

Londrina, PR
Janeiro, 2007

Autores

Nilton Pereira da CostaEngenheiro Agrônomo, D.Sc.
Embrapa Soja, Caixa Postal 231
CEP 86001-970 Londrina, PR
nilton@cnpsa.embrapa.br**José de Barros França Neto**Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Soja
jbfranca@cnpsa.embrapa.br**Francisco Carlos Krzyzanowski**Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Soja
fck@cnpsa.embrapa.br**Ademir Assis Henning**Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Soja
henning@cnpsa.embrapa.br

Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em semente de soja - Série Sementes

Introdução

Em um sistema moderno de produção de sementes, o emprego de métodos eficientes e rápidos é de importância vital na tomada de decisões na época de semeadura, na colheita, no beneficiamento e durante o armazenamento. Desse modo, fica evidente que a determinação da qualidade da semente se constitui em desafio histórico para os cientistas que, arduamente pesquisaram métodos que atendessem, entre outros critérios, as questões relativas à precisão e à rapidez. No Brasil, tem sido uma preocupação cada vez maior dos melhoristas de plantas incluir entre os parâmetros a serem aprimorados, o vigor da semente. Sabe-se que o vigor de uma semente é basicamente função de suas características genéticas e das condições edafoclimáticas de produção.

O teste de tetrazólio, além de avaliar a viabilidade e o vigor dos lotes de semente, fornece o diagnóstico das causas pela redução da qualidade, como danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejos, que são os principais problemas que afetam a qualidade fisiológica da semente de soja. Porém, além desses, os danos de secagem, de estresse hídrico e de geada podem também ser facilmente visualizados pelo teste. Aliás, o fornecimento desse diagnóstico tem sido o grande responsável pelo elevado índice de adoção do teste no Brasil, pois, além de apontar os problemas de redução de qualidade da semente, o mesmo, quando aplicado nas diferentes etapas do sistema de produção, pode identificar os pontos de origem desses problemas, permitindo que ações corretivas sejam adotadas, resultando na produção de sementes de alta qualidade. O emprego da metodologia alternativa do tetrazólio, em programas de controle de qualidade, torna-se uma ferramenta imprescindível para tomada de decisão quanto à avaliação do potencial fisiológico de um lote de semente. Neste trabalho avaliaram-se dois períodos de embebição (4h e 6h) à temperatura de 41°C, tendo como testemunha o procedimento padrão de 16h de embebição à temperatura de 25°C em semente de diversas cultivares de soja, procurando novas alternativas que possam viabilizar a realização do teste de tetrazólio em menor espaço de tempo do que preconiza a metodologia atual.

Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio

A metodologia alternativa do teste de tetrazólio é um avanço significativo, nos últimos anos na área de análise de semente. Esse método pode ser usado como alternativa rápida para determinar o vigor e a viabilidade, informações que são úteis no processo decisório de compra e manuseio de semente, além do apoio ao trabalho de controle de qualidade, por diagnosticar as causas dessa perda.

Processo de embebição e coloração da semente pela metodologia alternativa

O procedimento empregado para o pré-condicionamento da semente consiste na embebição de 200 sementes (quatro sub-amostras com 50 sementes). A semente é embebida em papel toalha (Figura 1A), previamente umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso e, posteriormente, submetidas ao processo de pré-condicionamento durante 6h à temperatura de 41°C. As sub-amostras são colocadas em

caixas plásticas (gerbox), em bandeja de tela de arame, adicionando 50 ml de água, a fim de manter uniforme a umidade relativa do ar no interior das mesmas. As caixas de gerbox são fechadas e colocadas em incubadora BOD previamente regulados à temperatura de 41°C (Figura 1B). Após o período de 6h, as amostras de semente são retiradas da BOD (Figura 1C), sendo duas sub-amostras utilizadas para monitorar o grau de umidade, através do método de estufa, 105°C/24h (Brasil, 1992). As outras duas sub-amostras são empregadas para a avaliação da qualidade da semente, pelo tetrazólio que após a embebição, são colocadas em copos plásticos com capacidade de 50 ml (Figura 1D), onde são totalmente submersas em solução de tetrazólio na concentração de 0,075% (Figura 1E) e, em seguida, são mantidas em estufa a 40°C, durante duas horas (Figura 1F). Ao alcançar o padrão de coloração, a semente é retirada da estufa, lavada em água comum e mantida submersa

