



ARTIGO ORIGINAL

Márcia Green^{1*}
Wanderlei Antônio Alves de Lima²
Antenor Francisco de Figueiredo³
Regina Caetano Quisen⁴
Ricardo Lopes⁴

Teste de tetrazólio em embriões de sementes de dendezeiro

Test tetrazolium in oil palm seed embryos

¹ Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Programa de Pós-graduação em Agronomia Tropical, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I, 69070-000, Manaus, AM, Brasil

² Embrapa Cerrados, Rodovia BR-020, km 18, Caixa Postal 08223, 73310-970, Planaltina, DF, Brasil

³ Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Endereço, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I, 69070-000, Manaus, AM, Brasil

⁴ Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 010, km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM, Brasil

*Autor Correspondente:
mgreen_37@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE

Palma de óleo
Elaeis guineensis
Qualidade fisiológica
2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio

KEYWORDS

Palm oil
Elaeis guineensis
Physiological quality
2, 3, 5 triphenyl tetrazolium chloride

RESUMO: O teste de tetrazólio (TZ) em dendezeiro pode ser uma ferramenta útil para verificar o vigor e viabilidade das sementes. O objetivo foi determinar procedimentos para uso do TZ na análise de vigor e viabilidade de embriões e da aplicação deste na avaliação do potencial de germinação das sementes de dendezeiro. Foi realizado experimento fatorial no delineamento inteiramente casualizado com combinação de três temperaturas na hidratação em água (30, 35 e 40 °C), três temperaturas de exposição em solução de tetrazólio (30, 35 e 40 °C) e três concentrações do sal (0,075, 0,1 e 0,5%) e determinadas classes de vigor e viabilidade dos embriões. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias. Para avaliar a relação entre TZ e germinação das sementes, oito lotes comerciais foram submetidos ao TZ e teste de germinação e os dados submetidos à análise de correlação. Houve efeito significativo da temperatura na hidratação dos embriões em água e da interação entre as temperaturas na hidratação em água e em solução de tetrazólio. Os melhores resultados foram obtidos com o pré-condicionamento dos embriões em água (overnight) a 35 °C e exposição em solução de tetrazólio a 0,075% por quatro horas a 40 °C. Alta correlação (0,907) e valores próximos foram observados entre a viabilidade dos embriões pelo TZ e a germinação das sementes. O TZ nas condições otimizadas é eficiente na análise do vigor e viabilidade dos embriões e pode ser utilizado para avaliar o potencial de germinação das sementes de dendezeiro.

ABSTRACT: The tetrazolium test (TZ) in seeds of oil palm can be a useful tool for diagnosing the vigour and viability of these seeds. The objective was to determine procedures for use of the tetrazolium test in the analysis of vigour and viability of oil palm seed embryos and the application of this evaluating the potential of seed germination of oil palm. The experiment was conducted completely randomized with a combination of three temperatures in the water hydration (30, 35 and 40 °C) three exposure temperatures in tetrazolium solution (30, 35 and 40 °C) and three sal concentrations (0.075, 0.1 to 0.5%) and determination of vigour classes and viability of the embryos. Data were submitted to analysis of variance and mean test. To evaluate the relationship between the TZ and seed germination, eight commercial lots were submitted to TZ and germination test data submitted to the correlation analysis. There was a significant effect of temperature on hydration of embryos in water and the interaction between the temperatures hydration in water and tetrazolium solution. The best results were obtained with pre-conditioning of water (overnight) at 35 °C and embryos exposure tetrazolium 0.075% solution for four hours at 40 °C. High correlation (0.907) and values close were observed between the viability of embryos by TZ and seed germination. TZ in optimized conditions is effective in analyzing the strength and viability of embryos and can be used to evaluate the germination potential of seeds oil palm.

