

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE SERRATO DOS SANTOS

TESTE DE TETRAZÓLIO E DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Pinus taeda*

CURITIBA

2019

FELIPE SERRATO DOS SANTOS

TESTE DE TETRAZÓLIO E DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Pinus taeda*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maristela Panobianco Vasconcellos

Coorientadora: Dr^a. Elisa Serra Negra Vieira

CURITIBA

2019

Santos, Felipe Serrato dos
S237t Teste de tetrazólio e definição de critérios para avaliação da
germinação de sementes de Pinus taeda / Felipe Serrato dos
Santos. - Curitiba, 2019.
57 p.: il.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia
- (Produção Vegetal).
Orientadora: Maristela Panobianco Vasconcellos
Coorientador: Elisa Serra Negra Vieira

1. Pinus taeda - semente. 2. Sementes. 3. Germinação. 4.
Tetrazólio. I. Vasconcellos, Maristela Panobianco (Orientadora) . II.
Vieira, Elisa Serra Negra (Coorientadora). III. Título. IV.
Universidade Federal do Paraná.

CDU 633.94



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRÔNOMA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FELIPE SERRATO DOS SANTOS**, intitulada: **TESTE DE TETRAZÓLIO E DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Pinus taeda***, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho. São de parecer pela sua APROVAÇÃO no ato de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2019

MARISTELA PANDBIANCO VASCONCELLOS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ADRIANA MARTINELLI SENEME
Avaliador Externo (UFPR)

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA
Avaliador Externo (EMERAPA)

Dedico

A Deus, por ser essencial em minha vida estando presente nas horas difíceis e por proporcionar tudo o que tenho e sempre precisei.

Ao meu pai Edio Marcio dos Santos, minha mãe Jussara de Fátima Serrato dos Santos e minha irmã Giovanna Serrato dos Santos, por acreditarem e investirem em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maristela Panobianco Vasconcellos, pela excelente e dedicada orientação, também pela sua paciência, confiança, amizade e principalmente pelo exemplo e preparo para a vida profissional.

À minha co-orientadora Dr^a Elisa Serra Negra Vieira, pela ajuda e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a todos os professores e técnicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em especial à Roseli do Rocio Beggiora. Agradeço, também, a minha colega e amiga de mestrado Andreza Cerioni Belniaki, por ter me ajudado no desenvolvimento da pesquisa.

À Embrapa Florestas, pela oportunidade, disposição de seus materiais e também pela concessão de seus equipamentos e instalações, os quais foram essenciais para a realização deste trabalho.

À empresa Kablin, pela concessão das sementes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo durante o período da pesquisa.

"Treine enquanto eles dormem, estude enquanto eles se divertem, persista enquanto eles descansam, e então, viva o que eles sonham."

(Provérbio Japonês)

RESUMO

Dentre as espécies do gênero *Pinus* a mais plantada no Brasil é *Pinus taeda* sendo seu principal emprego nas indústrias madeireiras e de celulose e papel. A propagação é realizada por sementes e para sua comercialização a realização do teste de germinação é obrigatório. Este teste possui duração de 28 dias, que pode ser estendida até 49 dias em caso de dormência das sementes recém-colhidas e sua avaliação é subjetiva, sem descrição detalhada dos critérios para interpretação. Por outro lado, o teste de tetrazólio pode estimar mais rapidamente a viabilidade, sem sofrer interferência do fenômeno da dormência; porém, apresenta divergências metodológicas na literatura, dificultando a definição das classes de qualidade para a espécie. Com base no exposto, o trabalho teve por objetivos: a) estudar métodos de preparo e coloração do teste de tetrazólio para a espécie, com definição das classes de viabilidade, visando obter resultados rápidos e relacionados com o teste de germinação; b) acompanhar o crescimento da plântula de *Pinus taeda*, descrevendo os seus estágios de desenvolvimento, e definir os critérios para interpretação do teste de germinação. Para o estudo do teste de tetrazólio foram realizados os procedimentos indicados nas Regras para Análise de Sementes do Brasil, da AOSA e, ainda, estudou-se um método alternativo, testando-se variação no corte da semente, na concentração do sal (0,2; 0,5 e 1,0%) e no período de coloração (2, 4 e 6 horas). Para o outro experimento, foram estudados dois critérios de interpretação para plântulas normais: o recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (plântulas que apresentam tegumento separado das folhas cotiledonares ou facilmente removível com um leve toque) e um alternativo (plântulas que já apresentam folhas cotiledonares diferenciadas). O procedimento alternativo proposto empregando-se corte longitudinal adjacente ao embrião, coloração de somente a metade da semente que contém o embrião, a 35°C, com 0,2% de sal de tetrazólio, por 4 horas, é o que apresenta maior praticidade, rapidez e possibilita resultado relacionado ao teste de germinação. Plântulas de *Pinus taeda* podem ser consideradas normais quando as folhas cotiledonares já se apresentam diferenciadas, não sendo necessário esperar a queda ou desprendimento do tegumento da parte aérea, uma vez que as anormalidades encontradas ocorrem antes do estágio mencionado.

Palavras-chave: *Pinaceae*. Morfologia de plântulas. Qualidade fisiológica. Viabilidade. Classes de qualidade.

ABSTRACT

Among the species of the genus *Pinus*, the most planted in Brazil is *Pinus taeda* being its main employment in the wood and pulp and paper industries. The propagation is carried out by seeds, which need methods to evaluate their viability, highlighting the germination test, used in the commercialization of seeds in Brazil. This test lasts for 28 days, which can be extended up to 49 days in case of dormancy of the newly harvested seeds and its evaluation is subjective, without detailed description of the criteria for interpretation. On the other hand, the tetrazolium test can estimate the viability more quickly, without interference from the phenomenon of dormancy; however, presents methodological differences in the literature, making it difficult to define the quality classes for the species. Based on the above, the objectives of this work were: a) to study methods of preparation and staining of the tetrazolium test for the species, with definition of the viability classes, aiming to obtain fast results related to the germination test; b) monitor the growth of *Pinus taeda* seedlings, describing their stages of development, and define the criteria for interpreting the germination test. For the study of the tetrazolium test, the procedures indicated in the Rules for Brazilian Seeds Analysis of the AOSA were performed and an alternative method was also studied, testing the variation in seed cut, concentration of salt (0, 2, 0.5 and 1.0%) and in the staining period (2, 4 and 6 hours). For the other experiment, two interpretation criteria were studied for normal seedlings: the one recommended by the Rules for Seed Analysis (seedlings that have tegument separated from cotyledonary leaves or easily removable with a light touch) and an alternative (seedlings that already have cotyledonary leaves differentiated). The proposed alternative procedure using longitudinal section adjacent to the embryo, staining of only half of the embryo-containing seed at 35 ° C with 0.2% tetrazolium salt for 4 hours is the most practical, rapidity and possible result related to the germination test. *Pinus taeda* seedlings can be considered normal when the cotyledonary leaves are already differentiated, and it is not necessary to wait for the tegument to fall or detach from the aerial part, once the abnormalities occur before the mentioned stage.

Key words: *Pinaceae*. Morphology of seedlings. Physiological quality. Viability. Quality classes.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Tipos de cortes realizados nas sementes de *Pinus taeda*: (A) e (B) - corte transversal na distância de $\frac{1}{3}$ da extremidade distal do endosperma; (C) - corte longitudinal através do endosperma para expor o embrião (utilizado em todos os tratamentos); (D) corte longitudinal adjacente ao embrião, mantendo-se unidas as duas metades da semente; (E) corte longitudinal adjacente ao embrião, separando a metade da semente que contém o embrião.....28
- FIGURA 2 – Estrutura externa e interna da semente de *Pinus taeda*: (a) tegumento; (b) endosperma; (c) embrião; (d) cotilédones; (e) hipocótilo; (f) radícula.....29
- FIGURA 3 – Classes de sementes viáveis de *Pinus taeda* obtidas no teste de tetrazólio – (A) vermelho intenso no endosperma e embrião. (cotilédones e eixo embrionário); (B) vermelho carmim ao longo do endosperma e embrião; (C) vermelho carmim com tonalidade menos intensa; (D) vermelho claro apresentando manchas transparentes no endosperma, não afetando o embrião; (E) embrião vermelho carmim com pequenas manchas vermelho claro no eixo embrionário.....31
- FIGURA 4 – Classes das sementes de *P. taeda* não viáveis após o teste de tetrazólio: (A) sementes que apresentaram endosperma e embrião com coloração esbranquiçada; (B) sementes que não coloriram após o processo de exposição ao sal; (C) sementes que apresentaram a maior parte do eixo embrionário sem colorir (mais de 50% da área do endosperma e embrião), com pequenas colorações pontuais (D) sementes que apresentaram pontos de cor vermelha no endosperma e na região do hipocótilo; (E) sementes com os cotilédones sem colorir; (F) sementes que apresentaram a ponta da radícula sem colorir.....32
- FIGURA 5 – Plântulas normais adotando os critérios utilizados pelos laboratórios oficiais e credenciados seguindo as Regras para Análise de Sementes – R.A.S. (BRASIL, 2009): tegumento facilmente removível com um leve toque ou já separado das folhas cotiledonares.....41

- FIGURA 6 – Estágios de desenvolvimento da plântula de *Pinus taeda*: (A) e (B) protusão da raiz; (C) crescimento do hipocótilo; (D) diferenciação entre hipocótilo e início das folhas cotiledonares; (E) folhas cotiledonares com diferenciação visível maior que 3 mm.....42
- FIGURA 7 – Plântula com desenvolvimento inicial da raiz e princípio de crescimento do hipocótilo, após sete dias de semeadura.....43
- FIGURA 8 – Plântulas já desenvolvidas, porém não consideradas normais seguindo os critérios dos laboratórios oficiais e credenciados (R.A.S.); (B) Plântulas com início de infecção fúngica.....44
- FIGURA 9 – Plântulas anormais de *Pinus taeda*: (A) Plântula sem a presença de raiz devido a formação de um calo; (B) Plântula somente com a parte aérea, ou seja, emissão dos primórdios cotiledonares diretamente do tegumento; (C) Plântula com parte aérea retorcida; (D) Plântula com estrangulamento da parte aérea, a qual ficou retida pelo perisperma; (E) e (F) Plântulas com infecções fúngicas.....45
- FIGURA 10 – Plântula com 3 mm de diferenciação dos primórdios cotiledonares, considerada normal segundo o critério alternativo.....46
- FIGURA 11 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Pinus taeda* considerando plântulas normais; (A) Plântulas consideradas normais pelo método alternativo (no momento da diferenciação das folhas cotiledonares); (B) Plântulas consideradas normais segundo critério adotado pelos laboratórios oficiais e credenciados seguindo recomendações das R.A.S. (plântulas completamente desenvolvidas sem a presença do tegumento, ou que o mesmo seja solto com facilidade).....48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dados médios obtidos nos testes de germinação e de tetrazólio (TZ), utilizando-se diferentes combinações de metodologia, para sementes de <i>Pinus taeda</i>	33
TABELA 2 – Dados médios de germinação de sementes de <i>Pinus taeda</i> , pelos dois critérios de interpretação do teste.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA ESPÉCIE <i>Pinus taeda</i>	15
2.2	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES De <i>P. taeda</i>	16
2.2.1	Teste de tetrazólio	16
2.2.2	Teste de germinação.....	18
	REFERÊNCIAS.....	21
3	TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i>: MÉTODOS DE PREPARO, COLORAÇÃO E DEFINIÇÃO DAS CLASSES DE VIABILIDADE.....	25
	RESUMO.....	25
3.1	INTRODUÇÃO.....	26
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.4	CONCLUSÕES.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36
4	ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS: SUBSÍDIO PARA NOVO CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i>.....	38
	RESUMO.....	38
4.1	INTRODUÇÃO.....	39
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.4	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	51
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pinus taeda é a espécie do gênero *Pinus* com maior importância no sul do país, contando com aproximadamente 670.000 e 545.000 ha plantados, respectivamente, nos estados do Paraná e de Santa Catarina (IBÁ, 2017). As condições climáticas semelhantes ao seu local de origem proporcionam alta produtividade, bem como a localização dos principais centros processadores fomentam o mercado uma vez que o principal emprego é na indústria madeireira e de celulose e papel.

