

Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 406

Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja

*José de Barros França-Neto
Francisco Carlos Krzyzanowski*

Autores

Embrapa Soja
Londrina, PR
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja
Rodovia Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral. Caixa Postal 231
CEP 86001-970 , Distrito de Warta, Londrina, PR
www.embrapa.br/soja
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Soja

Presidente
Ricardo Vilela Abdelnoor

Secretária-Executiva
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros
Alvadi Antonio Balbinot Junior, Claudine Dinali Santos Seixas, Fernando Augusto Henning, José Marcos Gontijo Mandarino, Liliane Márcia Mertz-Henning, Maria Cristina Neves de Oliveira, Norman Neumaier e Osmar Conte.

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinato Dall'Agnol

Normalização bibliográfica
Ademir Benedito Alves de Lima

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marisa Yuri Horikawa

Foto da capa
José de Barros França-Neto

Ilustrações (quando não mencionadas)
Neia Sussai

1ª edição
PDF digitalizado (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Soja

França Neto, José de Barros
Metodologia do teste de tetrazólio / José de Barros França Neto, Francisco Carlos Krzyzanowski. – Londrina : Embrapa Soja, 2018.
PDF (108 p.) : il. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n.406)

1.Soja. 2.Teste de tetrazólio. 3.Teste de sementes. I.Krzyzanowski, Francisco Carlos. II.Título. III.Série.

Autores

José de Barros França-Neto

Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Soja,
Londrina, PR.

Francisco Carlos Krzyzanowski

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. Pesquisador da Embrapa Soja,
Londrina, PR.

Apresentação

Qualidade fisiológica, alta germinação e alto vigor têm sido parâmetros fundamentais requeridos pelos sojicultores aos produtores de sementes no momento da aquisição da semente, importante matéria prima para o estabelecimento de uma lavoura com plantas de alto desempenho agrônômico, isto é, plantas com alto potencial produtivo, com bom desenvolvimento radicular e bom desenvolvimento do dossel.

Para oferecer sementes de alto desempenho fisiológico, os produtores necessitam de excelentes práticas agrônômicas de produção e de avaliação da sua qualidade.

O teste de tetrazólio, por estar fundamentado na caracterização dos tecidos vivos da semente e por permitir a identificação dos principais agentes causadores da redução da sua qualidade fisiológica, como os danos mecânicos (imediatos e latentes), os danos por percevejo e os danos por umidade, se apresenta como uma ferramenta estratégica para a gestão da qualidade fisiológica da semente, tanto no seu processo de produção, como na colheita, na secagem, no beneficiamento, no armazenamento e na comercialização.

A Embrapa Soja, sempre compromissada com o desenvolvimento e aperfeiçoamento da indústria brasileira de sementes de soja, traz esta nova edição revisada, atualizada e ampliada do manual “Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja” para contribuir com os programas de controle de qualidade desta importante indústria do agronegócio brasileiro.

Ricardo Vilela Abdelnor

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja

Sumário

Introdução.....	9
Histórico do teste.....	11
Princípios do teste.....	16
Equipamentos e materiais necessários.....	19
Amostragem e número de sementes.....	20
Procedimento.....	21
Soluções de tetrazólio.....	21
Solução tampão.....	22
Pré-condicionamento.....	23
Coloração.....	26
Lavagem da amostra.....	26
Interpretação.....	27
Diagnóstico das causas da deterioração da semente de soja.....	34
Danos mecânicos.....	34
Deterioração por umidade.....	36
Danos de percevejo.....	40
Danos por seca e altas temperaturas.....	42
Sementes de soja esverdeadas.....	44
Identificação da viabilidade e dos níveis de vigor.....	47
Classe 1: viável; mais alto vigor.....	48
Classe 2: viável; alto vigor.....	51

Classe 3: viável; vigor médio	54
Classe 4: viável; vigor baixo.....	60
Classe 5: viável; vigor muito baixo.....	65
Classe 6: não viável.....	66
Classe 7: não viável.....	67
Classe 8: semente morta	73
Sementes duras (SD).....	74
Anormalidades embrionárias	74
Anotação e interpretação dos resultados.....	75
Necessidade de reanálise	79
Interpretação dos resultados.....	79
Precisão dos resultados	85
Vantagens e limitações do teste para sementes de soja	86
Vantagens	86
Limitações	87
Quando aplicar o teste de tetrazólio.....	88
Áreas para melhorias	89
Agradecimentos.....	89
Referências	89
Apêndice.....	96

Introdução

A produção e a utilização de sementes de alta qualidade são fatores básicos e de grande importância para o sucesso da produção da lavoura. Para que isso seja concretizado, é imperativa a adoção de um programa de controle de qualidade que seja versátil, dinâmico e que disponha de resultados precisos e com agilidade. Diversas determinações, como as realizadas nos testes de pureza física, grau de umidade e de danos mecânicos podem ser avaliadas em poucos minutos, preenchendo parcialmente as demandas por agilidade no sistema de controle de qualidade.

O teste de germinação é o método padrão utilizado para a determinação da qualidade fisiológica das sementes para fins de comercialização. Entretanto, o mesmo apresenta algumas limitações, como a demora relativa (pelo menos cinco dias) para a obtenção dos seus resultados, fato esse que pode resultar numa séria limitação ao processo de tomada de decisões na indústria de sementes. Além da demora em sua execução, este teste, na sua forma de avaliação tradicional, não fornece informações quanto ao vigor, não permite de maneira precisa a identificação dos fatores que afetam a qualidade das sementes de soja, e seus resultados são frequentemente mascarados pela ocorrência de danos de embebição (França-Neto et al., 1998a; Toledo et al., 2010) e pela presença de fungos como *Phomopsis* spp. e *Fusarium semitectum* (Henning; França-Neto, 1980; França-Neto; West, 1989a; 1989b). Tais limitações podem resultar em sérios prejuízos aos produtores de sementes por afetar negativamente a tomada de decisões relativas à colheita, ao processamento, à armazenagem e à comercialização. Além dessas limitações, os resultados obtidos no teste de germinação são de utilidade apenas quando condições ideais de campo são propiciadas às sementes após a semeadura.

Dentre os diversos métodos de controle de qualidade adotados pela indústria de sementes no Brasil, o teste de tetrazólio tem se destacado, principalmente para a soja, devido à sua rapidez, precisão e também pelo grande número de informações fornecidas pelo mesmo. O teste, além de avaliar a viabilidade e o vigor dos lotes de sementes, fornece o diagnóstico das possíveis causas responsáveis pela redução de sua qualidade: danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejo, que são os problemas que mais comu-

mente afetam a qualidade fisiológica da semente de soja. Porém, além desses, os danos de secagem, de estresse térmico e de geada podem também ser facilmente visualizados por meio do teste. Aliás, o fornecimento desse diagnóstico tem sido o grande responsável pelo elevado índice de adoção do teste em nosso País, pois, além de apontar os problemas de redução de qualidade das sementes, o teste, quando aplicado nas diversas 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.

No Brasil, o teste de tetrazólio é amplamente utilizado no controle de qualidade de sementes, assumindo proporções jamais registradas mesmo nos países onde o teste foi desenvolvido. A sua metodologia tem sido aprimorada, principalmente no que se refere à determinação do índice de vigor, tornando o teste muito mais atrativo. No caso da soja, graças à publicação das primeiras versões do presente manual (França-Neto et al., 1985; 1988; 1998d) e também devido aos diversos treinamentos oferecidos pelos profissionais da Embrapa Soja e de outras instituições, é notório que o teste é executado em todos os laboratórios de análise de sementes brasileiros que trabalham com tal espécie.

