

NOTA CIENTÍFICA

Imagens digitalizadas na interpretação do teste de tetrazólio em sementes de *Brachiaria brizantha*¹

Ceci Castilho Custódio², Rogério Lopes Damasceno²,
Nelson Barbosa Machado Neto^{2*}

RESUMO - As espécies forrageiras, principalmente dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*, desempenham importante papel nas regiões pecuárias e têm auxiliado o desenvolvimento da indústria de sementes no Brasil, o qual se transformou em maior produtor, consumidor e exportador de sementes de gramíneas forrageiras tropicais. O objetivo desse trabalho foi avaliar lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* 'Marandu' por meio do teste de tetrazólio conduzido mediante dois procedimentos. Foram utilizados 5 lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* 'Marandu' de origens diferentes, avaliados pelo teste de germinação, após escarificação ou não com ácido sulfúrico, e pelo teste de tetrazólio com duas formas de avaliação: método convencional, sob estereomicroscópio, e análise de imagens digitalizadas, obtidas de sementes agrupadas em placa de vidro de alta transparência, com definição de 1200 dpi. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. A avaliação de lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* 'Marandu', conduzida por meio do teste de tetrazólio, com observação das imagens digitalizadas das sementes é equivalente à efetuada sob estereomicroscópio.

Termos de indexação: germinação, brizantão, escaner de mesa, vitalidade.

Digitalized images in the interpretation of the *Brachiaria brizantha* tetrazolium test

ABSTRACT - Forage crops, especially the genera *Brachiaria* and *Panicum*, have assumed an increasing role in forage areas and promoted the development of the Brazilian forage seed industry, which has become the largest producer, consumer and exporter of tropical grass seeds. The objective of this study was to evaluate seed lots of *Brachiaria brizantha* 'Marandu' by two procedures to interpret the tetrazolium test. Five seed lots of *Brachiaria brizantha* 'Marandu' of different origins were used. Seeds were evaluated by germination, with and without treatment with concentrated sulphuric acid solution to overcome dormancy, and by the tetrazolium test using two evaluation procedures: conventional, under a stereomicroscope, and digitalized image analysis, obtained from seeds on a transparent glass plate, with images being captured at a 1200dpi resolution. The experimental design was completely randomized. Seed lot evaluation of *Brachiaria brizantha* 'Marandu', with the tetrazolium test using digitalized images was as effective as using a stereomicroscope.

Index terms: germination, brizantão, table scanner, vitality.

¹Submetido em 08/04/2011. Aceito para publicação em 01/08/2011.

²UNOESTE CAMPUS II, 19067-175 - Presidente Prudente, SP, Brasil.

*Autor para correspondência <nbnmneto@unoeste.br>

Introdução

As áreas dedicadas à pecuária ocupam 210 milhões de hectares ou 20% do território nacional contra apenas 10% das áreas agrícolas. No Estado de São Paulo a área ocupada com pastagens representa 39,37% do total (6,5% das áreas de pastagens do país, sétima posição no ranking nacional, IBGE 2006), sendo que desta, 89% é cultivada com gramíneas do gênero *Brachiaria* (Lupa, 2008). As espécies deste gênero são extremamente importantes para as regiões pecuárias, principalmente devido às seguintes características: adaptam-se a vários tipos de solos, em particular aos de baixa fertilidade, possuem elevado valor nutritivo, produção de massa seca, poucos problemas fitopatológicos e crescimento vigoroso durante a maior parte do ano, inclusive no período seco (Botrel et al., 1998; Costa et al., 2005).

O crescente uso de gramíneas forrageiras e a eficiência dos produtores de sementes resultou no desenvolvimento da indústria de sementes de forrageiras tropicais no Brasil, que se transformou em maior produtor, consumidor e exportador destas sementes (Silva Filho, 2009), sendo que *Brachiaria* e *Panicum* dominam o comércio nos mercados interno e externos (França-Neto, 2009).

Para a formação de pastagens há necessidade da utilização de sementes de alto poder de germinação. Contudo, as sementes de *B. brizantha* apresentam desuniformidade na maturação, degrana e dormência, cujas causas não estão totalmente elucidadas. Esse último fenômeno fisiológico prejudica a formação de populações uniformes, favorecendo o aparecimento de plantas invasoras (Martins e Silva, 2003).