Em função do difícil enraizamento das mudas e do custo de obtenção mais elevado por propagação vegetativa, a sua multiplicação ocorre principalmente pela via sexuada, o que torna a tecnologia de sementes fundamental dentro do processo de produção da espécie.

Um teste bastante relevante para avaliação da viabilidade das sementes é o de tetrazólio, pois se trata de um método bioquímico que estima de forma mais rápida a qualidade fisiológica de um lote de sementes, especialmente nas que demonstram dormência. Para sementes de *Pinus taeda* verificam-se divergências de procedimentos, entre as Regras para Análise de Sementes – R.A.S. (BRASIL, 2009) e as regras presentes na *Association of Official Seed Analysts - AOSA* (AOSA, 2009). As R.A.S. preconizam um período de 36 horas para obtenção dos resultados do teste de tetrazólio, enquanto a AOSA indica períodos bastante variáveis entre quatro a 16 horas. Há divergência também em relação aos tipos de corte a serem realizados e a temperatura de exposição, permanecendo a mesma concentração do sal de tetrazólio para ambas as recomendações.

Adicionalmente, existe carência na literatura da caracterização das classes de qualidade específicas para esta espécie, ilustrando os padrões de coloração das sementes viáveis e não viáveis, e também descrevendo as áreas vitais a serem consideradas durante a interpretação dos resultados, o que contribuiria para a maior difusão do método para *P. taeda*. O ajuste metodológico do teste de tetrazólio para cada espécie é necessário, uma vez que as sementes apresentam características morfológicas e composições químicas diferentes umas das outras.

O teste de germinação de sementes de *Pinus taeda* é considerado demorado, levando-se 28 dias para obtenção do resultado (BRASIL, 2009), podendo estender para no mínimo 49 dias para sementes recém-colhidas, as quais apresentam intensidade maior de dormência. Este período prolongado restringe o uso dos equipamentos do laboratório e

aumenta a chance de ocorrência de contaminação do material. Além disso, a falta de detalhamento, devido a falta de clareza do encerramento do teste quanto à aderência do tegumento na parte aérea das plântulas, em relação ao teste de germinação, tornam a avaliação desse teste bastante subjetiva.

O acompanhamento dos estágios de desenvolvimento das plântulas de *Pinus taeda*, desde a germinação da semente, bem como a determinação do tempo mínimo necessário para a obtenção das estruturas essenciais, poderia levar à diminuição da duração do teste de germinação.

Baseado no exposto, o presente trabalho teve por objetivos: estudar métodos de preparo e coloração do teste de tetrazólio para *Pinus taeda*, com definição das classes de viabilidade, visando obter resultados rápidos e relacionados com o teste de germinação; e acompanhar o crescimento das plântulas descrevendo os seus estágios de desenvolvimento, para definir os critérios de interpretação do teste de germinação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA ESPÉCIE *Pinus taeda*

O *Pinus* é natural da região sul dos Estados Unidos; o clima da área de ocorrência natural é úmido, temperado ameno, com verões quentes e longos, e a temperatura anual é de 13°C a 24°C, com precipitação anual variando entre 1020 mm e 1520 mm (HIGA et al., 2008).

As árvores adultas de *Pinus taeda* podem chegar até 40 metros de altura e 1,30 metros de diâmetro, sendo as mais produtivas aquelas obtidas por sementes. Possuem alborno amarelo claro, enquanto o cerne é de coloração marrom avermelhada, a casca é fendida com cristas escamosas; ramos novos azulados que mais tarde se tornam marrom amarelados, com acículas rijas, finas, agudas, finamente dentadas, verde-escuras, medindo entre 15 cm a 20 cm de comprimento e em grupos de três por fascículo (SCHIMIDT, 2000).

Os órgãos reprodutores são chamados de estróbilos, sendo o masculino de forma alongada. Após a polinização e durante o desenvolvimento dos embriões, o gametófito feminino sofre divisões celulares, aumentando seu tamanho para servir de tecido nutritivo da semente madura, o endosperma. Ao mesmo tempo, os tegumentos endurecem e se desenvolvem no envoltório da semente. Sua germinação é fanerocotiledonar, ou seja, os cotilédones emergem do tegumento da semente e são livres dos restos seminais, e do tipo epígea, pois ficam acima do nível do solo (BRASIL, 2009)

As características dos envoltórios, como as alas, são herdadas exclusivamente do progenitor feminino, e as mesmas se desenvolvem apenas durante os estágios finais da maturação das sementes (CANCELA, 2007).

Segundo BAKER e LANGDON (2006), a disseminação das sementes de *Pinus taeda* ocorre numa distância entre 61-91m quando levada pelo vento e entre 23-30m quando por outros agentes. A semente possui tamanho variável de 2 a 15 mm de comprimento e 2 a 10 mm de largura e são formadas dentro dos cones. A colheita deve ser realizada no momento em que os cones se encontrarem maduros, característica que pode ser observada pela mudança de coloração ou densidade (KRONKA et al., 2005).

A liberação das sementes ocorre com a abertura dos cones, que está diretamente ligada a perda de água, sendo dependente das condições climáticas. Para preconização do processo, a colheita pode ser realizada com os cones apresentando altos teores de

água, sendo necessária a secagem dos mesmos, que pode ser realizada expondo os cones ao sol em camadas não muito espessas ou em estufas (SUASSUNA, 1977).

O *P. taeda* possui um longo ciclo reprodutivo, cerca de dois anos, sendo que esse período implica no fato de que cones em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes idades podem ser encontrados na mesma árvore (SCHIMIDT, 2000). AGUIAR et al. (1993) verificaram que em espécies monóicas, como o *P. taeda* e *P. kesya*, podem ocorrer variações na produção de estróbilos masculinos e femininos, fazendo com que algumas árvores tenham uma atuação dentro da população como femininas e outras como masculinas.

A espécie é importante fonte de matéria prima (lâmina, partícula ou fibra) na fabricação de diferentes produtos, tais como portas, janelas, móveis, balaústres, forros, compensados, produtos da construção civil e papel. Destaque, também, para a produção de papel Kraft e celulose branqueada (KRONKA et al., 2005).

2.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *P. taeda*

2.2.1 Teste de Tetrazólio

Além do teste de germinação, outro bastante difundido é o teste de tetrazólio, por ser considerado rápido e eficiente (FRANÇA NETO, 1998). Esse teste pode ser usado quando há necessidade de urgência na obtenção de resultados sobre a viabilidade das sementes, para espécies que apresentam dormência, para aquelas que germinam lentamente ou apresentem um grande número de plântulas anormais (MARCOS FILHO, 2005).

É um teste bioquímico que se baseia na atividade de enzimas desidrogenases que catalisam reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs (FRANÇA NETO, 1999). Essas enzimas, especificamente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio em trifenilformazan, indicando que há atividade respiratória nas mitocôndrias, logo viabilidade do tecido (FRANÇA NETO, 1999). A detecção da atividade respiratória ocorre por meio da coloração do tecido; portanto, aqueles que não reagem e conseqüentemente não colorem são considerados inviáveis (ABBADE e TAKAKI, 2014).

Para a obtenção de resultados pertinentes de viabilidade, o analista deve se atentar a quatro características básicas, a saber: condição e cor dos tecidos após coloração, localização e tamanho das lesões. Além disso, sua habilidade em identificar e

reconhecer os padrões e estruturas essenciais para análise também são primordiais para eficiência do teste (MOORE, 1985).

Segundo Moore (1985), tecidos vigorosos são aqueles que apresentam coloração vermelho carmim; a ocorrência de vermelho intenso já é considerada início do processo de deterioração nas sementes, pois as membranas estando comprometidas permitem maior difusão da solução de tetrazólio. As sementes brancas, amareladas e acinzentadas não possuem atividade enzimática (respiração) necessária para redução do sal.

Diversos fatores podem afetar o resultado do teste, principalmente aqueles baseados na metodologia de execução, como o preparo das sementes antes da exposição ao sal, o período e a temperatura de exposição, a concentração do sal e os critérios de avaliação (GASPAR OLIVEIRA et al., 2009).

Para sementes de *P. taeda* verificam-se divergências de procedimentos, ou seja, as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) preconizam um período de 36 horas para obtenção dos resultados do teste de tetrazólio, sendo destinadas 18 horas para o pré-condicionamento das sementes e mais 18 horas de coloração a 1,0%, na temperatura de 30°C, com indicação da realização de dois cortes: o primeiro em pré-coloração e o segundo antes da avaliação.

Por outro lado, as regras da *Association of Official Seed Analysts - AOSA* (AOSA, 2009) recomendam apenas um corte antes da coloração, deixando tecido intacto o suficiente para que se mantenham juntas as duas metades da semente. Quanto à coloração, a AOSA recomenda períodos bastante variáveis, de quatro a 16 horas, com 1,0% de concentração, a 35°C.

Trabalhos recentes sobre a metodologia do teste de tetrazólio para sementes de espécies florestais têm sido encontrados na literatura, como o de *Araucaria angustifolia* (SILVA et al., 2016), no qual os autores desenvolveram critérios de condução com maior rapidez de execução e caracterização dos grupos de viabilidade. Para tanto os autores utilizaram os embriões excisados imersos diretamente em solução de tetrazólio, em diferentes concentrações, combinadas com diferentes períodos de exposição e temperatura.

Para *Caesalpinia echinata* Lam. – pau-brasil foram estabelecidas classes de vigor de sementes por meio do teste de tetrazólio (LAMARCA et al., 2009). Os autores utilizaram sementes com e sem tegumento nas diferentes combinações de períodos de exposição com concentrações do sal. Diferentemente dos demais trabalhos para sementes florestais, foram definidas oito classes de vigor, o que permitiu diagnosticar a diferença de qualidade entre os lotes de sementes de pau-brasil.

Diferentes combinações para o teste de tetrazólio em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*) permitiram concluir que a interação entre período de exposição e concentração do sal ocorre de forma singular, uma vez que as concentrações mais baixas do sal (0,1%) permitiram a maior visualização de sementes viáveis; entretanto, só houve correlação significativa com o teste de germinação quando se utilizou a concentração de 0,5%, por um período de quatro horas (LAZAROTTO et al., 2011).

Para adequar a melhor combinação de período de exposição, preparo das sementes e concentração do sal de tetrazólio em sementes de copaíba e guapuruvu FOGAÇA et al. (2011) realizaram a classificação das sementes em oito classes, por meio de ilustrações, caracterizando cada nível de viabilidade. Foram definidas quatro classes de sementes viáveis e quatro classes de sementes inviáveis para copaíba e três classes de sementes viáveis e cinco de inviáveis para sementes de guapuruvu. Os autores concluíram que a adequação metodológica foi eficiente para a avaliação das sementes por meio do teste de tetrazólio, e que a realização da escarificação e do pré embebição, com posterior retirada do tegumento, foram adequadas para as duas espécies.

Para sementes de timbaúba, uma árvore nativa da região sul do Brasil, a adequação do teste de tetrazólio foi estudada por NOGUEIRA et al. (2014), sendo que os autores verificaram que para melhorar a eficiência do teste é necessária a escarificação das sementes, seguido de sua embebição em água por período de 24 horas, e posterior retirada do tegumento. Os períodos de uma e seis horas de exposição mostraram-se ineficazes, uma vez que as sementes não coloriram adequadamente, sendo respectivamente devido à falta e excesso de coloração. Logo, o melhor tratamento foi aquele em que as sementes permaneceram expostas ao sal por três horas, na concentração de 0,075%.

Em estudos com *Simira gardneriana* M.R. Barbosa e Peixoto – pereiro vermelho (OLIVEIRA et al., 2016), no qual foram testadas várias concentrações da solução de tetrazólio e períodos de coloração, bem como em estudo com sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (ABBADÉ e TAKAKI, 2014), foram também relatados a importância do ajuste metodológico do teste de tetrazólio para cada espécie.

2.2.2 Teste de germinação

O principal teste para avaliação da viabilidade das sementes é o de germinação que tem como objetivo determinar o potencial máximo de germinação de um lote de

sementes o qual pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e também estimar o valor para a semeadura em campo (BRASIL, 2009).

