

**ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO
TESTE DE TETRAZÓLIO PARA
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE
SEMENTES DE CAFÉ NO
ARMAZENAMENTO**

ALINE DA CONSOLAÇÃO SAMPAIO CLEMENTE

2009

ALINE DA CONSOLAÇÃO SAMPAIO CLEMENTE

**ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO
PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE CAFÉ
NO ARMAZENAMENTO**

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

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Laene Moreira de Carvalho

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Clemente, Aline da Consolação Sampaio.

Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de café no armazenamento / Aline da Consolação Sampaio Clemente. – Lavras : UFLA, 2009.

49 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Maria Laene Moreira de Carvalho.

Bibliografia.

1. Café. 2. Sementes. 3. Teste de tetrazólio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7321

ALINE DA CONSOLAÇÃO SAMPAIO CLEMENTE

**ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO
PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE CAFÉ NO
ARMAZENAMENTO**

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

APROVADA em 24 de julho de 2009

Prof. Dr. João Almir Oliveira	UFLA
Pesq ^a .Dr ^a Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa	EMBRAPA/Café
Pesq. Antônio Rodrigues Vieira	EPAMIG

Prof^a. Dr^a. Maria Laene Moreira de Carvalho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A DEUS, por tudo.

A minha família, pelo apoio.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e seu Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de recursos para execução do projeto e bolsa de estudos.

À Professora Maria Laene Moreira de Carvalho, pela orientação, profissionalismo, amizade e paciência.

Aos professores João Almir Oliveira, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Renato Mendes Guimarães e Rubens José Guimarães, pelos esclarecimentos e auxílio na execução deste trabalho.

Ao pesquisador Antônio Vieira Rodrigues e a pesquisadora Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pelos conselhos e amizade.

Aos funcionários, bolsistas de iniciação científica e estagiários do Laboratório de Sementes, pelo auxílio na execução dos experimentos e amizade.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram a atingir mais uma meta.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Germinação e viabilidade de sementes de café.....	3
2.2 Deterioração de sementes de café no armazenamento.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Fase 1: Estudos para adequação de metodologia do teste de tetrazólio em sementes de café	13
3.1.1 Preparação das sementes.....	13
3.1.2 Avaliação da viabilidade de embriões de sementes de café pelo teste de tetrazólio	14
3.1.3 Teste de Germinação	14
3.1.4 Determinação do grau de umidade	15
3.2 Fase 2: Estudos da aplicabilidade do teste de tetrazólio em sementes de café armazenadas.....	15
3.3 Procedimentos estatísticos	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Fase 1 Estudos para adequação de metodologia do teste de tetrazólio em sementes de café	17
4.2 Fase 2: Estudos da aplicabilidade do teste de tetrazólio em sementes de café armazenadas.....	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
6 CONCLUSÃO	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS	38

RESUMO

CLEMENTE, Aline da Consolação Sampaio. **Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de café no armazenamento.** 2009. 49p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A germinação de sementes de café ocorre de forma lenta e desuniforme, o que dificulta a obtenção de resultados da avaliação da qualidade de lotes em tempo hábil para formação de mudas. Um dos fatores que atrasa a germinação é a presença do pergaminho que age como uma barreira física à entrada de água e gases. O teste de tetrazólio é uma alternativa para avaliação rápida da viabilidade de sementes e vem sendo adotada para a comercialização dessa espécie. A pesquisa foi realizada em duas fases visando adequar a metodologia de realização do teste de tetrazólio para reduzir o tempo de preparo das sementes e o tempo de condução do teste. Na primeira fase foi comparado o uso de hipoclorito de sódio (200 ml de NaClO à 5%) na remoção do pergaminho com a remoção manual e o tempo de embebição das sementes (36 e 48 horas) para extração do embrião em quatro lotes de cinco cultivares de cafeeiro com qualidade e umidade variáveis. Na segunda fase foi comparada a remoção do pergaminho manualmente com a remoção com hipoclorito de sódio (200 ml de NaClO à 5%) em sementes de cinco cultivares de cafeeiro armazenadas por 6 meses. Além do teste de tetrazólio, foram avaliadas a germinação e determinada a umidade inicial dos lotes de sementes e a cada 30 dias durante o armazenamento. Os resultados de viabilidade pelo teste de tetrazólio foram comparados com os de germinação. Conclui-se que, o uso do hipoclorito de sódio na concentração de 5% por 6 horas de embebição não é eficiente para a retirada do pergaminho e afeta negativamente os resultados do teste de tetrazólio em semente de café com umidade abaixo de 25%. O período de embebição de sementes de café por 48 horas na fase de preparo, para a realização do teste de tetrazólio, facilita a extração dos embriões, não afetando os resultados do teste. O teste de tetrazólio em sementes de café com diferentes níveis de umidade e deterioração deve ser realizado com a retirada manual do pergaminho.

* Comitê Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Laene Moreira de Carvalho – UFLA (Orientadora), Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA e Prof. Dr. José Rubens Guimarães – UFLA

ABSTRACT

CLEMENTE, Aline da Consolação Sampaio. **Adaptation of the methodology of the tetrazolium test to assess the viability of coffee seeds during storage.** 2009. 49p. Dissertation (Master in Crop Science)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Germination of coffee seeds occurs in a slow and uneven way, making it difficult to obtain results of quality evaluation of lots in time for the propagation. One of the factors that delay germination is the presence of parchment that acts as a physical barrier to water and gases entrance. The tetrazolium test is an alternative for fast evaluation of seeds viability and has been adopted for the commercialization of this specie. The research was conducted in two phases aiming to adequate the methodology of the tetrazolium test, to reduce the pre-conditioning time of seeds and time to conduct the test. In the first phase we compared the use of sodium hypochlorite (200 ml NaCl 5%), in removing the parchment, with manual removal; and seeds imbibition time (36 and 48 hours) for extraction of the embryo in four lots of five coffee cultivars with variable quality and moisture content. In the second phase it was compared the manual removal of the parchment with the removal with sodium hypochlorite (200 ml NaCl 5%) in seeds of five coffee cultivars stored for 6 months. Besides the tetrazolium test, it was evaluated germination and determined the initial moisture of the lots of seed, at every 30 days during the storage period. The results of viability by tetrazolium test were compared with those from germination. We conclude that the use of sodium hypochlorite at a concentration of 5% for 6 hours of imbibition is not effective for removing the parchment and affects negatively the results of the tetrazolium test in coffee seeds with moisture content below 25%. The imbibition period of coffee seeds for 48 hours in the preparation phase, for the realization of the tetrazolium test, facilitates embryos extraction, without affecting the test results. The tetrazolium test in coffee seeds with different moisture and deterioration levels must be performed with the manual removal of the parchment.

* Guidance Committee: Prof. Dr. Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA (Major Professor), Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães – UFLA, Prof. Dr. José Rubens Guimarães - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional. A produção nacional para safra de 2009 está estimada em 37,9 milhões de sacas de café beneficiado, sendo que o estado de Minas Gerais é responsável por 48,6% da produção nacional, ou seja, 18,4 milhões de sacas (Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB, 2009).

Como a implantação da cultura do cafeeiro é feita por mudas, devido à facilidade de plantio e redução do custo de formação do cafezal, requer a utilização de sementes de alta qualidade para a formação dos viveiros. No entanto, nem sempre os produtores podem contar com sementes de alta qualidade, pelas suas características relacionadas à sensibilidade à dessecação, o que faz com que as sementes armazenadas por períodos relativamente curtos, até 6 meses, tenham sua qualidade diminuída. Além disso, a sua lenta germinação dificulta a avaliação da qualidade de lotes comerciais, sendo que a principal causa da lentidão do processo de germinação é a presença do pergaminho, que constitui numa barreira à entrada de gases e água.

Testes que possam reduzir o tempo de avaliação do potencial fisiológico das sementes de café poderia permitir a tomada de decisões antecipadas, durante as operações de colheita, recepção, beneficiamento, comercialização e formação de mudas, diminuindo riscos e prejuízos. O teste de tetrazólio, caracterizado pela sua rapidez, pode ser usado para a análise da viabilidade das sementes de café de acordo com a Portaria nº 482, de 29 de novembro de 2001, do Instituto Mineiro de Agropecuária-IMA (2001), porém ainda existem dúvidas sobre a aplicabilidade do teste para os diversos materiais genéticos com diferentes níveis de qualidade e as metodologias citadas na literatura são controversas demandando estudos que definam técnicas seguras para a utilização do teste de

tetrazólio. Além disso, a adequação da técnica visando à diminuição do tempo de embebição ou de extração do embrião, bem como a utilização de métodos mais rápidos para a retirada do pergaminho, poderia proporcionar maior rapidez de obtenção dos resultados.

Assim, a pesquisa foi realizada com o objetivo de verificar o efeito do hipoclorito de sódio na retirada do endocarpo, do tempo de embebição para a extração do embrião, e definir uma metodologia para a realização do teste de tetrazólio em sementes de café de diferentes cultivares com diferentes níveis de qualidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Germinação e viabilidade de sementes de café

A germinação de sementes, em um teste de laboratório, é a emergência ou desenvolvimento da plântula até um estágio em que os aspectos de suas estruturas essenciais indiquem a maior ou menor possibilidade de se transformarem em uma planta produtiva sob condições favoráveis no solo (International Rules for Seed Testing-ISTA, 2007).

Sementes de café germinam de forma lenta e desuniforme e vários fatores podem estar relacionados com esse comportamento. Entre eles podem ser citados a desuniformidade de maturação dos frutos, os mecanismos que regem processos de maturação e os processos de pós-colheita, como secagem e armazenamento (Bewley & Black, 1994), a presença do endocarpo ou “pergaminho” (Guimarães, 1995), a presença do espermoderma, também conhecido como “película prateada” devido a presença de inibidores naturais como a cafeína (Pereira et al., 2002).

Na realização do teste de germinação o período entre a sementeira e a formação de plântulas normais demanda cerca de 30 dias, sob condições ideais no laboratório de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Este tempo é considerado longo, atrasando a comercialização das sementes e posteriormente o processo de sementeira e de formação de mudas.

Alguns estudos têm buscado alternativas para antecipar a obtenção de sementes e conseqüentemente acelerarem o processo de formação de mudas ou mesmo da realização de testes para avaliação do potencial fisiológico dos lotes. Uma alternativa estudada foi a da antecipação da colheita de sementes em estágios iniciais de maturação (Carvalho & Alvarenga, 1979; Veiga, 2005), porém sem sucesso comprovando que as sementes apresentam melhor qualidade

fisiológica quando oriundas de frutos no estágio cereja inviabilizando a colheita antecipada dos frutos.

