabilidade do Teste de pH do Exsudato- fenolftaleína	30
4.2 Avaliação de metodologias para aplicação do Teste de pH do Exsudato-fenolftaleína	33
4.3 Considerações Gerais.....	43
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXO	55

RESUMO

FIGUEIREDO, T.G. Adaptação do teste rápido (pH do exsudato-fenolftaleína), para estimar a viabilidade de sementes de cafeeiro (*coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 2000. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).*

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes da UFLA, Lavras-MG, em duas etapas. A primeira etapa objetivou avaliar a possibilidade de se utilizar o teste de pH do exsudato-fenolftaleína, para determinar, de forma rápida, o potencial de germinação de sementes de cafeeiro. Foram testados 4 tempos de embebição (8, 10, 12 e 14 horas), em duas temperaturas (25 e 30°C), em esquema fatorial, com 4 repetições de 50 sementes. Os resultados foram comparados aos do teste de germinação e tetrazólio, onde se utilizou o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 100 sementes. Não houve efeito significativo para as temperaturas estudadas e foi conduzida a análise de correlação simples entre os resultados para tempos de embebição. Os resultados indicam que o teste de pH do exsudato-fenolftaleína apresenta-se eficiente em estimar a viabilidade de sementes de cafeeiro, no tempo de embebição de 10 horas, à temperatura de 25°C. A segunda etapa foi conduzida, objetivando avaliar a influência do período de embebição e da concentração da mistura da solução indicadora, nos resultados do teste do pH do exsudato-fenolftaleína. Foram considerados no presente estudo 3 lotes de sementes, 3 tempos de embebição (10, 15 e 20 horas) e três concentrações da mistura da solução indicadora (1:1, 1:0.75 e 1:0.50). A embebição foi efetuada na temperatura constante de 25°C. O delineamento foi em esquema fatorial, com 4 repetições de 50 sementes para cada tratamento. Os resultados foram comparados aos dos testes de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica, através de teste de correlação simples. Para estimar o potencial de germinação, a metodologia do teste do pH do exsudato-fenolftaleína vai variar, em função da safra do lote de sementes de cafeeiro, sendo que para lotes da safra atual a metodologia mais adequada foi a utilização da concentração de 1:1 (fenolftaleína/carbonato de sódio) em tempo de embebição de 10 horas.

Orientador: Rubens José Guimarães. **Comitê orientador:** Renato Mendes Guimarães, Maria das Graças G. C. Vieira e João Almir de Oliveira.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, T. G. Adaptation of the rapid test (pH of exudate phenolphthalein) for estimating the viability of seeds of coffee tree (*Coffea arabica* L.) Lavras: UFLA, 2000 (Dissertation – Master in Crop Science)*

↑
p?

The present research work was conducted in the UFLA Seed Analysis Laboratory , Lavras – Mg , in two steps . The first step aimed to evaluate the possibility of utilizing the Ph test of exudate-phenolphthalein , to determine, in a fast way , the germination of coffee tree seeds. Four times of imbibition were tested (8, 10 , 12 and 14 hours) at two temperatures (25 C and 30C) , in factorial scheme , with four replications of 50 seeds. The results were compared with those of the germination and tetrazolium tests , where the completely randomized design with four replications of 100 seeds was utilized .The means were compared by Tuckey's test at the 1% significance level and one-way correlation analysis among the results was conducted . The results indicated that pH test of exudate phenolphthalein proves to be efficient in estimating the coffee seed viability at the imbibition time of 8 hours at the temperature of 25 C. The second step was proceeded aiming to evaluate the influence of the imbibition period an the concentration of the mixture of the indicator solution in the results of the pH test of exudate- phenolphthalein . In the present study , three lots of seeds , three imbibition times (10 , 15 and 20 hours) and three concentrations of the indicator mixture (1:1, 1: 0.75 and 1 : 0.50) were taken into consideration. Imbibition was performed at the constant temperature of 25 C. The design was in factorial scheme , with four replications of 50 seeds for each treatment . The results were compared with those of the germination, tetrazolium and electric conductivity test, through the one – way correlation test. To estimate potential germination, the methodology of the pH test of exudate-phenolftalein is to vary in terms of the crop of the lot of coffe seeds, the use of the concentration of 1:1 (phenolftalein/ sodium carbonate) in imbibition times of 10 hours being the most sintable for the lots of the present crop.

* Guidance Committee: Rubens José Guimarães (Major Professor) – UFLA, Renato Mendes Guimarães - UFLA , Maria da Graças G.C.Vieira - UFLA and João Almir de Oliveira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro tem grande importância a nível mundial, perdendo em volume de negócio, apenas para o petróleo (Mendes et al. 1995).

Novas tecnologias e métodos de cultivo advindos de trabalhos de pesquisas têm sido colocados à disposição dos cafeicultores, podendo contribuir para a redução dos custos de produção e melhoria na qualidade do produto. Mesmo conseguindo solucionar parte dos fatores limitantes da produção, na etapa de formação de mudas, ainda existem alguns dos mais antigos desafios.

A formação de mudas de cafeeiro é de fundamental importância na implantação da lavoura, uma vez que, qualquer erro cometido nessa fase poderá incorrer em prejuízos ao longo da vida da cultura (Carvalho e Alvarenga, 1993; Guimarães, 1994 e Mendes et al. , 1995).

Um dos maiores problemas enfrentados pelos produtores de mudas de cafeeiro, diz respeito à lenta germinação das sementes, aliada a rápida perda do poder germinativo. Os resultados da capacidade germinativa obtidos pelo teste padrão de germinação só se encontram disponíveis no período mínimo de 30 dias. Esse fato, segundo Dias e Silva (1986) chega a criar situações em que, quando se obtém o resultado do teste padrão de germinação, este já não reflete o verdadeiro estado fisiológico das sementes naquele dado momento.

O conhecimento da qualidade fisiológica das sementes de cafeeiro é necessário para a tomada de decisões por parte dos produtores de sementes e viveiristas, sobre a utilização ou descarte de determinados lotes de sementes, o que acarretará na obtenção de mudas de qualidade para os cafeicultores.

O desenvolvimento de métodos rápidos, na avaliação da viabilidade de sementes, tem sido uma tônica entre pesquisadores de diversos países, tendo em vista a necessidade por parte dos produtores de sementes, em tomar decisões rápidas sobre o aproveitamento ou descarte de seu produto.

Para que os testes utilizados nesse tipo de avaliação cumpram seus objetivos, é necessário que sejam rápidos, simples, seguros e de baixo custo, possibilitando assim seu uso em larga escala, como testes rotineiros - Fernandes, Sader e Carvalho (1987).

O teste de pH do exsudato (fenolftaleína) desenvolvido por Amaral e Peske (1984) tem mostrado eficiência em predizer a viabilidade de sementes de soja e se destaca por ser um método que atende a maioria dos requisitos acima mencionados. Com isso, alguns estudos têm sido realizados, buscando a adaptação de sua metodologia para outras espécies.

Em face do exposto, este trabalho teve por objetivos verificar a possibilidade de aplicação do teste de pH do exsudato, na determinação rápida da viabilidade de sementes de cafeeiro e o desenvolvimento de metodologia do teste para sementes de cafeeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descrição da semente de *Coffea arabica* L.

A formação do botão floral ocorre, quando as gemas das axilas dos ramos plagiotrópicos diferenciam-se em botões florais, os quais permanecem em dormência verdadeira durante o período seco do ano. A antese da flor só ocorrerá com as condições hídricas favoráveis, associado ao aumento da temperatura, iniciando assim o desenvolvimento dos frutos, culminando com a maturação (Rena e Maestri, 1985).

O fruto do cafeeiro é uma drupa elipsóide, contendo dois locus e duas sementes, mas ocasionalmente pode conter mais. O endocarpo (“pergaminho”), quando maduro, é coriáceo e envolve independentemente cada semente. A semente é plano convexa, elíptica ou oval, sulcada longitudinalmente na face plana, constituída por embrião, endosperma e um envoltório, representado por uma “película prateada” ou espermoderma, Dedecca (1957), citado por Rena e Maestri (1986).

As reservas da semente do cafeeiro são principalmente hemicelulose e substâncias graxas e à medida que os cotilédones se utilizam dessas substâncias, estes vão crescendo dentro do endosperma. Após o “amolecimento” do endosperma começa o desenvolvimento da radícula, seguindo seu geotropismo positivo. A seguir, forma-se a alça hipocotiledonar, que desenvolvendo, culminará com a elevação total dos cotilédones, ainda presos ao endosperma, para a superfície. Considera-se então germinada a semente, sendo denominado esse estágio de “palito de fósforo” (Carvalho e Alvarenga, 1993).

2.2 Fatores que afetam o estabelecimento das mudas.

A formação de mudas de cafeeiro têm encontrado certas dificuldades, devido a características inerentes às sementes, como sua rápida perda de vigor e viabilidade, o que dificulta sua utilização a longo prazo, e a necessidade de longos períodos para a germinação.

Went (1957) já afirmava que a retomada do crescimento, ou germinação propriamente dita, poderia durar até 90 dias, chegando ao extremo de 120 dias, no período frio do ano fato esse, de relevante importância, pois, é justamente no início dessa estação que as sementes começam a estar à disposição dos produtores e viveiristas na maior parte da região Centro Sul do Brasil.

Miranda (1987) cita que o período ideal para a implantação de um cafezal é no início do período chuvoso, meses de outubro-novembro. Considerando que as chamadas mudas de “meio ano” levam cerca de 6 a 8 meses para atingirem o desenvolvimento ideal, o semeio de um viveiro deveria ser realizado de janeiro a março.

Outro fator que também vem sendo estudado mais a fundo é a influência do endocarpo sobre a germinação. Guimarães (1995) concluiu que para acelerar o processo germinativo, as sementes devem ter o endocarpo retirado, confirmando os resultados obtidos por Franco (1970), o qual observou também que as sementes com endocarpo não germinavam em meio asséptico. Rena e Maestri (1986) também afirmam que a presença do endocarpo nas sementes, especialmente sob baixas temperaturas, atrasam a germinação, sendo que com a remoção do endocarpo e à temperatura 32 °C, sementes maduras germinam em apenas 15 dias.