Os testes de germinação são realizados em laboratório e representam a porcentagem de emergência e desenvolvimento das plântulas que apresentaram suas estruturas essenciais desenvolvidas. De modo geral, segundo as R.A.S. (BRASIL, 2009) as estruturas essenciais das plântulas são: sistema radicular (raiz primária ou raízes adventícias) e parte aérea (hipocótilo ou epicótilo, gemas terminais ou folhas primárias, cotilédones e catafilos).

Já as plântulas consideradas anormais são aquelas que não mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais. Fazem parte as plântulas danificadas, ou que apresentem suas estruturas essenciais ausentes; plântulas deformadas, que apresentem distúrbios fisiológicos; plântulas deterioradas, como resultado de infecções primárias e que comprometam o seu desenvolvimento normal; são consideradas anormais, ainda, as plântulas albinas (BRASIL, 2009).

A recomendação de condução do teste de germinação para sementes recém-colhidas de *P. taeda*, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), envolve o pré-esfriamento a 3-5°C, por 21 dias, com posterior transferência para 22°C, sendo as contagens de plântulas normais realizadas no 7º e 28º dias após o período de pré-esfriamento, atingindo assim 49 dias para obtenção dos resultados da viabilidade do lote de sementes.

O pré-esfriamento é recomendado para sementes recém colhidas, que apresentam dormência. Segundo Yamauchi et al. (2004), há biossíntese de giberelina em sementes submetidas a tratamento a baixa temperatura, como relatado em *Arabidopsis* sp e esse hormônio está intimamente ligado ao início do processo de germinação.

A descrição morfológica de sementes e plântulas fornece informações sobre a biologia e os processos germinativos (GOMES et al., 2015). Diferentes espécies como *Psidium cattleianum* e *Acca sellowiana* (GOMES et al., 2015) tiveram suas particularidades analisadas, dentre elas a forma e coloração da raiz; pilosidade, forma e coloração do hipocótilo e do epicótilo, entre outras. Por meio dessas caracterizações os autores conseguiram definir o tipo de germinação, bem como a data aproximada para a realização da primeira contagem e encerramento do teste de germinação.

Diferentemente, para *Albizia edwallii* (DUARTE et al., 2015), os autores além de caracterizarem morfológicamente as sementes (biometria, características internas e externas), também estudaram suas características físicas, como o peso de mil sementes e o número de sementes por quilograma. Por meio do Índice de Velocidade de

Germinação (IVG) e demais avaliações, eles estabeleceram a data para o encerramento do teste, que se deu aos 15 dias após instalação.

Sideroxylon obtusifolium (SILVA et al., 2012), *Dalbergia cearensis* (NOGUEIRA et al., 2010) e *Hymenaea intermédia* (MELO et al., 2004) também tiveram a morfologia de suas sementes e plântulas descritas.

Rosa et al. (2010), analisando as alterações morfológicas das sementes e plântulas de café durante o processo de germinação, definiram diferentes estágios de desenvolvimento, concluindo que todas as estruturas essenciais já estavam presentes no 15º dia, possibilitando diminuir o tempo de duração do teste de germinação para cultura do café, que segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) é de 30 dias.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith - bignoniaceae, submetidas ao armazenamento.

Revista Árvore, v.38, n.2, p.233-240, 2014.

AGUIAR, I. B. de.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes Florestais Tropicais**. 1.ed. Brasília, DF, ABRATES. 1993. 350p.

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln, 2009. 105 p. (Contribution, 32)

BAKER, J. B.; LANGDON, O. G. **Loblolly pine**. Disponível em: <https://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/Volume_1/pinus/taeda.htm>. Acesso em: 04. Out. 2016.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

CANCELA, K. C. **Influência da família e do tamanho da semente de *Pinus taeda* L. nas propriedades tecnológicas do lote de sementes, performance da muda em viveiro e em campo**. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2007.

DUARTE, M. M. et al. Germinação e morfologia de sementes e plântulas de *Albizia edwallii* (Hoehne) Barneby & J. W. Grimes. **Revista Caatinga**, v.28, n.3, p.166-173, 2015.

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

FOGAÇA, C. A.; KROHN, N. G.; SOUZA, M. de A.; PAULA, R. C. de. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. **Floresta**, v.41, n.4, p. 895-904. 2011.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYANDWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. c.8.5, p.1-28.

GASPAR OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.160-167, 2009.

GOMES, J. P. et al. Caracterização morfológica de plântulas durante a germinação de sementes de *Psidium cattleianum* E *Acca sellowiana* (MYRTACEAE). **Ciência Florestal**, v.25, n.4, p. 1035-1041, 2015.

HIGA, R. C.V. et al. **Zoneamento Climático: *Pinus taeda*** no Sul do Brasil. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008. 17p. (Embrapa Florestas. Documentos, 175).

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório 2017**. São Paulo. 2017. 69p.

KRONKA, F. J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. **A cultura do *Pinus* no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. 160p.

LAMARCA, E. V.; LEDUC, S. N. M.; BARBEDO, C. J. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil - Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. **Brazilian Journal of Botany**, v.32, n.4, p.793-803, 2009.

LAZAROTTO, M.; PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; REINIGER, L. R. S. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.4, p. 1243-1250. 2011.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.

MELO, M. da G. G. de; MENDONÇA, M. S. de; MENDES, A. M. da S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazonica**, v.34, n. 1, p-14, 2004.

MONDO, V. H. V.; BRANCALION, P. H. S.; CICERO, S. M.; NOVENBRE, A. D. da L. C.; DOURADO NETO, D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rígida* (Benth), Brenan (Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.177-183, 2008.

MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zürich: ISTA, 1985. 99p

NOGUEIRA, F. C. B.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLAO, M. I. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearensis* Ducke (pau-violeta) - Fabaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.4, p.978-985, 2010.

NOGUEIRA, N. W.; TORRES, S. B.; FREITAS, R. M. O. Teste de tetrazólio em sementes de timbaúba. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.6, p. 2967-2976, 2014.

OLIVEIRA, F. N.; TORRES, S.B.; NOGUEIRA, N.W.; FREITAS, R.M.O. Viability of *Simira gardneriana* M.R. Barbosa & Peixoto seeds by the tetrazolium test. **Journal of Seed Science**, v.38, n.1, p.7-13, 2016.

ROSA, S. D. V. F. da.; MCDONALD, M. B.; VEIGA, A. D.; VILELA, F. de L.; FERREIRA, I. A. Saging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, v.38, p.421-431, 2010.

SCHIMIDT, L. **Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed**. Danida Forest Seed Centre, 2000. 511p.

SILVA, B. A.; NOGUEIRA, J.L.; VIEIRA, E.S.N.; PANOBIANCO, M. Critérios para condução do teste de tetrazólio em sementes de araucária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.1, p.61-68, 2016.

SILVA, K. B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. de L. A.; MATOS, V. P. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. (Sapotaceae). **Revista Árvore**, v.36, n.1, p.59-64, 2012.

SUASSUNA, J. A Cultura do Pinus: uma perspectiva e uma preocupação. **Revista Brasil Floresta**. Recife, PE, n. 29, 1977. Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br/index.php?option=com_content&id=760&Itemid=376>. Acesso em: 04. Out. 2016.

YAMAUCHI, Y., OGAWA, M., KUWAHARA, A., HANADA, A., KAMIYA, Y. AND YAMAGUCHI, S. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Cell**, v.16, p.367- 378, 2004.

3 TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Pinus taeda*: MÉTODOS DE PREPARO, COLORAÇÃO E DEFINIÇÃO DAS CLASSES DE VIABILIDADE

RESUMO

Sementes recém-colhidas de *Pinus taeda* apresentam dormência, sendo recomendada a realização de dois testes de germinação simultâneos, sem e com pré-esfriamento a 3-5 °C por 21 dias, o que estende a obtenção dos resultados para no mínimo 49 dias. O teste de tetrazólio estima rapidamente a viabilidade da semente e não sofre interferência da dormência. Verificam-se divergências de metodologia e ausência da descrição detalhada das classes de qualidade para a espécie. O trabalho teve por objetivo estudar métodos de preparo e coloração do teste de tetrazólio para sementes de *P. taeda*, com definição das classes de viabilidade. Foram realizados os procedimentos indicados nas Regras para Análise de Sementes, na AOSA e, ainda, foi estudado um método alternativo para a condução do teste de tetrazólio, testando: a) variação no corte da semente; b) na concentração do sal (0,2; 0,5 e 1,0%); c) no período de coloração (2; 4 e 6 h). Para a condução do teste de tetrazólio em sementes de *P. taeda*, o procedimento alternativo empregando corte longitudinal adjacente ao embrião, colocando para colorir somente a metade da semente que contém o embrião, a 35 °C, com 0,2% de sal de tetrazólio, por 4 h, é o que apresenta maior praticidade e rapidez.

Palavras chaves: *Pinaceae*. Qualidade fisiológica. Germinação.

3.1 INTRODUÇÃO

Em função do difícil enraizamento das mudas e do custo de obtenção mais elevado por propagação vegetativa, a multiplicação do *Pinus taeda* ocorre principalmente por via sexuada, o que torna a tecnologia de sementes fundamental dentro do processo de produção da espécie.

Sabe-se que para comercialização das sementes é necessária à realização do teste de germinação, sendo que para *Pinus taeda* as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) recomendam um pré-esfriamento a 3-5°C, por 21 dias, com posterior transferência para a temperatura de 22°C, sendo indicada a contagem final de plântulas normais no 28º dia após o período de pré-esfriamento, o que pode estender para no mínimo 49 dias o período de obtenção dos resultados da viabilidade do lote de sementes

Neste sentido, o teste de tetrazólio assume importância, uma vez que se trata de um método bioquímico que estima de forma mais rápida a viabilidade de amostras de sementes, especialmente nas que demonstram dormência. Para sementes de *Pinus taeda* verificam-se divergências de procedimentos, ou seja, as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) citando a *International Seed Testing Association - ISTA*, (ISTA, 2008) preconizam um período de 36 horas para obtenção dos resultados do teste de tetrazólio, sendo destinadas 18 horas para o pré-condicionamento das sementes e mais 18 horas de coloração a 1,0%, na temperatura de 30°C, com indicação da realização de dois cortes: o primeiro em pré-coloração e o segundo antes da avaliação, os quais demandam tempo e extrema habilidade do analista em função da dureza do tegumento.

Por outro lado, as regras da *Association of Official Seed Analysts (AOSA)*, (AOSA, 2009) recomendam apenas um corte antes da coloração, deixando tecido intacto o suficiente para que se mantenham juntas as duas metades da semente. Quanto à coloração, a AOSA recomenda períodos bastante variáveis, de quatro a 16 horas, com 1,0% de concentração do sal, a 35°C.

Adicionalmente, há carência na literatura da caracterização das classes de qualidade específicas para esta espécie, ilustrando os padrões de coloração das sementes viáveis e não viáveis, e também descrevendo as áreas vitais a serem consideradas durante a interpretação dos resultados, o que contribuiria para a maior difusão do método para sementes de *P. taeda*.

O ajuste metodológico do teste de tetrazólio para cada espécie é necessário, uma vez que as sementes apresentam características morfológicas e composições químicas diferentes umas das outras.

O objetivo do presente trabalho foi estudar métodos de preparo e coloração no teste de tetrazólio de sementes de *P. taeda*, com definição das classes de viabilidade para a espécie.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná. Foram utilizadas sementes provenientes de um lote de *Pinus taeda*, fornecido pela empresa Klabin.

A amostra de sementes foi inicialmente homogeneizada em laboratório, por meio de divisor mecânico de solo e subdividida em quatro subamostras, que constituíram as repetições estatísticas, as quais ficaram armazenadas em saco de papel do tipo Kraft, em ambiente controlado ($17 \pm 2^\circ\text{C}$ e 50-60% de umidade relativa do ar).

Realizou-se a determinação do teor de água das sementes pelo método da estufa, a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas, empregando-se duas repetições de 5,0 g cada. O resultado final foi expresso em porcentagem, base úmida (BRASIL, 2009).

Na condução do teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada, semeadas em caixas plásticas (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) transparentes e com tampa, sobre duas folhas de papel mata borrão, umedecidas com água na proporção de 2,5 vezes a massa seca do substrato. As caixas plásticas foram mantidas em germinador do tipo Mangelsdorf, com temperatura constante de 22°C , na presença de luz (BRASIL, 2009).