Em consequência, hoje, pode-se dizer que o Brasil é o líder mundial de utilização do teste de tetrazólio em nível de rotina. Alguns números podem ilustrar o nível de sua adoção: para a semeadura dos 35,15 milhões de hectares cultivados com soja na safra 2017/18 (CONAB, 2018), foram necessárias cerca de um 2,1 milhões de toneladas de sementes de soja, o que representa ao redor de 100.000 lotes. Caso esses lotes sejam analisados pelo menos três vezes pelo teste de tetrazólio, durante o processo de controle de qualidade, isto resulta em cerca de 300.000 análises realizadas apenas com soja.

A utilização do teste de tetrazólio em nosso País repercute não apenas com relação aos aspectos quantitativos, conforme ilustram os números apresentados acima, mas, principalmente, quanto aos qualitativos, pois quando realizado em conjunto com outros testes, tem propiciado a comercialização dos lotes que efetivamente apresentem elevados padrões de qualidade. Isto tem resultado num sistema de controle de qualidade de alta confiabilidade, assegurando maiores lucros aos produtores de sementes, por meio da produção

de sementes de alta qualidade a menor custo. Este fato pode resultar em índices próximos de zero de reposição de sementes e de ressemeadura.

Diversos aspectos sobre o teste de tetrazólio em sementes de soja serão abordados no presente manual: sua história e fatos que contribuíram para o desenvolvimento, aprimoramento e padronização do teste; os seus princípios básicos; equipamentos e materiais necessários para a sua execução; procedimentos para o preparo e avaliação das sementes; correta interpretação de seus resultados; vantagens e limitações; e precisão de seus resultados.

Histórico do teste

O desenvolvimento de testes rápidos e precisos, visando à determinação da qualidade fisiológica das sementes, tem sido um dos principais objetivos dos fisiologistas e tecnologistas de semente há vários anos, principalmente a partir do início do século 20, quando o sistema de produção de semente começou a ser organizado em diversos países da Europa. Um dos marcos pioneiros que deram o impulso para análise de sementes, incluindo o desenvolvimento de métodos rápidos para a determinação da viabilidade, foi a criação da primeira estação de análise de sementes em Tharandt, Saxônia em 1869 por Frederich Nobbe, que também publicou as primeiras regras para a amostragem e análise de sementes (Steiner, 1997a).

Diversos testes, baseados na observação da coloração, do aspecto, do peso volumétrico, da densidade, da velocidade de embebição, da condutividade elétrica e da intensidade respiratória das sementes foram inicialmente utilizados, visando a rápida avaliação da viabilidade das mesmas, porém sem nenhuma precisão (Moore, 1969). No início da década de 1920, a determinação da atividade de certas enzimas, como a peroxidase, catalase, oxidase, redutase e fenolase, recebeu atenção especial, porém a falta de sucesso de tais testes deveu-se ao fato de que a atividade destas enzimas não era realizada em sementes individualizadas. Nessa mesma época, diversos corantes, como o índigo-carmim, azul de metileno, vermelho neutro, ácido sulfúrico e verde malaquita foram testados e a falta de precisão resultou no insucesso da adoção de tais métodos.

Conforme relatado por Moore (1969) e por Steiner e Kruse (2003), as primeiras tentativas que apresentaram sucesso na avaliação da viabilidade das sementes com bio-corantes foram realizadas por Turina, na antiga Iugoslávia, em 1922, e por Neljubow, na Rússia, em 1925. Turina trabalhou com a redução de sais de telúrio e de selênio nas células das sementes e Neljubow relatou algum sucesso com a utilização de índigo-carmim.

Hasegawa (1935), trabalhando com sementes arbóreas no início dos anos 30, aperfeiçoou a aplicação de sais de telúrio e de selênio para a coloração de embriões de sementes. A grande maioria de seus trabalhos foi publicada em língua japonesa, tornando os seus avanços inacessíveis à comunidade científica. Alguns de seus estudos foram amplamente divulgados após a publicação de alguns de seus resultados em inglês (Hasegawa, 1935) e em alemão, após uma reunião da ISTA (Associação Internacional de Análise de Sementes) na Europa. Durante esta viagem, Hasegawa revelou alguns detalhes de sua metodologia de análise aos cientistas alemães F.E. Eidmann e W. Schmidt, que, por sua vez, aprimoraram o método do selênio (Moore, 1969; Steiner, 1997a; Steiner; Kruse, 2003).

O Dr. Georg Lakon, nascido em Atenas, Grécia, trabalhou em Hohenheim, Alemanha, desde o início da década de 20. Dedicou grande parte de sua vida profissional aos trabalhos na área de fisiologia de sementes. Ele aperfeiçoou o método do selênio, desenvolvido por Hasegawa, Eidmann e Schmidt, culminando com o desenvolvimento do método “topográfico” do selênio para a determinação da viabilidade de sementes (Lakon, 1940). Quando tomou conhecimento dos efeitos tóxicos do selênio aos analistas de sementes, Lakon procurou por um sal similar, porém não tóxico, que poderia ser utilizado com a mesma finalidade. Após a indicação por Kühn e Jerchel (1941), conforme citado por Cottrell (1948) e Isely (1952), de que diversos compostos de tetrazólio poderiam se reduzir em tecidos vivos, Lakon testou vários desses sais e concluiu que o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio era o mais apropriado para o teste topográfico. Lakon desenvolveu a metodologia para sementes de várias espécies de cereais e para milho.

Dentre os diversos conceitos básicos estabelecidos por Lakon, a definição e caracterização de “viabilidade de sementes” teve um forte impacto no desenvolvimento do teste de tetrazólio. Ele definia o termo viabilidade como um po-

tencial de germinação e, por conseguinte, via em uma semente em repouso como um tipo de potencial de plântulas (Steiner; Kruse, 2003).

Conforme relatado por Moore (1976), Steiner (1997a), e Steiner e Kruse (2003), a divulgação da existência e dos méritos do teste de tetrazólio ocorreu pela primeira vez nos Estados Unidos em 1945, mediante investigações realizadas pelo Exército Americano, após a II Guerra Mundial, sobre atividades de pesquisa na Alemanha. O primeiro trabalho realizado com o teste nos Estados Unidos foi publicado por Porter et al. (1947), da Universidade Estadual de Iowa. Outros estudos pioneiros, realizados nesse mesmo país, conforme relatado por Moore (1976), foram publicados por Flemion e Poole, do Instituto Boyce Thompson na cidade de Yonkers, Nova Iorque, por Goodsell, da companhia de sementes de milho Pioneer, de Johnston, Iowa, e por Bennett, da Universidade Estadual de Iowa. Em 1949, o teste de tetrazólio foi incorporado às Regras Oficiais Alemãs para Análise de Sementes (Steiner, 1997a).

Avanços significativos sobre o teste ocorreram na década de 1950. Vários pesquisadores de diversas universidades Americanas e Alemãs alcançaram resultados básicos importantes. Dentre eles, destacaram-se Isely, Bass, Smith e Throneberry, da Universidade Estadual de Iowa, Parker, da Universidade de Idaho e Bulat e Steiner da Universidade de Hohenheim. Em 1956, o Comitê de Tetrazólio da ISTA foi fundado, sendo que o mesmo contribuiu para significantes desenvolvimentos no teste, bem como diversos treinamentos sobre o mesmo (Steiner; Kruse, 2003).