1 Introdução

O teste de tetrazólio (TZ) tem como objetivos determinar o vigor e viabilidade de sementes, individualmente ou em lotes, particularmente, daquelas que apresentam dormência, recalcitrância e as que germinam lentamente em testes de rotina (Brasil, 2009). O teste pode ser realizado antes da germinação para verificação da qualidade das sementes e do potencial de germinação ou após, por exemplo, quando a germinação foi abaixo do esperado e é necessário identificar se as sementes ainda estão viáveis. Também é possível pelo TZ o diagnóstico das possíveis causas da redução da qualidade fisiológica das sementes, como danos mecânicos ou ocasionados por secagem, armazenamento, ataque de insetos e deterioração por umidade.

A eficiência do TZ em avaliar o vigor e a viabilidade das sementes depende do desenvolvimento do método adaptado para cada espécie, de modo a definir as condições apropriadas para a hidratação, o preparo, concentração da solução de tetrazólio, tempo e temperatura de condicionamento e avaliação adequada da coloração das estruturas avaliadas (Delouche et al., 1976; Oliveira et al., 2005; Pinto et al., 2008).

A aplicação do TZ em palmeiras (Arecaceae) ainda está restrita a poucas espécies como pupunheira (Ferreira & Sader, 1987), buritizeiro (Spera et al., 2001), macaúba (Ribeiro et al., 2010) e dendezeiro (Mok, 1972; Vargas, 1996; Murugesan et al., 2002; Villa et al., 2007; Fondom et al., 2010). Nas Regras de Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009), o teste de tetrazólio somente é descrito para um gênero de palmeira, a *Koelreuteria* spp., não existindo desta forma procedimentos oficiais estabelecidos para as espécies dos demais gêneros, incluindo o *Elaeis* spp., ao qual pertencem o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Não existe recomendação padrão para aplicação do teste nas palmeiras, por exemplo, na avaliação da viabilidade das sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart.) pelo teste do tetrazólio nos embriões, Ribeiro et al. (2010) verificaram que não há necessidade de pré-condicionar os embriões em água antes da exposição na solução de tetrazólio, já para palmeiras do gênero *Koelreuteria* spp., é recomendado o pré-condicionamento pela imersão dos embriões em água durante 18 horas na temperatura de 20 °C (Brasil, 2009).

Embora exista estudo da década de 1970 indicando ser útil o teste de tetrazólio para análise da viabilidade de sementes de dendezeiro (Mok, 1972), é necessário definir as melhores condições de aplicação do teste para estabelecer procedimento padrão para sua aplicação na análise do vigor e viabilidade dos embriões da espécie.

O objetivo desse estudo foi determinar procedimentos para uso do teste de tetrazólio na análise de vigor e viabilidade de embriões e da aplicação deste na avaliação do potencial de germinação das sementes de dendezeiro.

2 Material e Métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Dendê e Agroenergia da Embrapa Amazônia Ocidental, situado no km 29 da Rodovia AM 010, latitude 2°53'23.44" S, longitude 59°58'57.30" W, em Manaus, AM, no período de 2011 a 2012. Foram utilizadas sementes de frutos de cachos colhidos em estádio uniforme de maturação, oriundos de polinizações controladas de inflorescências

femininas de matrizes tipo Dura da origem Deli com pólen de genitores pisífera da origem La Mé.

O beneficiamento dos cachos para obtenção das sementes foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Lima et al. (2013). Para retirada dos embriões, o endocarpo das sementes foi quebrado por pressão mecânica e retirada a amêndoa. Os embriões foram extraídos da amêndoa manualmente com auxílio de pinça.

Para definir as condições adequadas de aplicação do TZ, na avaliação do vigor e viabilidade dos embriões de dendezeiro foi conduzido um experimento fatorial 3 x 3 x 3, composto de três temperaturas durante a hidratação dos embriões em água, três temperaturas durante a exposição dos embriões em solução de tetrazólio e três concentrações do sal de tetrazólio na solução. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com duas repetições e 25 embriões por parcela. Para hidratação dos embriões, estes foram depositados sobre papel germitest umedecido em água, em placas de petri e deixados overnight (12 a 16 horas) em câmara BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C. Após a hidratação os embriões foram imersos em solução de tetrazólio nas concentrações de 0,075, 0,1 e 0,5%, e colocados em câmara BOD nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C, por quatro horas.