Para o estudo de melhoria na metodologia do teste de tetrazólio já existente foram adotados os seguintes tratamentos:

Pré-condicionamento - Imersão das sementes diretamente em água, na quantidade de 50 mL, em béquer de vidro (capacidade de 100 mL), permanecendo incubadas em B.O.D. a 20°C , por 18 horas (BRASIL, 2009).

Preparo e coloração- foram testados três procedimentos:

a) procedimento recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) - preparo para coloração realizando primeiro um corte transversal na distância de $\frac{1}{3}$ da extremidade distal do endosperma para abrir a cavidade do embrião (Figuras 1A e 1B), e posterior preparo para avaliação efetuando um corte longitudinal através do endosperma para expor o embrião, com remoção do tegumento (utilizado em todos os

tratamentos) (Figura 1C), A coloração foi realizada com imersão das sementes em solução de tetrazólio na concentração de 1,0%, por 18 horas, no escuro, a 30°C;

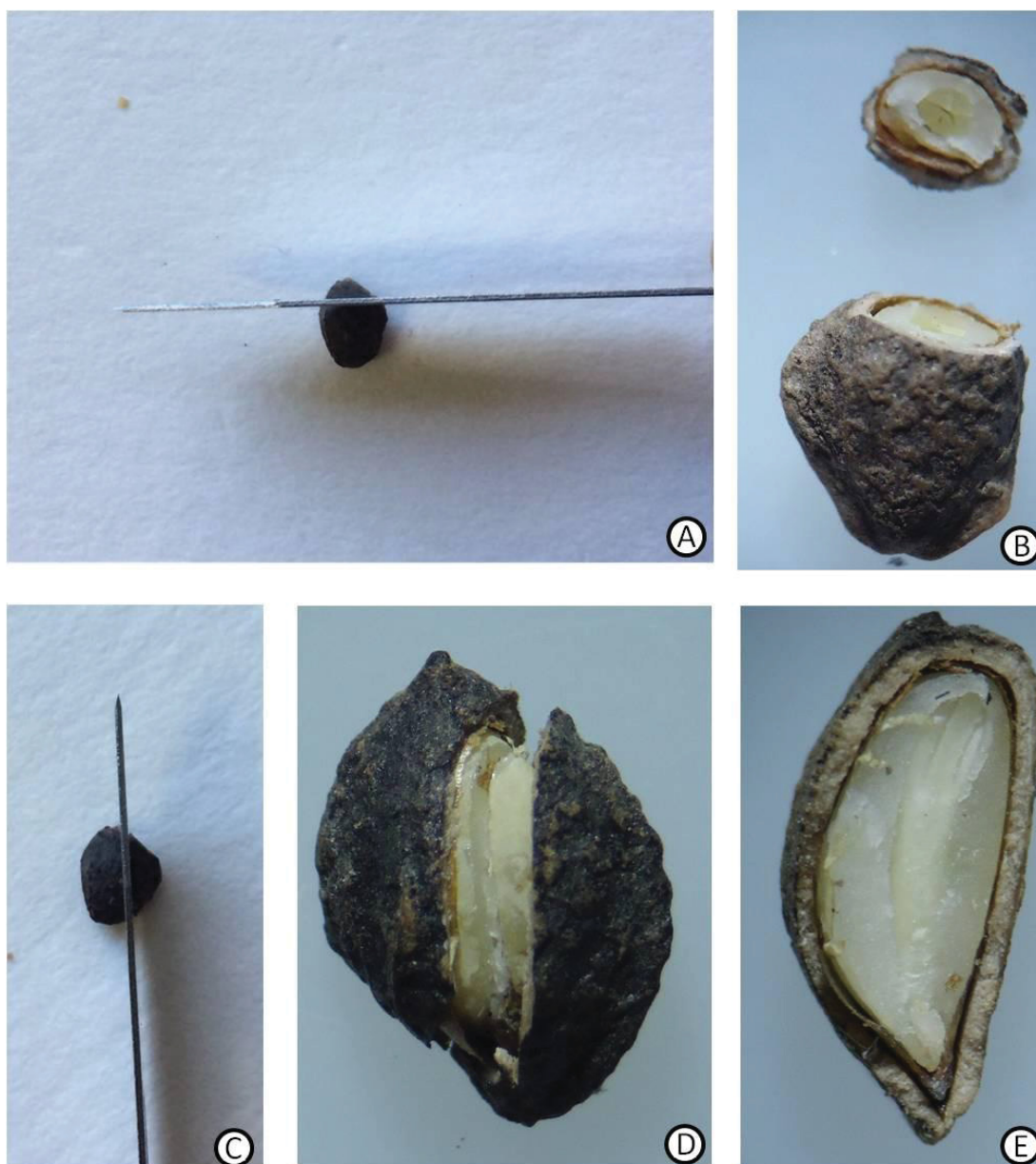


Figura 1. Tipos de cortes realizados nas sementes de *Pinus taeda*: (A) e (B) - corte transversal na distância de $\frac{1}{3}$ da extremidade distal do endosperma; (C) - corte longitudinal através do endosperma para expor o embrião (utilizado em todos os tratamentos); (D) corte longitudinal adjacente ao embrião, mantendo-se unidas as duas metades da semente; (E) corte longitudinal adjacente ao embrião, separando a metade da semente que contém o embrião.

b) procedimento recomendado pela AOSA (2009) – realização de um corte longitudinal adjacente ao embrião (Figura 1C), deixando tecido intacto suficiente para que se mantenham juntas as duas metades da semente (Figura 1D), com coloração em solução de tetrazólio a 1,0%, durante quatro horas, a 35°C, no escuro;

c) procedimento alternativo – efetuou-se um corte longitudinal adjacente ao embrião, de modo que este ficasse exposto sem a necessidade da remoção do tegumento. Coloração somente da metade que contém o embrião (Figura 1E), a qual foi imersa em 6 mL de solução de tetrazólio nas concentrações: 0,2%, 0,5% e 1,0%, por períodos de duas, quatro e seis horas, a 35°C, no escuro.

Para todos os tratamentos testados, as sementes foram submetidas à lavagem em água depois da coloração, sendo adotadas duas formas dependendo do tipo de corte realizado: em água corrente (no procedimento recomendado pelas Regras para Análise de Sementes) e a dupla lavagem em recipiente com água, sobre uma peneira, visando evitar que ocorresse o descolamento e perda do embrião caso ele fosse lavado sob água corrente.

Para avaliação da viabilidade da semente, contou-se com auxílio de um microscópio estereoscópico, acoplado a uma máquina fotográfica. As sementes foram classificadas em duas classes de qualidade (viáveis e não viáveis), de acordo com a coloração e a proporção dos danos apresentados nas áreas vitais (Figura 2), sendo consideradas as seguintes estruturas: endosperma e embrião (cotilédones, hipocótilo e radícula). O resultado foi expresso em porcentagem de viabilidade.

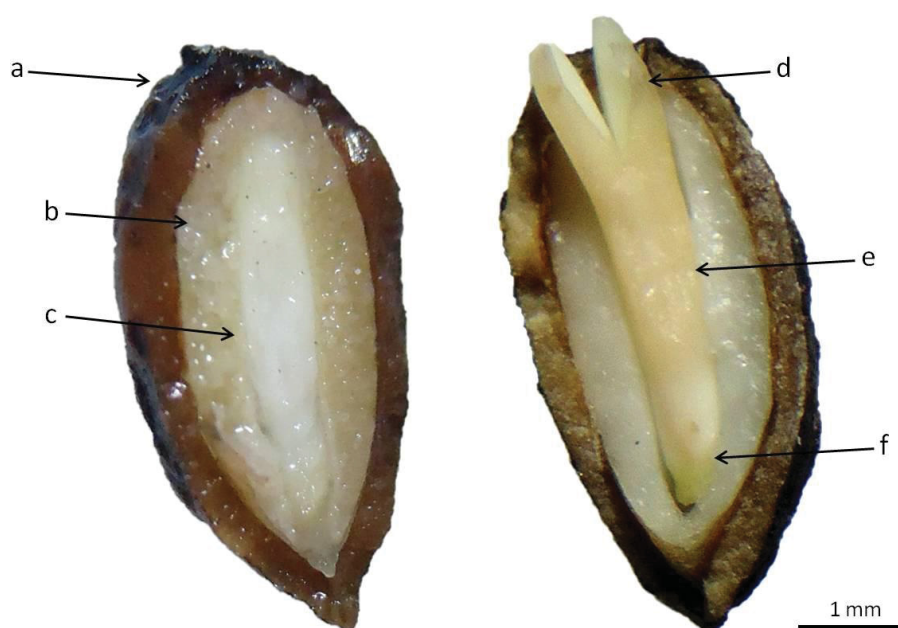


Figura 2. Estrutura externa e interna das sementes de *Pinus taeda*: (a) tegumento; (b) endosperma; (c) embrião; (d) cotilédones; (e) hipocótilo; (f) radícula.

O teste de germinação para comparação com os resultados obtidos no teste de tetrazólio teve avaliações realizadas diariamente, sendo a primeira contagem no sétimo

dia e o encerramento no 28º dias após a semeadura, seguindo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 1 % de probabilidade. Os dados de teor de água não foram analisados estatisticamente.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais do trabalho, o teor de água inicial das sementes foi de 8,7%, condições adequadas para a espécie. Já que as sementes de *Pinus taeda* são classificadas como de comportamento ortodoxo em relação ao armazenamento.

As sementes foram classificadas, no teste de tetrazólio, em duas classes de viabilidade: viáveis e não viáveis. Com base nos resultados obtidos, foram consideradas como viáveis as sementes que apresentaram todas as estruturas internas coloridas (Figura 3). Foram inseridas nessa classe as sementes que apresentaram cor vermelho intenso no endosperma e embrião (cotilédones e eixo embrionário) (Figura 3A); vermelho carmim ao longo do endosperma e embrião (Figura 3B); vermelho carmim com tonalidade menos intensa (Figura 3C); vermelho claro apresentando manchas transparentes no endosperma, não afetando o embrião (Figura 3D); embrião vermelho carmim com pequenas manchas vermelho claro no eixo-embrionário (Figura 3E).

