

MÁRIO JORGE BOTELHO WEIKERT

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)

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração, Fito-tecnia, para obtenção do grau de "MESTRE"

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1991



DEPARTAMENTO

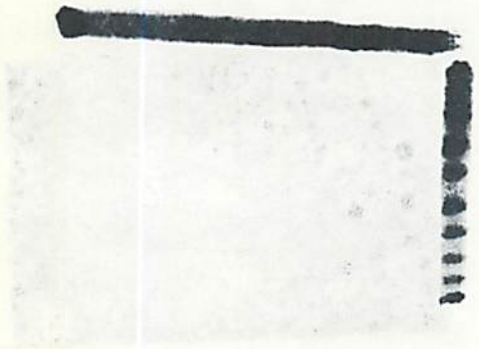
DE AGRICULTURA

AV. C. O. FERREIRA

DR. JOSE BOTELHO WITKOWSKI

COMPARAÇÃO E ABRIMORAMENTO DE METODOLOGIAS DO TESTE PADRÃO DE GERMINAÇÃO E TETRAZOLINA NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENES DE CAFÉ (Coffea arabica L. CV. CATUAI)

Esta pesquisa apresenta a faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, em homenagem ao Dr. José Botelho Witkowski, em reconhecimento a sua contribuição para a ciência e a cultura do Brasil.



ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

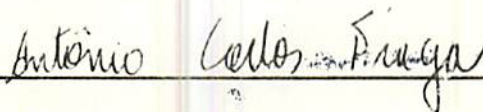
1991



COMPARAÇÃO E APRIMORAMENTO DE METODOLOGIAS DO TESTE
PADRAO DE GERMINAÇÃO E TETRAZOLIO NA DETERMINAÇÃO DA
VIABILIDADE DE SEMENTES DE CAFE
(*Coffea arabica* L. CV. CATUAI)

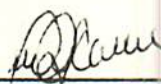
APROVADA EM: 22/03/1991

BANCA EXAMINADORA

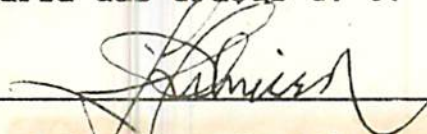


Prof. Dr. Antônio Carlos Fraga

(Orientador)



Profa. Maria das Graças G. C. Vieira



Prof. José Ferreira da Silveira

Aos meus pais

Mário Jorge e Henriqueta

Às minhas irmãs

M^a Tereza, Rita de Cássia e

Lucia Maria

À minha namorada

Márcia

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras-ESAL, especialmente ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

À Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais - EMATER, pela licença concedida para realização deste treinamento.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante o curso.

Ao professor Antônio Carlos Fraga, não só pela orientação, como também pela amizade, paciência, confiança, e incentivo.

À professora Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, pelas sugestões, ensinamentos e amizade.

Ao professor José Ferreira da Silveira, pela amizade e atenção.

Ao professor Gui Alvarenga, e à EPAMIG, através do pesquisador Antônio Nazareno Guimarães Mendes, pelo fornecimento das sementes para realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, pela atenção e amizade durante o curso.

Aos funcionários do viveiro de mudas de café da ESAL, pelo auxílio no preparo das sementes.

Aos funcionários da Biblioteca da ESAL, pela presteza e atenção.

Aos colegas de curso Edila, Renato, Elter, Antônio e Rinaldo, pela amizade e companheirismo durante o tempo de convivência, em especial ao Renzo e ao Renato pela colaboração na parte de computação.

Aos meus pais, irmãs e cunhados pelo carinho, compreensão, e incentivo em todos os momentos.

Ao meu sobrinho Christiano, pelos momentos de alegria, carinho e descontração.

Às tias Nini, Elza e Titita pela carinhosa acolhida.

À Márcia, pelo amor, confiança e estímulo em todos os momentos.

A todos aqueles que contribuíram de uma maneira ou de outra para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Análise de sementes	4
2.2. A semente de café	5
2.2.1. Estrutura	5
2.2.2. Germinação	7
2.3. Teste padrão de germinação	9
2.4. Teste de tetrazólio	12
2.4.1. Mecanismos da reação	12
2.4.2. Teste de tetrazólio em sementes de café	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Experimento 1	19
3.1.1. Teor de umidade	20
3.1.2. Análise estatística	21
3.2. Experimento 2	21
3.2.1. Metodologia 1	22
3.2.2. Metodologia 2	23
3.2.3. Metodologia 3	24
3.2.4. Critérios para avaliação	26
3.2.5. Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

4.1. Experimento 1	27
4.2. Experimento 2	32
5. CONCLUSÕES	44
6. RESUMO	45
7. SUMMARY	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE	54

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Resultados médios de germinação (%) de sementes de café pelo teste padrão de germinação, obtido de sementes com e sem o pergaminho.	28
2 Resultados médios de germinação de sementes de café (%), obtidos sob diferentes temperaturas, com e sem pré-embebição, pelo teste padrão de germinação.....	29
3 Resultados médios de germinação de sementes de café (%), obtidos sob diferentes temperaturas e substratos, pelo teste padrão de germinação.	30
4 Resultados médios de germinação de sementes de café (%) obtidos sob diferentes substratos, com e sem pré-embebição, pelo teste padrão de germinação.	31

Quadro

Página

5	Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio, obtidos na metodologia 1, em diferentes concentrações e temperaturas.	34
6	Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 2, em diferentes concentrações e temperaturas.	35
7	Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%) obtidos na metodologia 3, em diferentes concentrações e temperaturas.	35
8	Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%) obtidos na metodologia 1 em diferentes concentrações e tempos de reação.	36
9	Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 2, em diferentes concentrações e tempos de reação.	36

Quadro	Página
10 Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 3, em diferentes concentrações e tempo de reação. 37	37
11 Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 1 em diferentes temperaturas e tempos de reação. 39	39
12 Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 2, em diferentes temperaturas e tempos de reação. 40	40
13 Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 3, em diferentes concentrações e tempo de reação. 42	42
14 Efeito da concentração de tetrazólio, temperatura e tempo de imersão no grau de reação de coloração em sementes de café, nas diferentes metodologias estudadas..... 43	43

Quadro	Página
1A Resumo da análise de variância para os dados de germinação (%), realizado com diferentes substratos e temperaturas, com e sem pré- embebição de sementes.....	55
2A Resumo da análise de variância para os dados de viabilidade pelo teste de tetrazólio (%), utilizando três metodologias distintas.....	56
3A Resumo da análise de variância dos dados referentes à viabilidade de sementes de café pelos testes de tetrazólio (%) e teste padrão de germinação.....	57
4A Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio e teste padrão de germinação.....	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Corte longitudinal da semente de café para exposição do embrião (METODOLOGIA 1)	23
2	Esquema de cortes efetuados nas sementes de café sem exposição do embrião (METODOLOGIA 2).....	24
3	Exposição do embrião da semente de café após cortes superficiais e levantamento da camada superior do endosperma (METODOLOGIA 3).....	25

1. INTRODUÇÃO

A análise de sementes foi idealizada e vem sendo continuamente aperfeiçoada tendo como principal finalidade a avaliação da qualidade de lotes de sementes para fins de comercialização e densidade de semeadura, BRASIL (1976).

Entretanto, para que se tenha um real conhecimento da qualidade das sementes, é necessário a disponibilidade de métodos que permitam obter resultados uniformes e comparáveis entre diferentes análises e diferentes analistas. A fim de se alcançar este objetivo é imprescindível a disponibilidade de instalações adequadas, pessoal convenientemente treinado e métodos uniformes, bem como um programa de pesquisa em análise de sementes que procure desenvolver novos métodos e aprimorar os já existentes.

Sementes de café possuem uma germinação muito lenta, SCARANARI (1954), FRANCO (1963), sendo necessário trinta dias para obtenção dos resultados do "teste padrão de germinação", BRASIL (1976). Além do mais, as sementes de café são reconhecidamente chamadas "de vida curta" BENDANA (1962), e seu armazenamento, quando realizado sob condições

adversas, induz a uma rápida perda da viabilidade.

Segundo DIAS & SILVA (1986), a lenta germinação das sementes de café, aliada à rápida perda do poder germinativo, 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. Diante disso, torna-se importante o conhecimento do estado fisiológico da semente em tempo hábil.

Devido ao demorado tempo exigido pelo teste padrão de germinação, alguns inconvenientes, como a predisposição ao ataque de patógenos, alterações do substrato e condições de umidade são passíveis de ocorrer no decorrer do teste, prejudicando seriamente a leitura do teste, podendo levar a resultados duvidosos.