Para a descrição dos níveis de vigor e viabilidade dos embriões foi realizada avaliação individual utilizando lupa estereoscópica, considerando ocorrência, intensidade e homogeneidade da coloração das estruturas do embrião ilustradas na Figura 1. De acordo com a coloração do tigel e do haustório as sementes foram divididas em classes de vigor e viabilidade: Classe 1: sementes viáveis e de alto vigor; Classe 2: sementes viáveis e de médio vigor; Classe 3: sementes viáveis e de baixo vigor e Classe 4: sementes não viáveis. Determinou-se a porcentagem de sementes em cada classe, calculando em seguida, o nível de vigor e viabilidade (Classes 1 a 3). Para análise estatística foram utilizadas as médias das parcelas (25 embriões) e os resultados submetidos à análise de variância e comparação das médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do software ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2002).

Para verificar a relação entre os resultados do TZ e a germinação das sementes, após definidas as condições adequadas para aplicação do TZ, oito lotes de sementes comerciais de cultivares tenera provenientes de cachos de diferentes plantas foram analisados para determinação do vigor e viabilidade dos embriões e as sementes submetidas ao procedimento de germinação padrão (Lima et al., 2013). De cada lote foi retirada uma amostra de 25 embriões para o teste do tetrazólio e de 400 sementes para análise da germinação. Para o teste do tetrazólio os embriões foram hidratados em água (overnight) à temperatura de 35 °C e, posteriormente, imersos em solução de tetrazólio na concentração de 0,075% a 40 °C por quatro horas. Na avaliação da germinação das sementes a contagem de sementes germinadas foi iniciada aos 15 dias após acondicionamento na sala de germinação e encerrada após quatro semanas, com triagens semanais para separar sementes germinadas e eliminar sementes contaminadas com fungos. Considerou-se germinada a semente com protrusão visível do poro germinativo (parte aérea e raiz primária) e para cálculo do percentual de germinação, as sementes descartadas por

contaminação e não germinadas, foram consideradas como não germinadas. Os dados de vigor e viabilidade dos embriões e da germinação das sementes foram submetidos à análise de correlação de Pearson e teste de significância pelo Teste de Mantel, baseado em 5000 simulações. A análise foi realizada no programa GENES (Cruz, 1997).

3 Resultados e Discussão

A temperatura na hidratação dos embriões em água influenciou significativamente o teste de tetrazólio para vigor e viabilidade dos embriões ($p < 0,01$) e não foram significativos os efeitos da temperatura de exposição dos embriões em solução de tetrazólio e da concentração do sal de tetrazólio na solução ($p > 0,05$). Entretanto, foi verificado efeito significativo da interação entre a temperatura da água na hidratação dos embriões e da temperatura na exposição dos embriões na solução de tetrazólio ($p < 0,01$), indicando que as condições ótimas para análise de vigor e

viabilidade dos embriões pelo teste do tetrazólio são obtidas em combinações específicas das temperaturas dessas fases do teste. O maior valor de vigor e viabilidade (91,33%) foi obtido com a combinação de 35 °C na hidratação dos embriões em água e 40 °C durante exposição destes na solução de tetrazólio (Tabela 1), sendo este estatisticamente superior aos valores obtidos com a variação da temperatura de hidratação fixada a melhor temperatura da solução de tetrazólio e vice-versa.

As concentrações do sal de tetrazólio utilizadas não interferiram na avaliação do vigor e viabilidade, dessa forma, a menor concentração (0,075%) pode ser utilizada, sem comprometimento das interpretações e com menor custo das análises. Os resultados demonstraram que a concentração do sal de tetrazólio na solução de exposição pode ser muito inferior (menos de 10%) a utilizada por Mok (1972) quando demonstrou ser o teste do TZ uma ferramenta útil para avaliar a viabilidade das sementes de dendezeiro utilizando a concentração de 1% de sal de tetrazólio na solução de exposição com embriões pré-condicionados por hidratação em água na temperatura de 28 °C.