em água até o momento da leitura. A avaliação da qualidade da semente pode ser realizada conforme critérios descritos por França Neto et al. (1998). O procedimento adotado para a avaliação e a interpretação dos níveis de qualidade consiste no seccionamento longitudinal de cada semente com lâmina de barbear, o qual permite visualização perfeita, tanto do eixo radícula-hipocótilo como da região vascular, para fins de avaliação e interpretação do vigor, da viabilidade, de injúria mecânica, de lesões de percevejos e da deterioração por umidade. Por outro lado, deve-se enfatizar que, quando o grau de umidade da semente não atinge a faixa superior a 26%, geralmente ocorrem problemas de semente com manchas mosaico dificultando o desenvolvimento de coloração pelo tetrazólio (Figura 2). Esse fato geralmente tem sido observado com grau de umidade da semente abaixo de 24%, já testado anteriormente em semente de duas cultivares de soja.

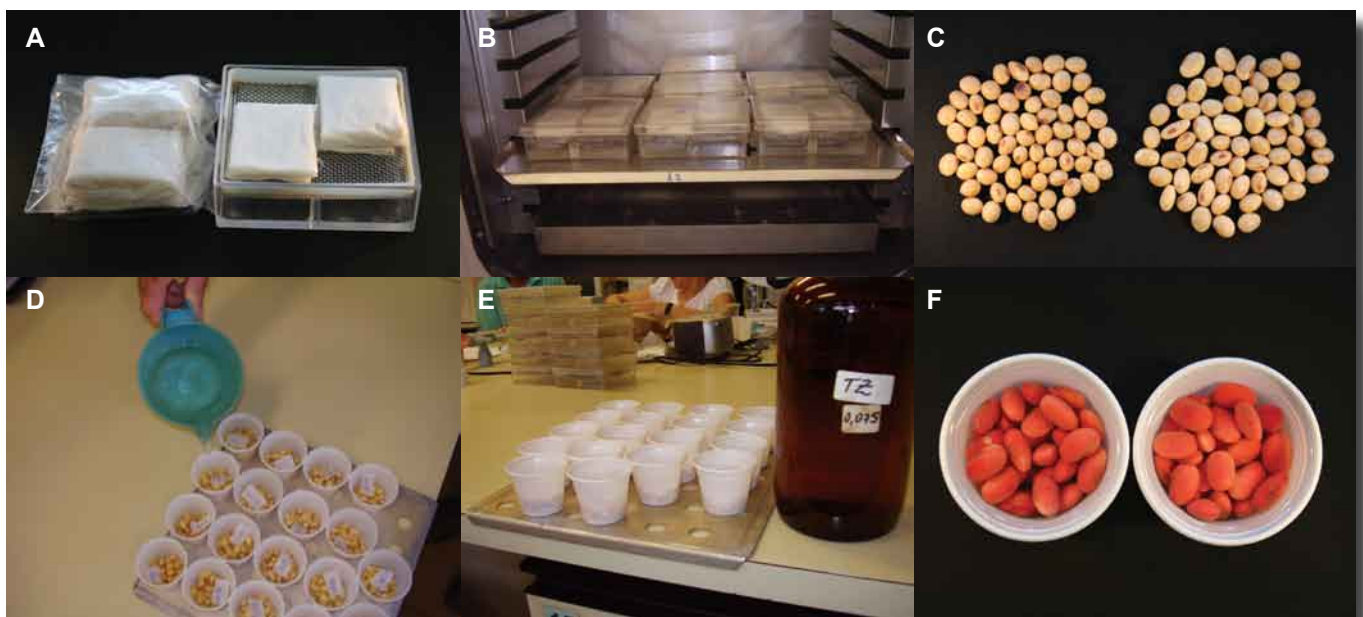


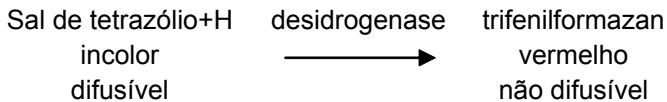
Figura 1. Procedimento indicado para o pré-condicionamento da semente em papel toalha pelo período de 6h à temperatura de 41°C para posterior desenvolvimento de coloração pelo teste de tetrazólio. A Figura 1C ilustra sementes de soja após o pré-condicionamento de 6h/41°C (esquerda) e 16h/25°C (direita). Londrina, PR, 2007.



Figura 2. Processo de embebição insuficiente de água pela semente, não permitindo o desenvolvimento adequado de coloração pelo teste de tetrazólio. Londrina, PR, 2007.

Princípio do teste de tetrazólio

A literatura mostra que os sais de tetrazólio se reduzem nos tecidos vivos, resultando em um composto de cor vermelha (formazan). Por sua vez, as enzimas desidrogenases catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias (organela celular-citoplasma) durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Essas enzimas, e especificamente a desidrogenase do ácido málico, participam do processo reduzindo o sal de tetrazólio nos tecidos vivos, conforme reação:



- Quando o TCT é reduzido, formando trifenilformazan, indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade das células e, portanto, dos tecidos. Assim, a coloração resultante da reação é indicação da viabilidade através da detecção da respiração celular. Tecidos não viáveis não reagem e, conseqüentemente, não se colorem.

Interpretação da metodologia alternativa

A classificação dos níveis de vigor (Tz 1-3) é feita de acordo com França Neto et al. (1938):

- vigor muito alto: igual ou superior a 85%
- vigor alto: entre 84% e 75%
- vigor médio: entre 74% e 60%
- vigor baixo: entre 59% e 50%
- vigor muito baixo: igual ou inferior a 49%
- vigor muito baixo: igual ou inferior a 49%

Obs:

- * Os valores obtidos para viabilidade (TZ 1-5) devem receber a mesma interpretação dos alcançados no teste de germinação
- * As percentagens de danos mecânicos, deterioração por umidade e de lesões de percevejos nos níveis 6-8, indicam os índices de perdas de viabilidade ocasionada pelos referidos danos, sendo consideradas com relação a qualidade de semente como:
 - **sem restrição: inferior a 6%
 - **problema sério: entre 7% a 10%
 - **Problema muito sério: superior a 10%

Vantagens e limitações da metodologia alternativa do TZ

Vantagens

- o teste não é afetado por diversas condições que geralmente afeta o teste de germinação
- foca atenção às condições físicas e fisiológicas do embrião de cada semente individualizada
- permite rápida avaliação da viabilidade e do vigor
- possibilita a identificação de diferentes níveis de viabilidade
- fornece o diagnóstico da causa da queda de viabilidade das sementes
- o equipamento necessário é simples e barato; e
- um analista experiente pode ter um rendimento de quatro a cinco amostras (2x50 sementes) por hora de trabalho

Limitações

- requer treinamento especial sobre a estrutura embrionária da semente e sobre técnicas de interpretação
- é relativamente tedioso, uma vez que as sementes são avaliadas uma a uma, requerendo, desta forma, experiência e paciência.
- embora seja um teste relativamente rápido, ele consome um maior número de homem-hora que o teste de germinação padrão.
- não mostra a eficácia de tratamentos químicos, nem as injúrias que estes possam causar; e
- requer do analista capacidade de decisão pelas características do teste.