Sementes não dormentes germinam prontamente quando colocadas em condições ideais de ambiente (Zaidan e Barbedo, 2004; Marcos Filho, 2005). Contudo, quando estas não germinam, são consideradas dormentes, mortas ou não viáveis (Carvalho e Nakagawa, 2000; Borghetti, 2004; Perez, 2004; Zaidan e Barbedo, 2004; Bradford, 2005), sendo a dormência provocada por várias causas (Koornneef et al., 2002) sofrendo influência ambiental no decorrer do desenvolvimento da semente (Baskin e Baskin, 2004).

O emprego de testes rápidos é uma ferramenta importante para composição de programas de controle de qualidade de sementes. Existe demanda por testes rápidos que proporcionem agilidade e segurança para comercialização ou armazenamento de sementes de espécies que exigem períodos relativamente longos para completar os testes de germinação (McDonald, 1998;

Marcos Filho, 2005; Custódio, 2005). A indicação das Regras para Análise de Sementes é de, até, 21 dias para complementação do teste de germinação de *Brachiaria brizantha* (Brasil, 2009). O teste de germinação consiste na determinação do potencial máximo de germinação, por ser realizado em condições ótimas de laboratório, podendo ser usado para se comparar o desempenho de diferentes lotes e estimar o valor para semeadura em campo (Brasil, 2009).

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases em células vivas, catalisando a redução do sal de tetrazólio (2-3-5 trifenil cloreto de tetrazólio) de uma solução incolor, a um precipitado vermelho, insolúvel, conhecido por formazan, tornando possível identificar a condição funcional das partes vitais das sementes examinadas (Deswal e Chand, 1997; Piña-Rodrigues et al., 2004).

É um teste utilizado rotineiramente por empresas produtoras de sementes forrageiras, mas a metodologia utilizada em cada laboratório pode variar. Alguns trabalhos de pesquisa têm sido conduzidos com a finalidade de aprimorar os procedimentos para a execução variando a concentração do sal, período e temperatura de embebição e de coloração (Dias e Alves, 2008) ou, além desses objetivos, a redução do tempo total para obtenção dos resultados (Novembre et al., 2006), sem perda da eficácia.

Todavia, para observação de espécies que produzem sementes relativamente pequenas, como as forrageiras, é necessário o auxílio de estereó microscópio para facilitar a visualização. O uso de imagens digitalizadas é uma alternativa que pode permitir a ampliação, o acesso rápido e o arquivamento da informação obtida para uso posterior (Geneve e Kester 2001; McDonald et al., 2001; Dell'Aquila, 2004; Dell'Aquila, 2007; Hosomi et al., 2011). Estudos que investiguem a possibilidade de avaliação do teste de tetrazólio por meio de imagens digitalizadas são altamente desejáveis, pois, as simples possibilidades de ampliação e armazenamento das imagens constituem-se em ferramentas valiosas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* 'Marandu' por meio do teste de tetrazólio conduzido convencionalmente, com observação das sementes por estereó microscópio, e através de uma nova proposta, cuja análise é efetuada por uso das imagens digitalizadas das sementes.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no laboratório de análise de sementes da UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista, em Presidente Prudente - SP. Foram utilizados cinco

lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* 'Marandu' de origens diferentes. O lote 1, com mais de um ano de idade, foi selecionado por apresentar baixa germinação. Os lotes 2 a 5 foram obtidos quatro meses após a colheita; todos foram colhidos pelo método mecanizado, com utilização da colhedora Prata 1000. A empresa Sementes Facholi forneceu as sementes, que permaneceram armazenadas na empresa em condições ambientais (armazém convencional, sem controle de temperatura e de umidade – temperatura máxima de 30 °C e mínima de 25 °C, com UR média anual 60%) até o início da pesquisa.

Retirou-se uma amostra de cada lote, que foi submetida à limpeza com a utilização de peneiras e soprador, complementada por separação manual, com auxílio de pinça, para eliminação do material inerte e de palhas obtendo-se amostras constituídas por sementes fisicamente puras (Brasil, 2009).