Segundo Delouche et al. (1976) é desejável e frequentemente necessário, pré-condicionar as sementes, antes de prepará-las para o teste de tetrazólio. O pré-condicionamento tem como finalidade hidratar os tecidos, ativar o metabolismo das sementes, proporcionar coloração mais limpa e clara e tornar a interpretação mais fácil. Os autores relatam que o pré-condicionamento se processa mais rapidamente com temperaturas mais elevadas e que, em geral, a maioria das sementes são pré-condicionadas satisfatoriamente a cerca de 30-°C. Essa informação é corroborada com os resultados obtidos neste estudo com embriões de sementes de dendezeiro, onde a combinação da temperatura de 35 °C na fase de hidratação dos embriões em água combinada com 40 °C na fase de exposição na solução de tetrazólio mostrou-se a mais adequada.

Nas RAS (Brasil, 2009), o tempo requerido de pré-condicionamento das sementes, para a maioria das espécies, é de 16 a 18 horas, à temperatura de 20 a 25 °C. Para a única espécie de palmeira (*Koelreuteria* ssp.) dentre as citadas nas RAS, o tempo de pré-condicionamento é de 18 horas, à

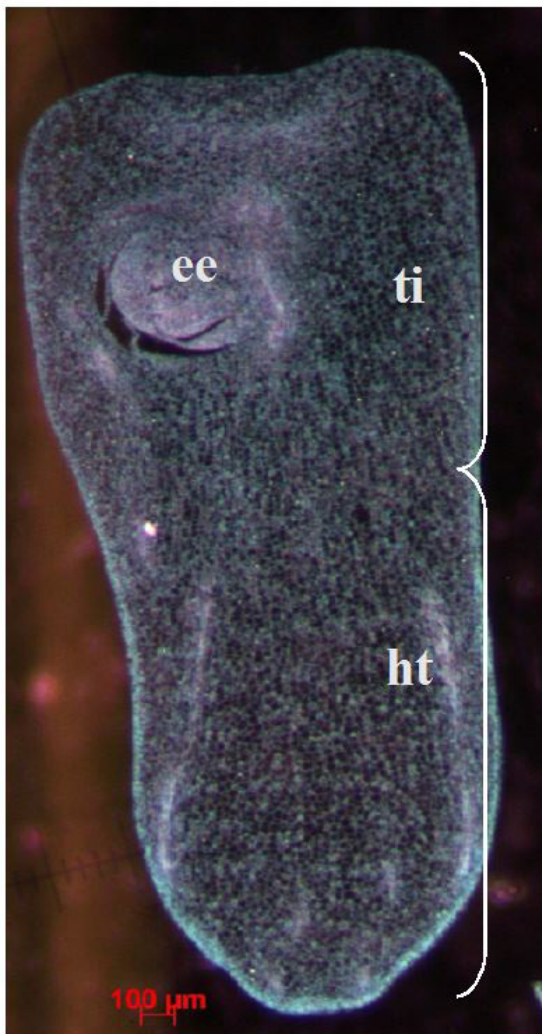


Figura 1. Corte longitudinal do embrião de semente de *Elaeis guineensis* Jacq. ee – eixo embrionário, ht – haustório, ti – tigelo. Barra = 100 μm. Fonte: W.A.A. Lima.

Figure 1. Longitudinal section of the seed embryo *Elaeis guineensis* Jacq. ee – embryonic axis, ht – haustorium, ti - tigellum. Bar = 100 μm. Source: W. A. A. Lima.

Tabela 1. Valores médios de vigor e viabilidade dos embriões de sementes de dendezeiro para a interação entre as temperaturas na hidratação dos embriões em água e na exposição dos embriões em solução de tetrazólio.

Table 1. Average values of vigour and viability of oil palm seed embryos for interaction between temperatures on the hydration of embryos in water and exposure of embryos in tetrazolium solution.