Avaliação

A elevação da temperatura na etapa de embebição é fator fundamental para antecipação do teste de tetrazólio em período relativamente curto. O pré-condicionamento da semente com o tratamento a 41°C durante seis horas, resulta num padrão de coloração nítida e suficiente para exame adequado das áreas vitais da semente e a identificação: de altos vigor e viabilidade (Figura 3), do dano mecânico (Figura 4), de deterioração por umidade (Figura 5) e de percevejos (Figura 6). Essas informações são similares às obtidas com 16h/25°C, quanto aos aspectos de coloração e interpretação do teste de tetrazólio, conforme ilustrado nas Figuras 7 a 10.

O período de 4h/41°C de pré-condicionamento, fase que antecede o processo de coloração pelo tetrazólio, limita drasticamente a embebição da semente, afetando a qualidade de coloração, especialmente, o surgimento de características de mancha mosaico que compromete a leitura da qualidade fisiológica da semente (Figura 2).



Figura 3. Semente de soja apresentando bom aspecto de coloração pelo teste de tetrazólio, quando submetidas ao período de pré-condicionamento de 6h/41°C. Londrina, PR, 2007.



Figura 4. Semente de soja apresentando incidência de dano mecânico imediato identificado pelo teste de tetrazólio, após o período de pré-condicionamento de 6h/41°C. Londrina, PR, 2007.

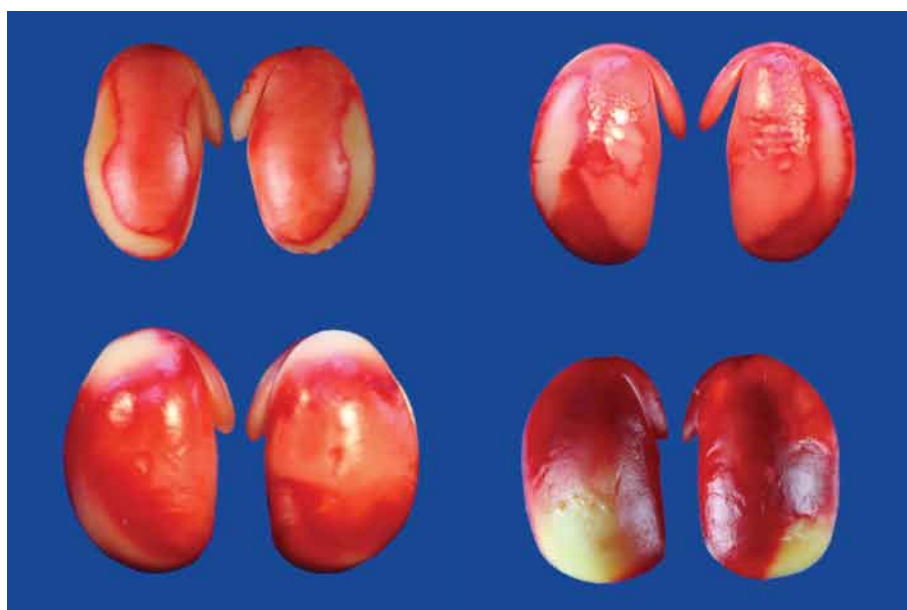


Figura 5. Sementes de soja, com problemas de deterioração por umidade identificada pelo teste de tetrazólio, submetidas ao período de pré-condicionamento de 6h/41°C. A foto inferior à direita ilustra sementes com deterioração por umidade causada pelo problema de semente esverdeada. Londrina, PR, 2007.



Figura 6. Sementes de soja, com problemas de lesões de dano de percevejo identificados pelo teste de tetrazólio, submetidas ao período de pré-condicionamento de 6h/41°C. Londrina, PR, 2007.



Figura 7. Semente de soja apresentando altos índices de vigor e viabilidade, avaliadas pelo teste de tetrazólio e pré-condicionadas por 16h/25°C. Londrina, PR, 2007.



Figura 8. Sementes de soja apresentando sintomas de deterioração por umidade, pela utilização do pré-condicionamento de 16h/25°C. Londrina, PR, 2007.