Para sementes de *Coffea* spp, as recomendações contidas nas "Regras Para Análise de Sementes" não foram ainda regulamentadas pela ISTA, "Internacional Seed Testing Association", permitindo assim variações na metodologia do teste de germinação.

O teste de tetrazólio vem a cada dia se revelando como um ótimo indicador da qualidade de sementes, bem como do potencial de germinação das mesmas, tendo como maior vantagem sua rapidez em fornecer resultados. Entretanto, para sementes de café, a metodologia de preparo da semente para o teste é controversa e carece de aprimoramento em alguns pontos.

Em face do exposto, este trabalho teve for objetivo procurar contribuir para o aperfeiçoamento do "teste padrão de

germinação" em sementes de café, através de variações nas temperaturas, substrato e preparo das sementes, visando maior eficiência na sua realização. Procurou-se também, um aprimoramento na realização do teste de tetrazólio, comparando diferentes metodologias de realização do teste, a fim de se ter maior praticidade e coerência com a real qualidade das sementes.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 *Análise de sementes*

Para a avaliação da qualidade das sementes existem métodos e regras estabelecidas, publicadas sob a denominação de "Regras para Análise de Sementes", também conhecidas como "RAS". Estas regras, adotadas no Brasil, foram elaboradas baseando-se nas regras da "International Seed Testing Association", (ISTA), e representam o resultado de experiências de pesquisadores e analista do mundo inteiro.

Estas regras visam padronizar os métodos de tal forma que os resultados obtidos de diferentes analistas e laboratório, referentes a um determinado lote, possam ser comparáveis entre si, dentro de certos limites de tolerância especificados nas próprias "Regras", como "tabelas de tolerância", LIBERAL (1975).

As "RAS" determinam para cada espécie estudada, as condições ideais para a condução dos testes, como temperatura ótima, substrato mais adequado, número de dias exigido para as avaliações, acompanhado de várias instruções adicionais que possibilitem o máximo de eficiência na realização dos

testes.

Os métodos de análise contidos nas "RAS", são qualificados como "Prescrições " ou "Recomendações". As prescrições são procedimentos obrigatórios e devem ser rigorosamente seguidas nas análises cujos resultados serão oficialmente emitidos em "Boletim de Análise". Quanto às recomendações, estas devem ser aplicadas sempre que possível, não sendo porém, obrigatórias, podendo ser alteradas de acordo com as necessidades do analista, devendo, no entanto, serem anotadas na ficha de análise e mencionada no respectivo Boletim, BRASIL (1976).

2.2 *A semente de café*

2.2.1 *Estrutura*

As sementes do cafeeiro são plano-convexas, elípticas ou ovais, sulcadas longitudinalmente na face plana e constituem-se de embrião, endosperma e um envoltório representado pelo espermoderma ou película prateada, constituído por numerosas células esclerenquimatosas, dispostas em diferentes direções, RENA & MAESTRI (1986).

A maior parte do tecido da semente é constituída pelo endosperma; na semente madura ele apresenta-se como um tecido córneo, esverdeado ou cor de cana, formado por células poliédricas de paredes muito espessas, onde as hemiceluloses

impregnantes apresentam uma função de reserva, DEDECCA (1957).

Nas pontuações primárias das paredes celulares do endosperma, AYRES (1954) observou a presença de plasmodesmos, aos quais atribui importante papel no transporte de substâncias durante o processo de germinação.

No tecido endospermico, sua camada mais externa é uniforme, com células apresentando paredes muito espessas. Ao nível da região mediana do endosperma, junto à cavidade embrionária, as células se tornam achatadas constituindo uma região mais ou menos densa. A seguir, para o interior, as células reassumem sua forma inicial. A zona densa marca o limite entre as duas porções do endosperma geralmente aceita pelos autores: endosperma duro e endosperma mole, correspondendo respectivamente às porções para o exterior e para o interior da zona densa, Ukers, citado por DEDECCA (1957).

Ao que parece, o embrião ao se desenvolver, alimenta-se quase que exclusivamente das camadas do endosperma mole, ao passo que as camadas exteriores (o endosperma duro), destacam-se e vão constituir o capuz que envolve os cotilédones da plântula, FRANCO (1963).

O endosperma é constituído, além de água, de proteínas, cafeína e outros alcalóides, triglicerídeos, açúcares, dextrina, pentosanas, galactomananas, celulose, ácido cafeico, ácido clorogênico e minerais, WOLFRON et alii (1960). Essa composição química tem grande importância na qualidade da bebida e também durante o processo de germinação, RENA & MAESTRI (1986).

O embrião da semente de café é relativamente

pequeno, com cerca de 3 a 4 mm, CARVALHO & SALLES (1957) e localiza-se na base da semente, na sua face convexa. É formado por um eixo hipocótilo-radícula e dois cotilédones cordiformes. Raramente observa-se a ocorrência de um embrião com tres ou quatro cotiledones, DEDECCA (1957).

Geralmente considerado parte da semente, o pergaminho corresponde ao endocarpo do fruto. Quando maduro torna-se coriáceo e envolve independentemente cada semente.

Para obtenção de sementes de melhor qualidade, diversos autores recomendam obtê-las de frutos que se encontram no estágio cereja, CAIXETA (1981), SCARANARI (1954).

2.2.2 *Germinação*

O processo de germinação de sementes de café é considerado lento, FRANCO (1963), CARVALHO & SALLES (1957). O tempo gasto para emergência no canteiro varia de 40 a 60 dias, ou mais, dependendo da umidade e temperatura.

A medida em que as raízes se desenvolvem, os cotilédones emergem do solo envolvidos por uma parte de tecido do endosperma, permanecendo neste estado por um período relativamente longo, até que os cotilédones se abrem e as primeiras folhas definitivas se desenvolvem, CARVALHO & SALLES (1957).

A temperatura de 30°C, as sementes germinam num prazo de 3 a 4 semanas, principalmente se o pergaminho é removido,

RENA & MAESTRI (1986). Rena, citado por FRANCO (1963), relata que sementes de Catuai sem pergaminho germinaram em apenas 15 dias, sob temperatura de 32°C.

Há evidências de que a presença do pergaminho na semente exerça influência na sua germinação. BENDANA (1952) estudando a germinação de sementes de café, concluiu não ser o pergaminho barreira de importância para o desenvolvimento do embrião. Sementes com o pergaminho parcialmente rompido germinaram tão rapidamente quanto aquelas sem pergaminho. Afirma também que o pergaminho constitui sim, um fator de atraso na germinação por não permitir uma normal absorção de água pela semente; e que não há inibição química por parte do pergaminho que afete o desenvolvimento do embrião.

MANPRIN (1947) em experiências no campo, concluiu não haver vantagem na eliminação do pergaminho, pois tanto as sementes com ou sem pergaminho germinaram normalmente.

No entanto, VALIO (1980) afirma que a presença do pergaminho nas sementes, em testes de laboratório, inibiu drasticamente a germinação. Sementes sem o pergaminho germinaram em média 91%, contra 0% daquelas com pergaminho. A hipótese básica seria a de que o pergaminho atuasse como barreira à entrada de água e gases. Contudo, a escarificação do pergaminho até a superfície da semente não predisps à germinação. Também a absorção de água em sementes com pergaminho não foi afetada, o que difere dos resultados obtidos por BENDANA (1962).

A presença de substancias semelhantes ao ácido

abacísico foi detectada em extratos de endosperma e embrião de sementes de café, por VALIO (1976) mas o autor conclui que o ABA não é o responsável pela inibição da germinação, uma vez que sementes sem o pergaminho germinaram normalmente. Observou também que, no caso de germinação no solo, o pergaminho é rapidamente decomposto pela flora microbiana, ocorrendo a germinação; quando em meio asséptico, a presença do pergaminho inibiria a germinação. Esta inibição, segundo o autor, não se deve a alguma insuficiência na absorção de água, mas, mais provavelmente a algum mecanismo de resistência imposto pelo pergaminho sobre o desenvolvimento do embrião.

2.3 *Teste padrão de germinação*

O teste de germinação determina, numa amostra, a proporção de sementes vivas e capazes de produzir plantas normais sob condições favoráveis. Foi desenvolvido e aperfeiçoado para avaliar o valor da semente para o plantio, bem como para comparar o valor de diferentes lotes, servindo assim como base para o comércio de sementes. É executado oferecendo às sementes as condições mais favoráveis possíveis, tais como umidade, temperatura, aeração e substratos mais adequados, POPINIGIS (1977).