Temperatura (°C) na hidratação dos embriões em água	Temperatura (°C) de exposição dos embriões em solução de tetrazólio			Média
	30	35	40	
30	81,3aA	73,3aA	76,0bA	76,8 a
35	61,3bC	76,6aB	91,3aA	76,4 a
40	58,0bA	58,6bA	51,3cA	55,9 b
Média	66,8 A	69,5 A	72,8 A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

temperatura de 20 °C. Para análise de sementes da palmeira macaúba, Ribeiro et al. (2010) indicaram não ser necessário o pré-condicionamento dos embriões em água. O contraste entre os resultados encontrados indica que não existe recomendação padrão para as palmeiras, sendo necessário definir as condições adequadas de aplicação do TZ para cada espécie de interesse.

Considerando os resultados obtidos, para aplicação do teste de tetrazólio em embriões de sementes de dendezeiro, recomenda-se como procedimentos: extrair e hidratar os embriões em papel germitest umedecido à temperatura de 35 °C por 12 a 16 horas (overnight) e, em seguida, embeber os embriões em solução de tetrazólio na concentração de 0,075% por quatro horas à temperatura de 40 °C, realizando então a classificação dos embriões de acordo com a coloração das estruturas do embrião conforme Figura 2. A partir dos padrões de coloração verificados no teste do TZ, foram estabelecidas quatro classes de vigor e viabilidade dos embriões, baseando-se na intensidade, homogeneidade e a ocorrência da coloração nas estruturas do embrião:

Classe 1 – Sementes viáveis e de alto vigor. Embrião apresentando coloração homogênea (vermelha e/ou rósea) tanto no tigelo como no haustório;

Classe 2 – Sementes viáveis e de médio vigor. Embrião apresentando coloração homogênea no tigelo (vermelho ou róseo) e haustório com coloração parcial (inferior a 50% da área do haustório);

Classe 3 – Sementes viáveis e de baixo vigor. Embrião apresentando tigelo com falta de coloração inferior a 50% em relação ao tigelo, nas extremidades, sem comprometer o eixo embrionário. Embrião com tigelo colorido e haustório sem coloração maior que 50% em relação ao haustório;

Classe 4 – Sementes inviáveis. Embrião apresentando tigelo totalmente sem coloração ou haustório, colorido ou sem coloração.

A correlação de Pearson entre os valores obtidos no teste de tetrazólio para vigor e viabilidade dos embriões e a germinação das sementes dos oito lotes analisados foi de 90,7% (Figura 3), valor próximo ao da correlação de 95,8% verificado por Mok (1972) quando estudou a relação entre o TZ e a germinação das sementes. Entre os oito diferentes lotes de sementes estudados, para seis a diferença entre o valor de vigor e viabilidade dos embriões obtido pelo teste do tetrazólio e a germinação das sementes pelo método padrão foi menor que 5%, para apenas dois (C3 e C8) a discrepância foi maior, em ambos a germinação das sementes foi 16% superior ao valor obtido no teste do tetrazólio. Para França Neto et al. (1998), em sementes de soja, diferenças de até 5% entre os valores obtidos no teste de viabilidade e de germinação das sementes indicam bom nível de precisão do teste. A alta e significativa ($p < 0,01$) correlação entre os valores de vigor e viabilidade dos embriões pelo teste do tetrazólio e da germinação das sementes pelo método padrão, bem como, a proximidade dos valores obtidos pelo TZ e na germinação das sementes, indicam que o TZ é eficiente para avaliar o potencial de germinação das sementes de dendezeiro.