A remoção do endocarpo, também conhecido como pergaminho, é uma alternativa apresentada para acelerar o processo de análise de sementes de café, visto que a presença desta estrutura é um dos principais fatores que atrasa a germinação constituindo numa barreira física a entrada de oxigênio e água no interior da semente e secundariamente dificultando a expansão do volume. Assim a remoção do pergaminho é de fundamental importância para acelerar a germinação das sementes de café (Guimarães, 1995). Além da barreira à entrada de água e gases, o pergaminho também dificulta o crescimento do embrião, através de mecanismo inerente a sua rigidez (Válio, 1976).

O pergaminho da semente de café é um componente fibroso que representa de 28,7 a 38,8% da casca (Teixeira, 1999) e é composto basicamente por 37% de celulose, 25 % de hemicelulose e de 9,3 a 13,5% de lignina em base seca (Ribeiro Filho, 1998; Barcelos et al., 2002) e tais componentes conferem ao pergaminho textura rígida e impermeabilidade ao tecido.

Araújo et al. (2004) relatam que a remoção do pergaminho deve ser realizada de forma criteriosa, para não causar danos ao embrião que está localizado em uma camada superficial do endosperma da semente, sendo o mais indicado a remoção manual do pergaminho. Contudo, este procedimento é bastante trabalhoso já que as sementes são manuseadas individualmente aumentando o tempo gasto na preparação das sementes para a realização do teste, além de demandar muita mão-de-obra. Desta forma torna-se necessária a investigação de outras formas de remoção do pergaminho, além da remoção manual, sendo uma alternativa a utilização do hipoclorito de sódio (NaClO) para a degradação do pergaminho, técnica investigada por Meirelles et al. (2007), Lima (2008) e Sofiatti et al. (2009) com alguns resultados satisfatórios.

Meireles et al. (2007) utilizando uma metodologia para realização do teste de germinação em sementes de café, SECAFÉ, observaram resultados eficientes com o uso da solução de hipoclorito de sódio na degradação do pergaminho. Os mesmos autores concluíram que a imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 5,0% durante 6 horas foi suficiente para degradar o pergaminho de sementes com 28% de umidade, com conseqüente melhora na germinação e vigor das sementes de café em laboratório.

Em trabalhos posteriores, Sofiatti et al. (2009) estudaram o efeito do hipoclorito de sódio em sementes de café com ampla faixa de umidade (13 a 33%) e constataram que a umidade da semente pode interferir na ação do hipoclorito de sódio. Os autores relatam que, a solução na concentração de 6% por 3 horas foi eficiente para a degradação do pergaminho quando as sementes se encontram com 23 a 33% de umidade ao passo que, para sementes com umidade abaixo desses valores, observa-se um efeito negativo do NaClO nas sementes de café nos resultados do teste de germinação. Também Lima (2008) estudando o efeito do hipoclorito de sódio na germinação de sementes e emergência de plântulas de cafeeiro observou que a imersão de sementes com teor de água de 12, 16 e 20% em solução de hipoclorito nas concentrações 3, 4 e 5% foi tão eficiente quanto à remoção manual do pergaminho, para aumentar e acelerar a emergência de plântulas, em condições de viveiro.

O hipoclorito de sódio é utilizado em laboratórios na escarificação de sementes de várias espécies que apresentam dormência sendo recomendado pelas Regras de análise de sementes para esse fim (Brasil, 1992). Esta substância é usada na degradação de tegumentos rígidos, viabilizando a entrada de água e gases no interior das sementes. Na indústria de celulose, o hipoclorito de sódio é utilizado para degradar a lignina através da ação da molécula de cloro fazendo com que ocorram reações de substituição, oxidação e adição do cloro ao anel

aromático presente na lignina (Hise, 1996). No caso do pergaminho de sementes de café, que possui alto teor de lignina na sua composição, é provável que este seja degradado quando em contato com o hipoclorito de sódio, por meio dessas reações.

No entanto, não é muito clara a ação do hipoclorito de sódio no interior da semente. Em solução aquosa, acontece a seguinte reação: $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NaOH} + \text{HOCl} \leftrightarrow \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{OCl}^-$. O ácido hipocloroso (HOCl), quando em contato com tecido orgânico age como um solvente, liberando cloro que, combinado com as proteínas do grupo amina, formam cloraminas e juntamente com os íons hipoclorito (OCl^-) provocam a degradação e hidrólise de aminoácidos (Estrela et al., 2002). Devido a tais características, o ácido hipocloroso e os íons hipoclorito em contato com o endosperma e embrião da semente podem ter efeitos negativos na qualidade da semente.

Além do teste de germinação, o teste de tetrazólio vem se consagrando como um método eficaz para verificação da viabilidade dos lotes como opção de testes rápidos e seguros para avaliação da qualidade de sementes de café.

A viabilidade é definida como a estimativa do potencial de germinação e o teste de tetrazólio pode ser utilizado para determinar a viabilidade das sementes, principalmente quando estas apresentam germinação lenta (ISTA, 2007).

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, que reduzem o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio nos tecidos vivos da semente, pela reação de íons de hidrogênio que são transferidos para o referido sal (Delouche et al., 1976). A redução do sal ocorre apenas nas células vivas, resultando na formação do trifenilformazam, composto vermelho e indifusível que confere cor vermelha ao tecido vivo.

Para a utilização do teste de tetrazólio na avaliação de viabilidade de sementes é necessário o treinamento do analista, além de metodologia específica

para cada espécie (Marcos Filho et al., 1987). A maior dificuldade na aplicação do teste de tetrazólio, em sementes de café, consiste na metodologia a ser adotada para sua condução, uma vez que, o embrião que precisa entrar em contato direto com a solução, encontra-se envolvido por tecidos do endosperma.

A metodologia do teste de tetrazólio é descrita nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 1992) como uma alternativa para a verificação do potencial de germinação de lotes de sementes de café. Pelas RAS, deve-se retirar o pergaminho manualmente, embeber as sementes em água por 18 horas, em seguida fazer um corte longitudinal, iniciado pela concavidade, e remover o pericarpo na região onde se encontra o embrião, deixando-o mais exposto; ou cortar a semente na sua extremidade distal, em torno de $\frac{1}{4}$ do seu tamanho. Estas porções devem ser embebidas em solução de tetrazólio a 1% por 24 a 28 horas a 30°C. Após a coloração, o embrião deve ser separado do endosperma para posterior avaliação.

Já Dias & Silva (1986) recomendam um período de pré-embebição das sementes em água de 18 a 24 horas a 30°C, e enquanto que Vieira et al. (1998) relatam que o período de condicionamento das sementes varia em função da idade das mesmas, sendo indicado 18 a 24 horas para sementes recém-colhidas ao passo que sementes de safras anteriores devem ser embebidas por 72 horas. Após o pré-condicionamento ambos os autores sugerem o corte de parte do endosperma portando o embrião e que tais porções (endosperma + embrião) sejam embebidas em solução de tetrazólio a 0,1% por 14 a 16 horas à temperatura de 30°C (Dias & Silva, 1986), ou fazer a extração completa dos embriões (Vieira et al., 1998). Na sequência, o embrião é desligado do endosperma e classificado em viável ou inviável.

Em trabalhos de pesquisa realizados com intuito de adaptar testes rápidos para a avaliação da qualidade de sementes de café, alguns autores utilizaram o teste de tetrazólio, além da germinação, como base de comparação

com os resultados da nova técnica. Figueiredo (2000), em estudos do teste pH do exsudato – fenolftaleína para estimar a viabilidade de sementes de café, realizou o teste de tetrazólio através de modificações das metodologias existentes. Para isso, as sementes de café foram embebidas em água por 52 horas à 25° C e em seguida foi realizado corte longitudinal sobre o eixo embrionário das sementes de modo a expor o embrião. A coloração procedeu-se após o corte, onde as sementes foram embebidas em solução de tetrazólio na concentração de 0,25% por 16 horas na ausência de luz à temperatura de 25° C. Pelos resultados desta pesquisa, são observadas pequenas diferenças (3% a 5%) entre os percentuais de viabilidade e germinação para todos os lotes de sementes utilizados na pesquisa.

Na mesma linha de pesquisa, Costa (2003) realizou o teste de tetrazólio para utilizar os resultados como base de comparação com resultados de condutividade elétrica em sementes de café. O mesmo autor também adotou algumas modificações nas metodologias propostas para realização do teste de tetrazólio, a citar a embebição das sementes por 36 horas à temperatura de 25°C, extração completa do embrião e em seguida foi realizada a coloração com embebição dos embriões em solução de tetrazólio a 0,5% por 3 horas à 30° C. Foi possível observar diferenças na faixa de 0 a 19 % entre os resultados de germinação e tetrazólio de 10 lotes de sementes de café utilizados neste trabalho.

O teste de tetrazólio em sementes de café é realizado atualmente apenas em laboratórios do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em pesquisas e como um teste de rotina no laboratório da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e de acordo com o observado, fica evidente que as metodologias existentes tornam a realização do teste extremamente trabalhosa (Carvalho, 2009).

Pelo exposto, entende-se que as metodologias propostas são divergentes quanto ao tempo de embebição, tempo de coloração e concentração da solução de tetrazólio, o que dificulta a adoção do teste em trabalhos de pesquisa e rotina

e que podem levar a resultados de viabilidade que não condizem com a qualidade real das sementes. Desta forma, a definição da metodologia para execução do teste e a confirmação da eficiência desta na predição do potencial de viabilidade de sementes de café são de extrema importância.

2.2 Deterioração de sementes de café no armazenamento

A avaliação da qualidade de sementes de café ao longo do armazenamento é dificultada por vários aspectos, sendo o mais importante a deterioração fúngica e fisiológica das sementes. A presença de microorganismos em sementes é observada em maior nível ao longo do armazenamento, e pode aumentar significativamente, quando as sementes são armazenadas como umidade alta, causando redução na viabilidade e vigor das sementes de café, principalmente quando o armazenamento é realizado em condições não controladas (Braccini et al., 1999).

A alta umidade das sementes, somada às temperaturas mais elevadas, contribuiu para a elevação da incidência de patógenos nas sementes (Braccini et al., 2008). Levando-se em consideração que o teste de germinação em laboratório é realizado sob condições ideais de umidade e temperatura para a germinação das sementes, essas condições também propiciam o desenvolvimento de fungos, durante o teste. O ambiente favorável somado ao tempo de germinação das sementes, de aproximadamente 30 dias, contribui para a disseminação dos fungos de sementes infestadas para sementes sadias, o que pode prejudicar a avaliação da qualidade das sementes de café ao final do teste de germinação.