Germinação - teste conduzido mediante dois procedimentos, um com sementes não tratadas (GSE – germinação sem escarificação) e outro com sementes tratadas com ácido sulfúrico (GCE – germinação com escarificação) para superação de dormência; esse tratamento consistiu na imersão em ácido sulfúrico 98% durante 15 minutos (Brasil, 2009), seguida por lavagem em água corrente para se retirar o resíduo do ácido. O teste foi conduzido com quatro repetições de 100 sementes para cada tratamento, colocadas para germinar sobre duas folhas de papel mata-borrão (tipo Germibox) umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, no interior de caixas de plástico transparente (11 x 11 x 3,5 cm). Utilizou-se temperatura alternada 15 - 35 °C, com iluminação durante 8 horas, coincidindo com a temperatura mais alta. Os testes foram avaliados semanalmente, durante três semanas, computando-se as porcentagens de plântulas normais e sementes não germinadas ao final do teste (Brasil, 2009).

Teste de tetrazólio - foram avaliadas quatro repetições de 50 sementes para cada lote, pré-embebidas em água a 25 °C, por 16 horas; decorrido esse período, as sementes foram cortadas longitudinalmente com auxílio de pinça e bisturi, sendo utilizada apenas uma metade da semente para coloração. A metade utilizada foi colocada em placa de petri com papel filtro umedecido com solução de 0,1% de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio e mantidas no escuro, no interior de um equipamento para banho-maria, por 5 horas, a 40 °C. As sementes foram avaliadas considerando-se a localização e a intensidade

da coloração de suas partes, permitindo identificar duas categorias: sementes vivas e não vivas (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Avaliação do teste de tetrazólio - foram utilizados dois métodos de avaliação: análise pelo método convencional, sob estereó microscópio em aumento de 10 vezes (TZEM), e análise por imagem digitalizada (TZID). Para o método convencional as sementes foram examinadas individualmente após a coloração, com auxílio de um estereó microscópio, observando-se a coloração das partes vitais do embrião e classificando-as em vivas ou não. Para análise pela imagem digitalizada, as sementes de cada repetição, foram agrupadas com as partes planas (embrião visível, após o corte) voltada para a superfície de uma placa de vidro transparente, comumente utilizada para análises de eletroforese (100 x 80 x 1 mm, Hoefer 80-6136-81). Esta estrutura (placa+sementes) foi colocada sobre o vidro do escaner de mesa (Hp Scanjet G2410) e digitalizada com definição de 1200 pontos por polegada quadrada (dpi). Através da visualização da imagem com todas as sementes e/ou usando aumento da imagem na tela do computador e individualizando cada semente da amostra para observação, as sementes foram classificadas em vivas ou não, seguindo os mesmos critérios descritos para o método convencional. Os resultados de cada categoria identificada foram expressos em porcentagem média por lote.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso. Para a análise da variância, os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial, avaliando-se efeitos de lotes e escarificação (5x2) e de lotes e método de avaliação do teste de tetrazólio (5x2). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados de avaliação do teste de tetrazólio, pelos dois métodos, foram submetidos a análise de correlação linear simples com os dados do teste de germinação com e sem escarificação, obtendo-se coeficientes (r) e a significância da correlação pelo teste t , utilizando-se o software SANEST (Zonta et al., 1984).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1, observam-se diferenças entre a germinação de lotes tratados ou não com ácido sulfúrico (H_2SO_4), de modo que a germinação após a escarificação foi superior à verificada para as sementes não tratadas; assim, houve resposta positiva da escarificação ácida, com exceção para o lote 1, que não germinou.

Tabela 1. Avaliação de sementes de *Brachiaria brizantha*, através da análise dos testes de germinação e tetrazólio. GSE – germinação sem escarificação; GCE – germinação com escarificação; TZEM – tetrazólio, análise sob estéreo microscópio; TZID – tetrazólio, análise por imagem digitalizada.

Testes Lotes	Germinação		Tetrazólio	
	GSE	GCE	TZEM	TZID
L1	0 Ad*	0 Ac	0 Ac	0 Ad
L2	84 Bb	90 Aa	92 Aa	88 Abc
L3	91 Ba	94 Aa	97 Aa	96 Aa
L4	64 Bc	74 Ab	81 Ab	78 Ac
L5	85 Bb	91 Aa	94 Aa	91 Aab

* Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na linha, dentro de cada tipo de avaliação, e minúsculas iguais, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A remoção das glumas das sementes quer seja química, via escarificação ácida, ou mecanicamente, é tratamento eficiente na superação de dormência das sementes de capim-braquiária ‘Marandu’ (Meschede et al., 2004). O benefício do tratamento de sementes de *Brachiaria brizantha*, com ácido sulfúrico, tem sido verificado em vários estudos (Garcia e Cícero, 1992; Macedo et al., 1994; Martins e Lago, 1996; Gaspar-Oliveira et al., 2008), mesmo durante o armazenamento por seis meses (Sallum et al., 2010).