Na década de 1960, progressos significativos relativos à aplicação prática do teste foram obtidos por Delouche, Still, Raspert e Leinhard, da Universidade Estadual do Mississippi, que publicaram o primeiro manual sobre o teste, que abordava a sua metodologia para um grande número de espécies (Delouche et al., 1962). Jensen, Pierpoint, Hayes e Grabe, do Laboratório de Sementes da Universidade Estadual do Oregon, e Copeland, Bruce e Midyette, da Virginia, também contribuíram com melhorias ao teste. Em 1966, o “Capítulo 6: Teste Bioquímico para Viabilidade - o Teste Topográfico do Tetrazólio” foi incorporado às Regras Internacionais para Análise de Sementes da ISTA.

Em 1970, outro marco importante foi atingido. A utilização do teste foi aceita pela AOSA (Associação Oficial dos Analistas de Sementes), através da publicação do Manual do Teste de Tetrazólio (Grabe, 1970). Em 1983, a AOSA

publicou o Manual de Testes de Vigor (AOSA, 1983), que abordava a metodologia do teste para soja, algodão, milho e trigo.

Reconhecimento especial deve ser dado ao Dr. Robert P. Moore, do Laboratório de Sementes da Universidade Estadual da Carolina do Norte. Entre 1955 e 1985 ele publicou mais de 230 trabalhos sobre o teste e editou o Manual do Teste de Tetrazólio (Moore, 1985), publicado pela ISTA. Tal publicação contém detalhes sobre a metodologia do teste para mais de 650 espécies.

Em 2000, a AOSA completou a primeira revisão do Manual do Teste de Tetrazólio, que foi subsequentemente atualizado em 2001, 2002, 2005, 2006, 2007 (Peters, 2007) e em 2010 (Miller, 2010). Atualizações mais recentes podem ser encontradas no site da AOSA (www.aosaseed.com).

Em 2003, a ISTA publicou as “ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing” (Fichas de Trabalho do Teste de Tetrazólio da ISTA), editadas por Norbert Leist, Stefanie Kramer e Andrea Jonitz (Leist et al., 2003) em dois volumes: Vol. 1 para sementes de espécies agrícolas e olerícolas, e o Vol. 2 para sementes de espécies florestais e arbustivas. Essa publicação é constantemente atualizada, sendo a mais recente realizada em 2011. Essas publicações da AOSA e da ISTA focam suas metodologias para a determinação da viabilidade de sementes por meio do teste de tetrazólio.

Já, para a determinação do vigor, as primeiras tentativas para o desenvolvimento de métodos para a sua determinação por meio da coloração das sementes foram realizadas na Rússia por Neljubow na década de 1920, que formulou cinco classes de padrões de coloração, de acordo com a intensidade da coloração dos tecidos de sementes (Moore, 1969). Na década de 1930, Eidmann, aprimorando o trabalho de Hasegawa, propôs três classes de avaliação (sementes plenamente germináveis, sementes germináveis fracas e sementes mortas), dependendo da intensidade e extensão da coloração (Steiner; Kruse, 2003). Em 1950, Lakon propôs um método que discriminava as sementes de alto e de baixo vigor a partir da localização e extensão da coloração, bem como da aparência e textura dos tecidos das sementes (Steiner, 1997b). Estes mesmos princípios foram usados e aprimorados por Moore e Smith (1956), onde as sementes eram classificadas nas classes “A” (vigorosa), “B” (viáveis não vigorosas) e “C” (não viáveis).

Em 1960, Moore (1961; 1962a; 1962b; 1967a; 1967b) aperfeiçoou um esquema de classificação do vigor relativo de sementes de milho e de soja. Cada semente era classificada de acordo com a sua classe de vigor, de 1 a 5, se viável, e de 6 a 8, se não viável. A presença, a localização e a natureza da coloração dos tecidos, bem como o estado físico das estruturas do embrião foram utilizados como critérios desse esquema de classificação.

A inclusão do teste de tetrazólio para a determinação de vigor em sementes no Manual de Métodos de Testes de Vigor (Handbook of Vigour Test Methods) editado pela ISTA (Perry, 1981) e atualizado por Fiala (1987) e por Hampton e TeKrony (1995), e no Manual de Testes de Vigor (Seed Vigor Testing Handbook) publicado pela AOSA (1983) contribuiu significativamente para a disseminação e aperfeiçoamento das noções e conceitos de que o teste de tetrazólio é um método confiável para a determinação do vigor de sementes de diversas espécies.

No caso de sementes de soja, o teste de tetrazólio foi aperfeiçoado para a determinação de vigor pelos especialistas em tecnologia de sementes da Embrapa Soja, que publicaram cinco manuais, contendo procedimentos específicos para o teste (França-Neto, 1981; 1989; França-Neto et al., 1985; 1988), sendo um deles publicado em três idiomas: Inglês (França-Neto et al., 1998b); Espanhol (França-Neto et al., 1998c); e Português (França-Neto et al., 1998d). Na Argentina, o procedimento do teste para determinação de vigor foi aperfeiçoado por Craviotto et al. (1995; 2008a), que também publicou a metodologia em inglês (Craviotto et al., 2008b).

Procedimentos detalhados para o teste de tetrazólio visando a determinação do vigor em sementes foram publicados pela ABRATES (Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes) no manual "Vigor de Sementes: conceitos e testes". Nesse livro, foram relatadas as metodologias do teste para sementes de algodão (Vieira; Von-Pinho, 1999), amendoim (Bittencourt; Vieira, 1999), feijão (Bhering et al., 1999), milho (Dias; Barros, 1999) e soja (França-Neto et al., 1999). A AOSA também publicou as metodologias dos testes de tetrazólio para determinação de vigor de sementes dessas mesmas espécies no Manual de Testes de Vigor em Sementes (Seed Vigor Testing Handbook), editado por Baalbaki et al. (2009).

Em 2017, a metodologia do teste para a determinação do vigor em sementes de soja foi incluída nas Regras Internacionais para Análise de Sementes

(International Rules for Seed Testing), que são anualmente editadas pela ISTA (2017). A metodologia descrita nessa publicação é um híbrido do procedimento indicado pela Embrapa (França-Neto et al., 1998d) e pelo divulgado na Argentina pelo INTA-Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (Craviotto et al., 2008a).

No Brasil, a Embrapa Soja teve e tem um papel de suma importância na adoção do teste de tetrazólio em sementes de soja, em função dos diversos treinamentos oferecidos: desde 1984, essa instituição ofereceu mais de 90 cursos sobre o teste, que contaram com a participação de mais de 2.200 profissionais envolvidos na Área de Ciência e Tecnologia de Sementes.

“O sucesso do desenvolvimento do teste de tetrazólio é resultado da conquista de várias etapas na história da pesquisa em sementes e da obtenção de novos conhecimentos sobre a vida da semente” (Moore, 1985). Revisões mais detalhadas sobre o histórico do teste de tetrazólio foram publicadas por Cottrell (1948), Delouche et al. (1962), Gadd (1950), Isely (1952), Lakon (1953), Lindenbein (1965), Moore (1962a; 1966; 1969; 1976), Steiner (1997a) e Steiner e Kruse (2003).

Princípios do teste

O teste de tetrazólio determina indiretamente a atividade respiratória nas células que compõem os tecidos das sementes. O teste baseia-se, portanto, na atividade das enzimas desidrogenases (AOSA, 1983; Bulat, 1961; Copeland et al., 1959; Moore, 1973; Smith, 1952; Smith e Throneberry, 1951) as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise (Figura 1) e o ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs (Figura 2). Na glicólise temos a ação de uma dessas enzimas, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e no ciclo do ácido cítrico outras cinco: piruvato desidrogenase; isocitrato desidrogenase; α -cetoglutarato desidrogenase; succinato desidrogenase; e malato desidrogenase. Estas enzimas, particularmente a malato desidrogenase, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos. Quando a semente de soja é imersa na solução incolor de TCT, esta é difundida através dos tecidos, ocorrendo nas células vivas a reação de redução que resulta na formação de um composto vermelho, estável e não-difusível, conhecido por trifetilformazan (Figura 3).