Além da ação prejudicial de microorganismos, as sementes de café apresentam sensibilidade à dessecação, tendo como consequência a perda do poder germinativo quando estas atingem baixos níveis de umidade (Ellis et al., 1990).

Devido à rápida perda da viabilidade relacionada à baixa tolerância à secagem, inicialmente, as sementes de café foram enquadradas no grupo das recalcitrantes (Roberts, 1973), porém Ellis et al. (1990) observaram que a classificação não poderia ser justificada, uma vez que sementes de café sobrevivem à secagem ao conteúdo de água inferior a 20%, que é normalmente o teor de água limiar para sementes recalcitrante. No entanto, as sementes não sobreviver dissecção completa ou os efeitos combinados da dessecação e baixa temperatura. Dessa forma, o mesmo autor classificou as sementes de café como intermediárias, incluindo esta categoria à classificação de Roberts (1973). Assim, passou a ser aceita a classificação (Hong & Ellis, 1996) que admite as sementes “ortodoxas” (toleram secadas a graus de umidade próximos de 5%), “intermediárias” (toleram secadas a graus de umidade em torno de 10-12,5% e têm a viabilidade reduzida em umidades inferiores) e “recalcitrantes” (perdem a viabilidade quando secadas a 15-20% de umidade).

Para a manutenção da viabilidade de sementes de café, por períodos prolongados, e considerando sua característica intermediária, alguns estudos têm demonstrado a necessidade de realizar o armazenamento com altos níveis de umidade, entorno de 40% (Barboza & Herrera, 1990) e 35% (Vasconcelos et al., 1992). Além do teor de umidade, as embalagens, condições de armazenamento e a interação entre estes três fatores tem se constituído em fontes de indagação e divergência entre várias pesquisas realizadas.

Estudando o efeito da temperatura e do grau de umidade na sobrevivência de sementes de café, Eira (1999) observou que o nível crítico de umidade para manutenção da viabilidade à temperatura de 15°C foi 10%, e que, os efeitos do grau de umidade e da temperatura foram interdependentes e o nível crítico de umidade foi mais elevado em temperaturas mais baixas.

Segundo Vieira et al. (2007), em estudos da influência de métodos de secagem e ambientes de armazenamento, foi observado que as sementes se

mantiveram viáveis até nove meses, quando armazenadas em embalagens herméticas em câmara fria (10°C e 50% umidade relativa), para sementes com 12% de umidade, secadas lentamente em condições não controladas, e para sementes sem secagem, com 47,5 % de umidade.

Vasconcelos et al. (1992) também observou que sementes de café secadas até umidade de 35% e acondicionadas em embalagem de polietileno mantiveram germinação de 70% após oito meses de armazenamento, enquanto aquelas com umidade de 15 e 25%, na mesma embalagem, tiveram redução na germinação e no vigor a partir de quatro meses, ficando o vigor próximo de zero.

Tem-se demonstrado que a rápida perda da qualidade das sementes de café está relacionada com desidratação dos tecidos (Ellis et al., 1990). Amorin et al. (1977) citam que a perda do poder germinativo em sementes de café é devida às alterações impostas à estrutura das membranas celulares, com consequente perda na permeabilidade seletiva, ocasionadas por exposição a temperaturas elevadas ou muito baixas, por variação na umidade do ar e por injúrias, corroborando com as afirmativas de Bewley & Black (1994) e Basu (1995) de que sementes em estágio avançado de deterioração apresentam danos no sistema de membrana.

Segundo Simon (1974), a permeabilidade seletiva das membranas varia de acordo com a fase da vida da célula e com as condições ambientais em que for exposta; assim, tanto a senescência como a exposição a uma condição de estresse, tal como a desidratação, pode alterar a sua permeabilidade. Tem sido demonstrado que o sistema de membranas mais permeável favorece a lixiviação de solutos em sementes de soja (Dias et al., 1995; Custódio & Marcos Filho, 1997), e é influenciado pela idade e condição fisiológica da sementes observado por Fessel et al. (2006) em milho. Estes solutos servem de atrativos à patógenos, promovendo sua disseminação entre as sementes e plântulas do teste, o que pode

levar a uma interpretação subjetiva da qualidade das sementes pelo teste de germinação nas condições em que é realizado.

Em síntese, a capacidade de armazenamento de sementes de café é reduzida, necessitando de condições especiais de ambiente de armazenagem para a manutenção da viabilidade por longos períodos. O teste de germinação usualmente utilizado para a aferição da qualidade das sementes ao longo do armazenamento pode também ser afetado pela presença de fungos, principalmente em condições de alta umidade. Com isso, pesquisas que visam meios para acelerar o processo de avaliação da qualidade de sementes de café são de grande importância.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais. Foram utilizadas sementes de café recém colhidas na região de Lavras e Sul de Minas no ano agrícola de 2006/2007, as quais foram recebidas para análise da qualidade para fins de comercialização e apresentavam diferentes teores de água e qualidade fisiológica.

O experimento foi realizado em duas fases distintas sendo que na primeira foram testadas metodologias para realização do teste de tetrazólio e na segunda a aplicabilidade do teste de tetrazólio em sementes de café deterioradas por meio de armazenamento em condições não controladas.

3.1 Fase 1: Estudos para adequação de metodologia do teste de tetrazólio em sementes de café

Foram utilizados quatro lotes de cinco cultivares de cafeeiro, Mundo Novo 376-4, Topázio MG 1190, Catuaí IAC 99, Catuaí Vermelho IAC 144 e Acaiá IAC 479-19, produzidas na região do Sul de Minas e avaliadas quanto à viabilidade pelo teste de tetrazólio e de germinação.

3.1.1 Preparação das sementes

No intuito de reduzir o tempo de execução do teste de tetrazólio, quatro metodologias foram avaliadas: dois métodos para remoção dos pergaminhos e dois períodos de embebição das sementes para retirada dos embriões.

A remoção do pergaminho foi efetuada pela embebição de 400 sementes em solução de 200 ml de hipoclorito de sódio (NaClO) a 5% por 6 horas à temperatura de 25°C, segundo Meireles et al. (2007). Este método de remoção

foi comparado ao método convencional, em que o pergaminho foi retirado manualmente.

Para a extração dos embriões, as sementes foram embebidas diretamente em água pelos períodos de 36 e 48 horas, à temperatura de 30°C.

3.1.2 Avaliação da viabilidade de embriões de sementes de café pelo teste de tetrazólio

Após os períodos de embebição (36 e 48 horas), os embriões foram extraídos e mantidos em solução de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP), desde o momento da sua extração dos endospermas até serem colocados na solução de tetrazólio. Ao término da extração dos embriões, estes foram lavados em água corrente com auxílio de uma peneira e embebidos em solução de tetrazólio 0,5% utilizando-se frascos escuros e submetidos à temperatura de 30°C por 2 horas.

A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para melhor visualização das estruturas internas e externas dos mesmos. Para isso, foi realizado um corte longitudinal ao meio dos embriões, os quais foram classificados em viáveis e inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos, conforme pode ser observado nas Figuras 1B, 2B, 3B, 4B e 5B dos anexos.

3.1.3 Teste de Germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes sem pergaminhos (extraídos manualmente) para cada tratamento, semeadas em rolos de papel toalha tipo "germitest" umedecido com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco e colocado para germinar a uma temperatura constante de 30°C na presença de luz. A contagem final foi realizada no 30º dia após a semeadura, computando-se as plântulas normais em cada repetição,

conforme os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), ilustrados nas Figuras 6B e 7B, dos anexos.

3.1.4 Determinação do grau de umidade

Foi realizado pelo método da estufa 105°C durante 24 horas, utilizando 2 repetições para cada amostra conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os resultados foram expressos em porcentagem média por amostra.

3.2 Fase 2: Estudos da aplicabilidade do teste de tetrazólio em sementes de café armazenadas

Para avaliar a aplicabilidade do teste de tetrazólio em sementes deterioradas, parte das sementes utilizadas na primeira etapa do experimento foi armazenada por 6 meses ao ambiente (sem controle de temperatura e umidade relativa do ar) e, a cada 30 dias, as sementes foram avaliadas pelos testes de germinação e de tetrazólio. As variações da umidade relativa do ar e da temperatura no ambiente de armazenamento foram medidas com auxílio de um termohigrógrafo (Figura 1A).

Foram utilizadas sementes das cultivares de cafeeiro Mundo Novo 376-4, Topázio MG 1190, Catuaí IAC 99, Catuaí Vermelho IAC 144 e Acaiá IAC 479-19, sendo um lote de cada cultivar, para estudar o efeito do hipoclorito de sódio em sementes de café em diferentes estágios de deterioração. Para a retirada dos pergaminhos, foram utilizados os métodos de extração manual e embebição em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 5% por 6 horas na temperatura de 25 °C, segundo metodologia de Meireles et al. (2007).

Após a extração do pergaminho as sementes foram embebidas diretamente em água por 48 horas e submetidas ao teste de tetrazólio, teste de germinação e determinação do teor de água, conforme descritos anteriormente.

3.3 Procedimentos estatísticos

Para os estudos de adaptação do teste de tetrazólio, na primeira fase, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo para o teste de tetrazólio, em esquema fatorial $4 \times 2 \times 2$, sendo quatro lotes, duas metodologias de extração do pergaminho e dois tempos de embebição, para cada cultivar isoladamente. Na segunda fase foi utilizado um esquema fatorial 2×6 , sendo duas metodologias de extração do pergaminho e seis épocas de armazenamento. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes em cada teste, com exceção da determinação de umidade, na qual foram utilizadas 2 repetições.

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância. A comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (características qualitativas) e pela análise de regressão (características quantitativas), por meio do programa estatístico SISVAR[®] (Ferreira, 2000). As análises estatísticas para a comparação entre os resultados do teste de germinação e do teste de tetrazólio foram realizadas considerando distribuição binomial (com função de ligação canônica, ou logística). A avaliação da diferença entre metodologias e o efeito do tempo foram observadas por meio de contrastes e por redução na deviance residual do ajuste sequencial de modelos. O procedimento foi desenvolvido no software R (R Development Core Team, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fase 1: Estudos para adequação de metodologia do teste de tetrazólio em sementes de café

O resumo da análise de variância dos dados obtidos no teste de tetrazólio para avaliar os efeitos dos métodos de retirada do pergaminho, manualmente ou com Hipoclorito de sódio (6%), e dos diferentes períodos de pré-condicionamento, 36 ou 48 horas, em sementes de café está apresentado na Tabela 1A. As interações duplas entre métodos de remoção do pergaminho e lotes e, períodos de embebição e lotes foram significativas para todas as cultivares. As demais interações não foram significativas.