Métodos de análise em laboratório, efetuado sob condições controladas de alguns ou de todos os fatores externos tem sido estudados e aperfeiçoados de modo a possibilitar uma

germinação mais regular, rápida e completa da maioria das amostras de uma determinada espécie de semente, BRASIL (1976).

CARVALHO & NAKAGAWA (1983) citam que o processo de germinação consiste de uma sequência complexa de reações bioquímicas, pelas quais substâncias de reservas armazenadas no tecido de sustentação são desdobradas, transformadas e resintetizadas no eixo embrionário. A germinação e o processo serão mais rápidos e eficientes quanto maior for a temperatura, até um certo limite. Assim sendo, a germinação somente ocorre dentro de uma faixa de temperatura, dentro da qual existe uma temperatura considerada ótima, onde o processo se realiza com a máxima eficiência.

Dentre os fatores envolvidos no teste de germinação, também o substrato assume grande importância. Os diferentes substratos comumente recomendados variam entre si em sua composição, toxicidade às sementes, associação com patógenos, aeração e capacidade de retenção de umidade, JUSTICE (1972), devendo assim haver critério na escolha do substrato mais adequado, levando em consideração a facilidade que o mesmo oferece para o perfeito desenvolvimento das plântulas, realização das contagens e avaliação das plântulas.

No momento, as recomendações contidas nas "Regras para Análise de Sementes" referentes a sementes ao gênero *Coffea* spp não foram ainda regulamentadas pela "ISTA", "International Seed Testing Association", ou seja, não são prescrições, permitindo assim, variações na realização do teste.

Para sementes de café, são mais recomendados os substratos "Rolo de Pano" (RO), Rolo de Papel (RP) e "Entre areia" (EA), BRASIL (1976).

No entanto, o substrato "pano" (RO) que seria o mais recomendado para sementes de café, possibilita alguns inconvenientes como o desenvolvimento do sistema radicular entre os fios do tecido, comprometendo seriamente a avaliação das plântulas, pela danificação causada na abertura dos rolos. Devido a este fato, na prática observa-se uma preferência pelo uso do substrato "papel" (RP) mas que, devido ao longo tempo e condições a que é submetido, perde muito de suas propriedades, e, aliado à predisposição ao ataque de patógenos dificulta bastante a avaliação das plântulas.

Sendo a temperatura recomendada a de 30°C constantes ou 20-30° C alternadas, possibilita o desenvolvimento de diversos fungos como *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp que, segundo PELCZAR et alii (1980) tem sua temperatura ótima de desenvolvimento situada nesta faixa.

Resultados obtidos com outras espécies tem evidenciado interações entre as temperaturas de germinação e os substratos utilizados.

CARNEIRO & PIRES (1983) testando diferentes substratos para sementes de mamona, verificou que as plântulas cujas sementes germinaram no substrato "pano" (RO) tiveram danos no sistema radicular durante a abertura dos rolos, dificultando a avaliação do teste. No substrato "papel" (RP) houve grande perda de umidade, enquanto que no substrato "papel+pano" (RPO), a

perda foi menor, e foi também o que apresentou menor ataque de microorganismos nas plântulas e sementes.

Trabalhando com sementes de seringueira, MACEDO (1985) observou que o substrato "pano" (RO) manteve sua umidade durante todo o decorrer do teste, apresentando baixa incidência de patógenos. Quanto ao substrato "papel" (RP), verificou uma rápida desidratação, excessiva e desigual, exigindo o reumidescimento dos rolos várias vezes durante o teste; fato este que deve ser evitado sempre que possível, uma vez que pode causar variações adicionais nos resultados, BRASIL (1976). Observou-se também, no substrato "papel" (RP), ocorrência de fungos, os quais se espalharam rapidamente por toda a superfície. O desenvolvimento das plântulas no substrato "pano" (RO) não provocou perfurações neste substrato, mostrando ser perfeitamente viável para as sementes analisadas.

2.4 Teste de tetrazólio

2.4.1 Mecanismo da reação

O teste de tetrazólio foi desenvolvido com o objetivo de prover estimativas rápidas da viabilidade das sementes, úteis para facilitar o comércio de sementes, testes preliminares no trabalho de controle de qualidade das sementes,

avaliar lotes quanto ao vigor, suplementar testes de germinação, DELOUCHE et alii (1976).

O princípio de ação baseia-se na atividade das enzimas dehidrogenases envolvidas na atividade respiratória de sistemas biológicos e que catalisam a redução do sal de tetrazólio (2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio) nas células vivas. Durante esse processo as enzimas agem inicialmente como receptoras de H^+ . Em suma, transferem ions H^+ liberados pela respiração de tecidos vivos para o sal de tetrazólio. Quando em contato com as sementes, o sal é reduzido, formando um composto não difusível de coloração vermelha, conhecido por "Formazan", DELOUCHE et alii (1976), GRABE (1976).

A interpretação do teste é baseada na graduação da coloração do embrião, nas áreas essenciais ao desenvolvimento, ROBERTS (1972).

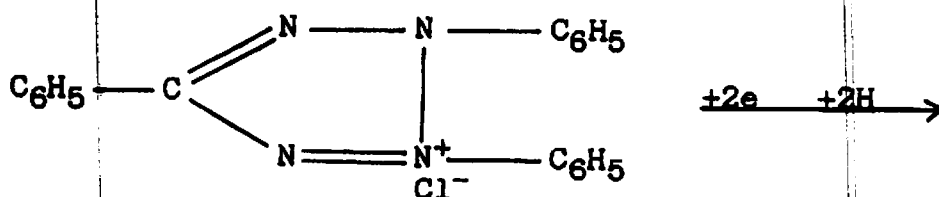
Embriões saudáveis absorvem o tetrazólio lentamente e tendem a desenvolver uma coloração mais leve que aqueles envelhecidos e/ou danificados. Os tecidos não-vermelhos, firmes e sadios, distribuídos uniformemente entre os tecidos coloridos indicam mais a falta de penetração da solução do que a morte dos tecidos. Coloração vermelha muito intensa indica avançado estado de deterioração enquanto que a coloração branca é demonstrativa de tecidos mortos.

Além da cor, atenção deve ser dada também à presença de danos mecânicos, contusões e turgescência dos tecidos. O tecido vivo é túrgido, enquanto que o tecido morto é de aparência flácida e opaca, GRABE (1976).

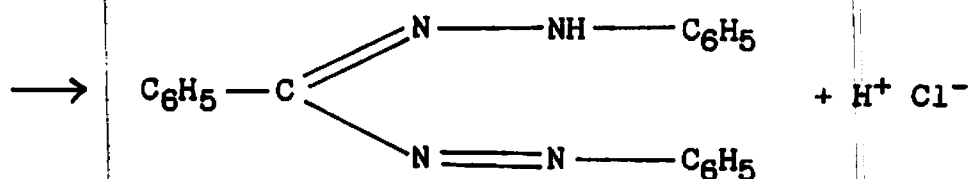
Deve-se ressaltar a importância de considerar, na

avaliação das sementes, não somente a extensão do dano, mas principalmente, a localização do mesmo.

Essa reação pode ser esquematizada da seguinte maneira, segundo DELOUCHE et alii (1976).



cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
.incolor, difusível



FORMAZAN
. vermelho, não difusível

O cloreto de 2,3,5, trifenil tetrazólio é um sal de coloração branca ou amarelo clara, solúvel em água. As soluções são preparadas com água destilada e podem permanecer armazenadas durante vários meses, em recipientes não-metálicos, escuros, em local com temperatura amena, DELOUCHE et alii, (1976), GRABE (1976).

De um modo prático, prepara-se inicialmente uma solução a 1,0% que pode ser usada como solução estoque para

futuras diluições.

2.4.2 O teste de tetrazólio em sementes de café

Vários métodos de teste rápido estão sendo testados em diferentes tipos de sementes. O teste de tetrazólio já tem comprovado sua eficiência em diversas culturas, como soja, milho e algodão, entre outras.

Entretanto, quando se trata de sementes de café, há uma certa dificuldade na aplicação do teste em função da definição da metodologia a ser adotada para sua condução, DIAS & SILVA (1986).

VASQUEZ & MORILLO (1964) trabalhando com tetrazólio em sementes de café, testaram vários métodos de preparo das sementes, utilizando sementes inteiras com e sem pergaminho, sementes com embrião brotado e fração da semente com exposição do embrião. Utilizaram concentrações de 1, 2 e 3% de tetrazólio. 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 desde rosa claro até o roxo. Concentrações mais fortes, de 3%, foram prejudiciais para as sementes, apresentando efeito cáustico.