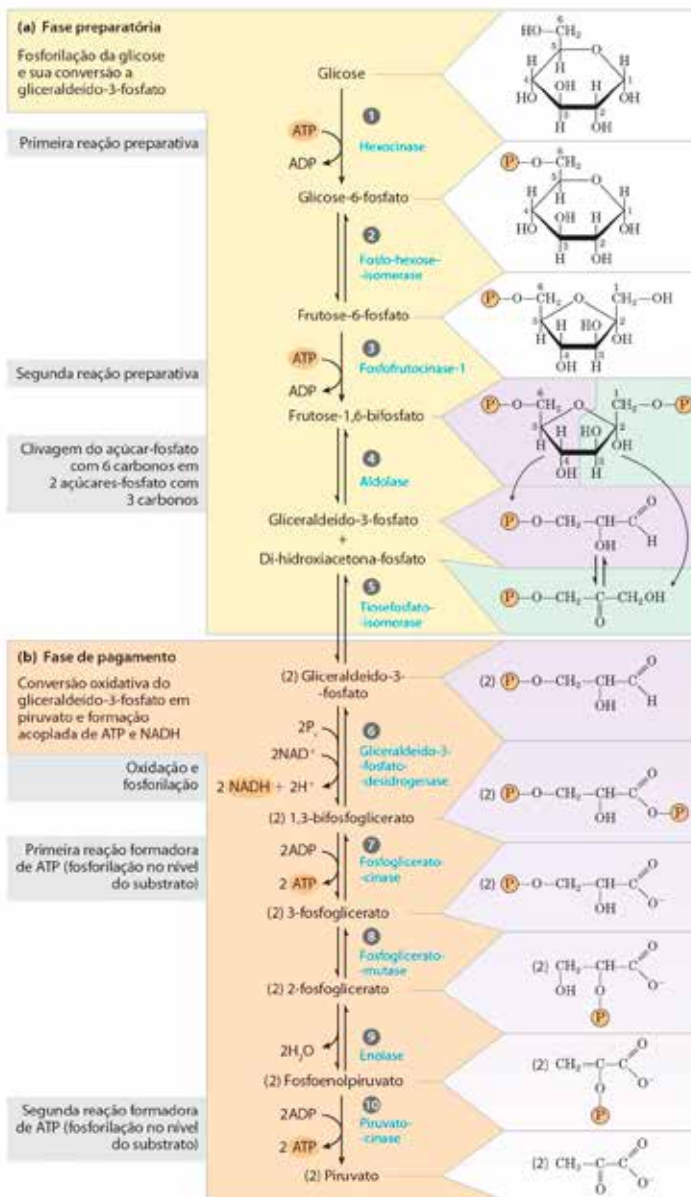


Figura 1. Esquema da glicólise, por meio da qual a glicose será metabolizada em dois ATP por molécula de glicose e em piruvato, dando início aos processos oxidativos do ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs.

Fonte: Lehninger et al. (2014).

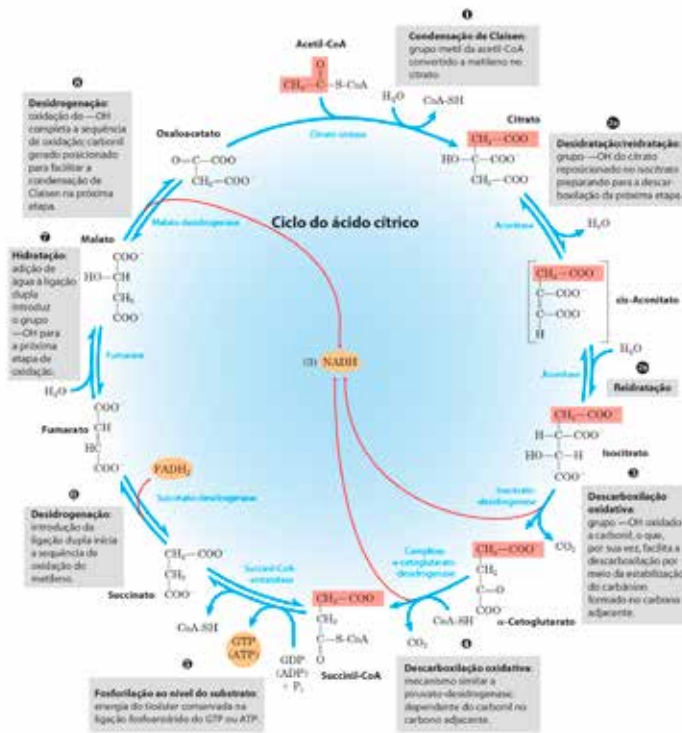


Figura 2. Ilustração do ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs, por meio do qual o piruvato, proveniente da glicólise, é metabolizado sob a ação de diversas enzimas, dentre as quais cinco desidrogenases, em energia (ATP), dióxido de carbono e água.

Fonte: Lehninger et al. (2014).

Ilustração: Thais Sofia Ribeiro Santos

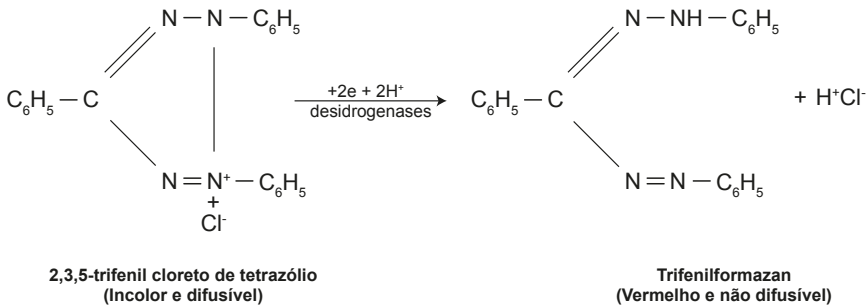


Figura 3. Reação de redução que resulta na coloração do sal de tetrazólio dentro de células vivas de sementes.

Fonte: adaptado de Peters (2007).

Quando o TCT é reduzido, formando o trifenílformazan, isto indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade celular e do tecido (Peters, 2007). Portanto, a coloração resultante da reação é uma indicação positiva da viabilidade através da detecção indireta da respiração a nível celular. Tecidos não viáveis não reagem e conseqüentemente não são coloridos.

Tecidos em respiração podem ser encontrados dentro do embrião de uma semente, em cotilédones, na radícula e nos tecidos do escutelo, em alguns tecidos nutritivos do endosperma, nos tecidos gametófitos femininos em gimnospermas, e na camada de células da aleurona no interior do pericarpo de gramíneas (Peters, 2007).

Sendo o tecido vigoroso, haverá a formação de um vermelho carmim claro; se o tecido está em deterioração, um vermelho mais intenso será formado, em virtude da maior intensidade de difusão da solução de TCT pelas membranas celulares comprometidas de tais tecidos; se o mesmo é não viável, a redução do sal não ocorrerá e o tecido morto contrastará como branco (não colorido) com o tecido colorido viável. A observação de tais diferenças de cor juntamente com o conhecimento de diversas características das sementes permitem a determinação da presença, da localização e da natureza dos distúrbios que podem ocorrer nos tecidos embrionários (Moore, 1973).