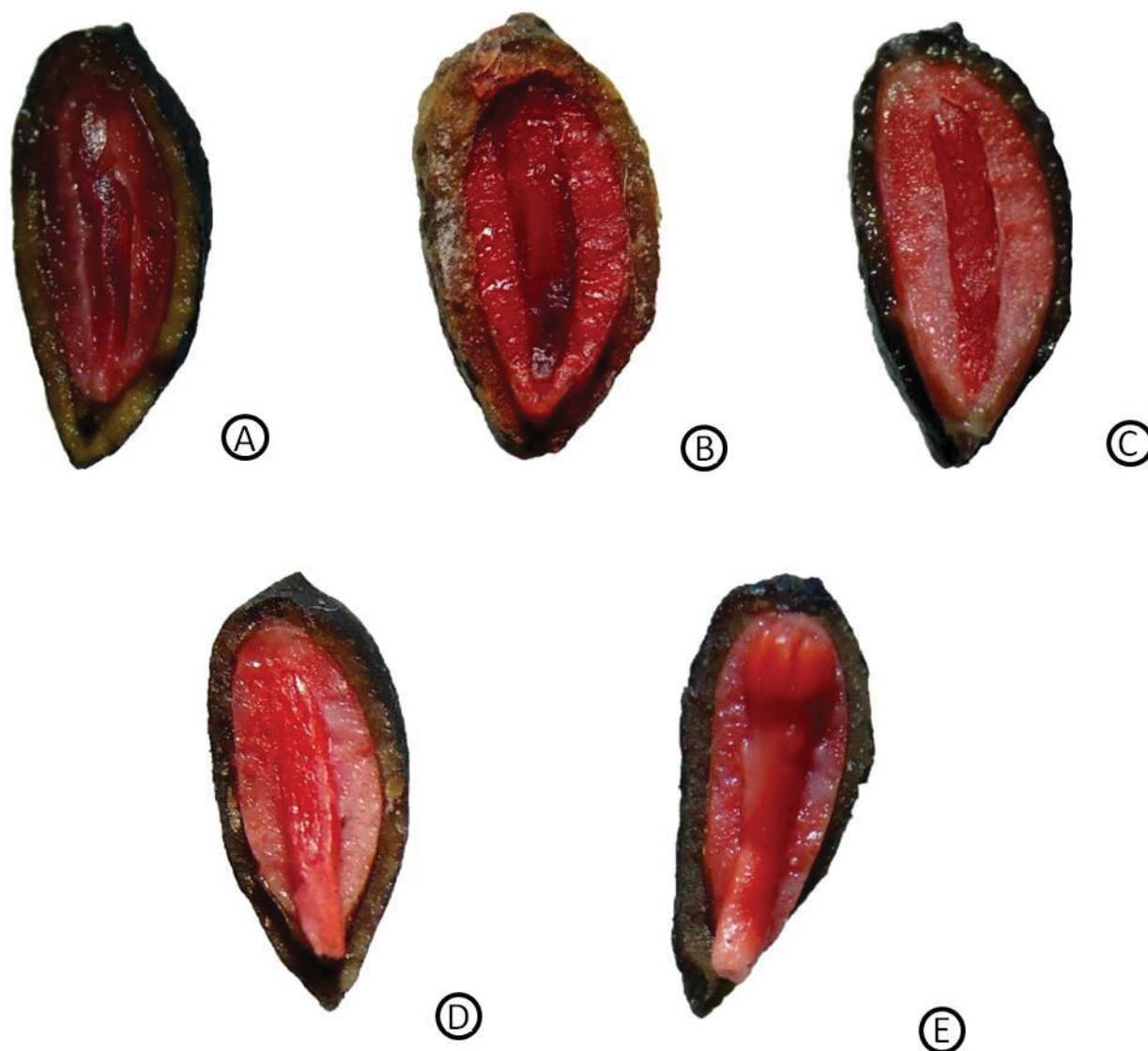


Figura 3. Classes de sementes viáveis de *Pinus taeda* obtidas no teste de tetrazólio – (A) vermelho intenso no endosperma e embrião (cotilédones e eixo embrionário); (B) vermelho carmim ao longo do endosperma e embrião; (C) vermelho carmim com tonalidade menos intensa; (D) vermelho claro apresentando manchas transparentes no endosperma, não afetando o embrião; (E) embrião vermelho carmim com pequenas manchas vermelho claro no eixo embrionário.

Na Figura 4 é possível observar a classe de sementes consideradas não viáveis, sendo elas: sementes que apresentaram endosperma e embrião com coloração esbranquiçada (Figura 4A); sementes que não coloriram após o processo de exposição ao sal de tetrazólio (Figura 4B); sementes que apresentaram a maior parte do eixo embrionário sem colorir (mais de 50% da área do endosperma e embrião), com pequenas colorações pontuais (Figura 4C); sementes que apresentaram pontos de cor vermelha no

endosperma e na região do hipocótilo (Figura 4D); sementes com os cotilédones sem colorir (Figura 4E); e sementes que apresentaram a ponta da radícula sem colorir (Figura 4F).

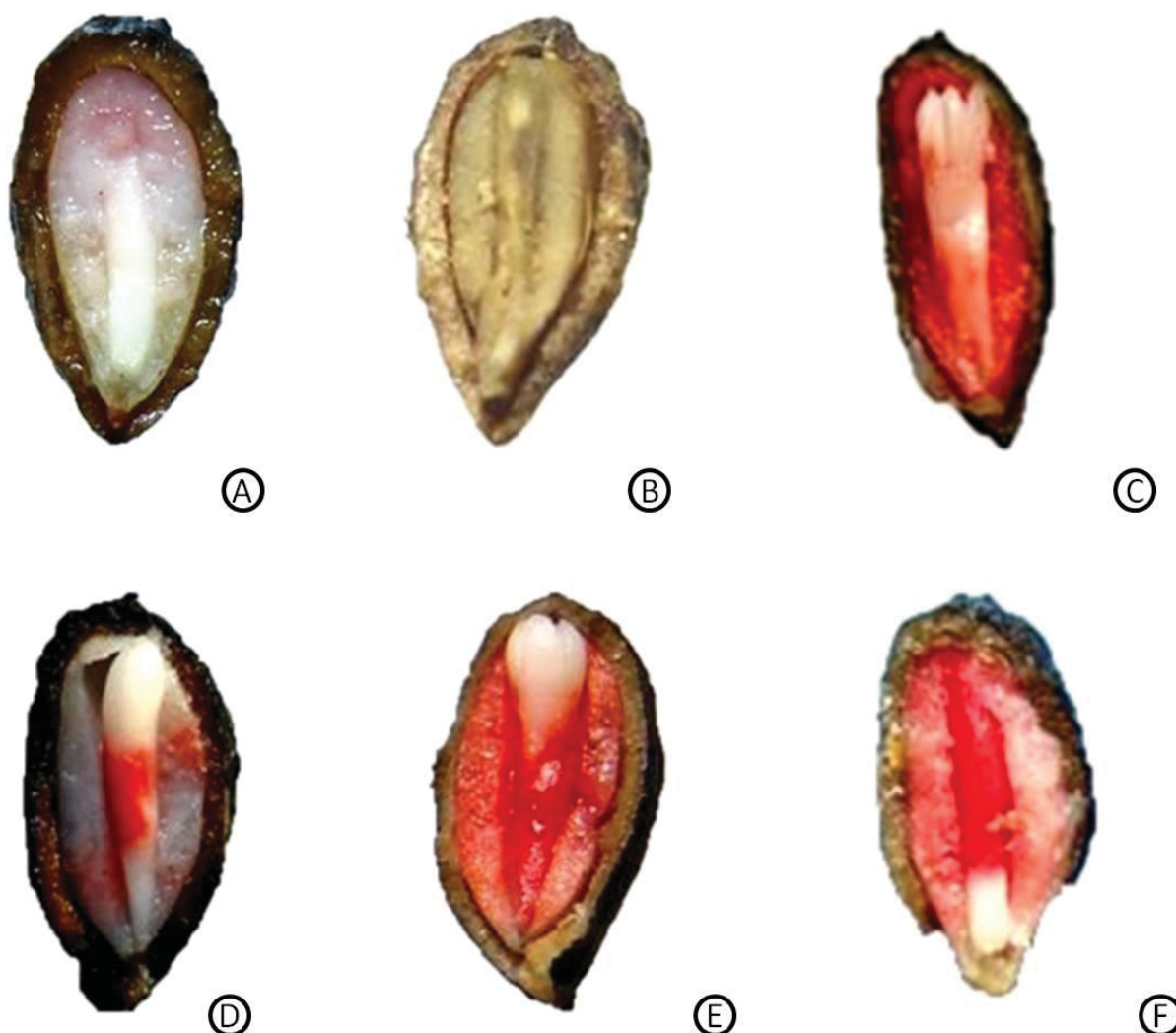


Figura 4. Classes das sementes de *P. taeda* não viáveis após o teste de tetrazólio: (A) sementes que apresentaram endosperma e embrião com coloração esbranquiçada; (B) sementes que não coloriram após o processo de exposição ao sal; (C) sementes que apresentaram a maior parte do eixo embrionário sem colorir (mais de 50% da área do endosperma e embrião), com pequenas colorações pontuais (D) sementes que apresentaram pontos de cor vermelha no endosperma e na região do hipocótilo; (E) sementes com os cotilédones sem colorir; (F) sementes que apresentaram a ponta da radícula sem colorir.

As classes de sementes não viáveis que apresentam cotilédones e radícula sem colorir (Figura 4E e 4F respectivamente) foram as mais encontradas em todas as combinações de tratamentos, possivelmente por problemas genéticos em sua formação.

Os resultados dos testes de germinação e de tetrazólio encontram-se na Tabela 1. Constatou-se que a porcentagem de germinação foi de 77%, estando dentro do padrão de comercialização de sementes da espécie (>70%) (BRASIL, 1984). Verificou-se, também, que seis metodologias do teste de tetrazólio testadas foram estatisticamente iguais aos resultados do teste de germinação, sendo elas: procedimento recomendado pela AOSA (2009), efetuando corte longitudinal adjacente ao embrião mantendo as duas metades unidas, a 35°C, com 1%, por 4h; procedimento recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com realização de dois cortes, sendo o primeiro transversal ao endosperma (pré-coloração), a 30°C, com 1,0% de concentração (por 18 h), e o segundo corte longitudinal através do endosperma para expor o embrião (antes da avaliação); procedimento alternativo (corte longitudinal descartando uma das metades) a 35°C, com 0,2% (por 4h), 0,5% (por 6h) e 1% (por 4 e 6h).

Tabela 1. Dados médios obtidos nos testes de germinação e de tetrazólio (TZ), utilizando-se diferentes combinações de metodologia, para sementes de *Pinus taeda*.

Avaliações	Viabilidade (%)
Teste de Germinação	77 a
TZ - CL, com as duas metades unidas/1,0%/4 h/35°C (AOSA, 2009)	80 a
TZ - CT e CL/ 1,0%/18h /30°C - RAS (BRASIL, 2009)	72 a
TZ - CL, com uma das metades/1,0%/2h/35°C (alternativo)	69 b
TZ - CL, com uma das metades/1,0%/4h/35°C (alternativo)	74 a
TZ - CL, com uma das metades/1,0%/6h/35°C (alternativo)	73 a
TZ - CL, com uma das metades/0,5%/2h/35°C (alternativo)	57 c
TZ - CL, com uma das metades/0,5%/4h/35°C (alternativo)	68 b
TZ - CL, com uma das metades/0,5%/6h/35°C (alternativo)	73 a
TZ - CL, com uma das metades/0,2%/2h/35°C (alternativo)	63 c
TZ - CL, com uma das metades/0,2%/4h/35°C (alternativo)	74 a
TZ - CL, com uma das metades/0,2%/6h/35°C (alternativo)	67 b
Coeficiente de Variação (%)	6,10

CL = Corte longitudinal; CT = Corte transversal

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade.

A coloração por duas horas, independentemente da concentração testada, subestimou a viabilidade das sementes provavelmente pelo baixo período de exposição à solução não propiciar coloração adequada, não sendo possível distinguir sementes não coloridas por estarem mortas ou por problema do método.

O procedimento das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) prescreve a realização de dois cortes: o primeiro transversal na distância de $\frac{1}{3}$ da extremidade distal do endosperma para abrir a cavidade do embrião e o segundo, posterior ao preparo e antes da avaliação, efetuando um corte longitudinal através do endosperma para expor o embrião, com remoção do tegumento, o que requer um tempo longo para a realização do teste, pois além das 18h de pré-condicionamento e mais as 18h para coloração, o segundo corte antes da avaliação demanda um período adicional, o que o torna inviável para análise de rotina em laboratórios.

A metodologia da AOSA (2009) embora facilite pelo fato de recomendar um único corte longitudinal adjacente ao embrião, traz a dificuldade para o analista em manter unidas as duas metades da semente durante a execução deste corte, havendo bastante descarte de material antes da coloração e necessidade de colocar um maior número de sementes no pré-condicionamento.

O procedimento alternativo, com corte longitudinal adjacente ao embrião, de modo que ele fique exposto sem a necessidade da remoção do tegumento, colocando para colorir somente a metade da semente que contém o embrião, descartando a outra, traz a vantagem da facilidade e rapidez deste corte proposto, apresentando resultados estatisticamente iguais ao do teste de germinação nas três concentrações testadas (0,2; 0,5 e 1,0%), com destaque para a combinação de 0,2%/4h, que requer menor gasto do sal de tetrazólio e reduzido período de execução. O único inconveniente do corte nesse procedimento alternativo é a maior dificuldade da lavagem das sementes após a coloração, pois pode ocorrer a separação do embrião da cavidade do endosperma, mas este problema é eficientemente contornado realizando-se a dupla lavagem em recipiente com água, por meio de peneiras, da metade da semente a ser analisada.

Dentre os tratamentos realizados, o procedimento alternativo de corte da semente, aliado a realização da dupla lavagem das sementes em recipiente com água após a coloração, foi o que apresentou melhor desempenho em termos de praticidade de execução do teste de tetrazólio, quando comparado aos métodos da AOSA (2009) e das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Pelo fato da semente de *Pinus taeda* apresentar tegumento duro, a realização de apenas um corte facilita a análise, e se for realizado deixando uma fina membrana sobre o embrião, por meio do corte pouco mais distante do embrião, evita-se o descarte do material durante a lavagem, o que torna o procedimento alternativo bastante promissor.