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 que as sementes mais novas.

GOLDBACH & VIZCARRA (1980) propuseram uma técnica própria para excisão do embrião. Em seu trabalho testaram preliminarmente a técnica de cortes longitudinais ao longo do embrião, como descrito por MONDONEDO (1970), não obtendo, entretanto, resultados concretos. Os autores observaram que a área de superfície do corte permanecia esbranquiçada, e a penetração da solução ocorria de forma irregular dificultando uma avaliação coerente. Quando trabalharam com embriões excisados, estes coloriram completamente após 4 horas de teste, a 35° C. A técnica, embora mais trabalhosa, consiste em deixar o embrião totalmente exposto à solução de tetrazólio possibilitando a obtenção de resultados em menor tempo, como também permitindo uma melhor visualização da coloração adquirida pelo embrião.

DIAS & SILVA (1986), procurando aprimorar a técnica de realização do teste de tetrazólio em sementes de café, utilizaram uma metodologia em que se procurou evitar, ao máximo, os possíveis danos mecânicos no embrião, durante o processo de preparo do teste. Neste 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 ausência de variabilidade para os tratamentos estudados, quando comparados com o teste padrão de germinação, indicando amplas possibilidades da utilização do teste de tetrazólio para estimar a germinação de sementes de café.

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

Independente da metodologia, na maioria dos trabalhos a remoção do pergaminho seguido da imersão em água morna foi considerada necessária para facilitar a localização do embrião. A imersão tornou mais fácil a remoção da película prateada, deixando o endosperma translúcido, possibilitando a visualização, no lado dorsal, da sombra branca do embrião no interior do endosperma, facilitando sua localização ao seccionar a semente. Outra função da imersão em água morna é a de promover o amolecimento do endosperma o bastante para ser cortado mais facilmente, MONDONEDO (1970), GOLDBACH & VIZCARRA (1980), DIAS & SILVA (1986) e LOPEZ (1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Análise de sementes do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras, em Lavras, MG, e constou de 2 experimentos.

As sementes utilizadas foram da cultivar CATUAI VERMELHO CH 2077-2-5-44, safra 88/89, coletadas na ESAL, para o experimento 1 e da safra 89/90, coletadas na Fazenda Experimental da EPAMIG de Lavras, MG, para o experimento 2.

A colheita dos frutos foi realizada manualmente recolhendo apenas os frutos cereja, conforme recomendação de CAIXETA (1981) e SCARANARI (1954). Em seguida, realizou-se o despulpamento e fermentação, por cerca de 15 horas, para retirada da mucilagem. As sementes foram secas à sombra, a fim de retirar o excesso de umidade. Por último, realizou-se uma catação manual eliminando-se sementes pequenas e com defeitos. Até a realização dos testes as sementes foram mantidas em sacos de papel, à temperatura ambiente.

3.1 *Experimento 1*

Este estudo constou da realização do teste padrão de germinação utilizando tres tipos de substratos em duas temperaturas, com e sem a pré embebição das sementes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 2 x 3) com 4 repetições, correspondendo respectivamente aos fatores:

- . temperatura: 30 e 35°C
- . embebição: sementes secas e sementes pré-embebidas em água durante 15 horas.
- . substratos: papel(RP), pano (RO) e papel e pano (RPO)

O teste padrão de germinação foi realizado com 4 repetições de 100 sementes, sendo semeados dezesseis rolos com 25 sementes cada, para cada tratamento.

As sementes tiveram o pergaminho removido uma vez que, em testes preliminares, a presença do pergaminho impediu a germinação das sementes.

Os substratos utilizados foram:

- . papel, marca GERMITEST, pH neutro, em folhas de 40 x 29 cm aproximadamente, os quais foram embebidos em água corrente por um período de ±15 horas. A semeadura foi feita em sistema tradicional utilizando-se tres folhas, sendo 2 como base nas quais foram colocadas as sementes e cobertas com uma unidade.

. Pano, de algodão, tipo "americano cru" cortados nas mesmas medidas do substrato "papel". Foi realizado uma lavagem do tecido com posterior esterilização em autoclave. A sementeira foi feita sobre uma unidade do tecido e coberta com outra unidade. O tecido foi previamente embebido em água corrente por um período de ± 15 horas.

. Papel + pano. Utilizou-se, uma combinação dos substratos anteriores, sendo uma unidade de pano e duas de papel de modo que o pano ficasse por baixo, envolvendo as duas folhas de papel entre as quais foram semeadas as sementes. Como nos demais substratos, foram submetidos à embebição em água corrente durante cerca de 15 horas.

As sementes foram colocadas para germinar em germinadores do tipo Mangelsdorf, marca Biomatic às temperaturas de 30 e 35°C constantes. A avaliação foi realizada aos 30 dias após início do teste.

3.1.1 *Teor de umidade*

As sementes apresentavam, no início do teste, um teor

de umidade de 41%, determinados pelo método de estufa a $105^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ de acordo com BRASIL (1976).

3.1.2 *Análise estatística*

Os dados percentuais foram previamente transformados em arcoseno $\sqrt{\%}$, conforme Bliss, citado por STEEL & TORRIE (1960). Os dados transformados foram submetidos à análise de variância.

3.2 *Experimento 2*

Neste experimento realizou-se uma comparação entre diferentes metodologias de aplicação do teste de tetrazólio em sementes de café. Para cada uma das metodologias foram testadas duas temperaturas, duas concentrações e tres tempos de leitura.

Estes testes seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 2 x 3) com 3 repetições de 50 sementes cada, totalizando 150 sementes por tratamento.

Os fatores estudados foram:

- . temperatura: 30 e 35°C
- . concentração da solução: 0,1 e 0,2%

tempo de leitura: 3 tempos, cabendo ressaltar que foram tempos diferentes para cada metodologia em função de suas características. Assim, as metodologias 1 e 3 que constituíram da exposição do embrião tiveram leituras com 3, 5 e 7 horas, enquanto que, para a metodologia 2, na qual não havia exposição direta do embrião, os tempos de leitura foram 15, 20 e 30 horas.

Para avaliação detalhada das sementes, utilizou-se de um microscópio estereoscópico com aumento de 6 a 30 vezes.

Um teste padrão de germinação foi montado trinta dias antes, para comparação com os resultados obtidos pelos testes de tetrazólio.

3.2.1 Metodologia 1

Proposta por MONDONEDO (1970), essa metodologia foi seguida no que concerne à técnica de preparo da semente, modificando-se em parte as condições do teste, como a seguir:

- . retirada do pergaminho das sementes
- . imersão em água por 15 horas sob temperatura de 30°C
- . eliminação da película prateada



tempo de leitura: 5 segundos, cabendo transferir os
 dados para diferentes partes para cada metodologia
 a fim de obter resultados. Assim, as
 metodologias 1 e 2 que consistem em exposições
 de amostras diversas durante os 5, 10 e 15 minutos,
 enquanto as 3, 4 e 5 consistem em exposições de
 amostra exposta direta ao ambiente, no tempo de
 leitura foram de 15, 20 e 30 segundos.

Para avaliação de liberação de amostras, utilizamos as
 metodologias 1 a 5 com amostras de 5 a 10 vezes.
 Os dados obtidos de resultados foram analisados
 estatisticamente para comparar com os resultados obtidos
 em testes de liberação.

3.2. Metodologia 1

Proposta por MONTENEGRO (1970), essa metodologia
 consiste em que o conteúdo de liberação de amostras
 seja analisado em partes em condições de teste, com a seguinte
 retirada de amostras das seguintes
 amostras em 15 horas sob condições de
 teste.

- corte longitudinal das sementes ao longo do embrião, (Fig. 1).

A seguir, parte da semente seccionada foi totalmente imersa na solução de tetrazólio, nas condições definidas em 3.2 .

Após completar os tempos pré-estabelecidos, as sementes foram lavadas em água corrente e a porção do endosperma contendo parte do embrião foi examinada cuidadosamente, levando-se em consideração a coloração adquirida pelo embrião.

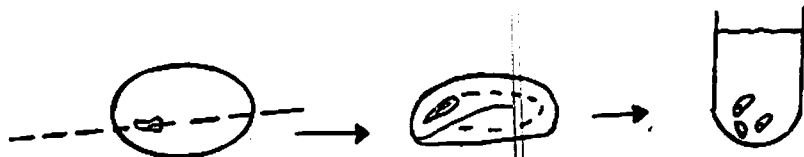


FIGURA 1 Corte longitudinal da semente de café para exposição do embrião (METODOLOGIA 1), MONDONEDO (1970).