Os efeitos do hipoclorito de sódio, utilizado para extração do pergaminho de sementes de café, sobre a viabilidade avaliada pelo teste de tetrazólio variou em função dos lotes. Na Tabela 1 verificam-se valores inferiores de viabilidade das sementes quando se utilizou a solução de hipoclorito de sódio para a retirada do pergaminho, para a maioria dos lotes das 5 cultivares estudadas. Na cultivar Mundo Novo 376-4, apenas o lote 3 não foi afetado negativamente pelo uso do hipoclorito de sódio para a extração do pergaminho. O mesmo ocorrendo para o lote 4 da cultivar Topázio MG 1190, o lote 3 da cultivar Catuaí IAC-99 e lotes 2 e 3 da cultivar Acaíá IAC 479-19. Vale ressaltar que para todos estes lotes onde não foi observado qualquer efeito negativo da solução de hipoclorito nos resultados do teste de tetrazólio, a umidade das sementes era superior a 26,5 %.

TABELA 1 Médias de viabilidade de sementes e umidade (%) de cinco cultivares de café submetidas a duas metodologias de extração do pergaminho (manual - M e com hipoclorito de sódio - H) e avaliadas pelo teste de tetrazólio.

		Cultivares																			
		Mundo Novo 376-4				Topázio MG1190				Catuaí IAC-99				Catuaí Vermelho IAC 144				Acaia IAC 479-19			
Lote	U%	Mét. Extração do pergaminho		U%	Mét. Extração do pergaminho		U%	Mét. Extração do pergaminho		U%	Mét. Extração do pergaminho		U%	Mét. Extração do pergaminho							
		M	H		M	H		M	H		M	H		M	H						
1	21,0	79,75	76,25	17,5	87,50	83,25	21,0	83,25	79,00	19,5	90,50	85,25	21,5	84,25	78,75						
		Ad	Bd		Ab	Bc		Aa	Bc		Aa	Ba		Aa	Bb						
2	17,5	88,25	82,75	14,0	86,25	81,87	21,5	77,75	69,25	19,5	84,75	81,25	33,0	81,25	81,00						
		Ab	Bb		Ab	Bc		Ab	Ba		Ac	Bb		Ab	Aa						
3	29,5	90,00	90,00	16,0	89,37	85,12	29,5	83,25	81,75	19,0	87,25	81,75	27,0	83,25	82,25						
		Aa	Aa		Aa	Bb		Aa	Ad		Ab	Bb		Aa	Aa						
4	21,5	82,50	79,25	26,5	87,62	86,62	25,0	78,75	75,25	19,0	86,25	80,25	22,0	76,87	73,00						
		Ab	Bc		Ab	Aa		Ab	Bb		Ab	Bb		Ac	Bc						

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula coluna para cada cultivar não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott no nível nominal de significância de 5%.

De acordo com Sofiatti et al. (2009), a solução de hipoclorito de sódio é eficiente na degradação e remoção de pergaminho em sementes de café quando estas apresentam grau de umidade acima de 23%. Assim, provavelmente as sementes dos lotes mais úmidos não foram afetadas pelo cloro ativo, devido à quantidade de água presente na semente, o que diminuiu a absorção dessa substância minimizando os efeitos negativos na viabilidade das sementes.

O mesmo autor considera que, quanto menor o grau de umidade inicial das sementes, maior é a absorção da solução de hipoclorito, o que ocasiona à degradação das membranas, tornando-as menos seletivas e mais susceptíveis a entrada de solutos, o que promove uma absorção ainda mais rápida, causando a perda de viabilidade dessas sementes. Sofiatti et al. (2009) ainda sugere que a reação do hipoclorito de sódio pode ter ocasionado aumento na temperatura da solução de pré-embebição, favorecendo o aumento da absorção da solução. Bewley & Black (1982) afirmam que a exposição de sementes ao hipoclorito de sódio por longos períodos pode provocar danos ao embrião. Na presente pesquisa, as sementes de café ficaram expostas por 6 horas à solução, o que pode ter provocado uma maior absorção de substâncias prejudiciais ao embrião, efeito constatado nos embriões que apresentavam maior descoloração na radícula,

A remoção do pergaminho deve ser realizada de forma criteriosa visando preservar o embrião que está localizado próximo à superfície do endosperma. A eficiência da remoção manual do pergaminho para promover a germinação e proporcionar aumento na velocidade de germinação de sementes de café já foi comprovada por Araújo et al. (2004). Isto indica que a remoção manual do pergaminho é um método bastante eficaz sem causar prejuízos à qualidade das sementes, confirmado nos resultados de porcentagem e velocidade de germinação de acordo com esse autor.

Além do efeito negativo do hipoclorito de sódio na retirada do pergaminho de sementes com umidade inferior a 25%, vale ressaltar que no

presente trabalho, a solução de hipoclorito de sódio utilizada não foi eficiente para a completa degradação do pergaminho, necessitando da retirada manual complementar dos pergaminhos remanescentes da maioria das sementes.

Pelos resultados do teste de tetrazólio referentes ao tempo de condicionamento (Tabela 2), pode-se observar que os dados de viabilidade das sementes pré-condicionadas no tempo de 48 horas foi superior para a maioria dos lotes das 5 cultivares. Com exceção do lote 4 da cultivar Topázio MG 1190, do lote 3 da cultivar Catuaí IAC-99 e do lote 3 da cultivar Catuaí Vermelho IAC-144, a porcentagem de viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio, quando submetidas ao período de 48 horas de embebição, foi igual ou superior àquelas embebidas por 36 horas. Observa-se também, que os resultados de viabilidade parecem não ser influenciados pelo teor de água ou qualidade inicial das sementes.

De acordo com Dias & Silva (1986), o recomendado é a embebição das sementes por 18 a 24 horas a 30 °C, porém a análise de resultados de pré-testes permite inferir que o tempo indicado é insuficiente para amolecer as sementes, o que dificulta a extração dos embriões. Vieira et al. (1998) relata que sementes de café, devem ser embebidas em água por um período maior, para que aconteça a ativação suficiente do sistema enzimático, o que melhora e torna o processo de coloração mais rápido, sendo indicados períodos de pré-condicionamento de até 72 horas. Além disto, maior período de embebição facilita a excisão dos embriões.

Nos resultados encontrados no presente trabalho, também foi observado melhor desempenho das sementes embebidas por um período maior (48 horas), além de facilitar a extração do embrião por provocar um melhor amolecimento do endosperma da semente.

TABELA 2 Médias de viabilidade de sementes e umidade (%) de cinco cultivares de café submetidas a dois períodos de pré-condicionamento e avaliadas pelo teste de tetrazólio.

		Cultivares																			
		Mundo Novo 376-4				Topázio MG1190				Catuaí IAC-99				Catuaí Verm. IAC 144				Acaí IAC 479-19			
Lote	U%	Tempo de pré-condicionamento		U%	Tempo de pré-condicionamento		U%	Tempo de pré-condicionamento		U%	Tempo de pré-condicionamento		U%	Tempo de pré-condicionamento		U%	Tempo de pré-condicionamento				
		36	48		36	48		36	48		36	48		36	48		36	48			
1	21,0	74,25	81,75	17,5	84,62	86,12	21,0	81,50	80,75	19,5	84,75	91,00	21,5	79,75	83,25	21,5	Bb	Aa			
		Bd	Ac		BB	Ab		Ab	Aa		Bb	Aa									
2	17,5	85,50	85,50	14,0	83,75	84,37	21,5	72,25	74,75	19,5	82,00	84,00	33,0	81,00	81,25	33,0	Ab	Aa			
		Ab	Ab		Ab	AC		Bd	Ac		Bc	Ac									
3	29,5	89,50	90,50	16,0	85,37	89,12	29,5	84,00	81,00	19,0	87,00	82,00	27,0	82,75	82,75	27,0	Aa	Aa			
		Aa	Aa		Bb	AA		Aa	Ba		Aa	Bd									
4	21,5	78,75	83,00	26,5	87,87	86,37	25,0	76,75	77,25	19,0	80,00	86,50	22,0	73,12	76,75	22,0	Bc	Ab			
		Bc	Ac		Aa	BB		Ac	Ab		Bd	Ab									

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula coluna para cada cultivar não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott no nível nominal de significância de 5%.

Pela análise de variância dos dados do teste de germinação (Tabela 2A) observa-se que o fator lote variou em função das cultivares. As médias das porcentagens de germinação das cinco cultivares estão apresentadas na Tabela 3.

Observa-se que os lotes são de diferentes níveis de qualidade nas diferentes cultivares de café utilizadas para a realização deste trabalho, satisfazendo a necessidade de se obter sementes com alto e médio percentual de germinação para estudar a eficiência do teste de tetrazólio. Independente dos valores do potencial de germinação, para todos os lotes, observa-se que estes estão dentro dos padrões mínimos de germinação (70%) exigidos para a comercialização de sementes de café de acordo a Portaria nº 482 do IMA (2001).

TABELA 3 Porcentagem média de germinação de sementes recém-colhidas de 4 lotes de sementes de 5 cultivares de café.

Lote	Germinação (%)				
	Mundo Novo 376-4	Topázio MG1190	Catuai IAC- 99	Catuai Vermelho IAC 144	Acaia IAC 479-19
1	71,00 c	82,75 b	78,25 b	86,00 a	79,25 a
2	89,00 a	88,50 a	74,00 c	77,00 c	78,25 a
3	92,00 a	91,25 a	83,75 a	79,50 a	79,50 a
4	74,50 b	86,00 b	74,00 c	81,00 b	74,50 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott no nível nominal de significância de 5%.

Os resultados das quatro metodologias utilizadas na realização do teste de tetrazólio foram comparados com os dados do teste de germinação considerando um modelo binomial. Os resultados obtidos para a análise de deviance estão na Tabela 5A. Pelos resultados é possível observar que, a interação cultivares *versus* metodologia não foi significativa, o que implica dizer

que, todas as cultivares, apesar de diferirem de qualidade entre si, se comportaram de forma semelhante em relação às metodologias de tetrazólio as quais foram submetidas. Assim são apresentados apenas valores médios das cultivares submetidas ao teste de germinação e às 4 metodologias de tetrazólio e a comparação se dá entre a germinação e cada metodologia do teste de tetrazólio.

Na Tabela 4, é possível observar que os valores médios de germinação são semelhantes aos resultados do teste de tetrazólio quando utilizado a extração do pergaminho com solução de Hipoclorito de sódio e com 36 e 48 horas de embebição, diferindo das demais metodologias.