O endosperma tem papel importante no processo de germinação algumas espécies de sementes, dada sua função de reserva nutritiva, a qual fornece energia ao

embrião para que esse inicie tal processo (COSTA et al., 2011). Portanto, para *P. taeda* é importante avaliar a coloração de toda a parte interna da semente, sendo embrião (eixo embrionário e cotilédones) e o endosperma.

Alguns trabalhos mais recentes, envolvendo também estudo da metodologia do teste de tetrazólio para sementes de espécies florestais, têm sido encontrados na literatura, como o de *Araucaria angustifolia* (SILVA et al., 2016), no qual os autores desenvolveram critérios de condução com maior rapidez de execução e caracterização dos grupos de viabilidade; também o trabalho de de *Caesalpinia echinata* Lam. – pau-brasil (LAMARCA, et. al, 2009), no qual foram estabelecidas classes de vigor de sementes; o de *Simira gardneriana* M.R. Barbosa & Peixoto – pereiro vermelho (OLIVEIRA et al., 2016), no qual foram testadas várias concentrações da solução de tetrazólio e períodos de coloração; além de outros estudos com sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (ABBADE e TAKAKI, 2014) e *Platymiscium floribundum*, *Lonchocarpus muehlbergianus* e *Acacia polyphylla* (MASULLO et al., 2017), todos salientando a importância do ajuste metodológico do teste para cada espécie.

Após a definição da melhor metodologia uma etapa posterior é a necessidade de testá-la em lotes de diferentes qualidades para propor sua validação e assim poder ser inserida nas R.A.S. como metodologia oficial.

3.4 CONCLUSÕES

Dentre as metodologias testadas para a condução do teste de tetrazólio em sementes de *Pinus taeda*, o procedimento alternativo empregando corte longitudinal adjacente ao embrião, coloração de somente a metade da semente que contém o embrião, a 35 °C, com 0,2% de sal de tetrazólio, por 4 h, é o que apresenta maior praticidade, rapidez e possibilita a separação das sementes em classes de viabilidade.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith - bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, v.38, n.2, p.233-240, 2014.

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln, 2009. 105 p. (Contribution, 32)

BRASIL. Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Portaria nº 18 de 25 de Janeiro de 1984. Regulamenta o Decreto 81,771 de 7 de Janeiro de 1978 e considerando o deliberado na XX Reunião Ordinária da Comissão Nacional de Sementes e Mudas - CONASEM. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 dez, 1984.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

COSTA, C. J.; ZIMMER, P. D.; VILLELA, A. Base celular da origem e desenvolvimento do endosperma Revisão bibliográfica. **Revista Científica Rural**, v. 13, n.1, p. 226-246, 2011.

ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Sampling. In: **International rules for seed testing**. ed. 2008. Bassersdorf, 2008. cap.2, p.2-1 a 2-47.

LAMARCA, E. V.; LEDUC, S. N. M.; BARBEDO, C. J. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil - Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. **Brazilian Journal of Botany**, v.32, n.4, p.793-803, 2009.

MASULLO, L. S.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; AMÉRICO, C. Optimization of tetrazolium tests to assess the quality of *Platymiscium floribundum*, *Lonchocarpus muehlbergianus* and *Acacia polyphylla* DC. Seeds. **Journal of Seed Science**, v.39, n.2, p.189-197, 2017.

OLIVEIRA, F.N.; TORRES, S.B.; NOGUEIRA, N.W.; FREITAS, R.M.O. Viability of *Simira gardneriana* M.R. Barbosa & Peixoto seeds by the tetrazolium test. **Journal of Seed Science**, v.38, n.1, p.7-13, 2016.

SILVA, B. A.; NOGUEIRA, J. L.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Critérios para condução do teste de tetrazólio em sementes de araucária. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira**, v.51, n.1, p.61-68, 2016.

4 ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS: SUBSÍDIO PARA NOVO CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Pinus taeda*

RESUMO

Dentre as espécies do gênero *Pinus*, a mais plantada no Brasil é a *Pinus taeda*, cuja multiplicação é realizada por meio da semente. A duração do teste de germinação da espécie é de 28 dias, podendo ser estendida até 49 dias no caso de sementes recém-colhidas e a sua interpretação ainda é baseada em critérios subjetivos e pouco detalhada. O trabalho teve por objetivos acompanhar o crescimento da plântula de *Pinus taeda* durante o processo germinativo, descrevendo os estágios de desenvolvimento, e definir critérios de avaliação práticos e eficientes para o teste de germinação. Foram estudados dois critérios de interpretação para plântulas normais: o adotado pelos laboratórios oficiais e credenciados, que seguem as recomendações das Regras para Análise de Sementes (plântulas que apresentam tegumento separado das folhas cotiledonares ou facilmente removível com um leve toque) e um alternativo (plântulas que já apresentam folhas cotiledonares diferenciadas). Com base nos resultados obtidos, conclui-se que plântulas de *Pinus taeda* podem ser consideradas normais quando as folhas cotiledonares já se apresentam diferenciadas, não sendo necessário esperar a queda ou desprendimento do tegumento da parte aérea, uma vez que as anormalidades encontradas ocorrem antes do estágio mencionado.

Palavras chaves: *Pinaceae*. Morfologia de plantas. Descrição morfológica.

4.1 INTRODUÇÃO

Pinus taeda é a espécie do gênero *Pinus* com maior importância no sul do país, contando com aproximadamente 670.000 e 545.000 ha plantados, respectivamente, nos estados do Paraná e de Santa Catarina (IBÁ, 2017). As condições climáticas semelhantes ao seu local de origem, proporcionam alta produtividade, sendo seu principal emprego na indústria madeireira e de celulose e papel.

A propagação da espécie ocorre por meio de mudas, produzidas a partir de sementes, o que destaca a importância de se conhecer a sua viabilidade. A recomendação de condução do teste de germinação para sementes recém-colhidas de *P. taeda*, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), envolve o pré-esfriamento a 3-5°C, por 21 dias, com posterior transferência para 22°C, sendo as contagens de plântulas normais realizadas no 7° e 28° dias após o período de pré-esfriamento, atingindo assim 49 dias para obtenção dos resultados da viabilidade do lote de sementes. Além desse longo período de duração do teste, outro fator impactante é a subjetividade na análise, em função da falta de clareza dos critérios existentes para caracterizar plântulas normais de *P. taeda*.

Em trabalho desenvolvido com sementes de café, no qual foram analisadas as alterações morfológicas das sementes e plântulas durante o processo germinativo (ROSA et al., 2010) e definidos diferentes estágios de desenvolvimento, verificou-se para a espécie a possibilidade de redução do período de duração do teste de germinação recomendado das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

A definição de estágios de crescimento de plântulas baseados em mudanças morfológicas, determinando cada fase durante a germinação, parece ser uma abordagem mais adequada para a avaliação do poder germinativo das sementes.

Conseqüentemente, estágios bem definidos permitem uma caracterização precisa do desenvolvimento das plântulas, permitindo maior eficiência na interpretação. Para *Pinus taeda*, poderia se reduzir o longo período de avaliação do teste de germinação e diminuir a proliferação de fungos, que ocorre com maior incidência quando há maior quantidade de plântulas presentes durante a condução do teste.

Diferentes espécies como *Psidium cattleianum* (araçá) e *Acca sellowiana* (feijoa) (GOMES et al., 2015), *Albizia edwallii* (angico-pururuca) (DUARTE et al., 2015), *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira) (SILVA et al., 2012), *Bromeliaceae* (SILVA, I. V.; SCATENA, V. L., 2011), *Dalbergia cearensis* (pau-brasil) (NOGUEIRA et al., 2010),

Hymenaea intermédia (MELO, et al., 2004) tiveram a morfologia de suas sementes e plântulas descritas, facilitando a interpretação dos testes de avaliação.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo descrever os estágios de desenvolvimento da plântula de *Pinus taeda* e definir os critérios para interpretação do teste de germinação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade da Universidade Federal do Paraná, utilizando-se sementes de *P. taeda* fornecidas pela empresa Klabin, da safra de 2017.

A amostra de sementes foi inicialmente homogeneizada em divisor mecânico de solo e subdividida em quatro subamostras, que constituíram as repetições estatísticas, as quais ficaram armazenadas em saco de papel do tipo Kraft, em ambiente controlado ($17 \pm 2^\circ\text{C}$ e 50-60% de Umidade Relativa do ar).

Realizou-se a determinação do teor de água das sementes pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas, empregando-se duas repetições de 5,0 g cada. O resultado final foi expresso em porcentagem, base úmida (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação, como as sementes não apresentavam mais dormência por serem de um lote de 2017, não foi necessário realizar inicialmente o pré esfriamento para promoção da germinação. Foram utilizadas oito repetições de 25 sementes cada, semeadas em caixas plásticas (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) transparentes e com tampa, sobre duas folhas de papel mata borrão umedecidas com água na proporção de 2,5 vezes a massa seca do substrato. As caixas plásticas foram mantidas em germinador do tipo Mangelsdorf, com temperatura constante de 22°C , na presença de luz.

O teste de germinação teve início no dia 19 de abril de 2018 e as avaliações foram realizadas diariamente, sendo conduzidas simultaneamente com dois critérios de interpretação, que foram adotados em cada caixa plástica, com as mesmas plântulas:

1) Critério utilizado pelos laboratórios oficiais e credenciados seguindo as Regras para Análise de Sementes – R.A.S. (BRASIL, 2009), plântulas que apresentaram seu tegumento separado das folhas cotiledonares ou que foi facilmente removível com um leve toque, com a primeira contagem de plântulas normais realizada no sétimo dia (Figura 5) e o encerramento do teste no 35° dia após a semeadura, pois o teste teve que ser prorrogado por mais uma semana a fim de permitir a máxima germinação do lote. De acordo com o estabelecido nas RAS (BRASIL, 2009), se no final do período do teste

algumas sementes apenas iniciaram a germinação, ele pode ser prolongado por mais sete dias ou por até a metade do período indicado para os testes mais demorados.



Figura 5. Plântulas normais adotando os critérios utilizados pelos laboratórios oficiais e credenciados seguindo as Regras para Análise de Sementes – R.A.S. (BRASIL, 2009): tegumento facilmente removível com um leve toque ou já separado das folhas cotiledonares.

II) Critério alternativo, baseado na identificação de diferentes estágios de desenvolvimento da plântula durante a germinação, a saber: protusão da raiz (Figuras 6A e 6B); crescimento do hipocótilo (Figura 6C); diferenciação entre hipocótilo e início das folhas cotiledonares (Figura 6D); folhas cotiledonares com diferenciação visível maior que 3 mm (Figura 6E); e finalmente seu desenvolvimento completo. Com base na determinação dos estágios de desenvolvimento, definiu-se o critério alternativo proposto para caracterização da plântula normal de *Pinus taeda*, como sendo o momento em que ocorre a separação das folhas cotiledonares (Figura 6E).



Figura 6. Estágios de desenvolvimento da plântula de *Pinus taeda*: (A) e (B) protusão da raiz; (C) crescimento do hipocótilo; (D) diferenciação entre hipocótilo e início das folhas cotiledonares; (E) folhas cotiledonares com diferenciação visível maior que 3 mm.

As plântulas consideradas normais pelo critério alternativo foram mantidas nas caixas plásticas durante a realização do teste, para que pudessem ser avaliadas também pelo critério das R.A.S., o qual pressupõe que plântulas normais são aquelas que já apresentam suas folhas cotiledonares livres, ou seja, sem a presença do tegumento.

Ao final do teste de germinação foi comparada a porcentagem de plântulas normais entre os dois métodos, sendo o resultado expresso em porcentagem de viabilidade.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 1 % de probabilidade. Os dados de teor de água não foram analisados estatisticamente.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *Pinus taeda* possuem tamanho variável de 2 a 15 mm de comprimento e de 2 a 10 mm de largura, além de possuírem germinação

fanerocotiledonar, ou seja, os cotilédones emergem do tegumento da semente e são livres dos restos seminais, com crescimento de plântula do tipo epígea (cotilédones ficam acima do nível do solo) (OLIVEIRA et al., 1993).