A diferença mais ampla entre os resultados do teste de germinação (64% sem escarificação) e de tetrazólio (81%, análise tradicional, sob estéreo microscópio), de 17 pontos percentuais, foi obtida para o lote 4, indicando que este lote apresentou uma quantidade considerável de sementes dormentes e que, mesmo usando ácido sulfúrico concentrado, ainda restaram sementes vivas que não germinaram.

As sementes de *Brachiaria brizantha* apresentam diversas causas de dormência, as quais podem ocorrer isoladas ou combinadas (Toledo et al., 1995), de modo que o tratamento com ácido sulfúrico pode não ser efetivo para remover a dormência de todas as sementes.

Os dados referentes ao teste de tetrazólio conduzido de maneira convencional, apresentaram correlação altamente significativa com os de germinação, sem e com escarificação (Figuras 1 e 2), com índices de, respectivamente, 0,9903 (Figura 1) e 0,9938 (Figura 2), para os dados de tetrazólio convencional x germinação de sementes não escarificadas e escarificadas. Da mesma forma, os dados do teste de tetrazólio, por imagem digitalizada, também apresentaram correlação positiva 0,9912 (Figura 1) e 0,9936 (Figura 2), respectivamente,

para sementes não escarificadas e para as escarificadas. A correlação significativa entre os dados do teste de tetrazólio, pelas duas formas de avaliação, e os da germinação com escarificação, pode ser explicada pela necessidade da escarificação para o teste de germinação em sementes de *Brachiaria brizantha*, que geralmente apresentam dormência; assim, existe tendência de variação mais próxima entre os dados de germinação com escarificação e o teste de tetrazólio que identifica sementes vivas, independentemente da dormência.

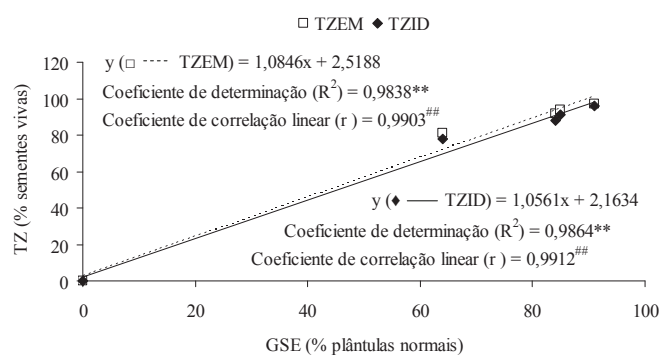


Figura 1. Correlação linear entre os resultados do teste de germinação sem escarificação (GSE) e teste de tetrazólio, análise sob estéreo microscópio (TZEM) e análise por imagem digitalizada (TZID). **Equação linear significativa pelo teste F ($P < 0,05$). ##Coeficiente de correlação linear significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

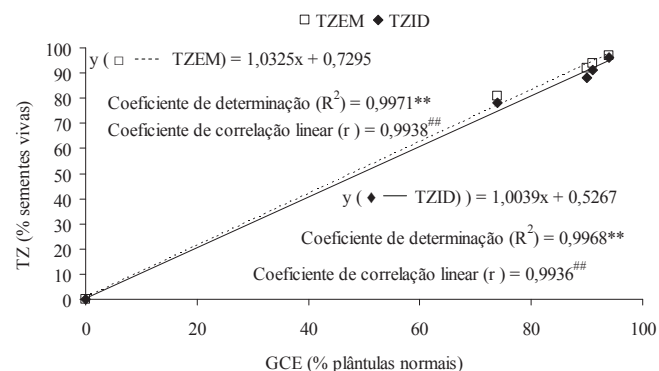


Figura 2. Correlação linear entre os resultados do teste de germinação com escarificação (GCE) e teste de tetrazólio, análise sob estéreo microscópio (TZEM) e análise por imagem digitalizada (TZID). ** Equação linear significativa pelo teste F ($P < 0,05$). ## Coeficiente de correlação linear significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