Equipamentos e materiais necessários

Para a realização do teste, são necessários os seguintes equipamentos, vidrarias e reagentes:

a) Reagente:

- Sal de tetrazólio: 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, normalmente comercializado em frascos com 10 g;

b) Artigos de plástico e vidro:

- Placas de Petri;
- Frasco de vidro (becker) ou copos de plástico (para cafezinho), com volume de 50 mL;

- Frasco de vidro, cor âmbar, para armazenar a solução de tetrazólio, que é fotossensível e se reduz com a luz;

Importante: não utilizar frascos metálicos, para evitar a redução da solução de tetrazólio em trifenílformazan, quando em contato com certos metais, conforme relatado por Bulat (1961).

- c) Lâmina de barbear ou de bisturi;
- d) Pinças;
- e) Estufa ou germinador, com temperatura de 35 °C a 41 °C;
- f) Lupa circular com aumento de 4X a 6X, com iluminação fluorescente, de preferência circular;
- g) Refrigerador para a armazenagem das amostras coloridas e das soluções de tetrazólio;
- h) Papel de germinação.

Amostragem e número de sementes

A amostra de trabalho deve ser representativa do lote e coletada conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009). Para o teste, as sementes devem ser obtidas de forma aleatória a partir do componente “Semente Pura” do teste de pureza, de acordo com as prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Caso o teste venha a ser realizado para fins oficiais, conforme prescrições das RAS (Brasil, 2009), deve-se utilizar 400 sementes, subdivididas em quatro repetições de 100 sementes ou oito repetições de 50. Opcionalmente, o teste poderá ser realizado em duas repetições de 100 sementes ou quatro de 50, totalizando 200 sementes.

No entanto, para o controle interno de qualidade ou para determinação do vigor, a utilização de 100 sementes (2 subamostras de 50 sementes cada) pode ser utilizada para o teste (Moore, 1973; França-Neto, 1981; França-Neto et al., 1985.; 1988, 1998d, 1999).

A razão para a utilização de um número reduzido de sementes para o teste de tetrazólio é devida às condições homogêneas a que as sementes são submetidas durante o seu preparo e o pré-condicionamento, o que normalmente não ocorre durante a execução do teste de germinação. Os resultados desse último teste podem ser afetados por várias fontes de variação, como gradientes de temperatura e de umidade no germinador, pH e textura do substrato (areia ou papel), às diferenças na quantidade de água adicionada ao substrato e à presença de certos fungos (*Phomopsis* spp. e/ou *Fusarium* spp.) infectando as sementes. Além disso, no teste de tetrazólio, cada semente é cuidadosamente avaliada individualmente, concentrando a atenção em os seus componentes internos e externos, o que normalmente não ocorre no teste de germinação.

Procedimento

Soluções de tetrazólio

Recomenda-se utilizar uma solução de tetrazólio na concentração de 0,075% (França-Neto et al., 1988; 1998), pois a mesma permite uma coloração adequada das sementes, propiciando a visualização com maior precisão de danos mecânicos recentes, causados por abrasão (danos mecânicos latentes), que normalmente não seriam detectados com o uso de soluções mais concentradas (0,5% a 1,0%), conforme sugerido na literatura internacional (AOSA, 1983; Delouche et al., 1962; Grabe, 1970; Moore, 1985; Leist et al., 2003). Além disso, a utilização de solução nessa concentração é mais econômica: com um vidro de 10 g do sal de tetrazólio pode-se testar a viabilidade de até 200 amostras de semente, utilizando a solução a 0,075%. Caso a solução utilizada tivesse a concentração de 1,0%, apenas 15 amostras poderiam ser avaliadas com 10 g do sal.

Nota: a Ficha de Dados de Segurança de Material (MSDS - *Material Safety Data Sheet*) do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio descreve e lista as propriedades toxicológicas do mesmo. Embora o sal de tetrazólio não seja considerado altamente tóxico e não apresente risco (especialmente quando diluído em concentrações líquidas de 1,0% ou menos), há protocolos específicos para o manuseio, uso e descarte de soluções de tetrazólio (Peters, 2007).

Prepara-se, inicialmente, a Solução Estoque a 1,0%, misturando 10,0 g do sal de tetrazólio em 1000 mL de água destilada ou deionizada, que deve ter um pH neutro, na faixa de 6,5 a 7,5. Se o pH da solução de tetrazólio, quando preparada em água, estiver muito ácida, devido às diferenças existentes entre as diversas marcas do sal disponíveis no mercado (Steiner, 1997c), o sal deverá ser dissolvido em uma solução tampão, preparada conforme as seguintes especificações (Moore, 1985; Brasil, 2009):

Solução tampão:

Solução 1 – dissolver 9,078 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4) em 1000 mL da água destilada ou deionizada;

Solução 2 – dissolver 11,876 g de fosfato monoácido de sódio bihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 1000 mL de água destilada, ou dissolver 9,472 g de Na_2HPO_4 em 1000 mL de água destilada ou deionizada.

Misturar 400 mL da Solução 1 com 600 mL da Solução 2, para obter 1000 mL da solução tampão, e observar o pH, que deve estar entre 6,5 e 7,5.

A semente de soja não é muito exigente em relação ao pH final da solução de tetrazólio, que normalmente é ácida, quando preparada com água. Para a avaliação do teste em culturas de cereais de inverno como o trigo, aveia, cevada, centeio e triticale, sugere-se que a solução de trabalho seja preparada com a solução tampão, conforme descrita acima.

Preparando-se a Solução Estoque do tetrazólio em água ou na solução tampão, a mesma deve ser armazenada em frasco de vidro ou de plástico de cor âmbar, ou em frascos envolvidos por filme de alumínio em local escuro e fresco, de preferência na geladeira. Isso deve ser realizado, pois o tetrazólio é degradado pela ação da luz. Segundo o Comitê de Tetrazólio da ISTA (dados não publicados), a solução de tetrazólio, se preparada com os cuidados mencionados acima, poderá ser armazenada por um período de até um ano, sem perder as suas características para a realização do teste.

A Solução de Trabalho, na concentração de 0,075%, deve ser preparada, quando necessário, seguindo as especificações abaixo, enfatizando-se que a mesma deve ser armazenada com os mesmos cuidados da Solução Estoque:

- 1000 mL de Solução de Trabalho a 0,075% = 75 mL Solução Estoque (1,0%) + 925 mL de água destilada ou deionizada (ou solução tampão).

Pré-condicionamento

As sementes devem ser embaladas em papel de germinação umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso seco e mantidas nestas condições por um período de 16 horas, à temperatura de 25 °C. Essa operação possibilitará a embebição lenta de água pelas sementes, ativando os processos de germinação. Para evitar a perda de umidade, as embalagens devem permanecer em câmara úmida, ou seja, em saco plástico, em dessecador com água em lugar de sílica-gel (Figura 4), ou em germinador.



Figura 4. Ilustração do pré-condicionamento das sementes de soja em papel de germinação: A. colocados em saco plástico, para evitar a desidratação do substrato; B. amostras acondicionadas em dessecador.

O pré-condicionamento do grau de umidade das sementes é de suma importância, visado a ativação dos mecanismos de respiração das sementes. As sementes de soja, quando em armazenagem, são organismos vivos e possuem atividades metabólicas, porém não respiram. O processo de respiração será ativado durante a embebição das sementes, somente a partir das mesmas atingirem 25% de água, conforme relatado por Vertucci e Leopold (1987). Devido a isso, é importante que no processo de pré-condicionamento das sementes, o seu grau de umidade atinja valores acima desse índice. Costa e Marcos-Filho (1994) e Costa et al. (1998) reportam que o grau de umidade das sementes após o pré-condicionamento deva atingir valores mínimos de 33% para assegurar a total ativação dos processos respiratórios nos tecidos das sementes de soja.

No caso de sementes maiores, observar que as mesmas tenham atingindo esse porcentual mínimo de água, para que ocorra uma perfeita coloração na

solução de tetrazólio. Para essas sementes, pode ser necessário um período maior de pré-condicionamento.