Aparentemente, a difusão de gases e água e a expansão em volume têm papel secundário, comparados ao efeito de algum inibidor presente, já que fragmentos de endocarpo misturado às sementes, também inibiram a germinação (Velazco e Gutierrez, 1974, citados por Rena e Maestri, 1986). A constatação da presença de algum inibidor foi feita por Figueiredo Jr , Figueiredo e Gomes (1997), trabalhando com extrato aquoso de espermoderma (“película prateada”), em diferentes concentrações, utilizando-se sementes de alface como planta indicadora. Determinaram que, à medida que a concentração do extrato foi aumentada, houve acréscimo do número de plântulas anormais e sementes que não germinaram da planta indicadora, aumentando também o número de dias para a germinação. Os resultados permitiram sugerir que o espermoderma pode contribuir para a lenta germinação das sementes de cafeeiro, possivelmente devido a presença de substâncias inibidoras.

Valio (1976) relaciona a germinação de sementes de cafeeiro, com variação dos teores de substâncias semelhantes aos ácidos abscísico, giberélico e citocininas. Nesse sentido, de acordo com Alvarenga (1990), as citocininas podem funcionar como agentes quebradores de dormência em alguns casos e até substituir a exigência de luz em espécies fotoblásticas positivas podendo assim, diminuir o efeito de certos inibidores de germinação, como o ácido abscísico, em sementes de cafeeiro. Por outro lado, Carvalho (1997) não verificou ganho significativo, quando sementes de cafeeiro foram tratadas com citocinina BAP.

De acordo com Popinigis (1985), além das características inerentes à própria espécie, as condições de ambiente são os principais fatores que afetam a qualidade da semente, pois o grau de umidade é controlado diretamente pela

umidade relativa e, indiretamente, pela temperatura do ar, a qual afeta também a velocidade dos processos bioquímicos na semente.

Existem ainda algumas discordâncias entre os autores sobre a qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro armazenados por períodos prolongados, no entanto, evidencia-se a existência de relação entre o grau de umidade das sementes, tipo de embalagem e condições de ambiente, sobre a qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro armazenadas.

Miglioranza (1982), avaliando a conservação de sementes de cafeeiro (cv. Catuai) nos diferentes graus de umidade, armazenadas em condições ambiente em embalagens hermeticamente fechadas, concluiu que para essas condições é preciso que o grau de umidade das sementes esteja entre 8 e 10%, de preferência o mais próximo possível de 9%. Determinou ainda que grau de umidade, entre 24 e 50%, induzem as sementes de cafeeiro à morte em tempo inferior a 6 meses.

Dias e Barros (1993) compararam a eficiência de diferentes embalagens na conservação de sementes de cafeeiro (cv. Mundo Novo), armazenadas por 11 meses com umidade inicial de 37%. Nas embalagens de polietileno perfurado e de papel, as sementes apresentavam-se totalmente inviáveis ao final do estudo. O saco de polietileno lacrado foi o que apresentou melhores resultados, com uma germinação de 60%.

Bacchi (1955) afirmou que para as sementes de cafeeiro, a secagem prolongada, em pleno sol, não causou nenhum prejuízo provocado pelos raios solares. Afirmou ainda que a principal causa da rápida perda do vigor seria a sensibilidade à dessecação, provocada pela diminuição da umidade das sementes, a teores inferiores à faixa de 8 a 9%. Esse mesmo autor ainda afirma

que teores de água abaixo desse valor, deve ser considerado o limite crítico para essa espécie, quando submetida a esse sistema de seca, pois sua capacidade germinativa é sensivelmente afetada a ponto de se tornar nula.

Arcila-Pulgarin (1976) obteve bons resultados quando secou sementes de cafeeiro artificialmente. Foram usadas temperaturas de 25 a 80°C, e como testemunha a seca natural, em ambiente e temperatura de sombra. Os resultados mostraram um poder germinativo de 95%, para as sementes secas, no ambiente natural e igual resultado para as sementes secas à temperatura de 25 até 45°C. Temperaturas acima de 45°C foram bastante prejudiciais às sementes de cafeeiro.

No entanto, Araújo (1988) cita a ocorrência de uma diminuição da qualidade das sementes, em função de uma secagem rápida, com a temperatura do ar em torno de 40°C, a qual manifestou seu efeito latente, quando elas foram armazenadas com umidade em torno ou acima de 13%. Ainda, segundo esse autor, na maioria dos trabalhos até então realizados, não se avaliou o efeito da secagem após determinado período de armazenamento (efeito latente), que é de grande importância.

2.3 Viabilidade e deterioração de sementes

Entende-se por qualidade fisiológica a capacidade da semente de desempenhar funções vitais, caracterizada pelo seu poder germinativo, seu vigor e longevidade, Popinigis (1985). Vários fatores interferem na qualidade da

semente, sendo que alguns deles propiciam a deterioração, que contribui diretamente para a perda da sua qualidade, podendo até inviabilizá-la.

O processo de deterioração de sementes é muito complexo e, para entendê-lo, é essencial o conhecimento do mecanismo físico, segundo o qual a célula perde seus componentes celulares. A embebição de uma semente ocorre através do processo de difusão, que é o movimento ao acaso, de partículas de determinada substância, distribuindo-se uniformemente num espaço disponível.

A absorção de água se faz de maneira diferenciada pelos diferentes tecidos da semente. A casca absorve muito pouca água, expandindo-se bem menos que os tecidos internos, a fim de ser rompida, facilitando a difusão de oxigênio para os tecidos internos. O tecido de reserva vem após a casca, em volume de água absorvido e absorve água até um certo ponto, funcionando daí por diante como um reservatório. O tecido meristemático, justamente por crescer é o que absorve as maiores quantidades de água (Carvalho e Nakagawa, 1988).

O movimento de água do solo para a semente é governado por vários fatores, destacando-se as relações hídricas da semente e do solo. Potencial hídrico (Ψ_s) é uma expressão do “status” energético da água e a difusão ocorre, devido a um gradiente de energia, translocando do mais alto para o mais baixo potencial (Bewley e Black, 1994). O potencial hídrico das células (Ψ_s), nos tecidos das sementes, é resultante da interação entre os três potenciais: o osmótico (Ψ_o), que representa a concentração de solutos dissolvidos nas células, condicionados pelas ligações entre a água e os solutos. Quanto maior a concentração de solutos, menor será o potencial osmótico e menor o potencial hídrico nas células; o potencial mátrico (Ψ_m), resultante das interações interfaciais, tais como forças capilares e adsorção, entre a água e os constituintes

moleculares das células (como proteínas e amido) e da semente (parede celular); e o potencial de pressão ($\square p$), relacionado à força contrária, exercida pela parede celular externa, por causa da turgescência causada pela entrada de água nas células. A soma desses três componetes é um valor negativo, exceto nas células completamente túrgidas, onde é aproximadamente zero, o que corresponde ao valor do potencial hídrico da água pura ($\square s$), (Bewley e Black, 1994).

A velocidade inicial de embebição será determinada, primariamente, pela permeabilidade do tegumento da semente, área de contato semente/substrato e a condutividade hidráulica do substrato (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). A temperatura na qual a semente está se embebendo exerce um efeito considerável sobre o processo.

Segundo De Roberts e De Roberts (1986) a especificidade da membrana, no transporte de moléculas, é o mecanismo pelo qual a mesma, regula o movimento de água e solutos para dentro e fora das células. Para esclarecer melhor a função da membrana, no processo de deterioração, basta salientar que o sistema de membranas celulares parece ser a última estrutura a organizar-se antes da maturação fisiológica, sendo assim, é a primeira a exibir alterações degenerativas, que caracterizam a deterioração de sementes (Heydecker, 1974). Esse processo degenerativo, que se inicia após o estágio de maturação fisiológica, continua até a perda da viabilidade e morte da semente.

Todavia, a falta de esclarecimentos sobre as causas de deterioração se deve, segundo Roberts (1973), ao grande volume de alterações citológicas e metabólicas, que ocorrem no processo, o que torna difícil o estabelecimento das primeiras causas ou mesmo a identificação de causa e efeito.

As teorias da inativação enzimática e a degeneração das membranas celulares têm sido as mais enfocadas para explicar o processo de deterioração.

A perda de viabilidade é acompanhada por uma redução, na capacidade de sintetizar proteínas e, dentre essas, as enzimas desempenham um papel importante na evolução da deterioração das sementes. Reduzindo a síntese protéica, acarretará numa redução das enzimas atuantes no processo germinativo, promovendo uma germinação mais lenta ou, até mesmo perda da viabilidade. Mudanças qualitativas e quantitativas em carboidratos, lipídios e proteínas, nos fornecem informação sobre mudanças metabólicas, associadas à deterioração durante o armazenamento (Anderson, 1973). Um bom indicativo de perda de qualidade seria a avaliação da atividade de enzimas específicas, Brandão Júnior (1996).

Para Murray (1984), citado por Vieira (1996), o efeito negativo da deterioração de sementes sobre taxas respiratórias, induz a um retardamento na degradação de reservas, o que prejudica o desenvolvimento do embrião. À medida que se processa a deterioração, a taxa respiratória diminui, ocasionando a perda da capacidade de germinação. Nesse processo, a respiração é referida como a expressão da atividade de um grande número de enzimas, que atuam no metabolismo de reservas, Copeland e McDonald (1985).

Harman (1956), propôs uma hipótese para explicar a deterioração nos sistemas biológicos. Ele sugeriu que a formação de grupos químicos, denominados radicais livres, agiam sobre os constituintes celulares e tecidos de ligação, promovendo a degeneração dos mesmos.