No teste de tetrazólio, pela avaliação das imagens digitalizadas (vide exemplo de uma repetição na Figura 3), os resultados obtidos, para os cinco lotes, foram semelhantes aos do teste interpretado sob estereó microscópio (Tabela 1), com diferença máxima de 4 pontos percentuais para um mesmo lote, ou seja, sem diferença estatística. Isto sugere a equivalência dos dois procedimentos utilizados nesta pesquisa para a interpretação do teste de tetrazólio. O lote 1, composto apenas por sementes inviáveis, permitiu a

observação da coloração e localização das partes não vivas do embrião vistas sob imagem digitalizada (Figuras 3 e 4). Este lote foi utilizado para avaliar se era realmente possível obterem-se imagens escaneadas, suficientemente nítidas, de sementes com restrita variação de cores, como tons de cinza e branco leitoso (tecidos não vivos do embrião). A interpretação das imagens indicou ser possível identificar o lote um como não vivo, bem como localizar sementes não vivas nos outros lotes (Figura 3).



Figura 3. Resultados de uma das repetições do teste de tetrazólio avaliado por imagem digitalizada (TZID) para os lotes de 1 a 5. As sementes do lote 1 apresentam-se todas não vivas. Setas brancas indicam embriões não vivos.

As vantagens observadas deste método são: todas as sementes de uma repetição podem ser visualizadas simultaneamente (Figura 3) ou em imagens ampliadas (Figura 4) e, inclusive, compararem-se repetições de lotes diferentes na mesma tela. Na imagem digitalizada, além da visualização individual e coletiva, existe a conveniência da documentação das imagens em arquivos digitais e da interpretação por mais de

um analista. Adicionalmente, devem ser captadas imagens suficientemente nítidas para permitir a visualização e interpretação segura da funcionalidade das partes vitais da semente; conseqüentemente há possibilidade da transmissão das imagens via rede mundial de computadores, a possibilidade de compartilhar a informação e facilitar a padronização de procedimentos.

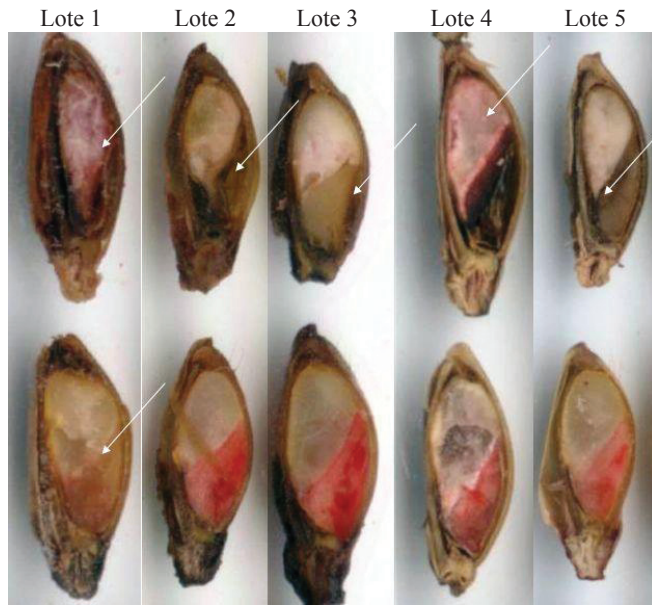


Figura 4. Resultados de ampliação das imagens digitalizadas (TZID) de algumas sementes para observação individualizada dos lotes 1 a 5. Setas brancas indicam embriões não vivos.

A interpretação do teste de tetrazólio, sob estéreo microscópio exige que as sementes sejam avaliadas individualmente, e a tomada de decisão deve ser efetuada no momento da leitura. Na literatura não há indicação sobre o armazenamento de sementes de forrageiras, logo após o desenvolvimento da coloração. Em outras espécies, como a soja, é recomendável que estas permaneçam submersas em água, por no máximo 12 h, em refrigerador, antes da interpretação, pois após este prazo a alteração da coloração dos tecidos pode comprometer a confiabilidade do teste (França-Neto et al., 1999). Além disso, o trabalho de análise é moroso, tedioso e requer experiência e paciência.