De acordo com as R.A.S. (BRASIL, 2009), a primeira contagem do teste de germinação deve ser realizada no sétimo dia; no entanto, não houve qualquer plântula normal nesse período, tendo apenas iniciado a protusão da raiz, de coloração branca e levemente afilada. Além disso, houve um pequeno crescimento dessa estrutura com o início do desenvolvimento do hipocótilo, que apresenta coloração amarronzada (Figura 7), não originando plântula normal nesse período. Vale salientar que uma plântula de *P. taeda* é considerada normal quando apresenta suas estruturas essenciais intactas (parte aérea e raiz bem desenvolvidas e sem atrofiamento), com defeitos em menos de 50% do tecido e com infecção desde que seja secundária (VIEIRA e BUHRER, 2015).



Figura 7. Plântula com desenvolvimento inicial da raiz e princípio de crescimento do hipocótilo, após sete dias de semeadura.

Seguindo o critério das R.A.S. para plântula normal (quando apresenta tegumento separado das folhas cotiledonares ou facilmente removível com um leve toque), as primeiras plântulas normais só apareceram a partir do 15º dia após a instalação do teste, tendo a maior concentração inicial no 19º dia. O último dia de avaliação foi o 35º dia (e não o 28º dia, como recomendado para o encerramento do teste), pois é permitido

estender o prazo de conclusão do teste de germinação se ainda houver plântulas em desenvolvimento (BRASIL, 2009), como foi o caso das plântulas que já diferenciaram as folhas cotiledonares, mas ainda não podiam ser consideradas normais pelos critérios adotados pelos laboratórios oficiais e credenciados (R.A.S.) (Figura 8A).



Figura 8. (A) Plântulas já desenvolvidas, porém não consideradas normais seguindo os critérios dos laboratórios oficiais e credenciados (R.A.S.); (B) Plântulas com início de infecção fúngica.

Assim, a data da primeira contagem indicada nas R.A.S. parece não ser adequada para avaliação, pois tem o intuito de remover as primeiras plântulas normais, porém com sete dias, ainda não há o completo desenvolvimento da plântula normal, seguindo critérios utilizados pelos laboratórios oficiais e credenciados baseados nas R.A.S.

Outra dificuldade encontrada na avaliação pelo critério das R.A.S. é o fato das plântulas já apresentarem tecido vegetal desenvolvido durante a condução; porém, com o tegumento ainda preso a proliferação de fungos é facilitada, comprometendo a interpretação do teste de germinação (Figura 8B).

Assim, o longo período de avaliação, a facilidade de proliferação de fungos com a maior quantidade de plântulas presentes na caixa plástica, bem como o já

desenvolvimento das folhas cotiledonares, justificam o desenvolvimento de um novo critério de avaliação.

As principais anormalidades encontradas durante o teste de germinação foram plântulas que apresentaram o atrofiamento da raiz formando um calo (Figura 9A); plântulas com apenas a parte aérea, ou seja, os primórdios cotiledonares emergiram diretamente do tegumento, não possuindo raiz (Figura 9B); plântulas com parte aérea retorcida (Figura 9C) e com estrangulamento pelo perisperma (Figura 9D); e as com infecção de fungos entre o tegumento e os primórdios cotiledonares (Figura 9E e 9F).

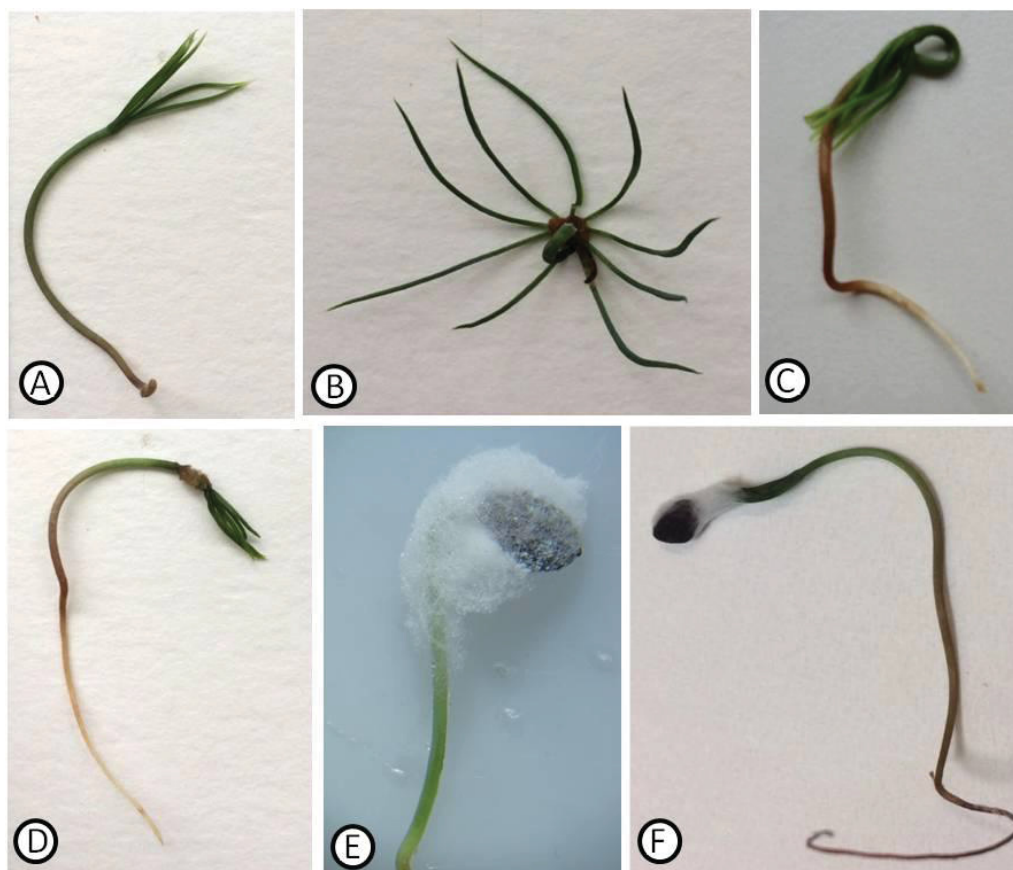


Figura 9. Plântulas anormais de *Pinus taeda*: (A) Plântula sem a presença de raiz devido a formação de um calo; (B) Plântula somente com a parte aérea, ou seja, emissão dos primórdios cotiledonares diretamente do tegumento; (C) Plântula com parte aérea retorcida; (D) Plântula com estrangulamento da parte aérea, a qual ficou retida pelo perisperma; (E) e (F) Plântulas com infecções fúngicas.

Todas essas anormalidades foram possíveis de serem visualizadas quando as folhas cotiledonares já se apresentavam diferenciadas, com pelo menos 3 mm (Figura 10). Logo, é possível utilizar o critério alternativo para definição de plântulas normais, porque a partir desse estágio de desenvolvimento não há mais incidência de anormalidades, apenas o desenvolvimento de fungos secundários. Com a retirada dessas

plântulas já consideradas normais, é possível reduzir o tempo de conclusão do teste de germinação e também diminuir a proliferação fúngica, pois haverá menos material na caixa plástica.



Figura 10. Plântula com 3 mm de diferenciação dos primórdios cotiledonares, considerada normal segundo o critério alternativo.

Para comprovar que pelo critério alternativo, plântulas com mais de 3 mm de diferenciação das folhas cotiledonares já pode ser considerada plântula normal, foi avaliado em uma mesma caixa as plântulas normais também pelo critério adotado pelas R.A.S. (Tabela 2). É possível observar que a partir do 26º dia após sementeira, considerando como plântulas normais aquelas que já apresentavam folhas cotiledonares diferenciadas com pelo menos 3 mm de comprimento (critério alternativo), a porcentagem de germinação foi 70%, padrão de germinação para comercialização, enquanto que pelo critério das R.A.S. (que só considera plântulas normais com o tegumento já despreendido ou suavemente preso) foi de 51% de germinação. Aos 28 dias após a sementeira, data estabelecida para a contagem final do teste de germinação pelas R.A.S. (BRASIL, 2009), verificou-se 75% de plântulas normais para o critério alternativo e 70% para o outro critério, porcentagem mínima para comercialização segundo legislação vigente (BRASIL, 1984). Em razão de haver diferença entre os dois métodos quanto à interpretação, o teste foi prolongado pelo período de mais uma semana, sendo encerrado aos 35 dias, quando se pôde observar que não houve diferença estatística entre os critérios, apresentando a mesma porcentagem de germinação.

Tabela 2. Dados médios de germinação de sementes de *Pinus taeda*, pelos dois critérios de interpretação do teste.

Dias após a semeadura	Porcentagem de plântulas normais	
	Critério alternativo	Critério adotado pelos laboratórios
22 dias	58 a	35 b
23 dias	62 a	41 b
26 dias	70 a	51 b
28 dias	75 a	70 b
35 dias	77 a	77 a

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 1% probabilidade

Pelo índice de velocidade de germinação (IVG) também foi possível observar que com sete dias após a semeadura não havia plântulas normais, sendo mais adequado realizar a primeira contagem do teste com maior período de tempo após a semeadura. Ao se comparar o IVG dos dois critérios - plântulas normais com diferenciação das folhas cotiledonares (Figura 11A) e plântulas normais com ausência do tegumento ou que esse se solte a um leve toque do analista (Figura 11B) verificou-se que com o critério alternativo o teste poderia ser encerrado com aproximadamente cinco dias de antecedência, apresentando o mesmo resultado que o critério dos laboratórios. Além disso, a grande quantidade de material vegetal dentro da caixa de germinação favorece a proliferação de fungos, dificultando e podendo até comprometer a avaliação do teste. Logo, se houvesse a remoção das plântulas após a diferenciação das folhas cotiledonares haveria menor quantidade de material vegetal.

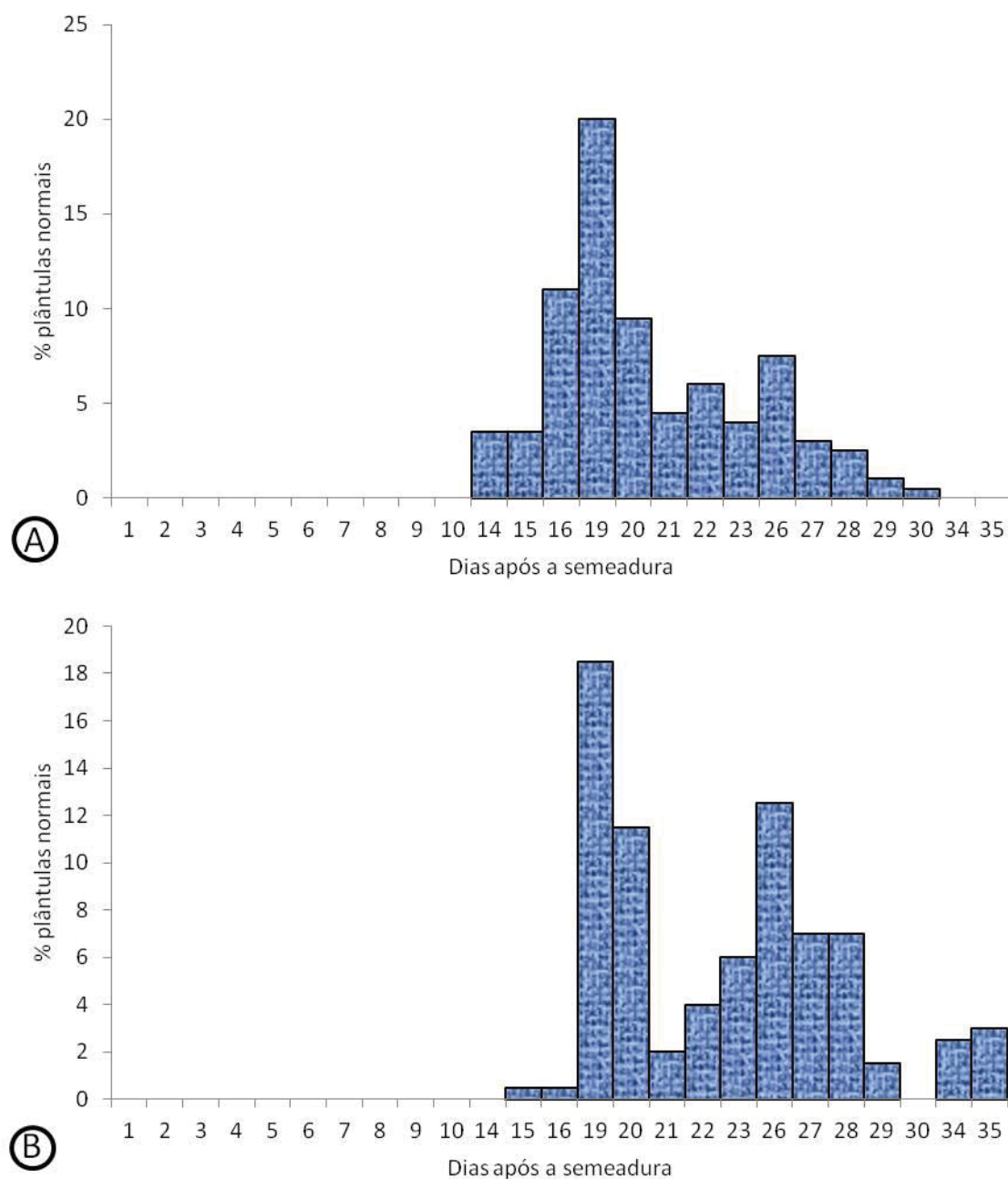


Figura 11. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Pinus taeda* considerando plântulas normais; (A) Plântulas consideradas normais pelo método alternativo (no momento da diferenciação das folhas cotiledonares); (B) Plântulas consideradas normais segundo critério adotado pelos laboratórios oficiais e credenciados seguindo recomendações das R.A.S. (plântulas completamente desenvolvidas sem a presença do tegumento, ou que o mesmo seja solto com facilidade).