Mais tarde, Harman (1969) constatou que a maior fonte de radicais livres, nos tecidos vivos seria resultante da peroxidação de lipídios, ou seja, o

processo de formação dos radicais livres através da atividade metabólica da célula, é consequência da reação de lipídios estruturais, principalmente, os polinsaturados, com o O₂, resultando radicais livres e peróxidos instáveis - daí a denominação de peroxidação de lipídios.

As membranas celulares representam um sítio chave de danos diretos da peroxidação de lipídios, por possuírem uma grande superfície e por serem, normalmente, mais insaturadas que os lipídios de armazenamento.

Segundo Koostra e Harrington (1973), o processo de deterioração teria, como alteração bioquímica inicial, a desestruturação do sistema de membranas a nível celular, através da ação de radicais livres. Essa desestruturação do sistema de membranas, leva a um desequilíbrio na sua capacidade de regular o fluxo de solutos, nos dois sentidos tanto a nível de célula como de organela. Essas mudanças ocorreriam nos ácidos graxos insaturados pela ação dos radicais livres.

Também ocorrem, segundo (Delouche e Baskin, 1973) o declínio na respiração, na biossíntese, taxa de germinação, crescimento e desenvolvimento, armazenabilidade, na uniformidade, resistência da planta, no rendimento e emergência em campo, bem como, um aumento no número de plântulas anormais.

As membranas mitocondriais mais interiores são compostas de maior proporção de cadeias de ácidos graxos insaturados do que outras membranas. Portanto, a consequência primária da peroxidação de lipídios, nos tecidos, pode ser a redução da eficiência respiratória, bem como da perda da integridade da membrana (Berjak e Villiers, 1972).

A queda na integridade da membrana citoplasmática tem sido demonstrada, em sementes envelhecidas, pela proporção de componentes citoplasmáticos lixiviados para o meio externo (Glosh, Adhikary e Banerjee, 1981) e pela atividade de certas enzimas. Porém, microrganismos patogênicos têm habilidade de secretar enzimas líticas, capazes de degradar polissacarídeos da parede celular, afetando também essa capacidade de regulação do fluxo de solutos (Fisher et al., 1973 citado por Vieira, 1996).

Com base no aumento de permeabilidade das membranas celulares e, conseqüentemente, do fluxo de solutos, diversos pesquisadores têm analisado a composição do exsudato de sementes em embebição e estabelecido correlações com a viabilidade de sementes. Segundo Powell (1986) há ocorrência de mudanças bioquímicas nas membranas, que resultam em um aumento de lixiviação de metabólitos já no início do processo de deterioração, quando as sementes ainda são viáveis; a quantidade de lixiviados é influenciada pela condição da semente, na época de colheita, pela idade da semente e também pela incidência de danificações. Woodstock (1973) destacou que a lixiviação de metabólitos das sementes está inversamente associada ao seu vigor, uma vez que reflete a perda da integridade das membranas, perda de constituintes essenciais da célula e pode favorecer a associação de microrganismos. Nesse sentido, diferentes testes, visando prever a viabilidade e o vigor de sementes, têm sido propostos (Tyagi, 1993).

2.4 Testes rápidos para a avaliação da qualidade de sementes

O teste padrão de germinação tem sido mundialmente utilizado na previsão de qualidade de sementes, devido a sua segurança e confiabilidade dos resultados. No entanto, esse teste necessita de mais de trinta dias, para indicar a viabilidade de lotes de sementes de cafeeiro e isso, segundo Delouche (1976) inviabiliza decisões rápidas sobre os processos de beneficiamento e armazenamento.

Os testes rápidos são de fundamental importância, em programas de controle de qualidade de sementes, com necessidade de utilização em diversas fases do sistema de produção (Fernandes, Sader e Carvalho, 1987). Esses testes se baseiam, principalmente, em propriedades físicas e fisiológicas das sementes, envolvendo processos respiratórios, ou ainda, na permeabilidade da membrana, ao avaliar a perda de metabólitos durante o processo de embebição de sementes.

O teste de tetrazólio é um dos testes mais promissores, que envolvem atividade enzimática - enzima desidrogenase, para uma estimativa rápida do potencial de germinação de uma semente. Sendo a avaliação do teste individual, para cada semente, mostra-se como um procedimento de sucesso, para avaliação da qualidade do lote (Delouche et al., 1976). No entanto, para obtenção de bons resultados, o teste requer analistas altamente especializados e dispêndio de tempo para sua execução (Antepara, 1979).

Outros métodos foram desenvolvidos no sentido de determinar a qualidade fisiológica de lotes de sementes, a exemplo do teste de condutividade elétrica, através da perda de eletrólitos para o meio de embebição (Mattews e Powell, 1981).

Tekrony (1983) relata o uso do teste de condutividade elétrica, desenvolvido por Matthews e Bradnock (1968), nos testes de rotina no período de 1972-1982. Mas, alguns problemas com a sua aplicação foram citados por Hepburn et al (1984) ao constatarem que sementes de algumas cultivares de ervilha apresentavam valores de condutividade maiores do que as outras, ainda que não houvesse variação no tamanho e na qualidade fisiológica das sementes.

Deswal e Sheoran (1993), trabalhando com medidas de absorvância espectrofotométrica, como alternativa do teste de condutividade elétrica, concluíram que medidas de condutividade elétrica apresentam boa correlação, quando a concentração de eletrólitos na semente é alta, mas em sementes pequenas, que lixiviam eletrólitos em concentrações relativamente baixas, o procedimento é pouco satisfatório.

Testes alternativos foram desenvolvidos, levando-se em consideração variações do pH e procedimentos colorimétricos. O primeiro deles foi o teste do timerosal, desenvolvido por Franco, Petrini e Amaral (1984), o qual se baseia na reação desse composto, com o exsudato de sementes embebidas em água, resultando em coloração laranja brilhante, para sementes viáveis e avermelhada para deterioradas.

Amaral e Peske (1984) observaram que exsudatos de sementes de soja, embebidas individualmente em água destilada, por um período de 20 horas, apresentavam diferentes tonalidades de cor, quando eram adicionadas duas gotas de um indicador misto, vermelho de metila e azul de metileno. Dessa forma, exsudatos que adquiriram cor verde, apresentavam estreita relação com sementes viáveis e de cor marrom com sementes inviáveis ou muito deterioradas. Tais tonalidades diferentes eram devidas ao pH do exsudato de cada semente, o qual

depois de mensurado individualmente, por meio de um peagâmetro, permitiu aos autores concluírem que exsudatos com pH inferior ou igual a 5,8 correspondiam a sementes não-viáveis e, quando superior a esse valor divisório, correspondiam à sementes de boa qualidade fisiológica. Posteriormente, esses mesmos autores desenvolveram um método colorimétrico, denominado teste do pH do exsudato ou teste de fenolftaleína.

O princípio bioquímico do teste pode ser hipoteticamente descrito da seguinte maneira : a organização dos sistemas de membranas a nível celular, em sementes, pode refletir seu estágio de deterioração e, conseqüentemente, à qualidade fisiológica. Assim, durante o processo de embebição e, previamente, à reorganização das membranas há liberação do conteúdo citoplasmático. A liberação de maiores quantidades de íons H^+ contribui para acidificar o meio e pode estar desfavoravelmente relacionado à capacidade de germinação de sementes (Marcos Filho, Cicero e Silva,1987).

Quando as sementes são submetidas à embebição em água, lixiviam maior ou menor quantidade de íons H^+ dependendo do seu estágio de deterioração, sendo que as mais deterioradas apresentam maior lixiviação desses íons e, conseqüentemente, exsudatos mais ácidos, com menor valor de pH; em contrapartida, as sementes menos deterioradas originarão exsudatos com valores de pH mais elevados (Amaral e Peske,1984).

Trabalhando com soja (*Glycine max.* L.), Amaral e Peske (1984) obtiveram correlação positiva, entre viabilidade e pH do exsudato de sementes, embebidas em água e determinaram o período de 30 minutos de embebição como ótimo, destacando o teste como sendo rápido, simples, preciso, de fácil avaliação e de baixo custo.

Barros e Marcos Filho (1990), utilizando do teste do pH do exsudato, para avaliar cinco épocas de colheita, em sete lotes de sementes de soja, conseguiram ótima correlação entre a emergência, em campo e o teste da fenolftaleína sob 30 minutos de embebição, apesar de superestimar a viabilidade de lotes com maior grau de deterioração. Tyag (1993) trabalhando com sementes de três variedades de soja colhidas em duas épocas distintas, utilizou o teste do pH do exsudato, para determinar sua viabilidade e constatou que tanto o teste padrão de germinação como o teste da fenolftaleína, foram capazes de detectar uma queda na germinação de sementes colhidas tardiamente, apesar do potencial de viabilidade, obtido pelo teste do pH, ter apresentado tendência de superestimar a capacidade germinativa nas duas épocas de colheita.

Em sementes de feijoeiro, Fernandes, Sader e Carvalho (1987), utilizando a metodologia do teste do pH do exsudato, trinta minutos de embebição verificaram que entre os sete cultivares estudados, quatro apresentaram resultados de viabilidade semelhantes aos detectados pelo teste padrão de germinação. Das três cultivares restantes, uma teve sua viabilidade subestimada e as outras duas superestimadas, quando da utilização do teste do pH do exsudato.

Carvalho (1992) trabalhando com amostras de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), com linter e deslinteradas quimicamente, testou seis tempos de embebição, associados a três temperaturas na execução do teste de pH do exsudato. O autor concluiu que o teste do pH do exsudato é viável para separar lotes de sementes de algodão em diferentes níveis de qualidade. Com relação ao efeito da temperatura de embebição, foi detectado que à 25°C só foi possível classificarem-se os lotes em melhor ou pior qualidade, ao contrário da

temperatura de 40°C, que separou as amostras em diferentes níveis de qualidade. Concluiu também, que o teste aplicado em sementes deslindadas quimicamente, proporciona uma separação de lotes, em diferentes níveis de qualidade, mostrando capacidade de estimar a viabilidade das sementes. No entanto, quando aplicado em sementes com linter, não apresenta capacidade de estimar a viabilidade das sementes, embora tenha sido capaz de separar lotes de diferentes níveis de qualidade.