TABELA 4 Contrastes entre porcentagens de germinação e de viabilidade com utilização de 4 metodologias para a realização do teste de tetrazólio (extração do pergaminho com Hipoclorito de sódio ou manual e embebição por 36 e 48 h.)

Método	% Médias
Germinação	81,4
Viabilidade (Hipoclorito de sódio; 36 h. embebição)	80,0 ^{ns}
Viabilidade (Hipoclorito de sódio; 48 h. embebição)	81,6 ^{ns}
Viabilidade (Manual; 36 h. embebição)	83,7 [*]
Viabilidade (Manual; 48 h. embebição)	85,4 [*]

“ns” não significativo comparado com o teste de germinação pelo teste t (5%).

“*” significativo comparado com o teste de germinação pelo teste t (5%).

O teste de tetrazólio é realizado sob condições mais favoráveis de ambiente do que as proporcionadas para o teste de germinação, além de ser realizado em menor período de tempo, o que atenua a ação de possíveis fatores

adversos, como exemplo microorganismos não permitindo que esses fatores interfiram na avaliação dos embriões, portanto são aceitáveis diferenças de até 5% entre o teste de viabilidade e germinação (França Neto et al., 1998; Krzyzanowski et al., 1999).

4.2 Fase 2: Estudos da aplicabilidade do teste de tetrazólio em sementes de café armazenadas

Pelos resultados do teor de água das sementes de café, ao longo do período de armazenamento (Figura 1), foi possível observar uma queda no grau de umidade das sementes no primeiro mês de armazenamento em todas as cultivares. Essa redução da umidade das sementes coincide com os valores mais baixos de umidade relativa do ar (Figura 1A) nos meses de julho e agosto (55% umidade relativa) nas condições de armazenamento.

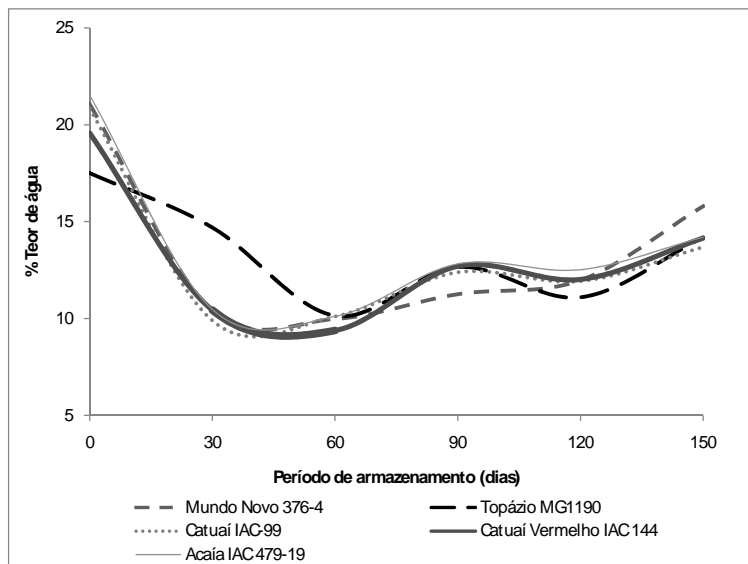


FIGURA 1 Teores de água (%) em sementes de café ao longo do armazenamento em condições não controladas. UFLA, Lavras-MG.

Nos meses subsequentes, a umidade das sementes permaneceu em equilíbrio, sendo notadas pequenas variações até o final do armazenamento. Esta variação da umidade das sementes acontece em maior ou menor intensidade de acordo com Ellis et al. (1990) influenciada por fatores, como, a umidade relativa e a temperatura do ar, já que as sementes entram em equilíbrio higroscópico com a umidade do ambiente. A partir do primeiro mês do armazenamento, o teor de água das sementes diminuiu significativamente, entrando em equilíbrio com a umidade relativa do ar com um teor de aproximadamente 10%.

O efeito dos tratamentos de retirada do pergaminho nos resultados do teste de tetrazólio pode ser observado na Figura 2. A eficiência na remoção do pergaminho das sementes com uso da solução de hipoclorito de sódio após armazenamento foi comprometida, uma vez que os pergaminhos não foram degradados totalmente. Como realizado na primeira fase, a retirada manual complementar dos pergaminhos remanescentes foi realizada para a maioria das sementes.

Além da baixa eficiência da solução de hipoclorito de sódio na remoção do pergaminho, pôde-se notar que a mesma solução foi prejudicial ao embrião das sementes como observado pelos resultados do teste de tetrazólio já que sementes embebidas na solução de hipoclorito de sódio apresentaram valores de viabilidade inferiores em comparação ao tratamento onde o pergaminho foi removido manualmente (Figura 2). Esse comportamento foi observado para todas as cultivares confirmando os resultados observados nas sementes com baixo grau de umidade e recém colhidas, na primeira fase do experimento.

A perda de viabilidade das sementes segue a mesma tendência (modelo quadrático) para as sementes submetidas às duas metodologias de extração do embrião com valores diferentes para todas as épocas de armazenamento e essa diferença foi constante em todas cultivares estudadas indicando o efeito negativo do tratamento com hipoclorito para remoção do pergaminho. Da mesma forma o efeito negativo do hipoclorito foi notado desde o início do armazenamento. Vale ressaltar que a umidade das sementes na fase inicial era menor que 23%. Esses resultados confirmam a hipótese de que sob condições de umidade inferiores os efeitos do hipoclorito são mais acentuados, afetando não só a germinação (Meireles et al., 2007; Sofiatti et al., 2009) como a viabilidade das sementes.

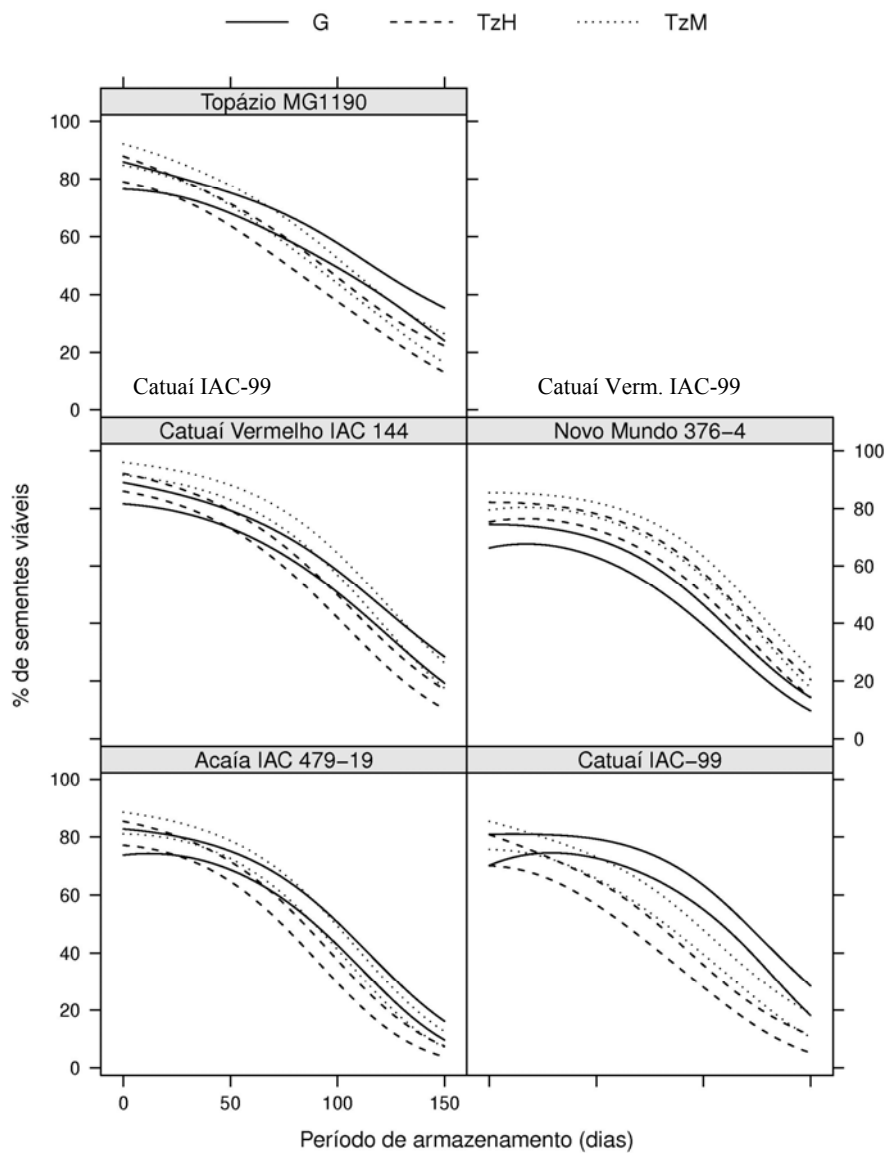


FIGURA 2 Intervalos de confiança (95%) para porcentagens de germinação (G) e de viabilidade (Tz) de sementes de café de 5 cultivares avaliadas por meio de duas metodologias de remoção do pergaminho (manualmente - TzM e com Hipoclorito de sódio - TzH) ao longo do armazenamento.

A redução da umidade já nos primeiros 30 dias de armazenamento pode ter acarretado uma aceleração no processo de deterioração das sementes, observado a partir de 60 dias de armazenamento, com declínio acentuado da qualidade das sementes nas épocas seguintes, para todas as cultivares.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Bacchi (1958), Silva & Dias (1985), Miranda (1987), Vasconcelos et al. (1992) e Soto et al. (1995), que observaram um declínio da viabilidade de sementes de café com teores de água entre 15 e 25% caracterizando o comportamento intermediário da espécie com relação à dessecação.

Pelos resultados do teste de germinação das sementes de café (Figura 2) observa-se potenciais máximos de germinação para sementes não armazenadas e com 30 dias de armazenamento. A partir do segundo mês, o potencial germinativo das sementes decresce para todas as cultivares. Essa perda de germinabilidade é acentuada ao longo do tempo atingindo valores entre 30% (cultivar Topázio MG1190) a 8% de germinação (cultivar Mundo Novo 376-4) aos 150 dias de armazenamento.

Trabalhos realizados por diversos autores comprovam a perda de viabilidade de sementes de café ao longo do armazenamento (Matiello, 1991; Vasconcelos et al., 1992), e principalmente quando as sementes são armazenadas em ambiente aberto (Vieira et al., 2007) o que pode promover o equilíbrio higroscópico das sementes a baixos teores de água.