O avanço das pesquisas com imagens digitais tem permitido a apresentação de novas propostas para utilização desse conhecimento. Braga Júnior et al. (2001) propuseram uma linha de pesquisa para o desenvolvimento de um teste avaliar a viabilidade de sementes a partir da técnica do biospeckle, baseada no uso de raios laser e da captura das imagens deste por câmaras CCD (Nascimento et al., 2007). Essa técnica apresenta-se com potencial para a eliminação da subjetividade, redução de tempo de análise e automação do processo de avaliação da viabilidade de sementes.

Sementes de orquídeas estão entre as menores existentes na natureza (Arditti e Ghani, 2000). A análise e a estocagem das imagens digitalizadas de sementes de

duas espécies de *Cattleya*, tanto coloridas pelo tetrazólio, quanto germinadas em meio de cultura, foram eficientes, para avaliação da germinação e do teste de tetrazólio, ressaltando a vantagem da independência entre a tomada da imagem e a interpretação da mesma pelo analista (Hosomi et al., 2011).

Neste estudo verificou-se que a digitalização da imagem não afetou a interpretação do teste de tetrazólio pelo analista. A automação completa, no entanto, exigiria a interação de profissionais de tecnologia de sementes e de informática, para o desenvolvimento de um sistema de visão artificial onde um programa de computador deveria permitir o reconhecimento da imagem e sua interpretação.

Conclusões

A avaliação de lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* 'Marandu', conduzida por meio do teste de tetrazólio, com observação das imagens digitalizadas das sementes é equivalente à efetuada sob estéreo microscópio.

Referências

- ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytology*, v.145, p.367-421, 2000.
- BASKIN, M.J.; BASKIN, C.C. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, v.4, n.1, p.1-17, 2004. http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FSSR%2FSSR14_01%2FS0960258504000017a.pdf&code=4b1836fd301925bc90aeca20ceafeb1
- BORGHETTI, F. Dormência embrionária. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.109-125.
- BOTREL, M.A.; NOVAES, L.P.N.; ALVIM, M.J. Características forrageiras de algumas gramíneas tropicais. Juiz de Fora, MG: EMBRAPA – CNPGL, 1998. 35p.
- BRADFORD, K.J. Threshold models applied to seed germination ecology. *The New Phytologist*, v.165, n.2, p.338-341, 2005. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.01302.x/pdf>
- BRAGA JÚNIOR, R.A.; SOUZA, A.; VIEIRA, M.G.G.C.; RABAL, H.J.; VON PINHO, E.V.R.; DAL FABRO, I.M. Potencial do biospeckle laser para avaliação da viabilidade de sementes. *Ciência e Agrotecnologia*, v.25, n.3, p.645-649, 2001. http://www.editora.ufba.br/site/_adm/upload/revista/25-3-2001_20.pdf
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/