Andrade (1994) avaliou a viabilidade de utilização do teste do pH do exsudato na determinação rápida do potencial de germinação de sementes de capim-brachiária (*Brachiaria decumbens* Staf. Cv. Basilisk). Foi estudada a influência do período e temperatura de embebição e o tamanho de gota do carbonato de sódio na execução do teste. O autor concluiu que é viável a utilização do teste do pH do exsudato, para estimar de forma rápida, a viabilidade de sementes de capim-brachiária, sendo que o tempo de 75 minutos à 25 °C, associado ao tamanho de gota de 14 µl, foi o que propiciou maior precisão de resultados.

Santana (1994) estudou o efeito da temperatura e tempo de embebição e o tipo de preparo das sementes (íntegras; seccionadas ao longo do eixo embrionário; escarificadas mecanicamente), nos resultados do teste do pH do exsudato, quando aplicado às sementes de milho (*Zea mays* L.). A autora concluiu que a utilização de sementes escarificadas associadas ao tempo de embebição de 30 minutos e à temperatura de 25 °C, apresentou a maior correlação com o teste padrão de germinação.

Segundo Barros (1988) há uma grande importância na padronização de procedimentos, visando uma maior uniformidade de resultados, principalmente,

no que se refere ao volume de água, período e temperatura de embebição, bem como o peso das gotas das soluções de fenolftaleína e carbonato de sódio, que podem originar alterações nas colorações dos exsudatos das sementes, provocando interpretações errôneas. Marcos Filho, Cícero e Silva (1987) observaram que podem aparecer dúvidas quanto a interpretação da viabilidade de sementes, colocadas em células, onde se obtém coloração rosa fraco, pois, essa tonalidade poderá não estar bem caracterizada e apresentar variações.

Existem poucos trabalhos utilizando métodos rápidos para avaliação da viabilidade de sementes de cafeeiro, sendo o teste de tetrazólio o mais estudado.

Vasquez e Morillo (1964) trabalhando com tetrazólio, em sementes de cafeeiro, testaram vários métodos de preparo das mesmas, utilizando sementes inteiras com e sem pergaminho, sementes com embrião brotado e fração da semente com exposição do embrião. As sementes inteiras, com pergaminho não apresentaram reação positiva de coloração. Naquelas em que houve um contato direto da solução de tetrazólio com o embrião, ocorreu reação positiva de coloração, variando de rosa claro até o roxo.

Mondonedo (1970) utilizando uma técnica de seccionar a semente longitudinalmente, ao longo do embrião, obteve melhores resultados, quando utilizou concentrações do sal de 0,1 e 0,5%, com tempo de imersão, variando de 8 a 16 horas. Concentrações mais fortes, acima de 2%, exerceram efeito prejudicial às sementes. Os resultados obtidos, comparados aos do teste de germinação, apresentaram números superiores de viabilidade. Observou também que sementes mais velhas necessitaram de maior tempo para a reação do que as sementes mais novas.

Dias e Silva (1986) utilizaram uma metodologia em que se procurou evitar ao máximo, os possíveis danos mecânicos no embrião durante o processo de preparo do teste. Nesse método, parte do endosperma, contendo o embrião é submetido à solução de tetrazólio, porém, a exposição do embrião não é feita diretamente com a solução. Somente após determinado tempo de exposição é que o embrião é isolado do endosperma. Segundo os autores, os resultados indicaram não haver variação para os tratamentos estudados, quando comparados ao teste padrão de germinação, indicando amplas possibilidades da utilização do teste de tetrazólio para estimar a germinação de sementes de cafeeiro.

Lopez (1988) também afirma ser o sal de tetrazólio, um indicador da viabilidade das sementes de cafeeiro, possibilitando seu uso para se ter um controle de qualidade de sementes para semeadura. A técnica empregada foi a de seccionamento longitudinal da semente ao longo do embrião, semelhante àquela proposta por Mondonedo (1970).

Weikert (1991) estudou três metodologias de aplicação do teste de tetrazólio, para sementes de cafeeiro, variando concentrações do sal de tetrazólio, temperatura e tempo de leitura. O autor concluiu que a temperatura de 30 °C, associada à concentração de 0,1% da solução de tetrazólio com a exposição total do embrião, foram os procedimentos que proporcionaram maior rapidez nos resultados e uma melhor correlação com os percentuais de viabilidade do teste padrão de germinação.

Mantovaneli et al. (1997), comparando metodologias do teste de tetrazólio, para determinar a viabilidade de sementes de cafeeiro, concluíram que, quando os embriões são expostos na semente e novamente submersos em

água a 30°C e sua extração completada após um período de 12 horas, ocorre maior perda dos embriões, mostrando-se inadequado o seu uso. Quando se utilizou o seccionamento da semente, ao longo do eixo embrionário, na concentração do sal de tetrazólio de 0,1%, ficou dificultada sua avaliação, levando a resultados imprecisos. Já a utilização de embriões extraídos proporcionou maior facilidade de avaliação, sendo que o tempo de submersão antes da retirada do embrião variou com o estágio de deterioração das sementes.

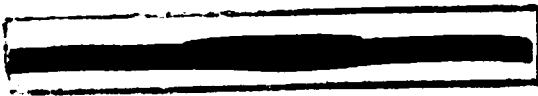
2.5 Fatores que influenciam os resultados do teste de pH do exsudato

De acordo com Popinigis (1985), o processo de embebição é do tipo difusão, sendo esse o movimento, ao acaso, de partículas de determinada substância, distribuindo-se uniformemente num espaço disponível. A velocidade de absorção de água da semente varia com a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato semente/água, forças intermoleculares, composição química e condição fisiológica. Holtzman e Novikoff (1985) verificaram que o aumento da temperatura aumenta a fluidez da membrana citoplasmática, facilitando assim o movimento da água através desta. Mas, apesar de aumentar a fluidez da membrana, o aumento excessivo da temperatura pode causar a ruptura das membranas e, como consequência, a lixiviação de íons orgânicos, aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas. Segundo Mayer e Poljakoff-Mayber (1989) o aumento da temperatura aumenta a energia cinética da água, com isso diminui a viscosidade da mesma, como consequência o processo de embebição torna-se mais rápido.

Marcos Filho, Cícero e Silva (1987) referindo-se ao teste do pH do exsudato-fenolftaleína, ressaltam a necessidade de utilização de amostras com grau de umidade uniforme, para obtenção de resultados mais precisos.

O efeito da umidade da semente no processo, segundo Becwar, Stanwood e Ross (1982) está na estreita relação entre a umidade contida na semente e o rápido aumento da lixiviação de solutos. Ao trabalharem com sementes recalitrantes, os autores verificaram que quanto menor é o grau de umidade da semente, maior a quantidade inicial de solutos lixiviados.

Fatores de natureza física, associados ao processo de embebição, são citados por Bruggink, Kraak e Bekendam (1991), ao verificarem sementes de milho submetidas a vários tipos de preparo (sem dano, dano severo no embrião e endosperma). Tais autores concluíram que após sete horas de embebição à 10 °C, as sementes danificadas apresentavam aumento significativo na lixiviação. Ainda segundo os autores acima citados, substâncias localizadas no pericarpo do milho são responsáveis pelo rápido aumento de eletrólitos lixiviados nas primeiras horas de embebição das sementes.



3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, no período de 1997 a 1998.

3.1 Aplicabilidade do Teste de pH do exsudato-fenolftaleína para estimar a viabilidade de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).

3.1.1 Obtenção das Sementes

Foram utilizadas sementes de cafeeiro da cultivar Acaia MG 1474/19 - colhidas no ano agrícola 1996/1997, produzidas no Campo de Produção de Sementes do Departamento de Agricultura da UFLA. O campo de sementes foi conduzido, seguindo os tratamentos culturais normalmente recomendados à cultura na região (Mendes et al., 1995).

A colheita foi feita manualmente, tendo-se o cuidado de colher apenas os frutos no estágio "cereja", conforme recomendação de Caixeta (1981). As sementes foram então, imediatamente despulpadas (retirando o exocarpo) e, logo em seguida, colocadas em tanque de fermentação, para se proceder a degomagem, ou seja, a retirada do mesocarpo ou mucilagem. Após processadas, as sementes foram selecionadas, eliminando-se aquelas quebradas ou mal formadas e secas à sombra até umidade de 14%, quando, então, foram armazenadas em câmara fria até a execução dos testes.

3.1.2 Metodologia para o teste do pH do exsudato

Foram utilizadas sementes sem o endocarpo (pergaminho), o qual foi retirado, utilizando-se o método manual, a fim de evitar qualquer tipo de dano ao embrião. Posteriormente, 4 repetições de cinquenta sementes foram acondicionadas em formas plásticas, com células individualizadas, de fundo côncavo de 2,7 cm de diâmetro e 1,8 cm de profundidade. Em cada célula foram colocados 2 ml de água destilada (pH 7,0) e uma semente, sendo que, para cada repetição, uma célula permaneceu somente com água, para referência no ato da interpretação. Anteriormente, foram feitos testes preliminares, utilizando-se tipos de preparo de sementes para a realização do teste, sendo que os mesmos constavam da utilização de sementes escarificadas, sementes seccionadas e sementes integras, sendo que, o tratamento com sementes íntegras foi o que obteve melhor resultado de avaliação para o teste. A embebição foi efetuada sob duas temperaturas, 25 °C e 30 °C, em câmaras de germinação (BOD), previamente reguladas. Os períodos de tempo de embebição foram de 8, 10, 12 e 14 horas, determinadas por um ensaio preliminar em que se acompanhou a variação do pH da solução de água (pH 7,0), contendo sementes de cafeeiro.