3.2.2 Metodologia 2

Utilizou-se uma metodologia idealizada por DIAS & SILVA (1986) com a seguinte sequência de montagem do teste:

- remoção do pergaminho das sementes

- . imersão em água por 15 horas, sob temperatura de 30°C
- . corte das sementes, procurando eliminar ao máximo parte do endosperma, utilizando apenas uma pequena parte do mesmo, na qual se achava inserido o embrião (Fig. 2). As condições em que foi realizado o teste foram os descritos em 3.2 .

Em cada tempo de leitura, com o auxílio de um estilete, a porção do endosperma contendo o embrião era dissecada cuidadosamente, separando o endosperma duro, deixando à mostra o embrião.

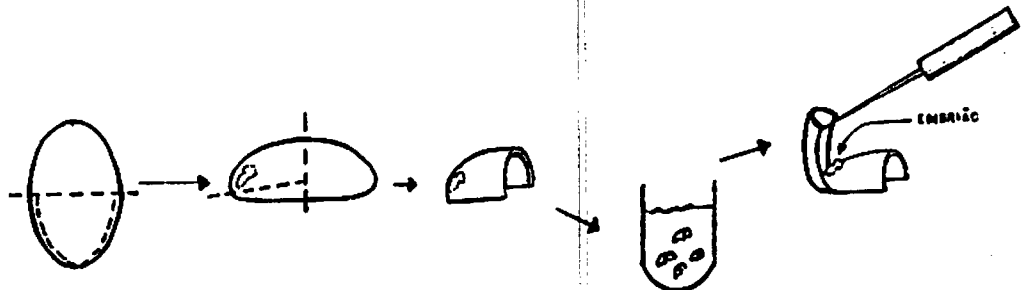


FIGURA 2 Esquema de cortes efetuados nas sementes de café sem exposição do embrião (METODOLOGIA 2), DIAS & SILVA (1986).

3.2.3 Metodologia 3

Neste método, proposto por GOLDBACH & VIZCARRA (1980) permitiu-se um contato direto do embrião com a solução de tetrazólio, na seguinte sequência:

- . remoção do pergaminho das sementes
- . imersão em água por 15 horas sob temperatura de 30°C
- . conforme fig. 3, foram feitos tres cortes superficiais na camada do endosperma, contornando o embrião.

Em seguida, essa camada foi retirada com auxilio de um estilete, deixando exposto o embrião, o qual foi cuidadosamente retirado e colocado na solução de tetrazólio. Em algumas sementes nos quais o embrião se achava mais interligado, parte da semente contendo o embrião foi imersa na solução. As condições foram tal como das metodologias anteriores.

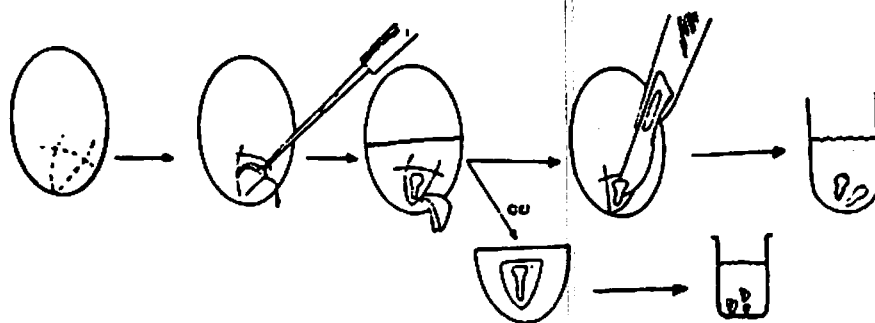


FIGURA 3 Exposição do embrião da semente de café após cortes superficiais e levantamento da camada superior do endosperma (METODOLOGIA 3), GOLDBACH & VIZCARRA, (1980).

3.2.4 *Crêterios para avalia o*

Na análise dos embriões foram computados como viáveis aqueles que se apresentaram com colora o variando de rosada até vermelho.

Embriões com colora o vermelho muito intenso ou arroxeados, indicando deteriora o fisiológica foram considerados inviáveis. Quando apenas parte do embrião apresentou colora es mais intensas, ou de cor branca, a viabilidade era considerada em fun o da extensão do dano, bem como da localiza o do mesmo.

3.2.5 *Análise estatística*

Os resultados expressos em percentagem, foram previamente transformados em arco seno $\sqrt{\%}$, conforme Bliss, citado por STEEL & TORRIE (1960) e submetidos a análise de variância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1

Preliminarmente ao estudo foi montado um teste padrão de germinação com e sem a retirada do pergaminho das sementes. Os resultados mostraram uma inibição da germinação das sementes com pergaminho (Quadro 1), diferindo dos resultados encontrados por MIRANDA (1987) e concordando com observações de VALIO (1976) que sugere a existência de algum mecanismo de resistência do pergaminho sobre o desenvolvimento do embrião.

No quadro 1A são apresentados os dados relativos à análise de variância para a porcentagem de viabilidade obtidos pelo teste padrão de germinação, realizado com diferentes substratos e temperaturas em sementes submetidas ou não à pré-embebição.

Observou-se diferenças significativas para as diferentes temperaturas, substratos e interações temperatura x substrato e pré-embebição x substrato.

QUADRO 1. Resultados médios de germinação (%) de sementes de café pelo teste Padrão de germinação, obtido de sementes com e sem o pergaminho. ESAL, Lavras-MG, 1989.

	Média
Sementes sem pergaminho	95
Sementes com pergaminho	0

A seguir, nos quadros 2,3 e 4 encontram-se os resultados médios de germinação (%) obtidos sob diferentes temperaturas e substratos, com e sem a pré-umbebição das sementes.

A temperatura de 30°C constante (Quadro 2) foi a que melhor expressou a capacidade de germinação das sementes, comparada à temperatura de 35°C.

Segundo COME & TISSAOUI (1973), quanto mais alta a temperatura na qual as sementes são colocadas para germinar, menor é a quantidade de oxigênio disponível ao embrião e, segundo relatos de POPINIGIS (1985), há um aumento dessa necessidade. Desse modo, de acordo com esses autores, sob temperaturas mais elevadas e sendo o oxigênio menos solúvel, os tecidos embrionários receberiam quantidades insuficientes deste gás para satisfazê-los em suas exigências metabólicas. Também, a velocidade respiratória é maior, e o embrião exige maior quantidade de oxigênio, que se não for suprida,

comprometerá em parte o processo germinativo. No caso em questão, o grande período sob alta temperatura a que foi submetida a semente (35°C) criou possivelmente um déficit no suprimento de oxigênio, em detrimento da germinação.

QUADRO 2. Resultados médios de germinação de sementes de café (%), obtidos sob diferentes temperaturas, com e sem pré-embebição, pelo teste padrão de germinação. ESAL, Lavras-MG, 1989. ^{1/}.

Temperatura (° C)	Pré-embebição		Médias
	Ausente	Presente	
30	95	95	95 A
35	91	92	92 B
Médias	93 a	93 a	

^{1/}. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação aos substratos utilizados, não houve efeito significativo (Quadro 3), quando se utilizou a temperatura de 30°C. No entanto, observou-se uma maior facilidade de manuseio em termos de firmeza na estrutura dos rolos, para o substrato papel + pano (RPO).

Vale ressaltar que, quando da utilização da temperatura de 35°C, houve diferença significativa para substratos, sendo que o substrato papel (RP) foi o que apresentou

melhores resultados, seguido do substrato pano (RO) e papel + pano (RPO). Provavelmente, esta posição inferior do substrato papel + pano (RPO) se deva à restrição de oxigênio, uma vez que nos substratos em que se utilizou pano, estes apresentaram-se com alta retenção de umidade durante o decorrer do teste.

QUADRO 3. Resultados médios de germinação de sementes de café (%), obtidos sob diferentes temperaturas e substratos, pelo teste padrão de germinação. ESAL, Lavras-MG, 1989. 1/.

Temperatura (°C)	Substratos			Médias
	Papel (RP)	Pano (RO)	Papel+Pano (RPO)	
30	95 a	95 a	96 a	95 A
35	94 a	92 b	88 c	92 B
Médias	94	94	92	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A pré-embebição das sementes (Quadro 4) apresentou efeito positivo apenas para o substrato papel + pano (RPO), mostrando-se indiferente para os resultados obtidos no substrato papel (RP) e exercendo influência negativa para o desenvolvimento de plântulas no substrato pano (RO), possivelmente devido ao excesso de umidade nesse substrato com

de plântulas, uma nítida diferença no que concerne à presença de fungos que, de uma forma ou outra influenciam negativamente o desenvolvimento das plântulas bem como a respectiva avaliação. Nos substratos contendo sementes não submetidas à pré-embebição, a ocorrência de microorganismos foi grande, principalmente no substrato papel + pano (RPO), afetando, visualmente, mais de 50% das sementes, ao passo que, naquelas submetidas à pré-embebição, a ocorrência de microorganismos foi mínima, não se espalhando pelo substrato.