Figura 9. Semente de soja apresentando incidência de dano mecânico, pela utilização do pré-condicionamento de 16h/25°C. Londrina, PR, 2007.

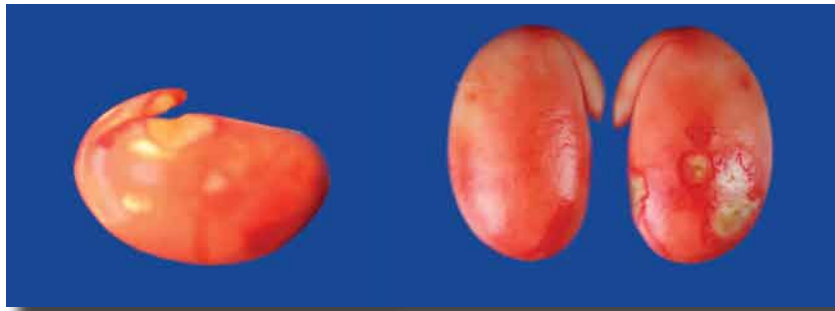


Figura 10. Semente de soja apresentando sintomas de lesões de percevejos, pela utilização do pré-condicionamento de 16h/25°C Londrina, PR, 2007.

Observações importantes

O método alternativo do tetrazólio pelo processo de embebição, no período de 6h/41°C, é considerado eficaz para a determinação da viabilidade da semente de soja (mesmo com 2 x 50 sementes) e apresenta, também, boa precisão para a avaliação do vigor.

Desse modo, pode-se afirmar que **a reação do sal de tetrazólio catalizada pelas enzimas desidrogenases ocorre em células vivas do embrião com grau de umidade da semente superior a 27%**. Todavia, outros componentes da semente também participam ativamente da velocidade de embebição, influenciando diretamente no desenvolvimento da coloração pelo tetrazólio, como a composição química da semente, a qualidade fisiológica e a impermeabilidade do tegumento. O grau de umidade da semente abaixo de 24% restringe o início dos processos metabólicos e respiratórios, não permitindo a ativação enzimática, especialmente com relação ao grupo das desidrogenases, responsáveis pelo desenvolvimento da coloração no teste de tetrazólio.

Considerações Gerais

Com base em avaliações realizadas em sementes de mais de 50 cultivares de soja, observou-se que é possível reduzir em 10 horas o período de embebição da semente. Assim, pode-se afirmar que: a) quando se aplica o pré-condicionamento pelo período de 6h/41°C de embebição, ocorre o intumescimento da semente, permitindo o desenvolvimento de coloração exequível para a interpretação do vigor e da viabilidade das sementes; b) o período de condicionamento de 4h à 41°C, possibilita apenas aferir com nitidez a ocorrência de danos mecânicos ou causadas por percevejos; c) o tamanho da semente não afeta a velocidade de embebição, para posterior desenvolvimento de coloração, quando submetidas ao teste de tetrazólio e d) o teor de água da

semente superior a 27%, permite bom desenvolvimento de coloração na solução de tetrazólio.

Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLA, 1992. 365p
- COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; OLIVEIRA, M. C. N. Metodologia alternativa do teste de tetrazólio em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 6, p. 869-877, 1998.
- COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Avaliação da metodologia alternativa para o teste de tetrazólio para sementes de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 305-312, 1998.
- COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZZONOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; OLIVEIRA, M. C. N. Efeito da temperatura e do período de embebição de sementes de soja para o teste de tetrazólio. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 1, p. 169-177, Mar. 1997.
- COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PEREIRA, J. E. Desenvolvimento da metodologia alternativa do teste de tetrazólio para sementes de soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 20., 1998. Londrina. **Ata e resumos...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. p. 404. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 121).
- COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PEREIRA, J. E. Validação da metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja. In: RESULTADOS de Pesquisa da Embrapa Soja 1997. Londrina, 1998. p. 179-180. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 118).