Após cada período de embebição, foi adicionado a cada célula uma gota da solução de fenolftaleína e carbonato de sódio anidro ($\pm 60 \mu\text{l}$), misturando-se, em seguida, com bastão de vidro. A avaliação foi realizada em função da coloração desenvolvida, sendo as sementes avaliadas em normais (rosa) e mortas (incolor).

Preparo da solução indicadora (solução AP)

Essa solução de fenolftaleína e carbonato de sódio, foi preparada mediante a dissolução de 1 grama de fenolftaleína, em 100 ml de álcool, adicionando-se igual volume de água destilada e recentemente fervida. Para o preparo da solução de carbonato de sódio, dissolvem-se 0,43 gramas de carbonato de sódio anidro, em 200 ml de água destilada e fervida. Em seguida, misturaram-se as duas soluções em partes iguais. Ao final do preparo, determinou-se o pH final da solução, o qual encontrava-se em torno de 10,2, (Amaral, 1991).

3.1.3 Perfil Fisiológico do lote.

Paralelamente ao teste do pH do exsudato-fenolftaleína, foi determinado o grau de umidade das sementes e o percentual de germinação pelos teste de germinação e de tetrazólio.

O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método de estufa à 105 ± 3 °C, durante 24 horas, conforme as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Foram utilizadas 2 sub-amostras do lote em estudo e os resultados foram expressos em porcentagem.

Para a determinação do percentual de germinação, pelo teste de germinação, foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes, as quais, após tratadas com os fungicidas Benomil e Thiran, nas dosagens de 200 e 100g /100 Kg de sementes, respectivamente, foram semeadas em papel toalha (50 sementes por rolo) previamente umedecidos com água, na proporção de 2,5 vezes o peso

do papel, dispostos na forma de rolos, em germinador tipo Mangelsdorf, previamente regulado para manter a temperatura de 30 °C.

As avaliações foram aos 30 dias após o início do teste, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras de Análise de Sementes (Brasil,1992).

A determinação do potencial de germinação, pelo teste de tetrazólio, foi efetuada em 4 amostras de 50 sementes do lote, que foram embebidas por 52 horas à 25°C em câmaras tipo BOD. Decorrido esse período, foi realizado o corte longitudinal sobre o eixo embrionário das sementes, de modo a expor o embrião e transferidos imediatamente para copos plásticos, contendo solução a 0,25% de sal de tetrazólio (cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio), aí mantidos por um período de tempo de 16 horas, na ausência de luz, à temperatura de 25°C. Após o desenvolvimento da coloração, as sementes foram avaliadas individualmente e classificadas em viáveis e não viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.1.4 Delineamento Estatístico

O teste do exsudato foi montado em esquema fatorial, utilizando-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, sendo o ensaio: 4 tempos de embebição (8,10, 12 e 14 horas) X 2 temperaturas (25 e 30 °C). Para a embebição, foi realizado estudo da regressão para os tempos utilizados.

3.2 Avaliação de metodologias para aplicação do Teste do pH do Exsudato-fenolftaleína.

3.2.1 Obtenção das Sementes

Três lotes de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv Acaia), foram selecionadas, sendo 1 lote da safra 96/97, 1 lote da safra 97/98 e 1 lote da safra 98/99, armazenados em câmara fria, do laboratório de sementes do Departamento de Agricultura da UFLA em condições controladas. As amostras representativas desses lotes foram retiradas e homogeneizadas, sendo que os mesmos sofreram o mesmo tipo de preparo, para obtenção das sementes, conforme descrito no item 3.1.1 .

3.2.2 Metodologia para o Teste do pH do Exsudato-Fenolftaleína

Foram utilizadas sementes sem o endocarpo (pergaminho), o qual foi retirado utilizando-se o método manual, a fim de evitar qualquer tipo de dano ao embrião. Posteriormente, quatro repetições de cinquenta sementes, foram acondicionadas em formas plásticas, com células individualizadas, de fundo côncavo de 2,7 cm de diâmetro e 1,8 cm de profundidade. Em cada célula foram colocados 2 ml de água destilada (pH 7,0) e uma semente, sendo que para cada repetição uma célula, permaneceu somente com água, para referência no ato da interpretação. A embebição foi efetuada sob a temperatura de 25°C, em câmaras de germinação (BOD) previamente reguladas. Os períodos de tempo de

embebição foram de 10, 15 e 20 horas, conforme resultados da primeira etapa do trabalho.

Após cada período de embebição, foi adicionado em cada célula uma gota da solução de fenolftaleína e carbonato de sódio anidro ($\pm 60 \mu\text{l}$), com três concentrações de mistura diferentes (1:1, 1:0.75 e 1:0.5), misturando-as em seguida, com bastão de vidro. A avaliação foi realizada em função da coloração desenvolvida, sendo as sementes avaliadas em normais (rosa) e mortas (incolor).

Preparo da solução indicadora (solução AP)

Essa solução de fenolftaleína e carbonato de sódio foi preparada mediante a dissolução de 1 grama de fenolftaleína em 100 ml de álcool, adicionando-se igual volume de água destilada e recentemente fervida. Para o preparo da solução de carbonato de sódio dissolveu-se 0,43 gramas de carbonato de sódio anidro, em 200 ml de água destilada e fervida, (Amaral,1991). Em seguida, foram misturadas as duas soluções nas proporções de 1:1, 1:0.75 e 1:0.5 de fenolftaleína e carbonato de sódio anidro respectivamente.

3.2.3 Perfil Fisiológico do lote.

Paralelamente ao teste do pH do exsudato-fenolftaleína, foi determinado o grau de umidade das sementes e o percentual de germinação pelos teste de germinação e tetrazólio, e vigor pelo teste de condutividade elétrica.

A determinação do grau de umidade, o teste de germinação e o teste de tetrazólio, foram realizados conforme descrito no item 3.1.3 da primeira etapa, para os lotes estudados.

Para o teste de condutividade elétrica, quatro repetições de 50 sementes, aparentemente intactas, foram selecionadas e pesadas para cada lote. Em seguida, foram imersas em 75 ml de água destilada por 24 horas à temperatura constante de 25°C. Com um condutivímetro de massa, marca DIGIMED, foi efetuada a leitura em $\mu\text{S}/\text{cm}$ e os resultados expressos com base no peso da amostra (Vieira, 1994).

3.2.4 Delineamento Estatístico

Para os testes de perfil fisiológico foram utilizados o delineamento inteiramente casualizado e suas médias comparadas entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O delineamento estatístico, utilizado no teste de pH do exsudato-fenolftaleína, foi montado em esquema fatorial, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo o ensaio: 3 lotes de semente X 3 tempos de

embebição (10, 15 e 20 horas) X 3 concentrações da solução indicadora (1:1, 1:0,75 e 1:0,50), com 4 repetições.

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, bem como foi realizada análise de correlação simples entre os resultados de todos os teste realizados.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Verificação da aplicabilidade do Teste do pH do Exsudato-fenolftaleína.

O resumo da análise de variância dos dados referentes ao teste do pH do exsudato das sementes de cafeeiro, revela significância ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F, somente para tempos de embebição (Tabela 1A).

Sabe-se, no entanto, que a temperatura exerce efeito considerável sobre o processo de embebição. As atividades metabólicas também são aumentadas à medida que aumenta a temperatura, o que ocasiona um conseqüente aumento na velocidade de embebição (Popinigis, 1985). Carvalho (1992) obteve efeito significativo da temperatura de embebição, no teste do pH de exsudato, quando de sua utilização para sementes de algodão com e sem línter. Andrade (1994), trabalhando com pH do exsudato, em sementes de brachiária, verificou a influência da temperatura de embebição associada ao tamanho de gota de carbonato de sódio na realização do teste. Contudo, nesse estudo, não foi detectado efeito das temperaturas consideradas no processo de lixiviação, provavelmente, devido a pequena faixa de variação (5°C) utilizada.

O estudo do tempo de embebição, foi realizado por meio de regressão linear, no qual o modelo de segundo grau foi o que melhor se ajustou aos dados, $R^2 = 98\%$ (Figura 1). Observando o gráfico, o tempo que propiciou o maior potencial de viabilidade foi de 8 horas. É importante ressaltar que para sementes de cafeeiro, tempos de embebição superiores a 10 horas propiciam maior lixiviação de exsudatos, levando a resultados não precisos da estimativa do potencial de germinação de sementes de cafeeiro por esse teste, concordando

com as observações de Amaral e Peske (1984) e Barros (1988) por ocasião de suas pesquisas com sementes de soja; com as de Carvalho (1992), trabalhando com semente de algodoeiro e com as de Andrade (1994), em sementes de capim braquiária. Esse fato sugere que com o aumento do período de embebição, ocorre também aumento da lixiviação de vários íons das sementes, principalmente H^+ , que irá promover a redução do pH da água de submersão.