Rosa et al. (2010), analisando as alterações morfológicas das sementes e plântulas de café durante o processo de germinação, definiram oito estágios de desenvolvimento (desde a embebição de água pelas sementes até o crescimento das

folhas cotiledonares), relacionaram os dias após a semeadura com os estágios de desenvolvimento, e por meio de ilustrações manuais conseguiram caracterizar de forma clara e objetiva as diferenças morfológicas de cada estágio. Por meio de tais medidas, os autores concluíram que todas as estruturas essenciais já estavam presentes no 15º dia após a instalação, não sendo necessário esperar um período de 30 dias para o encerramento do teste de germinação, como recomendado pelas R.A.S. (BRASIL, 2009).

O ajuste das técnicas, bem como a definição clara e objetiva de critérios de avaliação e condução do teste de germinação, são muito importantes para a sua maior eficiência.

Pelos resultados apresentados supõe-se que a primeira contagem pode ser realizada no 16º dia após semeadura pelo método alternativo (Figura 11A), pois é nessa data em que se inicia um grande número de plântulas germinadas. Enquanto que para a conclusão do teste, quando da utilização de lotes de sementes recém colhidas e de maior qualidade fisiológica o período de encerramento pode ser encurtado em até sete dias.

4.4 CONCLUSÕES

Plântulas de *Pinus taeda* podem ser consideradas normais quando as folhas cotiledonares já se apresentarem diferenciadas, não sendo necessário esperar a queda ou desprendimento com facilidade do tegumento da parte aérea, uma vez que as anormalidades encontradas ocorrem antes da diferenciação das folhas cotiledonares.

Durante o teste de germinação de sementes de *Pinus taeda* são identificados quatro diferentes estágios, sendo: protusão da raiz, crescimento do hipocótilo, diferenciação entre o hipocótilo e início das folhas cotiledonares e folhas cotiledonares com diferenciação visível maior que 3 mm.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p

DUARTE, M. M. MILANI, J. E. de F.; BLUM, C. T.; NOGUEIRA, A. C. Germinação e morfologia de sementes e plântulas de *Albizia edwallii* (Hoehne) Barneby & J. W. Grimes. **Revista Caatinga**, v.28, n.3, p.166-173, 2015.

GOMES, J. P.; OLIVEIRA, L. M. de; FRANÇA, C. S. S.; DACOREGIO, H. M.; BORTOLUZZI, R. L. da C. Caracterização morfológica de plântulas durante a germinação de sementes de *Psidium cattleianum* E *Acca sellowiana* (MYRTACEAE). **Ciência Florestal**, v.25, p.1035-1041, 2015 .

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório 2017**. São Paulo. 2017. 69p.

MELO, M. da G. G. de; MENDONÇA, M. S. de; MENDES, A. M. da S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazonica**, v.34, n. 1, p-14, 2004

NOGUEIRA, F. C. B.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLÃO, M. I. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearensis* Ducke (pau-violeta) - Fabaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, p.978-985, 2010.

ROSA, S. D. V. F.; MCDONALD, M. B.; VEIGA, A. D.; VILELA, F. de L.; FERREIRA, I. A. Saging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, v.38, p.421-431, 2010.

SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. **Rodriguésia**, v. 62, n. 2, p. 263-272, 2011.

SILVA, K. B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. de L. A.; MATOS, V. P. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. (Sapotaceae). **Revista Árvore**, v.36, p.59-64, 2012.

VIEIRA, E. S. N.; BUHRER, C. de B. **Interpretação do teste de germinação de sementes de *Pinus taeda***. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2015. 4p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 359).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aprimoramento das metodologias, para o teste de germinação com a definição dos estágios de desenvolvimento das plântulas, possibilita melhorar a eficiência desse teste para as sementes de *Pinus taeda*, uma vez que na literatura vigente não há detalhamento suficiente que possibilite uma análise objetiva. Além disso as datas recomendadas para primeira contagem e encerramento do teste encontram-se inapropriados, podendo-se reduzir o tempo para comercialização das sementes como também economizar espaço e tempo nos laboratórios.

Por meio de diferentes combinações entre tipos de corte, períodos de exposição e concentrações do sal de tetrazólio em sementes de *Pinus taeda* foi possível adequar uma metodologia mais prática e eficiente, reduzindo o período de exposição das sementes ao sal de tetrazólio bem como sua concentração e a realização de apenas um corte.

A próxima etapa a ser realizada, como o trabalho desenvolveu-se com apenas um lote, é o desenvolvimento de trabalhos que testem as metodologias indicadas na dissertação com o objetivo de verificar as respostas em lotes de diferentes qualidades para uma posterior validação dos métodos e por consequência que possam ser recomendadas oficialmente.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L. C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith - bignoniaceae, submetidas ao armazenamento.

Revista Árvore, v.38, n.2, p.233-240, 2014.

AGUIAR, I. B. de.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes Florestais Tropicais**. 1.ed. Brasília, DF, ABRATES. 1993. 350p.

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln, 2009. 105 p. (Contribution, 32)

BAKER, J. B.; LANGDON, O. G. **Loblolly pine**. Disponível em: <https://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/Volume_1/pinus/taeda.htm>. Acesso em: 04. Out. 2016.

BRASIL. Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Portaria nº 18 de 25 de Janeiro de 1984. Regulamenta o Decreto 81,771 de 7 de Janeiro de 1978 e considerando o deliberado na XX Reunião Ordinária da Comissão Nacional de Sementes e Mudas - CONASEM. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 dez, 1984.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

CANCELA, K. C. **Influência da família e do tamanho da semente de *Pinus taeda* L. nas propriedades tecnológicas do lote de sementes, performance da muda em viveiro e em campo**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2007

COSTA, C. J.; ZIMMER, P. D.; VILLELA, A. Base celular da origem e desenvolvimento do endosperma Revisão bibliográfica. **Revista Científica Rural**, v. 13, n.1, p. 226-246, 2011.

DUARTE, M. M.; MILANI, J. E. de F.; BLUM, C. T.; NOGUEIRA, A. C. Germinação e morfologia de sementes e plântulas de *Albizia edwallii* (Hoehne) Barneby & J. W. Grimes. **Revista Caatinga**, v.28, n.3, p.166-173, 2015.

FOGAÇA, C. A.; KROHN, N. G.; SOUZA, M. de A.; PAULA, R. C. de. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. **Floresta**, v.41, n.4, p. 895-904. 2011.

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

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. c.8.5, p.1-28.

GASPAR OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. c.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.160-167, 2009.

GOMES, J. P.; OLIVEIRA, L. M. de; FRANÇA, C. S. S.; DACOREGIO, H. M.; BORTOLUZZI, R. L. da C. Caracterização morfológica de plântulas durante a germinação de sementes de *Psidium cattleianum* E *Acca sellowiana* (MYRTACEAE). **Ciência Florestal**, v.25, n.4, p. 1035-1041, 2015.

HIGA, R. C. V.; WREGGE, M. S.; RADIN, B.; BRAGA, H.; CAVIGLIONE, J. H. BOGNOLA, I.; ROSOT, M. A. D.; GARRASTAZU, M. C. CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, Y. M. M. de **Zoneamento Climático: *Pinus taeda* no Sul do Brasil**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008. 17p. (Embrapa Florestas. Documentos, 175).

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório 2017**. São Paulo. 2017. 69p.

ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Sampling. In: **International rules for seed testing**. ed. 2008. Bassersdorf, 2008. cap.2, p.2-1 a 2-47.

KRONKA, F. J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. **A cultura do *Pinus* no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. 160p.

LAMARCA, E. V.; LEDUC, S. N. M.; BARBEDO, C. J. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil - Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. **Brazilian Journal of Botany**, v.32, n.4, p.793-803, 2009.

LAZAROTTO, M.; PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; REINIGER, L. R. S. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.4, p. 1243-1250. 2011.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.

MASULLO, L. S.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; AMÉRICO, C. Optimization of tetrazolium tests to assess the quality of *Platymiscium floribundum*, *Lonchocarpus muehlbergianus* and *Acacia polyphylla* DC. Seeds. **Journal of Seed Science**, v.39, n.2, p.189-197, 2017.

MELO, M. da G. G. de; MENDONCA, M. S. de; MENDES, A. M. da S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazonica**, v.34, n. 1, p-14, 2004.

MOORE, R. P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zürich: ISTA, 1985. 99p

NOGUEIRA, F. C. B.; MEDEIROS FILHO, S.; GALLAO, M. I. Caracterização da germinação e morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Dalbergia cearensis* Ducke (pau-violeta) - Fabaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.4, p.978-985, 2010.

NOGUEIRA, N. W.; TORRES, S. B.; FREITAS, R. M. O. Teste de tetrazólio em sementes de timbaúba. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.6, p. 2967-2976, 2014.

OLIVEIRA, F. N.; TORRES, S. B.; NOGUEIRA, N. W.; FREITAS, R. M. O. Viability of *Simira gardneriana* M.R. Barbosa & Peixoto seeds by the tetrazolium test. **Journal of Seed Science**, v.38, n.1, p.7-13, 2016.

OLIVEIRA, E. C. Morfologia de plântulas. In: AGUIAR, I. B.; PIÑARODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Ed.). Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 1993. p.175-214

ROSA, S. D. V. F. da; MCDONALD, M. B.; VEIGA, A. D.; VILELA, F. de L.; FERREIRA, I. A. Saging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, v.38, p.421-431, 2010.

SCHIMIDT, L. **Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed**. Danida Forest Seed Centre, 2000. 511p.

SILVA, B. A.; NOGUEIRA, J. L.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Critérios para condução do teste de tetrazólio em sementes de araucária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.1, p.61-68, 2016.

SILVA, K. B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. de L. A.; MATOS, V. P. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. (Sapotaceae). **Revista Árvore**, v.36, n.1, p.59-64, 2012.

SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. **Rodriguésia**, v. 62, n. 2, p. 263-272, 2011.

SUASSUNA, J. A Cultura do Pinus: uma perspectiva e uma preocupação. **Revista Brasil Floresta**. Recife, PE, n. 29, 1977. Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br/index.php?option=com_content&id=760&Itemid=376>. Acesso em: 04. Out. 2016.

VIEIRA, E. S. N.; BUHRER, C. de B. **Interpretação do teste de germinação de sementes de *Pinus taeda***. Embrapa Florestas, 2015. 4p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 359). AGUIAR, A.V. de; SOUSA, V. A. de; SHIMIZU, J. Y. Espécies de *Pinus* mais plantadas no Brasil. Embrapa Florestas, Sistemas de Produção 5. 2014.

YAMAUCHI, Y., OGAWA, M., KUWAHARA, A., HANADA, A., KAMIYA, Y. AND YAMAGUCHI, S. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Cell**, v.16, p.367- 378, 2004.