Como salienta Mok (1972), considerando que o procedimento clássico para germinação das sementes de dendezeiro demanda no mínimo três meses e, que o teste de tetrazólio para análise de vigor e viabilidade de embriões no máximo três dias, este tem grande aplicabilidade na avaliação da qualidade das sementes

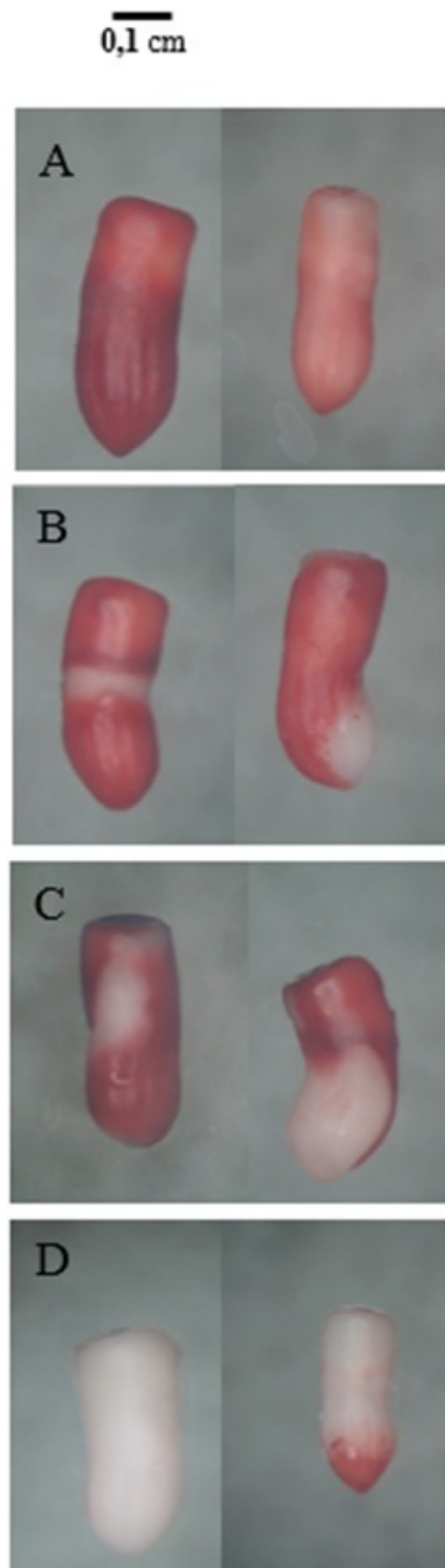


Figura 2. Classes de vigor e viabilidade de embriões de dendezeiro submetidos ao teste de tetrazólio. (A) Classe 1; (B) Classe 2; (C) Classe 3; e (D) Classe 4. Barra: 0,1 cm. Fonte: W.A.A. Lima.

Figure 2. Vigour classes and viability of oil palm embryos submitted to the tetrazolium test. (A) Class 1; (B) Class 2; (C) Class 3; and (D) Class 4. Bar: 0.1 cm. Source: W.A.A. Lima.

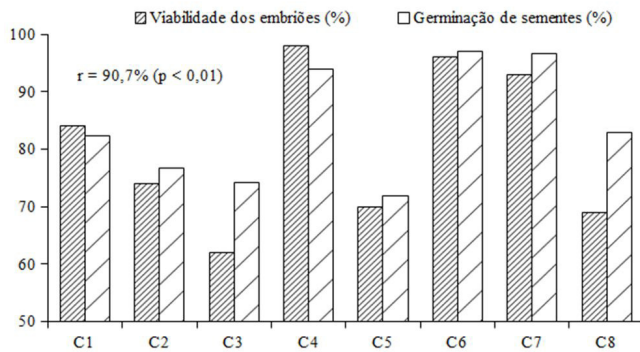


Figura 3. Valores (%) e correlação (r) entre viabilidade dos embriões, analisada pelo teste de tetrazólio, e germinação de sementes de oito diferentes cachos de dendzeiro (C_i).

Figure 3. Values (%) and correlation (r) between viability of embryos analysed by the tetrazolium test, and the germination of seeds from eight different bunches of oil palm (C_i).

e se constitui em uma excelente forma de economizar recursos e tempo, pois permite conhecer previamente o potencial de germinação dos lotes de sementes e a possibilidade de eliminação daqueles com baixa viabilidade.