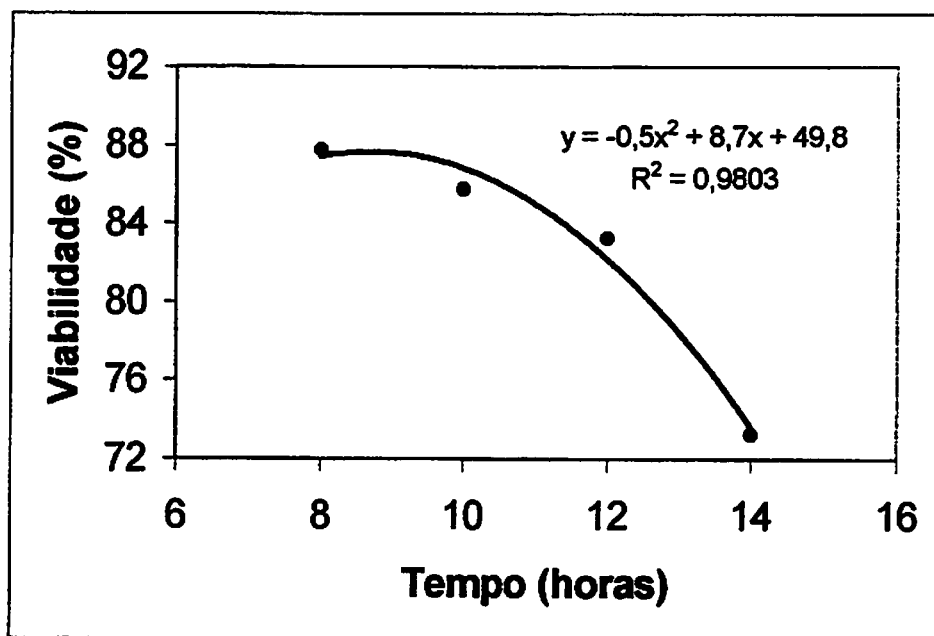


FIGURA 1. Estimativa do percentual de viabilidade de sementes de *Coffea arabica* L., avaliadas pelo teste do pH do exsudato-fenolftaleína, em diferentes tempos de embebição. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Os resultados da Figura 2 indicam que o teste do pH do exsudato-fenolftaleína, no tempo de embebição de 8 horas apresentou valores percentuais de germinação, tanto na temperatura de embebição de 25°C (88%), quanto na de 30°C (87%), bastante similares ao detectado pelo teste de germinação (88%). Esse fato, evidencia o potencial do referido teste, em estimar de forma rápida, o potencial de germinação de sementes de cafeeiro.

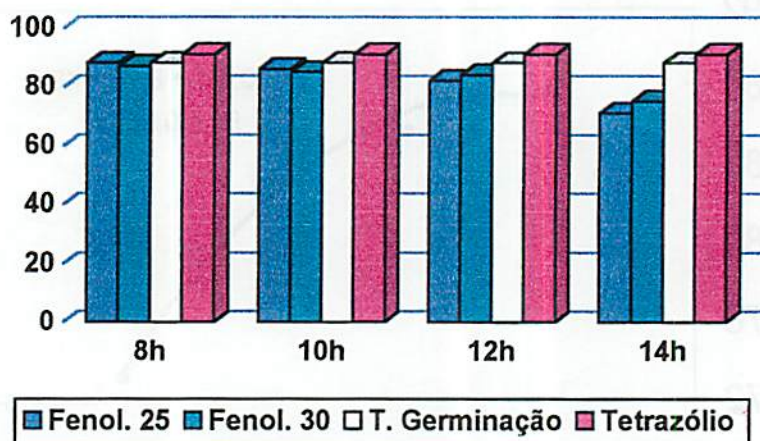


FIGURA 2 – Percentual médio de viabilidade de sementes de *Coffea arabica* L., considerando temperaturas e tempos de embebição. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Pode-se observar que os resultados do potencial de germinação detectado pelo teste de tetrazólio, foram ligeiramente superiores (3%), se comparados aos detectados pelo teste de germinação e pelo teste de pH do

exsudato-fenolftaleína. Essa diferença, no entanto, não invalida o resultado apresentado por nenhum teste, pois, pode ser devida a outros fatores, como por exemplo, composição da amostra em que foi efetuado o teste.

4.2 Avaliação de metodologias para aplicação do Teste do pH do Exsudato-fenolftaleína.

Os resultados do grau de umidade dos três lotes estudados, não foram submetidos a análise estatística e encontram-se apresentados na Tabela 1. É importante ressaltar a uniformidade do grau de umidade entre as amostras de sementes, já que, segundo Peske e Amaral (1986), Marcos Filho, Cícero e Silva (1987), diferenças no grau de umidade das sementes podem provocar alterações nos resultados do teste do pH do exsudato-fenolftaleína, comprometendo sua precisão.

TABELA 1. Resultados médios do grau de umidade das sementes de diferentes lotes de cafeeiro, *Coffea arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2000.

LOTES	GRAU DE UMIDADE (%)
1	9.7
2	9.9
3	9.5

Os resultados do resumo das análises de variância revelam efeito significativo, pelo teste “F”, para todos os testes utilizados na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de cafeeiro (Tabela 2A).

Os dados da Tabela 2, indicam que todos os testes utilizados para estimar a viabilidade e o utilizado para estimar o vigor dos diferentes lotes de sementes de cafeeiro, detectaram diferenças na qualidade desses, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Todos os testes detectaram o lote 3, como o de melhor qualidade, apesar do teste de condutividade elétrica não ter detectado diferença de vigor entre os lotes 2 e 3. O teste de germinação e o teste de vigor, pelo método de condutividade elétrica, detectaram o lote 1 como o de pior qualidade. Pode ser observado que o teste de tetrazólio superestimou o potencial de germinação do lote 1. Isso, provavelmente, ocorreu em função de sementes, que se encontravam em estágio avançado de deterioração e que no ato de germinar não possuíam energia suficiente não sendo, portanto, capazes de originar plântulas normais, mas que ainda apresentavam no teste de tetrazólio, coloração específica de sementes viáveis. Tanto assim é, que o teste de vigor, condutividade elétrica, o diferenciou do lote 2. Andrade (1994), trabalhando com adaptação do teste do pH do exsudato em sementes de capim brachiária (*Brachiaria decumbens* STAPF.), também concluiu que o teste de tetrazólio superestimou o potencial de germinação das sementes, comentando que isso provavelmente poderia ter ocorrido, devido ao fato do teste não sofrer influência de fatores externos, como dormência e presença de microorganismos.

TABELA 2 . Resultados médios de viabilidade e vigor determinados pelos teste padrão de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica, dos lotes de sementes de *Coffea arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2000.

LOTES	TETRAZ. (%)	T.G. (%)	C.E. (μS/cm/g)
1	82 b ¹	35,50 c	21,82 b
2	83 b	73,50 b	17,04 a
3	93 a	93,00 a	16,05 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Potencial de germinação pelo teste do pH do exsudato-fenolftaleína.

O resumo da análise de variância referente ao potencial de germinação, obtido pelo teste do pH do exsudato-fenolftaleína, revela efeito significativo entre os três fatores estudados (lotes, tempos de embebição e concentração da solução). Apesar da interação tripla ter sido significativa, mostrando uma relação de dependência entre os três fatores estudados, a concentração da solução indicadora não interagiu com lotes, quando se avaliaram os dois fatores (Tabela 3A), mostrando assim que o efeito da concentração da solução foi semelhante para lotes de diferentes qualidades. Dessa forma, a escolha da concentração da solução indicadora, que melhor caracterize o estágio de deterioração de um lote de sementes, dependerá, principalmente, do tempo de embebição que as sementes serão expostas no teste.

Os resultados apresentados na tabela 3, sugerem uma tendência de decréscimo do potencial de germinação, nos diferentes lotes e diferentes concentrações, com o aumento do período de tempo de embebição das sementes, concordando com os resultados obtidos na primeira etapa desse trabalho. A embebição é progressiva, por isso, o estabelecimento do tempo de embebição é fundamental na execução do teste. Para todos os lotes os maiores percentuais foram obtidos, quando o teste do pH do exsudato-fenolftaleína foi efetuado com 10 horas de embebição, independente da relação fenolftaleína/carbonato de sódio. Na concentração de 1:0.5 no lote 1 e concentração 1:1 no lote 2, os tempos de embebição de 15 e 20 horas diferiram entre si, na detecção dos resultados relativos ao potencial de germinação dos diferentes lotes. Nas demais concentrações não houve diferenças significativas.

TABELA 3 . Resultados percentuais médios de viabilidade, determinados pelo teste de pH do exsudato-fenolftaleína, nos tempos de embebição de 10, 15 e 20 horas, para sementes de *Coffea arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Tempo	1			2			3		
	1: 1	1: 0,75	1: 0,5	1: 1	1: 0,75	1: 0,5	1: 1	1: 0,75	1: 0,5
10 horas	84 a ¹	80 a	76 a	93 a	87 a	77 a	92 a	83 a	77 a
15 horas	76 b	70 b	58 b	82 b	72 b	66 b	87 a b	78 a b	66 b
20 horas	71 b	66 b	50 c	75 c	71 b	61 b	84 b	76 b	64 b

¹ Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados na Tabela 4, indicam que a relação fenolftaleína/carbonato de sódio, influenciou na obtenção dos resultados relativos ao potencial de germinação de sementes de cafeeiro para os três lotes estudados. Na maioria das combinações lote/tempo de embebição, a relação 1:1 de fenolftaleína/carbonato de sódio, propiciaram-se os maiores valores percentuais de viabilidade de sementes de cafeeiro, determinados pelo teste do pH do exsudato-fenolftaleína, a exceção do lote 1, quando o teste foi efetuado nos tempos de embebição de 10 e 20 horas e do lote 2, quando no tempo de 20 horas, os quais, embora com valores maiores, não diferiram da relação 1:0,75 de

fenolftaleína/carbonato de sódio. Isso, provavelmente, se deveu à reação que o carbonato de sódio provoca, elevando o pH da solução, o que propicia uma coloração rosa mais forte, na presença da fenolftaleína, podendo superestimar os percentuais de viabilidade dos lotes, fato esse observado por Barros (1988); Peske et al. (1990) e Andrade (1994).

TABELA 4 . Resultados percentuais médios de viabilidade, determinados pelo teste de pH do exsudato-fenolftaleína, nas concentrações da solução indicadora de 1:1, 1:0,75 e 1: 0,50, para sementes de *Coffea arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2000.

CONC	10 horas			15 horas			20 horas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1: 1,00	84 a	93 a	92 a	76 a	82 a	87 a	71 a	75 a	84 a
1: 0,75	80 a b	87 b	83 b	70 b	72 b	78 b	66 a	71 a	76 b
1: 0,50	76 b	77 c	77 c	58 c	66 c	66 c	50 b	61 b	64 c

[†] Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados na tabela 5, revelam que quando se utilizou o tempo de 10 horas, com a relação fenolftaleína/carbonato de sódio 1:0.5, não se

detectou diferença entre os potenciais de germinação dos diferentes lotes, divergindo dos resultados apresentados pelos demais testes determinantes da qualidade fisiológica das sementes.