QUADRO 4. Resultados médios de germinação de sementes de café (%) obtidos sob diferentes substratos, com e sem pré-embebição, pelo teste padrão de germinação. ESAL, Lavras-MG, 1989. 1/.

Pré-embebição	Substratos			Médias
	Papel (RP)	Pano (RO)	Papel+Pano (RPO)	
Ausente	94 A	96 A	90 B	93
Presente	94 A	92 B	94 A	93
Médias	94 a	94 a	92 b	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Com o decorrer do teste, o substrato pano (RO) mostrou-se saturado de umidade, superior à dos outros substra-

tos. Apesar de ter sido utilizado um pano de tecido bem fechado, conforme recomenda BRASIL (1976), isto não impediu que o sistema radicular penetrasse pelas malhas do tecido prejudicando gravemente a avaliação das plântulas; fato este também observado em outras sementes, CARNEIRO & PIRES (1983).

4.2 *Experimento 2*

Teste de tetrazólio aplicado em diferentes metodologias.

No quadro 2A são apresentados os dados relativos à análise de variância para a porcentagem de viabilidade obtidos pelo teste de tetrazólio utilizando 3 metodologias correspondendo à exposição parcial do embrião, não exposição do embrião e exposição total do embrião à solução de tetrazólio.

Observou-se diferenças significativas para as diferentes temperaturas, tempos de leitura e interações temperatura x tempos de leitura e concentração x temperatura x tempo de embebição.

A comparação entre as médias de viabilidade pelos testes de tetrazólio e pelo teste padrão de germinação encontra-se no quadro 4A do apêndice. Nos quadros 5, 6 e 7 encontram-se as médias das porcentagens de viabilidade pelo teste de tetrazólio (%) obtidos nas três metodologias testadas

para os fatores concentração e temperatura, com a indicação dos resultados da aplicação do teste de comparação de médias.

Observa-se, nestes quadros, a forte influência da temperatura sobre a velocidade da reação do tetrazólio, possibilitando no experimento em questão, quando à 35° C, a obtenção de leituras próximas aos valores do teste padrão de germinação que foi de 86% de plântulas normais. Estes resultados, no que concerne ao efeito da temperatura, confirma de certa forma observações feitas por GRABE (1976), sobre a velocidade de coloração das sementes.

Em relação ao efeito das diferentes concentrações é interessante salientar que, nas metodologias onde houve um contato direto do embrião com a solução de tetrazólio (Quadros 5 e 7), as concentrações utilizadas possibilitaram resultados estatisticamente iguais. Isto se deve basicamente ao fato de que, estando os embriões em contato direto com a solução teste, esta não encontrou nenhuma barreira para penetração e difusão nos tecidos, enquanto que na metodologia em que não houve um contato direto do embrião com a solução (Quadro 6), houve diferença significativa entre as concentrações, sendo que a concentração de 0,2% possibilitou uma reação no menor tempo testado, possibilitando desta forma, a obtenção de resultados em menor espaço de tempo. . Esse efeito se deve, mais provavelmente, à dificuldade de difusão da solução, ao ter de atravessar o tecido do endosperma para atingir o embrião, sendo favorecido, no caso, pela concentração mais forte.

concentração mais forte.

Nos quadros 8,9 e 10 encontram-se as médias de viabilidade de sementes de café, pelo teste de tetrazólio, (%) obtidas nas tres metodologias, nos diferentes tempos de leitura e concentrações, com a indicação dos resultados da aplicação do teste de comparação de médias.

Observou-se nesses resultados, no que refere ao fator tempo de leitura, que, como era de se esperar, a medida em que se aumenta o tempo de embebição na solução, a tendência é de aumentar a coloração e sua intensidade. Na metodologia 3 (Quadro 10), este tempo, para as condições em que foi realizado o teste, mostrou-se ideal na faixa de 5 a 7 horas. Uma vez que o embrião achava-se totalmente exposto, sua embebição e consequente reação de coloração foi mais rápida, semelhante a resultados encontrados por GOLDBACH & VIZCARRA (1980).

QUADRO 5. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio, obtidos na metodologia 1 em diferentes concentrações e temperaturas. ESAL, Lavras-MG, 1990). 1/.

Temperaturas (° C)	Concentrações (%)		Médias
	0.1	0.2	
30	42	40	41 B
35	75	79	77 A
médias	58 a	60 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 6. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 2, em diferentes concentrações e temperaturas. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Temperaturas (°C)	Concentrações (%)		Médias
	0.1	0.2	
30	48	49	49 B
35	85	89	87 A
médias	66 b	69 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 7. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 3, em diferentes concentrações e temperaturas. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Temperaturas (°C)	Concentrações (%)		Médias
	0.1	0.2	
30	52	54	53 B
35	83	83	83 A
médias	68 a	69 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 8. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%) obtidos na metodologia 1 em diferentes concentrações e tempos de reação. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Tempo de reação (h)	Concentrações (%)		Médias
	0.1	0.2	
3	35	39	37 C
5	67	62	64 B
7	72	77	75 A
médias	58 a	59 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas na linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 9. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 2, em diferentes concentrações e tempos de reação. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Tempo de reação (h)	Concentrações (%)		Médias
	0.1	0.2	
15	40	42	41 C
20	75	79	77 B
30	84	86	85 A
médias	66 b	69 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Turkey, ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 10. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 3, em diferentes concentrações e tempo de reação. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Tempo de reação(h)	Concentrações (%)		Médias
	0.1	0.2	
3	42	41	42 B
5	80	83	82 A
7	81	82	81 A
médias	68 a	69 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Turkey, ao nível de 5% de probabilidade.

Encontram-se nos quadros 11, 12 e 13, os resultados médios de viabilidade, nas tres metodologias testadas, para os fatores temperatura e tempo de leitura, com respectiva indicação dos resultados de aplicação do teste de comparação de médias.

Quando realizado sob temperatura de 30°C, o primeiro tempo de leitura, para as tres metodologias não foi suficiente para promover reação de coloração nos embriões, permanecendo todos com coloração branca, porém túrgidos, com aspecto normal, diferente da coloração branca sem brilho, aspecto flácido, característica de tecidos mortos.

Analisando-se as interações, pode-se observar melhores resultados quando utilizada temperatura de 35°C. Nessas condições, as reações de coloração, as quais permitiam a identificação de sementes viáveis, propiciaram porcentagens de viabilidade próximas às determinadas pelo teste padrão de germinação (86%); apenas na metodologia 1 estes valores foram cerca de 12% abaixo que os do teste padrão de germinação (Quadro 11).

Sob temperatura de 30°C, na metodologia 1, os dados se aproximaram mais daqueles do teste padrão de germinação após 7 horas de reação. Aumentado-se a temperatura, 35°C, os percentuais de viabilidade foram estatisticamente iguais para todos os tempos, sugerindo a possibilidade de obtenção de resultados em tempo mais curto. No entanto, cabe salientar que, se no aspecto de preparo das sementes esta metodologia mostrou-se mais fácil e simples, foi também a de mais difícil interpretação, devido a uma coloração branca que se desenvolvia na área do corte. Esta dificuldade na interpretação talvez explique os valores bem abaixo daqueles obtidos no TPG, concordando plenamente com observações de GOLDBACH & VIZCARRA (1980), e discordando de LOPEZ (1988) e MONDONEDO (1970).

QUADRO 11. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%) obtidos na metodologia 1 em diferentes temperaturas e tempos de reação. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Temperaturas (°C)	Tempos de reação (h)			Médias
	3	5	7	
30	0 c	50 b	74 a	41 B
35	74 a	79 a	76 a	76 A
médias	37 c	64 b	75 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto à metodologia 2 (Quadro 12), ao analisarmos o efeito do tempo de leitura para a temperatura de 30°C, somente no maior tempo, 30 h, os resultados relativos ao percentual de viabilidade se mostraram semelhantes aos do TPG. Sob temperatura de 35°C, os resultados mostraram-se bastante coerentes com os do TPG, quando realizadas as leituras com 20 e 30 h de reação. Embora a porcentagem de sementes viáveis tenha sido estatisticamente igual nestes dois tempos de leitura, é interessante observar que, numericamente, a média proveniente da leitura com 20 horas foi superior à realizada com 30 horas. Vale ressaltar que, após 30 horas, sob temperatura e 35°C, o embrião adquire uma tonalidade vermelho intenso, podendo

haver uma superestimação de sementes inviáveis por parte do analista, em detrimento daquelas realmente viáveis.