- ACS, 2009. 395p. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.
- COSTA, K.A.P.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I.P.; CUSTÓDIO, D.P.; SILVA, D.C. Efeito da estacionalidade na produção de matéria seca e composição bromatológica de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Ciência Animal Brasileira*, v.6, n.3, p.187-193, 2005. <http://h200137221174.ufg.br/bitstream/123456789/138/1/efeito%20da%20estacionalidade.pdf>
- CUSTÓDIO, C.C. Testes rápidos para avaliação do vigor de sementes: uma revisão. *Colloquium Agrariae*, v.1, n.1, p.29-41, 2005. http://www.sumarios.org/sites/default/files/pdfs/33511_4275.PDF
- DELL'AQUILA, A. Application of a computer-aided image analysis system to evaluate seed germination under different environmental conditions. *Italian Journal of Agronomy*, v.8, n.1, p.51-62, 2004.
- DELL'AQUILA, A. Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. *Seed Science and Technology*, v.35, n.3, p.519-538, 2007.
- DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) seeds. *Seed Science and Technology*, v.25, n. p.409-417, 1997.
- DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, v.30, n.3, p.145-151, 2008. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n3/19.pdf>
- FRANÇA-NETO, J.B. Evolução do conceito de qualidade de sementes. *Informativo ABRATES*, v.19, n.2, p.76-80, 2009.
- 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. *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999, p.8.5.1-8.5.28.
- GASPAR-OLIVEIRA, C.M.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Duração do teste de germinação de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. *Revista Brasileira de Sementes*, v.30, p.30-38, 2008. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n3/05.pdf>
- GARCIA, J.; CÍCERO, S.M. Superação da dormência em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Scientia Agricola*, v.49, n.1, p.9-13, 1992. <http://www.scielo.br/pdf/sa/v49nspe/02.pdf>
- GENEVE, R.L.; KESTER, S.T. Evaluation of seedling size following germination using computer Aided analysis of digital images from a flat bed scanner. *HortScience*, v.36, n.6, p.1117-1120, 2001. <http://hortsci.ashspublications.org/content/36/6/1117.full.pdf>
- HOSOMI, S.T., SANTOS, R.B., CUSTODIO, C.C., SEATON, P.T., MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, v.39, n.1, p.178-189, 2011.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo da Agropecuária 2006*. IBGE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, v.5, n.1, p.33-36, 2002.
- LUPA – Levantamento censitário das unidades de produção agropecuária do estado de São Paulo. Secretaria de Agricultura e Abastecimento, CATI/IEA 2007/08 –<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/dadosestado.php>
- MACEDO, E.C.; GROTH, D.; LAGO, A.A. Efeito de escarificação com ácido sulfúrico na germinação de sementes de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.19, n.2, p.165-171, 1994. http://webnotes.sct.embrapa.br/pdf/pab1994/marco/pab15_mar_94.pdf
- MARCOS-FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MARTINS, L.; LAGO, A.A. Germinação e viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.18, n.2, p.262-266, 1996.
- MARTINS, L.; SILVA, W.R. Efeitos imediatos e latentes de tratamento térmico e químico em sementes de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. *Bragantia*, v.62, n.1, p.81-88, 2003. <http://www.scielo.br/pdf/brag/v62n1/18504.pdf>
- McDONALD, M.B. Seed quality assessment. *Seed Science Research*, v.8, n.2, p.265-275, 1998.
- McDONALD, M.B.; EVANS, A.F.; BENNETT, M.A. Using Scanners to improve seed and seedling evaluations. *Seed Science and Technology*, v.29, n.3, p.683-689, 2001.
- MESCHEDÉ, D.K.; SALES, J.G.C.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; SCHUAB, S.R.P. Tratamentos para superação da dormência das sementes de capim braquiária cultivar Marandu. *Revista Brasileira de Sementes*, v.26, n.2, p.76-81, 2004. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v26n2/24492.pdf>
- NASCIMENTO, A.L.; COSTA JÚNIOR, A.T.; RABELO, G.F., BRAGA JÚNIOR, R.A. Desenvolvimento de um modelo para *biospeckle* na análise de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, p.456-461, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n2/a28v31n2.pdf>
- NOVEMBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P.; GOMES, R.B.R. Viabilidade das sementes de braquiária pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, v.28, n.2, p.147-151, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v28n2/a20v28n2.pdf>
- PEREZ, S.C.J.G.A. Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. 125-135p.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.; FIGLIOLIA, M.B.; PEIXOTO, M.C. Teste de qualidade. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Org.) *Germinação – do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.283- 297.

SALLUM, M.S.S.; ALVES, D.S.; AGOSTINI, E.A.T.; MACHADO-NETO, N.B. Neutralização da escarificação química sobre a germinação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. 'Marandu'. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.5, n.3, p.315-321, 2010. http://agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path%5B%5D=agraria_v5i3a603&path%5B%5D=748

SILVA FILHO, J.P. Qualidade de sementes de forrageiras. *Informativo ABRATES*, v.19, n.2, p.81-82, 2009.

TOLEDO, F.F.; CHAMMA, H.M.C.P.; NOVENBRE, A.D.L.C. Germinação de sementes de *Panicum maximum* Jacq. pré-tratadas com ácido sulfúrico. *Scientia Agricola*, v.52, p.20-24, 1995.

ZAIDAN, L.B.P.; BARBEDO, C.J. Quebra de dormência. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.135-146.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D.; SILVEIRA Jr., P. *Sistemas de análise estatística para microcomputadores – SANEST*. Pelotas: UFPel, 1984. (Registro SEI n.º 06606-0, Categoria AO).