Em todos os tempos e em qualquer das concentrações, o teste do pH do exsudato-fenolftaleína, a exemplo dos teste comparativos (teste de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica), distinguiu o lote 3 como o de melhor qualidade entre os avaliados.

Com excessão da metodologia, onde utilizou-se o tempo de 10 horas e as concentração de 1:0,50, na qual não houve diferença entre os 3 lotes, todas as outras conseguiram identificar o lote 1 como de mais baixa qualidade.

A qualidade intermediária não foi detectada por nenhuma das metodologias. O lote 2, em todos os casos, mostrou-se semelhante ora ao lote 1 ora ao lote 3.

Nenhuma das metodologias estudadas conseguiu, com precisão, separar a qualidade dos três lotes.

Assim é que para o lote da safra, o referido teste deve ser efetuado com um tempo de embebição de 10 horas, na concentração fenolftaleína/carbonato de sódio de 1:1. Para lote de safra anterior, o tempo de embebição deverá ser de 15 ou 20 horas, nas concentrações de 1:1 e 1:0.75 respectivamente. Para lotes mais velhos há necessidade de se estudar melhores tempos de embebição.

Em relação a diferenciação e classificação dos lotes, em termos de vigor, o teste do pH do exsudato-fenolftaleína, classificaram-se os lotes, a semelhança do teste de condutividade elétrica, quando foi desenvolvido no tempo de embebição de 10 horas, na concentração 1:1; 15 horas, nas concentrações 1:1 e 1:0.5 e 20 horas, na concentração 1:0,50. A concentração de 1:0.75, tanto no

tempo de embebição de 15 horas quanto de 20 horas e a concentração de 1:1 no tempo de 20 horas, classificaram-se os lotes à semelhança do teste de tetrazólio.

TABELA 5. Resultados percentuais médios de viabilidade, para três lotes de sementes de *Coffea arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 1999.

LOTES	10 horas			15 horas			20 horas		
	1: 1	1: 0,75	1: 0,5	1: 1	1: 0,75	1: 0,5	1: 1	1: 0,75	1: 0,5
1	84 b ¹	80 b	76 a	76 b	70 b	58 b	71 b	66 b	50 b
2	93 a	87 a	77 a	82 a	72 b	66 a	75 b	71 a b	61 a
3	92 a	83 a b	77 a	87 a	78 a	66 a	84 a	76 a	64 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Independente do tempo de embebição e da concentração da solução utilizados (Tabelas 4, 5 e 6), o teste do pH do exsudato-fenolftaleína superestimou a viabilidade do lote de qualidade inferior, quando comparado aos demais testes determinantes da qualidade fisiológica. Esse fato foi observado também por Barros (1988), quando trabalhou com o teste do pH do exsudato-fenolftaleína em sementes de soja e Carvalho (1992), com sementes de algodão. Provavelmente, lotes de café de pior qualidade, precisam de maiores tempos de

embebição, para que seu potencial de germinação possa ser estimado com maior precisão.

Pela Tabela 6, nota-se que os resultados percentuais médios do teste do pH do exsudato-fenolftaleína, para os lotes estudados em determinadas concentrações da solução e tempos de embebição, apresentaram correlação com os resultados detectados pelos demais testes, utilizados na determinação da qualidade fisiológica das sementes de cafeeiro de diferentes lotes. Nos tempos de embebição de 15 e 20 horas, houve correlação altamente significativa entre o teste do pH do exsudato e o teste de germinação, em todas as concentrações utilizadas, com exceção para a concentração de 1:0,5 em 15 horas, que foi significativa ao nível de 5%. Já a correlação com o teste de condutividade elétrica foi altamente significativa, em todas as concentrações com 15 horas de embebição e em 10 horas na concentração 1:1,0 e 20 horas na concentração de 1:0,5. Já com relação ao teste de tetrazólio, esse não mostrou boa correlação com o teste do pH do exsudato-fenolftaleína em nenhum tempo e concentração. A maior correlação foi entre o teste de germinação e o teste do pH do exsudato, desenvolvido na concentração de 1:0,5, com o tempo de 20 horas de embebição. Também a maior correlação entre o teste de condutividade elétrica e o pH do exsudato-fenolftaleína, deu-se quando foi efetuado nas condições citadas acima.

Deve-se atentar para o fato de que a análise da Tabela 6, apresenta dificuldades, considerando-se que apenas uma metodologia não foi eficiente, para ser utilizada em lotes de diferentes qualidades.

TABELA 6. Valores do coeficiente de correlação de Pearson, entre o teste do pH do exsudato-fenolftaleína, com os testes de tetrazólio, padrão de germinação e condutividade elétrica, realizados com sementes de *Coffea arabica* L. cv. Acaia. UFLA, Lavras-MG, 1999.

TESTE DE FENOLFTALEÍNA	TESTE DE TETRAZÓLIO	TESTE DE GERMINAÇÃO	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA
1:1,00	0,46 ^{NS}	0,79**	-0,82**
10 hs 1: 0,75	0,02 ^{NS}	0,42 ^{NS}	-0,65*
1: 0,50	-0,26 ^{NS}	0,22 ^{NS}	-0,19 ^{NS}
1: 1,00	0,61*	0,77**	-0,79**
15 hs 1: 0,75	0,69*	0,71**	-0,71**
1: 0,50	0,52 ^{NS}	0,67*	-0,80**
1: 1,00	0,61*	0,79**	-0,71*
20 hs 1: 0,75	0,53 ^{NS}	0,78**	-0,59*
1: 0,50	0,61*	0,91**	-0,84**

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{NS} Não significativo.

4.3 Considerações Gerais

- No presente trabalho utilizaram-se sementes de *Coffea arabica* cv. Acaiá, porém, sugerem-se trabalhos nessa linha, com a espécie *Coffea canephora* ou mesmo com outras cultivares.

- Diante da grande correlação existente entre temperaturas e tempo de embebição sugerem-se novos trabalhos, buscando maiores amplitudes tanto de temperatura como de tempo de embebição.

- Diante da dificuldade encontrada para a determinação de uma única metodologia (concentração X tempo de embebição X temperatura), para estimar a viabilidade de sementes de cafeeiro, pelo teste do pH do exsudato-fenolftaleína, sugerem-se diferentes trabalhos para diferentes qualidades de lote.



5 CONCLUSÕES

É viável a utilização do teste do pH do exsudato-fenolftaleína, para se estimar de forma rápida, a viabilidade de sementes de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá.

O teste do pH do exsudato-fenolftaleína, desenvolvido na concentração de solução 1:0.75 fenolftaleína/carbonato de sódio, no tempo de 15 horas, classificou e diferenciou os lotes à semelhança do teste de tetrazólio e na concentração de solução 1:1, no tempo de 10 horas, à semelhança do teste de condutividade elétrica.

O teste do pH do exsudato-fenolftaleína, desenvolvido na concentração de solução 1:0,75, no tempo de 20 horas, classificou os lotes à semelhança do teste de germinação.

Para estimar o potencial de germinação, a metodologia do teste do pH do exsudato-fenolftaleína vai variar, em função da safra do lote de sementes de cafeeiro. Para lotes da safra atual, o teste do pH do exsudato-fenolftaleína, efetuado na concentração de 1:1 e tempo de embebição de 10 horas é eficiente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, A.A. Substâncias de crescimento e regulação de desenvolvimento vegetal. Lavras: ESAL, 1990. 56p.
- AMARAL, A.D. Testes rápidos para estimar a germinação de sementes. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, v.44, n.397, p. 10-14, 1991.
- AMARAL, A D.; PESKE, S.T. pH do exsudato para estimar em 30 minutos, a viabilidade de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.6, n.3, p.85-92, 1984.
- ANDERSON, J.D. Metabolic changes associated with senescence. *Seed Science and Tecnology*, Zurich, V.1, n.2, p.401-416, 1973.
- ANDRADE, A C. Adaptação do teste rápido (pH do exsudato - fenoltaleína) para estimar a viabilidade de sementes de capim brachiária (*Brachiaria decumbens* STAFF). Lavras, UFLA, 1994. 67p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- ANTEPARA, H.V.E. Caracterização e avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja através do tetrazólio. Pelotas, U.F.P., 1979. 81p. (Tese MS).

- ARAÚJO, R.F.** Influência de teor de umidade, da embalagem e do ambiente de armazenamento e conservação de sementes de café. Viçosa: UFV, 1988. 56p (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- ARCILA-PULGARIN, T.** The effect of drying temperature on the germination of coffee seeds. *Cenicafé, Caldas*, v.27, n.2, p.89-91, Apr./June 1976.
- BACCHI, O .** Seca da semente de café ao sol. *Bragantia, Campinas*, v.14, n.22, p.225-236, nov. 1955.
- BARROS, A.S.R. do.** Testes para avaliação rápida da viabilidade e do vigor de sementes de soja [*Glycine max (L.) Merrill*]. Piracicaba: ESALQ, 1988. 140p. (Tese MS).
- BARROS, A.S.R. do.; MARCOS FILHO, J .** Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja, *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, v.10, n.25, p.1447-1459, out. 1990.
- BECWAR, M.R.; STANWOOD, P.C.; ROOS, E.E.** Dehydration effects on imbibitional leakage from desiccation-sensitive seeds. *Plant Physiology, Baltimore*, v.69, p.1132-1135, Apr.1982.
- BENDANÁ, F.E.** Fisiología de los semillas de café. *Turrialba, Turrialba*, v.4, n.15, p.99-106, out./dez. 1962.
- BERJAK, P.; VILLIERS, T.A.** Ageing in plant embryos V: Lysis of the cytoplasm in nonviable embryos. *New Phytologist, Cambridge*, v.71, p.1075-1079, 1972.