Estes resultados evidenciam a possibilidade de se utilizar temperaturas mais altas para obtenção de resultados em menor tempo, não ultrapassando, porém a temperatura de 45°C, devido à inativação de enzimas, TOLEDO & MARCOS FILHO, (1977).

QUADRO 12. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%) obtidos na metodologia 2, em diferentes temperaturas e tempos de reação. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Temperaturas (°C)	Tempos de reação (h)			Médias
	15	20	30	
30	0 c	64 b	82 a	49 B
35	82 b	90 a	88 a	87 A
médias	41 c	77 b	85 a	

1/. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Esse tipo de metodologia apresenta certas dificuldades por ocasião da avaliação, quando o embrião tem que ser retirado da porção do endosperma no qual se encontra inserido. Devido ao seu tamanho reduzido, no momento de retirada do endosperma vários embriões são danificados. Em parte, estes danos ocorriam com mais frequência quando, após completado o tempo de reação, e não havendo tempo hábil para a leitura, as

sementes permaneciam por algum tempo em um refrigerador, recurso este utilizado sem restrições para a maioria das sementes. Porém, no caso específico de sementes de café, a semente, após retirada da solução, por ocasião da avaliação, encontrava-se com o endosperma tenro, facilitando a exposição do embrião. Quando permanecia algum tempo sob temperaturas mais baixa, os tecidos do endosperma tornavam-se rígidos de tal forma que era bastante trabalhosa a retirada do embrião intacto, para a devida avaliação.

Quando o embrião se achava em contato direto com a solução de tetrazólio (QUADRO 13), os percentuais de viabilidade após 7 horas de reação, sob temperatura de 30°C, aproximaram bastante daqueles do TPG. Tempos menores foram insuficientes para a perfeita reação e coloração.

Concordando com os demais métodos, a temperatura de 35°C mostrou-se mais adequada para a realização do teste de tetrazólio, e, nesta metodologia, com exposição do embrião, leituras após 3 horas de início do teste não diferiram daquelas realizadas com 5 ou 7 horas, sendo de grande utilidade em termos de menor tempo gasto para emissão de resultados.

Para todas as metodologias estudadas, a pré-embrição em água morna foi fundamental para o preparo adequado das sementes, concordando plenamente com observações feitas por GRABE (1976) e DELOUCHE (1976).

No quadro 14 encontram-se as variações de coloração dos embriões, para todos os tratamentos realizados.

A temperatura de 30°C mostrou-se insuficiente para promover uma boa reação de coloração, nos tempos estudados.

Quando submetidos ao teste, sob temperatura de 35° C, possibilitou uma melhor reação de coloração, permitindo a determinação mais precisa da viabilidade das sementes.

Quando utilizou-se a solução de tetrazólio na concentração de 0,1% , esta mostrou-se adequada para uma boa reação de coloração, nas sementes nas quais havia contato direto do embrião com a solução de tetrazólio. Na metodologia 2, na qual não havia este contato direto do embrião com a solução teste, melhores resultados de coloração fora obtidos com a utilização de solução de tetrazólio a 0,2%.

E necessário ressaltar a validade dessas afirmações para sementes de idades diferentes, que não foram estudadas no presente trabalho.

QUADRO 13. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (%), obtidos na metodologia 3, em diferentes concentrações e tempo de reação. ESAL, Lavras-MG, 1990. ^{1/}.

Temperaturas (°C)	Tempos de reação (h)			Médias
	3	5	7	
30	0 b	78 a	81 a	53 B
35	83 a	85 a	82 a	83 A
médias	42 b	82 a	81 a	

^{1/}. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas ou maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 14. Efeito da concentração de tetrazólio, temperatura e tempo de reação no grau de reação de coloração* em sementes de café, nas diferentes metodologias estudadas. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Metodologias	Tempo de reação(h)	Temperaturas (° C)			
		30		35	
		concentração da solução TZ (%)			
		0.1	0.2	0.1	0.2
1	3	B	B	RP	RP
	5	RP	RP	R	R
	7	RP	RP	VI	VI
2	15	B	B	RP	R
	20	RP	RP	R	V
	30	RP	RP	VI	VI
3	3	B	B	RP	RP
	5	RP	RP	V	V
	7	R	R	VI	VI

* VI = vermelho intenso; V = vermelho; R = rosa; RP = rosa pálido; B = branco.



5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvida esta pesquisa e com base na interpretação dos resultados, as seguintes conclusões foram retiradas.

— A temperatura de 30°C foi mais eficiente em promover a germinação de sementes de café, nos diferentes substratos utilizados.

— O substrato "pano" (RO) não deve ser indicado para sementes de café, por dificultar a avaliação dos plântulas.

— A concentração de 0,1% da solução de tetrazólio mostrou-se adequada para a realização do teste, quando da utilização de embriões excisados ou semi-expostos.

— A reação do teste, sob temperatura de 35°C, apresentou-se mais rápida.

— A metodologia na qual permitiu a exposição total do embrião e naquela utilizando-se parte do endosperma contendo o embrião, mostraram-se adequadas para a determinação da viabilidade de sementes de café.



COMPARAÇÃO E APRIMORAMENTO DE METODOLOGIAS DO TESTE PADRAO DE GERMINAÇÃO E TETRAZÓLIO NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.CV. CATUAI)

Autor: Mário Jorge Botelho Weikert

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Fraga

6. RESUMO

As sementes de café são caracterizadas como rapidamente perdedoras de viabilidade e também possuem uma lenta germinação, sendo necessário 30 dias para a obtenção dos resultados pelo teste padrão de germinação.

Um dos tipos de mudas tecnicamente recomendada, mudas de meio ano, tem sua produção iniciada logo após a colheita, tornando importante a determinação da viabilidade das sementes em tempo hábil.

As condições em que se realiza o teste de germinação para sementes de café ainda não foram regulamentadas pela "ISTA", Internacional Seed Testing Association, permitindo assim, variações na metodologia do teste.

Diante disso, procurou-se estudar a eficiência de diferentes substratos (papel, pano e papel + pano) sob diferentes temperaturas (30 e 35°C) com e sem a pré-embebição das

sementes, visando uma maior eficiência do teste padrão de germinação.

Trabalhou-se também com o teste de tetrazólio, em três metodologias de realização do teste, sob condições de diferentes temperaturas (30 e 35°C) e concentrações (0,1 e 0,2%) em diferentes tempos de leitura.

Para o teste padrão de germinação, os resultados mostraram uma melhor eficiência do teste, quando realizado sob temperatura de 30°C.

O substrato "pano" (RO), mostrou-se inadequado, devido ao desenvolvimento do sistema radicular entre os fios do tecido, dificultando seriamente as leituras do teste.

Em relação ao teste de tetrazólio, a temperatura de 35°C mostrou-se mais indicada para se obter maior rapidez nos resultados.

A concentração de 0,1% da solução de tetrazólio mostrou-se adequada para a realização do teste, quando da utilização de embriões excisados ou semi-expostos.

A metodologia na qual houve a exposição total do embrião e naquela em que se utilizou parte do endosperma contendo o embrião, permitiram a obtenção de percentuais de viabilidade semelhantes aos do teste padrão de germinação.

COMPARISON AND IMPROVEMENT OF THE STANDARD GERMINATION TEST AND
TETRAZOLIUM TEST METHODOLOGIES FOR DETERMINATION OF COFFEE SEEDS
(*Coffea arabica* L. CV. CATUAI) VIABILITY.

Author: Mário Jorge Botelho Weikert

Adviser: Prof. Dr. Antônio Carlos Fraga

7. SUMMARY

Coffee seeds are characterized by a rapid loose of their viability and also by having a slow germination, taking about 30 days to obtain results from the standard germination test.

One kind of seedlings technically recommended, a half-year old seedling, has its formation initiated just after harvest, thus it is necessary to determine seeds viability in an adequate time.

The conditions under which the germination test is performed for coffee seeds have not been regulated by "ISTA", International Seed Test Association, so that variations in the methodology can occur.

Based on this fact, this study evaluated the efficiency of different substrates (paper, cloth and paper + cloth) and varying temperatures (30 and 35°C) with and without seed pre-soaking, aiming to improve the efficiency of the standard germination test.