Quando se observa a tendência das curvas de germinação, TZ M e TZ H, ajustadas por meio de função logística, notam-se uma inversão da posição destas curvas ao longo do armazenamento onde, em sementes com alta qualidade, os valores de germinação estão próximos dos valores de viabilidade na metodologia de utilização de Hipoclorito de sódio para a remoção dos pergaminhos. Já quando as sementes perdem qualidade ao longo do armazenamento, as curvas de TZ M e germinação tendem a ficar mais próximas para a maioria das cultivares

com exceção da cultivar Mundo Novo 376-4, onde o teste de tetrazólio realizado nas duas metodologias tende a superestimar a qualidade das sementes em relação a germinação. Esses resultados podem ser explicados pela alta incidência (7%) de plântulas anormais infeccionadas da cultivar Mundo Novo 376-4, o que afetou os resultados da germinação.

A alta incidência de patógenos que afetam o desenvolvimento de plântulas pode interferir nos resultados do teste de germinação. Segundo Krzyzanowski et al. (1999) uma das limitações do teste de germinação é justamente a presença de microorganismos que afetam o desenvolvimento de plântulas.

Na análise apenas equações ajustadas do efeito do hipoclorito de sódio na remoção do pergaminho referentes aos resultados de tetrazólio ao longo do armazenamento, observa-se a mesma tendência vista na primeira fase do experimento, onde o hipoclorito prejudica a viabilidade das sementes, visto a redução de umidade das sementes durante o armazenamento em ambiente não controlado. Este resultado é notado pelos valores de viabilidade das sementes que, quando o pergaminho foi removido manualmente, permanecem superiores ao longo do armazenamento.

Pelo exposto fica evidente que, a solução de hipoclorito não é recomendada para a retirada do pergaminho de sementes com qualidade inferior, podendo obter resultados subestimados no teste de tetrazólio devido a efeitos negativos do tratamento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de tetrazólio pode ser considerado uma técnica importante na avaliação da viabilidade de sementes de café, pois o resultado é obtido com aproximadamente 3 dias, sendo sua principal característica a rapidez na informação sobre as condições fisiológicas do lote, o que auxilia o produtor de sementes na tomada de decisão para a comercialização e destino dos lotes.

Para a adoção do teste de tetrazólio em um laboratório de sementes, deve-se levar em consideração a habilidade e treinamento do analista, já que se não houver padronização e detalhamento na análise em relação aos tecidos do embrião, o teste torna-se subjetivo.

O tempo de 48 horas de embebição das sementes em água proporciona maior amolecimento do endosperma, facilitando a extração do embrião tanto para sementes recém colhidas como armazenadas. Esse tempo de embebição propiciou a retirada do embrião, sem que houvesse danos causados pelo bisturi, diminuindo também o tempo de extração, pela maior facilidade de execução.

O método de extração do pergaminho com hipoclorito de sódio não foi eficiente para remover totalmente o pergaminho, além de promover efeitos negativos na viabilidade de sementes, quando estas estavam com teores de água inferiores a 25%, não sendo, portanto, recomendado para retirada do pergaminho na realização do teste de tetrazólio em sementes de café.

6 CONCLUSÃO

O uso do hipoclorito de sódio na concentração de 5% por 6 horas de embebição não é eficiente para a retirada do pergaminho e afeta negativamente os resultados do teste de tetrazólio em semente de café com umidade abaixo de 25%.

O período de embebição de sementes de café por 48 horas na fase de preparo, para a realização do teste de tetrazólio, facilita a extração dos embriões, não afetando os resultados do teste.

O teste de tetrazólio em sementes de café com diferentes níveis de umidade e deterioração deve ser realizado com a retirada manual do pergaminho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H.V.; CRUZ, A.R.; DIAS, R.M.; GUTIERREZ, L.K.; TEIXEIRA, A.A.; MELLO, M.; OLIVEIRA, G.D. de. Transformações químicas e estruturais durante a deterioração da qualidade do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1977. p.15-18.

ARAÚJO, E.F.; REIS, L.S.; MEIRELES, R.C.; SERRANO, L.A.L. Efeito da danificação mecânica e da remoção manual do pergaminho sobre a emergência das plântulas de *Coffea arábica* L. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v.8, p.1-5, jun. 2004. Edição especial.

BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes: café. **Bragantia**, Campinas, v.17, n.20, p.261-270, 1958.

BARBOZA, R.; HERRERA, J. El vigor en la semilla de café y su relación con la temperatura de secado, el contenido de humedad y las condiciones de almacenamiento. **Agronomia Costarricense**, San José, v.14, n.1, p.1-8, 1990.

BARCELOS, A.F.; PAIVA, P.C. de A.; PEREZ, J.R.O.; SANTOS, V.B.; CARDOSO, R.M. Parâmetros bromatológicos da casca e polpa desidratada de café (*coffea arabica* l.) armazenadas em diferentes períodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.4, p.780-790, jul./ago. 2002.

BASU, R.N. Seed viability. In: BASRA, A.S. **Seed quality**: basic mechanisms and agricultural implications. New York: The Haworth, 1995. p.1-42.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**: viability, dormancy and environmental control. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 375p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York: Plenum, 1994. 445p.

BRACCINI, A.L.; REIS, M.S.; SEDIYAMA, C.S.; SCAPIM, C.A.; BRACCINI, M.C.L. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, após o processo de hidratação-desidratação e envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.1053-1066, jun. 1999.

BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; LANA, M.C.; ALBRECHT, L.P.; BARRETO, R.R.; RODOVALHO, M.A. Produtividade de grãos e qualidade de sementes de café em resposta à densidade populacional. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.55, n.6, p.489-496, nov./dez. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

CARVALHO, M.L.M. **Tetrazólio em sementes de café** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <m1aenemc@gmail.com> em 8 jul. 2009.

CARVALHO, M.M. de; ALVARENGA, G. Determinação do estágio de desenvolvimento mínimo do fruto do cafeeiro (*Coffea arabica* L.), para germinação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1979. p.118-119.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Segundo levantamento de café 2009**: maio 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2cafe_09.pdf>. Acesso em: 30 maio 2009.

COSTA, P. de S.C. **Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. 2003. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CUSTÓDIO, C.C.; MARCOS-FILHO, J. Potassium leachate test for the evaluation of soybean seed physiological quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.25, n.3, p.549-563, Sept. 1997.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.

DIAS, D.C.F.S.; MARCOS-FILHO, J.; CARMELO, Q.A.C. Teste de lixiviação de potássio para avaliação do vigor de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.3, p.444-451, set./dez. 1995.

DIAS, M.C.L.L.; SILVA, W.R. Determinação da viabilidade de sementes de café através do teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.11, p.1139-1145, nov. 1986.

EIRA, M.T.S. da. **Estudos biofísicos da tolerância a desidratação e baixa temperatura em sementes e embriões de *coffea* spp.** 1999. 123f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, n.230, p.1167-1174, Sept. 1990.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; BARBIN, E.L.; SPANÓ, J.C.E.; MARCHESAN, M.A.; PÉCORA, J.D. Mecanismo de ação do hipoclorito de sódio. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.13, n.2, p.113-117, maio/ago. 2002.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FESSEL, S.A.; VIEIRA, R.D.; CRUZ, M.C.P.; PAULA, R.C.; PANOBIANCO, M. Electrical conductivity testing of corn seeds as influenced by temperature and period of storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p.1551-1559, out. 2006.

FIGUEIREDO, T.G. **Adaptação do teste rápido (pH do exsudato - fenoltaleína), para estimar a viabilidade de sementes de cafeeiro (*Coffea arabi* L.).** 2000. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

GUIMARÃES, R.J. **Formação de mudas de cafeeiro: (*Coffea arabida* L.):** efeitos de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e do uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas. 1995. 133f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HISE, R. Chlorination. In: DENCE, C.W.; REEVE, D.W. **Pulpe bleaching:** principles and practice. Atlanta: Tapi, 1996. chap.2, p.241-259.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: IPGRI, 1996. 62p. (IPGRI Technical Bulletin, 1).

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 388**, de 22 de maio de 2000. Dispõe sobre normas e padrões para a produção de sementes básicas e fiscalizadas de café. Belo Horizonte, 2000. Disponível em: <http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias_pdf/0388.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2009.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING. **International rules for seed testing**. Zurich, 2007. 180p.

KRYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

LIMA, J.S. **Efeito da reidratação do hipoclorito de sódio na germinação de sementes e emergência de plântulas de cafeeiro**. 2008. 68p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MATIELLO, J.B. **O café: do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991. 39p.

MEIRELES, R.C.; ARAUJO, E.F.; REIS, M.S.; SEDIYAMA, C.S.; SAKIYAMA, N.S.; REIS, L.S. Secafé: metodologia para acelerar a germinação das sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.29, n.3, p.90-96, jul./set. 2007.

MIRANDA, J.M. **Estudo de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. *Catuai*)**. 1987. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

PEREIRA, C.E.; PINHO, E.V.R.V.; OLIVEIRA, D.F.; KIKUTI, A.L.P. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.24, n.1, p.306-311, jan./mar. 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R, a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

RIBEIRO FILHO, E. **Degradabilidade in situ da matéria seca, proteína bruta e da fibra em detergente neutro da casca de café e desempenho de novilhos mestiços em fase de recria**. 1998. 55p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Ruminantes)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.3, p.499-514, Oct. 1973.

SILVA, W.R.; DIAS, M.C.L. de L. Interferência do teor de umidade das sementes de café na manutenção de sua qualidade fisiológica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.20, n.5, p.551-560, maio 1985.

SIMON, E.W. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytologist**, London, v.73, n.3, p.377-420, Mar. 1974.

SOFIATTI, V.; ARAUJO, E.F.; ARAUJO, R.F.; CARGNIN, A.; REIS, M.S.; SILVA, L.V.B.D. Uso de hipoclorito de sódio para acelerar a emergência das plântulas e o desenvolvimento das mudas de cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.1, p.233-240, jan./abr. 2009.

SOTO, F.; ECHEVARRIA, I.; RODRIGUEZ, P. Estudio sobre la conservacion de semillas de cafetos (*Coffea Arabica* L. variedad Caturra). **Cultivos Tropicales**, Havana, v.16, n.1, p.33-36, 1995.

TEIXEIRA, M.N.M. **Determinação da degradabilidade “in situ” das diferentes frações da casca de três cultivares de café (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 44p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Ruminantes)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, n.100, p.983-991, 1976.

VASCONCELOS, L.M.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Efeito de processos de secagem, diferentes graus de umidade e tipos de embalagens na conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.2, p.181-188, mar./abr. 1992.