Os tegumentos de sementes escuras de soja normalmente não permitem a rápida difusão da solução de tetrazólio. Caso problemas com a difusão da solução de tetrazólio nessas sementes sejam detectados, o tegumento das mesmas deve ser removido antes do processo de coloração.

Caso haja a necessidade de maior rapidez no processo de pré-condicionamento, pode-se utilizar a metodologia alternativa, sugerida por Costa e Marcos-Filho (1994), Costa et al. (1998; 2008), realizando-se o pré-condicionamento por 6 horas a uma temperatura de 41 °C, o que representa um ganho de 10 horas no preparo das sementes, sem que haja perda de precisão dos resultados.

Observação importante: os danos por sensibilidade à embebição rápida que podem ocorrer no teste de germinação em plântulas de soja, conforme descritos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), podem também ocorrer durante o preparo das sementes para o teste de tetrazólio. Normalmente esses danos ocorrem quando o grau de umidade das sementes está abaixo de 12% (França-Neto et al., 1998a; Toledo et al., 2010). Nas plântulas, os sintomas desse tipo de dano são detectados pela presença de anormalidades no sistema radicular: raízes encurtadas ou ausentes. Nas sementes coloridas pela solução do sal de tetrazólio, os sintomas ocorrem nas extremidades das radículas, com danos vermelhos escuros, que podem ser confundidos com danos mecânicos ou deterioração por umidade (Figura 5).

Quando esses sintomas são encontrados nas sementes, sugere-se realizar os mesmos procedimentos, conforme descritos na Instrução Adicional número 70, pg. 222 das RAS (Brasil, 2009): realizar o pré-condicionamento das sementes, em “gerbox” com tela (do tipo utilizado no teste de envelhecimento acelerado), contendo 40 mL de água (Figura 6), pelo período de 16-24 horas a 25 °C; após o pré-condicionamento, as sementes são pré-condicionadas em papel de germinação umedecido (Figura 4), conforme mencionado acima.



Foto: José de Barros França-Neto

Figura 5. Danos de embebição rápida detectados em sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio: note a presença de danos vermelho intenso nas extremidades das radículas.



Foto: José de Barros França-Neto

Figura 6. Pré-condicionamento das sementes em “gerbox” com tela, contendo 40 mL de água, pelo período de 16-24 horas a 25 °C; após o pré-condicionamento, as sementes são pré-condicionadas em papel de germinação umedecido.

Coloração

Após o pré-condicionamento, as sementes são colocadas em frascos béquer ou copinhos de plástico, sendo totalmente submersas na solução de tetrazólio (0,075%). As sementes devem permanecer assim a uma temperatura de 35 °C a 40 °C por aproximadamente 150 a 180 minutos. Esta temperatura pode ser obtida utilizando-se uma estufa ou um germinador. É bom ressaltar que esta operação deve ser realizada no escuro, uma vez que a solução de tetrazólio é sensível à luz (Lakon, 1949).

Lavagem da amostra

Alcançada a coloração ideal, as sementes são lavadas com água corrente comum e devem ser mantidas submersas em água até o momento da avaliação, para evitar desidratação das mesmas (Figuras 7 e 8). Caso as amostras não sejam avaliadas de imediato, devem ser mantidas em refrigerador, por até 12 horas.

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 7. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, após lavagem em água comum, prontas para serem avaliadas.



Foto: José de Barros França-Neto

Figura 8. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, após lavagem em água comum, prontas para serem avaliadas.

Interpretação

Apesar de não utilizar equipamentos e reagentes caros, o teste requer que o analista de sementes seja bem treinado nas técnicas do teste. É básico o conhecimento das estruturas anatômicas da semente pelo analista. Experiência, imaginação e julgamento crítico são também necessários para que o analista possa visualizar os tipos de anormalidades de plântulas que são revelados pelo teste de tetrazólio. A precisão do teste depende do conhecimento de todas as técnicas e procedimentos envolvidos.

Conforme mencionado por Moore (1985), há três objetivos básicos na avaliação das sementes: a) determinar o potencial de germinação de um lote de sementes sob as condições mais ideais possíveis; b) categorizar as sementes em diferentes classes de viabilidade, visando à determinação da classificação do vigor; e c) diagnosticar as possíveis causas que resultam na perda de viabilidade das sementes. Os dois primeiros objetivos podem ser alcançados pela interpretação de quatro características básicas: condição dos tecidos (firmes ou flácidos) e cor dos mesmos, e pela localização e tamanho das

lesões nas sementes. A habilidade do analista de sementes em reconhecer os sintomas típicos dos diferentes tipos de danos que podem ocorrer nas sementes é imperativo para a obtenção do diagnóstico correto das causas de perda de viabilidade.

Para que a interpretação se torne menos cansativa, sugere-se que seja efetuada sob lupa de seis aumentos (6 X), com iluminação fluorescente. As sementes devem ser avaliadas uma a uma, seccionando-as longitudinalmente através do centro do eixo embrionário (Figura 9), com o auxílio de uma lâmina de barbear. Atenção deve ser dada para que se seccione o eixo embrionário exatamente em sua parte central. Porém, caso o corte não seja bem centralizado, a avaliação da condição do eixo embrionário deve ser realizada na metade que contenha a maior parte do eixo, expondo-se o seu cilindro central, após cortes adicionais.

Ilustração: Thais Sofia Ribeiro Santos

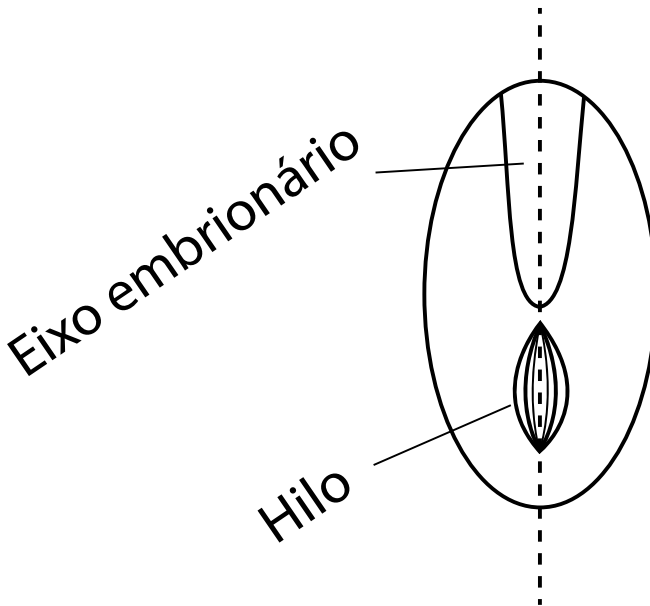


Figura 9. Ilustração do local de corte longitudinal da semente de soja, orientado através da parte central do eixo embrionário e do hilo.

Para aumentar o rendimento na realização das análises no laboratório, sugere-se que o analista que realizará a avaliação do teste, já receba as sementes previamente seccionadas por outro laboratorista, mantidas sob uma camada de água para evitar a sua desidratação (Figura 10).



Foto: José de Barros França-Neto

Figura 10. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio, previamente seccionadas.

Após o seccionamento da semente, as suas metades são abertas, sendo o tegumento removido para que a superfície externa dos cotilédones venha a ser exposta. O analista deve observar as superfícies externa e interna dos cotilédones, procurando por todos os tipos de danos.