We used also the tetrazolium test in three

methodologies, under different conditions of temperature (30 and 35°C), concentrations (0.1 and 0.2%) and reading times.

For the standard germination test, results showed the best efficiency when the test was performed at 30°C.

The cloth substrate showed to be inadequate due to growth of the root system through the cloth threads.

Regarding the tetrazolium test, 35°C temperature showed to be the most suited to speed up the results.

Concentration of 0.1% of tetrazolium solution showed to be adequate for the test when we used excised embryos of semi-exposed embryos.

The methodology which had total exposition of the embryo and which used part of the endosperm containing the embryo, allowed percentage of viability similar to the standard germination test.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AYRES, G. C. de M. A ocorrência de plasmodesmas no endosperma de *Coffea arabica* L. VAR. *typica* c. Bragantia, Campinas, 13(23):282-6, out. 1954.
02. BENDANA, F.E. Fisiologia de las semillas de café I. Problemas relativos al almacenamiento. Turrialba, Turrialba, 4(15):93-6, 1962.
03. BRASIL, M. A. Regras para análise de sementes. Brasília, Departamento Nacional de Produção Vegetal, 1976, 188p.
04. CAIXETA, I. F. Maturação fisiológica da semente do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) CV. MUNDO NOVO. Lavras, ESAL, 1981. 48p. (Tese MS)
05. CARNEIRO, J. W. P. & PIRES, J. C. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de mamona. Revista Brasileira de sementes, Brasília, 5(3):127-31, 1983.

06. CARVALHO, A. & SALLES, F. J. M. A influência do tamanho da semente de café na germinação e crescimento das mudas, Boletim da superintendência dos serviços do café, São Paulo, 32(370):11-20, 1957.
07. CARVALHO, N. M. & NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2. ed. Campinas, Fundação Cargill, 1983. 429p.
08. COME, D. & TISSAOU, T. Interrelated effects of inhibition, temperature and oxygen on seed germination. In: HEYDECKER, W. ed. Seed ecology. Pennsylvania, University Park, Pennsylvania State University Press, 1973.
09. DEDECCA. Anatomia de *Coffea*. Bragantia, Campinas, 16(23):315-55, 1957.
10. DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M. & LIENHARD, M. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. Mississippi, Mississippi State University, 1976. 103p.
11. 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, 21(11):1139-45, nov. 1986.
12. FRANCO, C. M. Fisiologia do cafeeiro. In: INSTITUTO BRASILEIRO DA POTASSA. Cultura e adubação do cafeeiro. São Paulo, 1963. p.63-80.

13. GOLDBACH, H. & VIZCARRA, H. A. Some observations on tetrazolium-testing on coffee seed (*Coffea arabica* and *C. Canephora*). Turrialba, turrialba, 30(2):223-6, 1980.
14. GRABE, D. F. Manual do teste de tetrazólio em sementes. Brasília, AGIPLAN, 1976. 85p.
15. JUSTICE, O. L. Essentials of seed testing. In: KOZLOWSKI, T.T. Seed Biology. New York, Academic press, 1972. v.3, p. 301-70.
16. LIBERAL, O. H. T. Principais problemas na análise de germinação e pureza de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) Semente, Brasília, 1(1):26-30, dez. 1975.
17. LOPEZ, M. H. Tetrazólio como indicador de viabilidade en semillas de café. Resúmenes de café, Chinchiná, 14(24):15-16, 1988.
18. MACEDO, R. L. G. Influência da temperatura, substrato e luminosidade na germinação e avaliação da qualidade fisiológica das sementes de seringueira (Hevea brasiliensis Muell arg.). Lavras, ESAL, 1985. 77p. (Tese MS)
19. MANPRIN, O. Tipo de semente para o cafeeiro. Revista de Agricultura, Piracicaba 22:109-18, 1947.

20. MIRANDA, J. M. Estudo de alguns fatores que influenciam a duracao da viabilidade de sementes de café (Coffea arabica L. CV. CATUAI). Lavras, ESAL, 1987. 60p. (Tese MS)
21. MONDONEDO, J. R. Quick test with tetrazolium chloride on coffee seed viability. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. - Puerto Rico, 54(2):370-6, 1970.
22. PELCZAR,; REID, R. & CHAN, E. C. S. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, 1980. 566p.
23. POPINIGIS, F. Fisiologia da Semente. Brasília, AGIPLAN, 1977. 289p.
24. RENA, A. B. & MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: SIMPOSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO, 1., Poços de Caldas, 1984. Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade, anais. Piracicaba, Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p.13-85 (Anais).
25. ROBERTS, E.H. Viability of seeds. Syracuse, Syracuse University Press, 1972. 448p.
26. SCARANARI, H. J. Viveiros de café, instruções práticas. O Agrônomo, Campinas, 5(54):5-9, maio 1954.

27. STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. Principles and Procedures of Statistic. New York, McGraw-Hill, 1960. 481p.
28. TOLEDO, F.F. de & MARCOS FILHO, J. Manual das sementes - Tecnologia da produção. Sao Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1977. 224p.
29. VALIO, I. F. M. Germination of Coffee Seeds (*Coffea arabica* L. CV. Mundo Novo). Journal of Experimental Botany, Oxford, 27(100):983-91, out.1976.
30. _____ . Inhibition of Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. CV. MUNDO NOVO) by the endocarp. Journal of seed technology. East Lansing, 5(1):32-9, 1980.
31. VASQUEZ, A. R. & MORILLO, A. R. Uso del tetrazolium en la determinacion del poder gerrminativo de la semilla de cafe. Agronomia Tropical. Maracay, 14(1):25-32, 1964.
32. WOLFRON, M. L.; PLUNKETT, R. A.; LAVER, M. L. Coffee constituents: carbohydrates of the coffee bean. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, 8:58-65, 1960.

APÊNDICE

QUADRO 1A. Resumo da análise de variância para os dados de germinação (%), realizado com diferentes substratos e temperaturas, com e sem pré-embebição de sementes. ESAL, Lavras-MG, 1989.

F.V.	G.L.	Quadrados médios
temperatura	1	0.0731 **
substrato	2	0.0066 **
pré-embebição	1	0.0004
T x S	2	0.0167 **
T x PE	1	0.0017
S x PE	2	0.1233 **
T x S x PE	2	0.0003
Resíduo	36	0.0004
CV (%)	1.52	
médias	93	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 2A. Resumo da análise de variância para os dados de viabilidade pelo teste de tetrazólio (%), utilizando tres metodologias distintas. ESAL, Lavras-MG, 1990.

F.V.	G.L.	Quadrados médios		
		M1	M2	M3
Concentração (C)	1	0.0030	0.0147 *	0.0016
Temperatura (T)	1	1.9400 **	2.4174 *	1.5704 **
Tempo de reação (TR)	2	0.9270 **	1.3175 **	1.2310 **
C x T	1	0.0059	0.0049	0.0016
C x TR	2	0.0089	0.0006	0.0019
T x TR	2	0.8138 **	0.9028 (**)	1.2055 **
C x T x TR	2	0.0141 *	0.0057	0.0009
Resíduo	24	0.0036	0.0027	0.0033
CV (%)		7.23	5.45	6.06

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 3A. Resumo da análise de variância dos dados referentes à viabilidade de sementes de café pelos testes de tetrazólio (%) e teste padrão de germinação. ESAL, Lavras-MG, 1990.

F.V.	G.L.	Quadrados médios		
		M1	M2	M3
Tratamentos	12	0.4845 **	0.5876 **	0.5513 **
Resíduo	26	0.0034 **	0.0025 **	0.0030 **
CV (%)		6.75	5.16	5.72

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

QUADRO 4A. Resultados médios de viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio e teste padrão de germinação. ESAL, Lavras-MG, 1990. 1/.

Tratamentos			Metodologias*					
conc. (%)	T(°C)	Tempo reação	1		2		3	
0.1	30	T1	0	E	0	E	0	B
		T2	56	CD	60	D	75	A
		T3	69	BC	83	AB	80	A
0.1	35	T1	71	BC	80	BC	84	A
		T2	77	AB	89	AB	85	A
		T3	76	AB	85	AB	81	A
0.2	30	T1	0	E	0	E	0	B
		T2	43	D	67	CD	80	A
		T3	78	AB	81	B	82	A
0.2	35	T1	78	AB	84	AB	82	A
		T2	81	AB	91	A	86	A
		T3	77	AB	91	A	82	A
TPG	--	--	86	A	86	AB	86	A

1/. As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre se, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

* 1 = exposição parcial do embrião; 2 = sem exposição do embrião; 3 = exposição total do embrião.