VEIGA, A.D. **Armazenabilidade de sementes de cafeeiro em diferentes estágios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VIEIRA, A.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; PEREIRA, C.E.; CARVALHO, F.E. Armazenamento de sementes de cafeeiro: ambientes e métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.1, p.76-82, jan./fev. 2007.

VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; PINHO, E.V.R.; GUIMARÃES, R.J.; OLIVEIRA, J.A. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34p. (Boletim Agropecuário, 26).

ANEXOS

ANEXO A	Página
FIGURA 1A	Temperatura e umidade relativa do ar ao longo de seis meses de armazenamento em condições não controladas na UBS da UFLA 40
TABELA 1A	Resumo das análises de variância da variável tetrazólio (%) para as cultivares Mundo Novo 376-4, Topázio MG1190, Catuaí IAC-99, Catuaí Vermelho IAC 144, Acaiá IAC 479-19, segundo os tratamentos estudados no ensaio com sementes de café..... 41
TABELA 2A	Resumo das análises de variância da variável germinação (%) para as cultivares Mundo Novo 376-4, Topázio MG1190, Catuaí IAC-99, Catuaí Vermelho IAC 144 e Acaiá IAC 479-19 para ensaios com lotes em sementes de café..... 42
TABELA 3A	Coefficientes do preditor linear para as porcentagens de germinação versus viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (TZ) utilizando duas metodologias de remoção do pergaminho (manual e hipoclorito de sódio) em função do tempo de armazenamento através da ligação logística..... 43
TABELA 4A	Análise de deviance para comparação entre o teste de germinação e 4 metodologias do teste de tetrazólio (extração do pergaminho manualmente e com hipoclorito de sódio) em 5 cultivares de cafeeiro..... 44
TABELA 5A	Análise de deviance para comparação entre o teste de germinação e 2 metodologias do teste de tetrazólio (extração do pergaminho manualmente e com hipoclorito de sódio) ao longo do armazenamento.. 45

ANEXO B

ANEXO B	Página
FIGURA 1B	Embrião viável – cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e ponto de translocação coloridos pelo sal de tetrazólio (A). Detalhe do corte indicando tecidos condutores coloridos (B). 46
FIGURA 2B	Embriões viáveis com pequenos danos na região da radícula causados durante a sua extração (A, B). Embrião viável com menos de 50% da área cotiledonar afetada (C). 46
FIGURA 3B	Embriões de café inviáveis com danos no ponto de ligação entre os cotilédones e o eixo hipocótilo-radícula (A, B) e danos causados por hipoclorito de sódio (C). 47
FIGURA 4B	Embriões inviáveis com mais de 50% de sua reserva comprometida, danos no eixo hipocótilo-radícula (A); totalmente descolorido (B) e exemplo de poliembrionia. 47
FIGURA 5B	Embriões inviáveis com a visualização de danos na parte externa (A e D), corte longitudinal (B) e interna após o corte (C e E). 48
FIGURA 6B	Plântulas normais de café aos 30 dias após semeadura em papel, na realização do teste de germinação. 48
FIGURA 7B	Plântulas anormais de café com raiz primária deficiente ou ausente e hipocótilo pouco desenvolvido (curto e grosso). 49

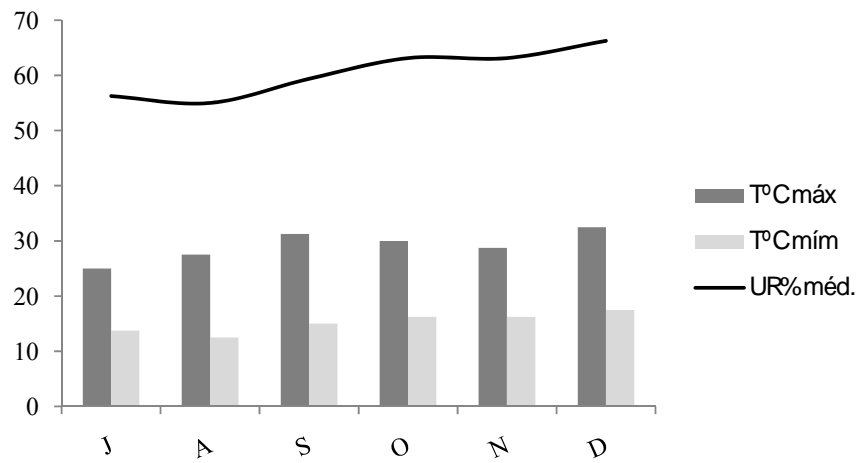


FIGURA 1A Temperatura e umidade relativa do ar ao longo de seis meses de armazenamento em condições não controladas na UBS da UFLA.

TABELA 1A Resumo das análises de variância da variável tetrazólio (%) para as sementes de café, das cultivares Mundo Novo 376-4, Topázio MG1190, Catuaí IAC-99, Catuaí Vermelho IAC 144, Acaíá IAC 479-19.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio				
		Mundo Novo 376-4	Topázio MG1190	Catuaí IAC-99	Catuaí Vermelho IAC 144	Acaíá IAC 479-19
Lote (L)	3	444,5625(p<0,0001)*	37,1406 (p<0,0001)*	267.3958(p<0,0001)*	80.5625 (p<0,0001)*	195.640625 p<0,0001)*
Método de extração (M)	1	150,0625 (p<0,0001)*	192,5156(p<0,0001)*	315.0625(p<0,0001)*	410.0625 (p<0,0001)*	112.890625 p<0,0001)*
Tempo de embebição (T)	1	162,5625 (p<0,0001)*	19,1406 (p:0,0028)*	0.5625 (p: 0.6978)	95.0625 (p<0,0001)*	54.390625 (p:0.0004)*
L x M	3	20,7291 (p:0.0004)*	10,8489 (p:0,0021)*	34.7291 (p<0,0001)*	4.7291 (p:0.2615)	24.140625 (p:0.0009)*
L x T	3	46,2291 (p<0,0001)*	18,8906 (p<0,0001)*	21.2291 (p<0,0019)*	33.5700 (p<0,0001)*	15.807292 (p:0.0094)*
M x T	1	3,0625 (p:0.3019)	0,1406 (p:0,7978)	7.5625 (p: 0.1586)	4.0910 (p:0.0487)*	6.890625 (p:0.1789)
L x M x T	3	5,3958 (p:0.1391)	2,0572 (p:0,3705)	0.3330 (p: 0.8012)	0.2120 (p:0.8877)	1.973958 (p:0.6618)
Erro	48	2,8125	1,921875	3.687500	3.437500	3.703125
CV (%)		2,01	1.61	2.45	2.19	2.40

*Significativo pelo teste F no nível de 5% de probabilidade

TABELA 2A Resumo das análises de variância da variável germinação (%) para as sementes de café, das cultivares Mundo Novo 376-4, Topázio MG1190, Catuai IAC-99, Catuai Vermelho IAC 144 e Acaia IAC 479-19.

Fonte de Variação	Gl	Quadrado Médio (valor p)				
		Mundo Novo 376-4	Topázio MG1190	Catuai IAC-99	Catuai Vermelho IAC 144	Acaia IAC 479-19
Lote	3	434,2500*	52,416667*	85,5000*	57,5833*	21.4166
Erro	12	4,9167	8,71	7,4583	3,4166	7.1250
CV (%)		2,72	3,39	3,52	2,29	3.43

*Significativo pelo teste F no nível de 5% de probabilidade

TABELA 3A Coeficientes do preditor linear para as porcentagens de germinação *versus* viabilidade de sementes de café pelo teste de tetrazólio (TZ) utilizando duas metodologias de remoção do pergaminho (manual e hipoclorito de sódio) em função do tempo de armazenamento através da ligação logística.

Mundo Novo 376-4				
	Estimativa	Erro	Valor Z	Valor P
Germinação	8,75E-001	1,01E-001	8,688	< 0,0001*
TZ (Hipoclorito)	4,47E-001	9,23E-002	4,842	< 0,0001*
TZ(Manual)	6,86E-001	9,37E-002	7,321	< 0,0001*
Tempo	3,67E-003	2,71E-003	1,355	0,175
I(tempo^2)	-1,53E-004	1,77E-005	-8,622	< 0,0001*
Topázio MG1190				
Germinação	1,49E+000	1,62E-001	9,255	<0,0001*
TZ (Hipoclorito)	1,60E-001	2,33E-001	0,685	0,4934
TZ(Manual)	6,00E-001	2,52E-001	2,382	0,0172 *
Tempo	-8,98E-003	4,67E-003	-1,921	0,0547 .
I(tempo^2)	-4,54E-005	2,91E-005	-1,559	0,1189
TZ (Hipoclorito):tempo	-7,73E-003	6,78E-003	-1,141	0,2538
TZ (Manual):tempo	-1,05E-002	7,07E-003	-1,482	0,1383
TZ (Hipoclorito):I(tempo^2)	1,37E-005	4,27E-005	0,321	0,7479
TZ (Manual):I(tempo^2)	2,31E-005	4,36E-005	0,531	0,5957
Catuaí IAC-99				
Germinação	1,15E+000	1,50E-001	7,68	< 0,0001*
TZ (Hipoclorito)	-5,59E-003	2,11E-001	-0,026	0,9789
TZ(Manual)	2,98E-001	2,19E-001	1,36	0,17377
Tempo	8,18E-003	4,56E-003	1,793	0,07302
I(tempo^2)	-1,59E-004	2,94E-005	-5,417	< 0,0001*
TZ (Hipoclorito):tempo	-1,72E-002	6,63E-003	-2,586	0,00972
TZ (Manual):tempo	-1,61E-002	6,63E-003	-2,429	0,01515
TZ (Hipoclorito):I(tempo^2)	5,83E-005	4,46E-005	1,308	0,19084
TZ (Manual):I(tempo^2)	6,82E-005	4,30E-005	1,584	0,11325
Catuaí Vermelho IAC 144				
Germinação	1,79E+000	1,53E-001	11,715	< 0,0001*
TZ (Hipoclorito)	3,45E-001	1,99E-001	1,739	0,081997
TZ(Manual)	9,84E-001	2,22E-001	4,434	< 0,0001*
Tempo	-8,55E-003	3,34E-003	-2,561	0,01044
I(tempo^2)	-7,49E-005	1,96E-005	-3,823	0,000132
TZ (Hipoclorito):tempo	-6,94E-003	2,13E-003	-3,265	0,001093
TZ (Manual):tempo	-7,31E-003	2,22E-003	-3,29	0,001003
Acaia IAC 479-19				
Germinação	1,30E+000	1,37E-001	9,529	< 0,0001*
TZ (Hipoclorito)	1,90E-001	1,79E-001	1,06	0,289111
TZ (Manual)	4,48E-001	1,85E-001	2,426	0,015254
Tempo	1,42E-004	3,17E-003	0,045	0,964161
I(tempo^2)	-1,45E-004	1,98E-005	-7,338	< 0,0001*
TZ (Hipoclorito):tempo	-7,45E-003	2,18E-003	-3,411	0,000647
TZ (Manual):tempo	-5,05E-003	2,12E-003	-2,38	0,017307