- BRANDÃO JÚNIOR, D. DA S. Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho. Lavras: UFLA, 1996, 110p. (Dissertação Mestrado em Fitotecnia).**
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA-Departamento Nacional de Defesa Vegetal, CLAV, 1992. 365p.**
- BRUGGINK, H.; KRAAK, H.L.; BEKENDAM, J. Some factors affecting maize (*Zea mays* L.) cold test results. Seed Science and Tecnology, Zurich, v.19, n.1, p.15-23, 1991.**
- CAIXETA, I.F. Maturação fisiológica da semente do cafeeiro cv. Mundo Novo. Lavras: ESAL, 1981. 48p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).**
- CARVALHO, C.A.M. Viabilidade de utilização do teste de pH do exsudato na avaliação da qualidade de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) Lavras: ESAL, 1992. 76p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).**
- CARVALHO, G.R. Germinação de sementes e aclimação de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas "in vitro". Lavras: UFLA, 1997. 64p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).**
- CARVALHO, M.M. de; ALVARENGA, G. Cultura do cafeeiro; parte II. Lavras: ESAL, 1993. 50p. (Apostila de cafeicultura).**

- COPELAND, L.O.; Mc Donald, M.B. Seed Science and Technology. 3.ed.,
New York: Chapman and Hall, 1995. 409p.**
- DELOUCHE, J.C. Standardization of vigor tests. Journal of Seed Technology,
Lansing, v.1, n.2, p.75-85, July, 1976.**
- DELOUCHE, J.C. BASKIN, C.C. Accelerated ageing techniques for predicting
the relative stability of seed lots. Seed science and Technology, Zurich,
v.1, n.2, p.427-452, 1973.**
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. O teste de
tetrazólio para a viabilidade da semente. Brasília: AGIPLAN, 1976.
103p.**
- DE ROBERTS, E.D.P.; DE ROBERTS JR., E.M.F. Bases da biologia celular e
molecular. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. 332p.**
- DESWAL, D.P.; SHEORAN, I.S. A simple method for seed leakage
measurement: aplicable to single seeds of any size. Seed Science and
Tecnology, Zurich, v.21, n.1, p.179-185, 1993.**
- DIAS, M.C.L. de; BARROS, A .S. do R. Conservação de sementes de café
(*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. Revista Brasileira de
Sementes, Brasília, v.15, n.2, p.197-202, 1993.**
- DIAS, M. C. L. de L.; SILVA, W. R. da . Determinação da viabilidade de
sementes de café através do teste de tetrazólio. Pesquisa Agropecuária
Brasileira, Brasília, v. 21, n.11, p.1139-1145, nov. 1986.**

- FERNANDES, D.P.; SADER, R.; CARVALHO, N.M. de. Viabilidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) estimada pelo pH do exsudato. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.9, n.3, p.69-75, 1987.
- FIGUEIREDO Jr., W.P.; FIGUEIREDO, T.G.; GOMES, M.S.; et al. Avaliação da concentração de espermoderma de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), na inibição alelopática da germinação de sementes de alface. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 6., , 1997, Belém: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1997. p.489.
- FRANCO, C.M. Apontamentos de fisiologia do cafeeiro. Campinas: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo/CATI, 1970. 55p.
- FRANCO, D.F.; PETRINI, J.A.; AMARAL, A.S. Novo teste de viabilidade em sementes de soja; teste de trimerosal. Pelotas: (EMBRAPA-UEPAE de Pelotas, 1984. 3p. (EMBRAPA-UEPAE. Pesquisa em Andamento, 10).
- GHOSH, B.; ADDDHIKARY, J.; BANERJEE, N.C. Changes of some metabolites in rice seeds during aging. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.9, n.2, p.468-473, 1981.
- GUIMARÃES, R.J. Formação de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), efeito de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas. Lavras: UFLA, 1995. 133p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

- HARMAN, D. Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, Springfield, v.11, p.298-300, 1956.
- HARMAN, D. Prolongation of life : role of free radical reactions in ageing. **Journal of American Geriatrics Society**, Baltimore, v.17, p.721-735, 1969.
- HEYDECKER, W. Vogour. In: ROBERTS, G.H (ed.). **Viability of seeds**. London: Chapman and Hall, 1974. p.209-252.
- HOLTZMAN, E. E.; NOVIKOFF, A B. **Células e estrutura celular**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1985. 630p.
- KOOSTRA, P.; HARRINGTON, J. Biochemical effects of age membranal lipids of *Cucumis sativus* L seed. **Proceedings International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.34, p.329-340, 1973.
- LOPEZ, M. H. Tetrazólio como indicador de viabilidade en semillas de cafe. **Resumenes de café**, Chinchiná, v.14, n.24, p.15-16, 1988.
- MANTOVANELI, M.C.H.; CAMARGO, R.; FIGUEIREDO, T.G.; et al. Comparação de metodologias para determinar a viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio. In. **CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES**, 10., 1997, Curitiba: Informativo ABRATES, V.7, n.1/2, p.115.
- MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. da. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

- MATTHEWS, S.; POWELL, A A** Electrical conductivity test. In: **PERRY, D. A** (ed.). **Handboock o Vigour Test Methods**. Zurich: ISTA, 1981. p.37-42.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF- MAYBER, A.** (eds) **The germination of seeds**. Oxford: Pergamon Press, 1975. p.21-45. Factors affecting germination, p. 21-45.
- MENDES, A N.G. et al.** **Recomendações técnicas para a cultura do cafeeiro no Sul de Minas**. Lavras, UFLA, 1995. 76p.
- MIGLIORANZA, E.** **Conservação de sementes de café (*Cofeea arabica L.* cv.Catuai) com diferentes teores de umidade, armazenadas em embalagens hermeticamente fechadas**. Piracicaba: ESALQ, 1982. 60p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- MIRANDA, J.M.** **Estudos de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café (*Cofeea arabica L.*) cv. Catuaí**. Lavras: ESAL, 1987. 60p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- MONDONEDO, J. R.** Quick teste with tetrazolium chloride on coffee seed viability. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**. Puerto Rico, v.54, n.2, p.370-376, 1970.
- POPINIGIS, F.** **Fisiologia da semente**. Brasília: Agiplan, 1985. 289p.
- POWEL A.A.** Cell membranes and seed leachate conducivity in relation to the quality of seed for sowing. **Journal of Seed Tchonogy**, Lansing, v.10, n.2, p.81-100, 1986.

- RENA, A .B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.26-40, jun.1985.
- RENA, A .B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A .B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA,T. **Cultura do cafeeiro; fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p.13-85.
- ROBERTS, E.H. Loss of seed viability: chromosomal and genetical aspects. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v.1, n.3, p.515-527, 1973.
- SANTANA, D.G.de. **Adaptação do teste do pH do exsudato e viabilidade do uso da amostragem sequencial na rápida definição sobre o destino de lotes de semente de milho (*Zea mays* L.)** Lavras: UFLA, 1994. 73p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- TEKRONY, D.M. Seed vigour testing-1992. **Journal of Seed Technology**, Lansing, v.8, n.1, p.55-60, Sept.1983.
- TYAGI, C.S. Evaluating viability na vigour in soybean seed na pH test. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v.21, n.2, 475-478, 1993.
- VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds (*Cofeea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.2, n.100, p.983-991, Oct./Nov. 1976.
- VASQUEZ, A . R.; MORILLO, A . R. Uso del tetrazolium en la determinacion del poder germinativo de la semilla de cafe. **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 14, n. 1, p. 25-32, 1964.

- VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras: UFLA, 1996. 114P. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).**
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.**
- WEIKERT, M.J.B. Comparação e aprimoramento de metodologias do teste padrão de germinação e tetrazólio na determinação da viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí). Lavras: ESAL, 1991. 58p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)**
- WENT, F.W. The experimental control of plant growth . New York: The Ronald, 1957. p.164-168. (Chronica Botanica. Na International Biological and Agricultural Series, 17).**
- WOODSTOCK, L.W. Physiological and biochemical tests for seed vigor. Seed Science and Technology, Zurich, v.1, n.1, 127-157, 1973.**

ANEXO

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos dados percentuais de viabilidade, determinados pelo teste do pH do exsudato, sob quatro tempos de embebição e duas temperaturas, para sementes de *Coffea arabica* L. cv. Acaia. UFLA, Lavras-MG, 1999.

F.V.	G.L.	Q.M.
Tempo	3	331,3333**
Temperatura	1	2,0000 ^{NS}
Tempo × Temperatura	3	12,0000 ^{NS}
Resíduo	24	9,9753
<hr/>		
Total	31	
<hr/>		
Média Geral	82,500	
C.V.(%)	4,1402	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

^{NS} Não significativo.

TABELA 2A - Resumo da análise de variância dos dados percentuais de viabilidade, determinados pelos testes padrão de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica, para sementes de *Coffea arabica* L. cv. Acaia. UFLA, Lavras-MG, 1999.

F.V.	G.L.	Q.M.		
		TETRAZ.	T.P.G.	C.E.
Lotes	2	40,5833**	3420,3333**	38,0936**
Resíduo	9	4,2778	19,7778	0,9649
Total	11			
Média Geral		42,8333	67,3333	18,3050
C.V.(%)		4,8287	6,6048	5,3663

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 3A - Resumo da análise de variância para o potencial de germinação determinados pelo teste do pH do exsudato, sob quatro tempos de embebição, três concentrações de solução indicadora e três lotes de sementes de *Coffea arabica* L. cv. Acaia. UFLA, Lavras-MG, 1999.

F.V.	G.L.	Q.M.
Tempo	2	2027,1111**
Lote	2	675,1111**
Concentração	2	2493,7778**
Tempo × Lote	4	64,8889**
Tempo × Concentração	4	40,8889**
Lote × Concentração	4	15,5556 ^{NS}
Tempo × Lote × Concentração	8	20,6667*
Resíduo	81	9,9753
Total	107	
Média Geral	74,8889	
C.V.(%)	4,2174	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

^{NS} Não significativo.