Cuidados especiais devem ser tomados durante a avaliação do eixo embrionário, que é composto por dois tipos de tecidos: o **córtex** e o **cilindro central** (Figura 11). O cilindro central é a estrutura mais crítica do eixo embrionário. Como uma regra geral, caso um dano venha a ocorrer nesse eixo, mas não é suficientemente profundo para danificar o cilindro central, a semente pode então ser considerada viável. Entretanto, se o dano atingir o cilindro central, a semente será considerada não viável (Figura 12).

Foto: José de Barros França-Neto

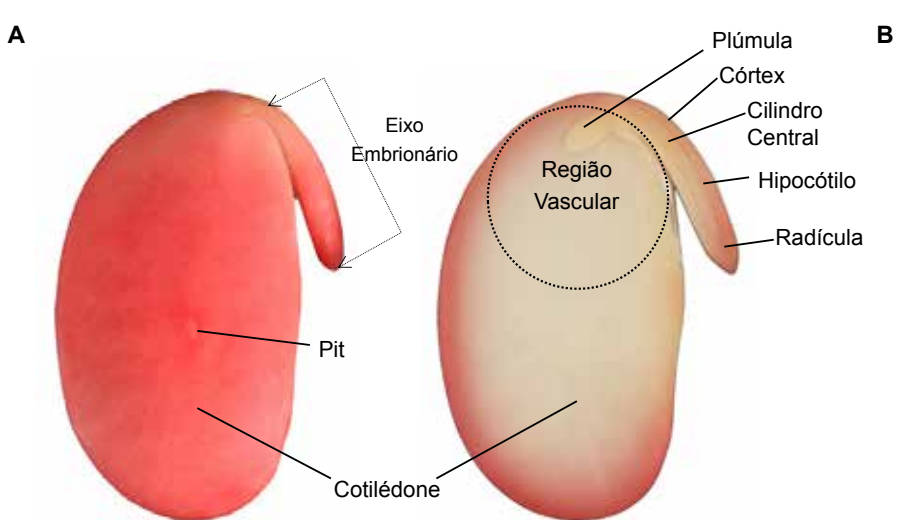


Figura 11. Estruturas de uma semente de soja de alta qualidade, após embebição e coloração pelo tetrazólio, com o tegumento removido; A. face externa da semente; B. face interna, ilustrando o padrão de difusão da coloração do tetrazólio; região vascular circundada por linha pontilhada.

Ilustração: Thais Sofia Ribeiro Santos

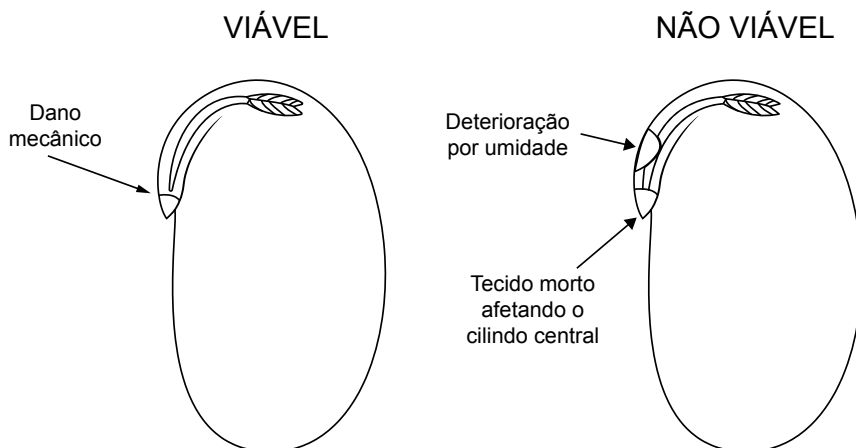
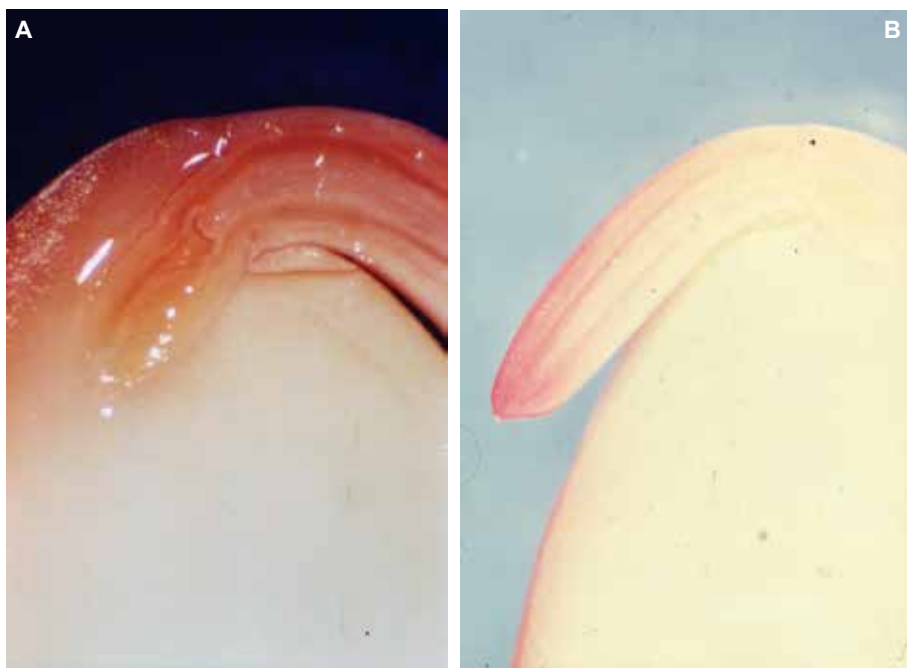


Figura 12. Corte longitudinal de duas sementes de soja, mostrando a ocorrência de danos no eixo embrionário; esquerda: dano em região crítica, sobre a radícula, mas sem atingir o cilindro central: semente viável; direita: mesmo dano em maior extensão, atingindo o cilindro central da radícula; além de dano no hipocótilo com profundidade maior que metade da extensão do cilindro central: semente não viável.

Além do cilindro central, outra região crítica na semente de soja, que deve ser observada com muita atenção, é a **região vascular** (Figuras 11 e 13), que se situa no terço superior dos cotilédones, próxima à inserção do eixo embrionário. Através dessa região passam os vasos que conectam o eixo embrionário aos cotilédones (Figura 14), sendo, portanto, de suma importância para o transporte de materiais de reserva dos cotilédones à plântula em desenvolvimento, nas fases iniciais de germinação e emergência. Caso tal região venha a ser afetada por algum tipo de dano, o vigor e/ou a viabilidade da semente poderão ser comprometidos.

Outro fator que deve ser observado é a diferenciação de cores dos tecidos:

- Vermelho carmim: tecido vivo e vigoroso
- Vermelho carmim forte: tecido em deterioração
- Branco leitoso: tecido morto.



Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 13. Detalhes da região vascular, eixo embrionário e plúmula; A. note a plúmula e região meristemática apical; B. diferenciação do cilindro central e do córtex do eixo embrionário (embrionário).