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PEREIRA, J. E. Determinação do nível crítico de umidade de sementes de soja para o desenvolvimento de coloração pelo teste de tetrazólio. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 9, v. 1/2, p. 132, jul./ago.1999. Número especial, ref. 204.

Resumo apresentado no XI Congresso Brasileiro de Sementes.

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



Parceiros construindo o futuro.

A Fundação Meridional nasceu com a união de parceiros e se fortalece valorizando cada vez mais a integração entre instituições públicas e privadas. As parcerias potencializam o trabalho desenvolvido pela entidade, que reúne 95% dos produtores de sementes dos estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina.

Os colaboradores da Fundação Meridional investem em produção de sementes de qualidade e também em transferência de tecnologias ao agricultor das culturas de soja e trigo.

Porque a semente é o começo de tudo.

COLABORADORES:

- | | | |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1. Agrária | 23. Copercampos | 45. Sementes Frôes |
| 2. Agrícola Horizonte | 24. Coprossel | 46. Sementes Guerra |
| 3. Agromen Sementes | 25. Coptar | 47. Sementes Joná |
| 4. Agropecuária Ipê | 26. Corol | 48. Sementes Lagoa Bonita |
| 5. Batavo | 27. Dedini Sementes | 49. Sementes Loman |
| 6. Brejeiro | 28. Fazenda Estrela Sementes | 50. Sementes Mauá |
| 7. C.Vale | 29. Germina | 51. Sementes Paraná |
| 8. Camisc | 30. Granjas Modelo | 52. Sementes Plantar |
| 9. Camp | 31. Herbioeste | 53. Sementes Prezzotto |
| 10. Carol | 32. I. Riedi | 54. Sementes Semel |
| 11. Castrolanda | 33. Iberá Sementes | 55. Sementes Sojamil |
| 12. Cereagro | 34. Integrada | 56. Sementes Sorria |
| 13. Cerealista Pan | 35. Irmãos Bocchi | 57. Sementes Stocker |
| 14. Coagel | 36. Lavoura | 58. Sementes Trimax |
| 15. Coagru | 37. Nishimori | 59. Sementes Veit |
| 16. Coamo | 38. Peron Ferrari | 60. Sementes Vilela |
| 17. Cocamar | 39. Plantanense | 61. SG Sementes |
| 18. Cocari | 40. Procopense | 62. Solotécnica |
| 19. Coocam | 41. San Rafael | 63. Sperafico Agroindustrial |
| 20. Coopagricola | 42. Sementes Campo Verde | 64. ZI Sementes |
| 21. Coopavel | 43. Sementes Condor | |
| 22. Copacol | 44. Sementes Escol | |



Av. Higienópolis, 1.100 - 4º andar
CEP 86020-911 - Londrina-Pr.
Fone: (43) 3323-7171 Fax: (43)3324-6742
www.fundacaomeridional.com.br



Circular Técnica, 39

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Soja
Cx. Postal 231
86001-970 - Londrina, PR
Fone: (43) 3371-6000 - Fax: 3371-6100
Home page: <http://www.cnpso.embrapa.br>
e-mail: sac@cnpso.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2007): tiragem 2000 exemplares

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento Governo
Federal

Comitê de Publicações

Presidente: Alexandre José Cattelan
Secretário Executivo: Regina Maria Villas Boas de Campos Leite
Membros: Antonio Ricardo Panizzi, Claudine Dinali Santos Seixas, Francismar Corrêa Marcelino, Ivan Carlos Corso, José Miguel Silveira, Maria Cristina Neves de Oliveira, Rafael Moreira Soares, Ricardo Vilela Abdelnoor

Expediente

Coordenador de editoração: Odilon Ferreira Saraiva
Bibliotecário: Ademir Benedito Alves de Lima
Editoração eletrônica: Neide Makiko Furukawa