4 Conclusões

Como procedimento padrão para aplicação do teste de tetrazólio na análise de vigor e viabilidade de embriões de dendzeiro recomenda-se o pré-condicionamento dos embriões com hidratação em água por uma noite a 35 °C e, posteriormente, exposição em solução de sal de tetrazólio na concentração de 0,075% por quatro horas a 40 °C.

O teste do tetrazólio aplicado nos embriões de sementes de dendzeiro pode ser utilizado na análise do potencial de germinação das sementes.

Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.
- CRUZ, C. D. *Programa GENES. Aplicativo Computacional em Genética e Estatística*. Viçosa: UFV/MG, 1997. 442 p.
- DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. *O teste de tetrazólio para viabilidade da semente*. ROCHA, F. F. (Trad.). Brasília: Agiplan/MAPA, 1976. 102 p.
- FERREIRA, S. A. N.; SADER, R. Avaliação da viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes*) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 9, n. 2, p. 109-114, 1987.

FONDOM, N. Y.; ETTA, C. E.; MIH, A. M. Breaking seed dormancy: revisiting heat-treatment duration on germination and subsequent seedling growth of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) progenies. *Journal of Agricultural Science*, v. 2, n. 2, p. 101-110, 2010.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. *The tetrazolium test for soybean seeds*. Londrina: Documentos 115, Embrapa/CNPSo. 1998. 71 p.

LIMA, W. A. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; GREEN, M.; SIMONETTI, R. *Produção de sementes germinadas de dendzeiro (Elaeis guineensis, Jacq.) na Embrapa*. Manaus: Circular Técnica 41, Embrapa/CPAA. 2013. 14 p.

MOK, K. C. The tetrazolium test for evaluating the viability of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, v. 37, n. 3, p. 771-77, 1972.

MURUGESAN, P.; VANANGAMUDI, K.; UMARANI, R. Evaluation of viability of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seeds by tetrazolium test and comparison with germination and in vitro culture results. *Proceedings of Placrosym XV*. Mysore, p. 246-250, 2002.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert Leguminosae Caesalpinioideae. *Cerne*, v. 11, n. 2, p. 159-166, 2005.

PINTO, T. L. F.; BRANCALION, P. H. S.; NOVENBRE, A. D. L. C.; CICERO, S. M. Avaliação da viabilidade de sementes de coração-de-negro (*Poecilanthe parviflora* Benth. - Fabaceae-Faboideae) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 30, n. 1, p. 208-214, 2008.

RIBEIRO, L. M.; GARCIA, Q. S.; OLIVEIRA, D. M. T.; NEVES, S. C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, n. 4, p. 361-368, 2010.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SPERA, M. R. N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J. B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 12, p. 1567-1572, 2001.

VARGAS, P. F. Processo germinativo de la semilla de palma de aceite. *Primer Curso Internacional de Palma de Aceite. Memorias*. Colombia: Cenipalma, p. 55-68, 1996.

VILLA, A. L.; JIMÉNEZ, P. É.; VALBUENA, R. I.; BASTIDAS, S.; NÚÑEZ, V. M. Estudio preliminar para el establecimiento de un protocolo de crioconservación para palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Agronomia Colombiana*, v. 25 n. 2, p. 215-223, 2007.

Contribuição dos autores: Márcia Green: instalação, condução e avaliação dos experimentos, análise de dados, revisão bibliográfica e redação científica; Wanderlei Antonio Alves de Lima: contribuiu com orientação de desenvolvimento do projeto, supervisionou as atividades, em todas as etapas, além de contribuir com a revisão ortográfica, gramatical e redação científica; Antenor Francisco de Figueiredo: orientou e contribuiu com a revisão ortográfica, gramatical e redação científica; Regina Caetano Quisen: contribuiu com a revisão ortográfica, gramatical e redação científica; Ricardo Lopes: contribuiu com as análises estatísticas, revisão ortográfica, gramatical e redação científica.

Fonte de financiamento: FAPEAM, Embrapa-CPAA.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.