*significativo pelo teste t (5%)

As equações são dadas pelos seguintes modelos:

$$y(\text{germinação}): \frac{e^{(\text{germinação} + \text{tempo} + \text{tempo}^2)}}{1 + e^{(\text{germinação} + \text{tempo} + \text{tempo}^2)}}$$

$$y(\text{TZ (Hipoclorito)}): \frac{e^{((\text{germinação} + \text{TZ (Hipoclorito)}) + (\text{tempo} + \text{TZ (Hipoclorito)} \cdot \text{tempo}) + \text{tempo}^2)}}}{1 + e^{((\text{germinação} + \text{TZ (Hipoclorito)}) + (\text{tempo} + \text{TZ (Hipoclorito)} \cdot \text{tempo}) + \text{tempo}^2)}}$$

$$y(\text{TZ (Manual)}): \frac{e^{((\text{germinação} + \text{TZ (manual)}) + (\text{tempo} + \text{TZ (manual)} \cdot \text{tempo}) + \text{tempo}^2)}}}{1 + e^{((\text{germinação} + \text{TZ (manual)}) + (\text{tempo} + \text{TZ (manual)} \cdot \text{tempo}) + \text{tempo}^2)}}$$

TABELA 4A Análise de deviances para comparação entre o teste de germinação e 4 metodologias do teste de tetrazólio (extração do pergaminho manualmente e com hipoclorito de sódio) em 5 cultivares de cafeeiro.

Efeito	GL	Deviance	Valor P
Cultivar	4	121,396	< 0,0001*
Metodologia	4	51,785	< 0,0001*
Cultivar x Lote	15	140,05	< 0,0001*
Cultivar x metodologia	16	13,24	0,6607
Cultivar x lote x metodologia	60	55,57	0,64

*significativo pelo teste t (5%)

TABELA 5A Análise de deviance para comparação entre o teste de germinação e 2 metodologias do teste de tetrazólio (extração do pergaminho manualmente e com hipoclorito de sódio) ao longo do armazenamento.

Mundo Novo 376-4			
	GL	Deviance	Valor P
Método	2	44,89	< 0,0001*
Tempo	(5)	786,14	< 0,0001*
M x T	(10)	11,37	0,33
Linear	1	707,01	< 0,0001*
Quadrático	1	75,66	< 0,0001*
Falta de ajuste	13	14,8366	0,3177
Topázio MG1190			
Método	2	12,84	< 0,0001*
Tempo	(5)	777,27	< 0,0001*
M x T	(10)	15,99	0,1
Linear	1	753,09	< 0,0001*
Quadrático	1	3,43	0,06
M x linear	2	14,19	< 0,0001*
M x quadrático	2	0,29	0,87
Falta de ajuste	9	22,2472	< 0,0001*
Catuaí IAC-99			
Método	2	60,64	< 0,0001*
Tempo	(5)	838,87	< 0,0001*
M x T	(10)	29,62	< 0,0001*
Linear	1	766,33	< 0,0001*
Quadrático	1	38,47	< 0,0001*
M x linear	2	20,2	< 0,0001*
M x quadrático	2	2,95	0,23
Falta de ajuste	9	40,543	< 0,0001*
Catuaí Vermelho IAC 144			
Método	2	24,94	< 0,0001*
Tempo	(5)	1039,3	< 0,0001*
M x T	(10)	19,86	0,03*
Linear	1	1017,88	< 0,0001*
Quadrático	1	15,55	< 0,0001*
M x Linear	2	14,91	< 0,0001*
Falta de ajuste	11	10,8176	0,4587
Acaí IAC 479-19			
Método	2	14,32	< 0,0001*
Tempo	(5)	1146,41	< 0,0001*
M x T	(10)	17,21	0,07
Linear	1	1089,32	< 0,0001*
Quadrático	1	53,11	< 0,0001*
M x Linear	2	12,52	< 0,0001*
Falta de ajuste	11	8,6589	0,6533

*significativo pelo teste t (5%)

Critérios de avaliação do teste de tetrazólio e germinação em sementes de café

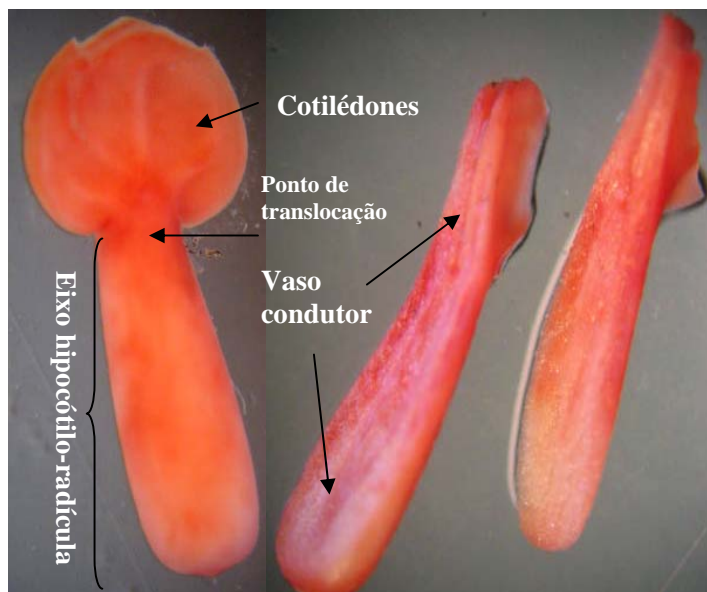


FIGURA 1B Embrião viável – cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e ponto de translocação coloridos pelo sal de tetrazólio (A). Detalhe do corte indicando tecidos condutores coloridos (B).

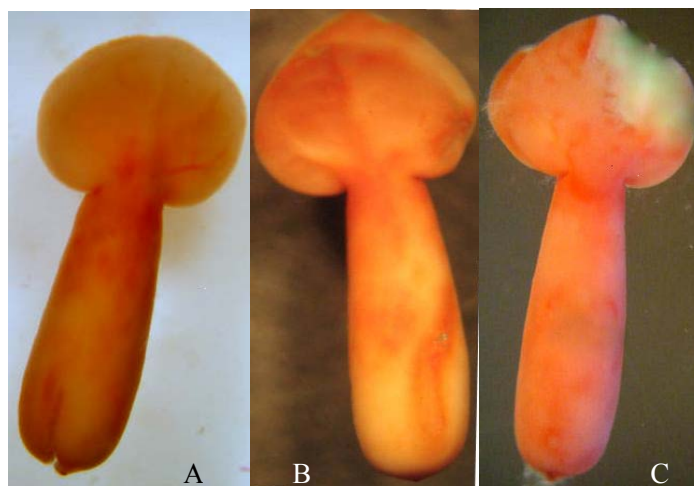


FIGURA 2B Embriões viáveis com pequenos danos na região da radícula causados durante a sua extração (A, B). Embrião viável com menos de 50% da área cotiledonar afetada (C).



FIGURA 3B Embriões de café inviáveis com danos no ponto de ligação entre os cotilédones e o eixo hipocótilo-radícula (A, B) e danos causados por hipoclorito de sódio (C).

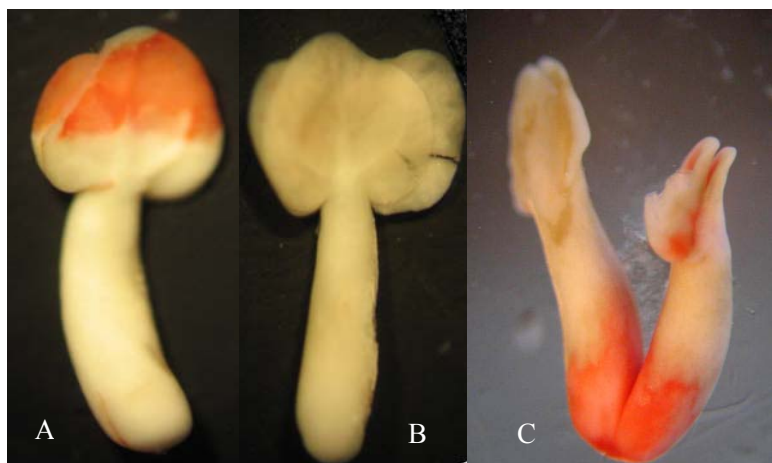


FIGURA 4B Embriões inviáveis com mais de 50% de sua reserva comprometida, danos no eixo hipocótilo-radícula (A); totalmente descolorido (B) e exemplo de poliembrionia.



FIGURA 5B Embriões inviáveis com a visualização de danos na parte externa (A e D), corte longitudinal (B) e interna após o corte (C e E).

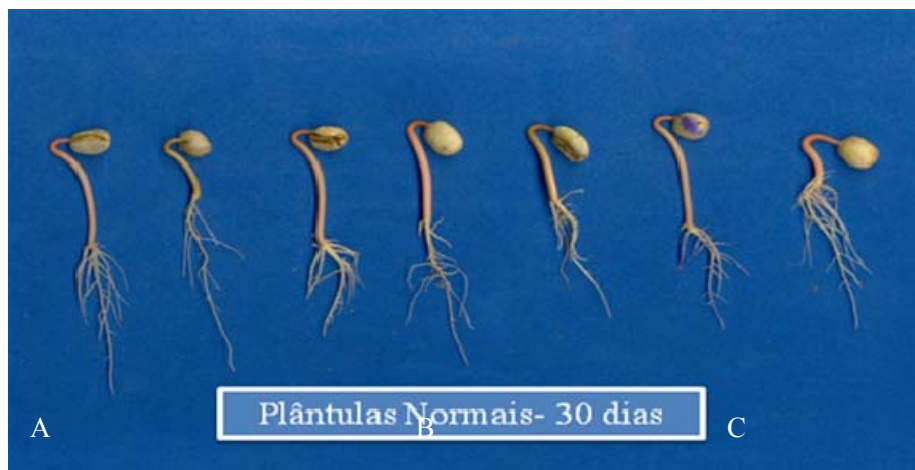


FIGURA 6B Plântulas normais de café aos 30 dias após semeadura em papel, na realização do teste de germinação.



FIGURA 7B Plântulas anormais de café com raiz primária deficiente ou ausente e hipocótilo pouco desenvolvido (curto e grosso).