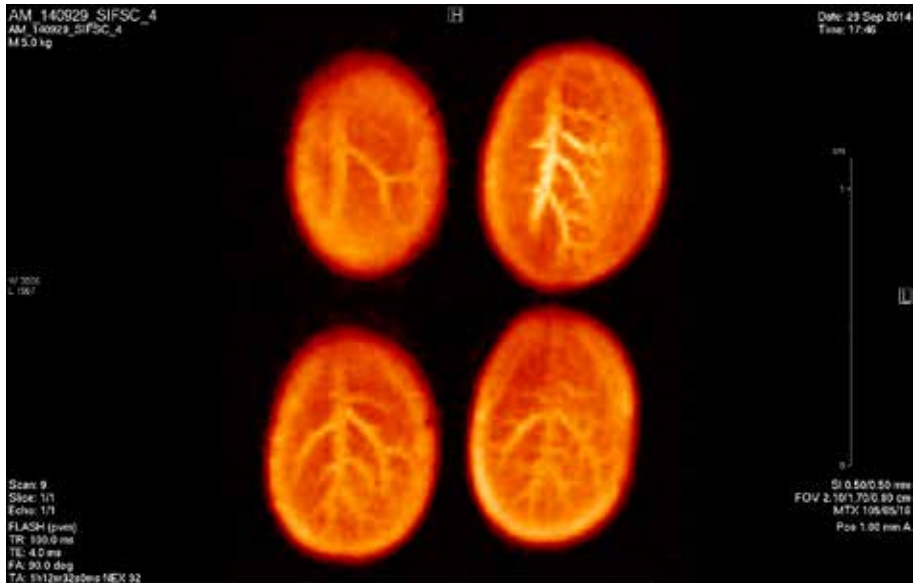


Figura 14. Foto de ressonância magnética de sementes de soja, ilustrando os vasos cotiledonares.

De acordo com Moore (1985), tecidos vigorosos tendem a colorir gradualmente e uniformemente da sua superfície para o interior; quando embebidos, apresentando-se túrgidos (Figuras 11 e 15). A ocorrência de vermelho intenso é característica de tecidos em deterioração, que permitem uma maior difusão da solução de tetrazólio através de suas membranas celulares já comprometidas. Quando expostos ao ar, tais tecidos perderão a turgidez mais rapidamente que os tecidos vigorosos. O branco identifica tecidos mortos, que não apresentam a atividade enzimática necessária para a produção do trifenílformazan. Tecidos mortos normalmente são flácidos e apresentam a coloração branco-opaca, mas podem ser amarelados, cinzentos ou esverdeados, principalmente quando sofreram danos causados por percevejos. Em algumas raras situações, tecidos mortos podem apresentar manchas avermelhadas, causadas por atividades de certos fungos ou bactérias. Entretanto, tais tecidos são facilmente diferenciados de tecidos viáveis, por serem extremamente flácidos e friáveis.

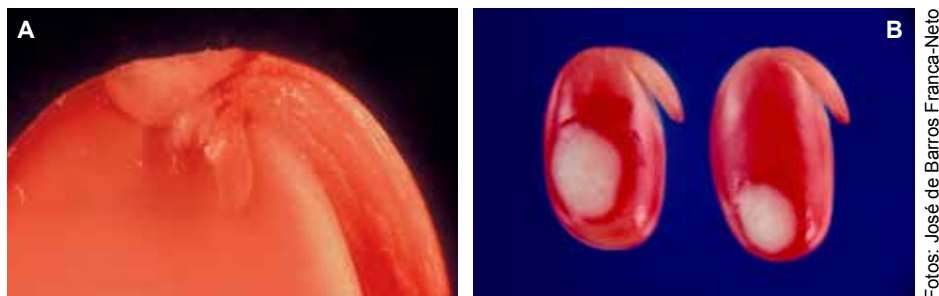


Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 15. Semente de soja de alto vigor (Classe 1), colorida pela solução do sal de tetrazólio; A. face externa dos dois cotilédones; B. face interna dos cotilédones.

Deve-se enfatizar que após o seccionamento das sementes, as superfícies internas dos cotilédones são normalmente descoloridas (brancas), devido à falta de difusão da solução de tetrazólio às suas camadas mais profundas (Figuras 11 e 15). Moore (1985) caracteriza os tecidos viáveis, que não coloriram, como normalmente túrgidos, brilhantes, apresentando tonalidades branco-rosadas ou branco-amareladas.

A posição e a extensão dos danos que ocorrem nas sementes são características de importância crucial para a correta avaliação das mesmas e devem ser consideradas em combinação. Por exemplo, uma pequena lesão causada por percevejo, que danifica o hipocótilo, atingindo o cilindro central, resultará em consequências mais sérias que uma lesão de grande extensão, localizada na metade inferior de um cotilédone, longe do eixo embrionário e da região vascular (Figura 16).



Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 16. Sementes de soja coloridas pela solução de tetrazólio; A. ilustra pequeno dano causado por percevejo próximo à região vascular e plúmula; B. danos de grande extensão causados por percevejo em região inferior dos cotilédones.

Diagnóstico das causas da deterioração da semente de soja

Vários fatores afetam a qualidade da semente de soja. Os principais, conforme descrito por Moore (1960; 1962a; 1973) e por França-Neto (1984), França-Neto et al. (1998d; 2016) e Craviotto et al. (1995; 2008a) são danos mecânicos, deterioração por umidade, danos causados por percevejos, danos por seca e altas temperaturas, danos de secagem e danos de geada. Cada tipo de dano está associado com lesões características, que são descritas resumidamente a seguir.

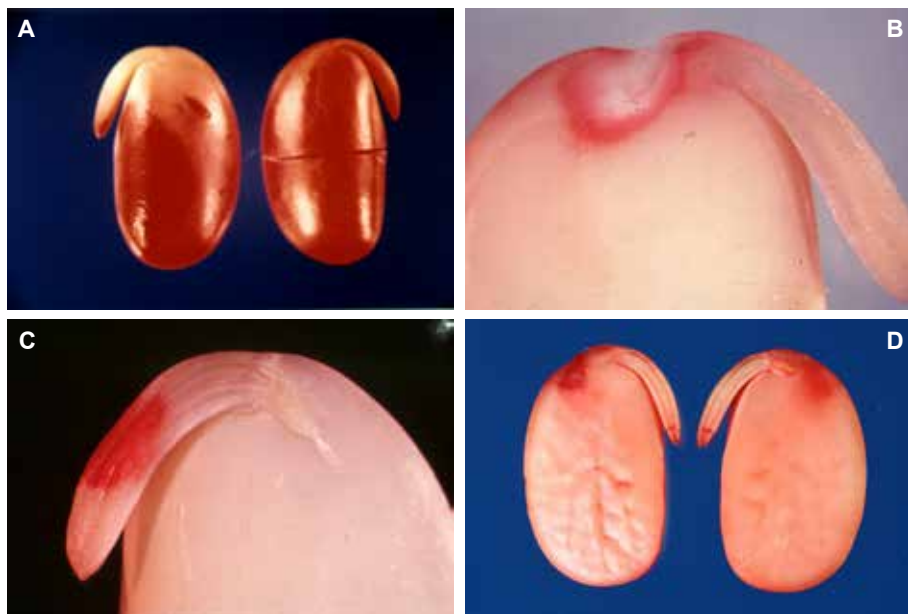
Danos mecânicos

Resultam de impactos físicos durante as operações de colheita, trilha, secagem, beneficiamento, transporte e semeadura das sementes de soja. Há dois tipos de danos mecânicos que são facilmente identificados pelo teste de tetrazólio (França-Neto et al., 2016): danos mecânicos imediatos (Figura 17), caracterizados pela presença de rachaduras e trincas nas sementes, resultantes de impactos das sementes nos sistemas de trilha e transporte na colhedora quando a semente é colhida muito seca (graus de umidade abaixo de 12%); e danos mecânicos latentes, caracterizados por abrasões e amassamentos nas sementes, resultantes de impactos sofridos pelas sementes mais úmidas (graus de umidade acima de 14%); esse último é identificado pela presença de lesões de coloração vermelho escura, caso tenham ocorrido recentemente, ou por lesões brancas com tecidos flácidos, se não recentes. Danos mecânicos latentes podem evoluir durante a armazenagem (Moreano et al., 2011). Um analista inexperiente pode confundir o pit (Figura 11) com lesões de danos mecânicos latentes. O pit é uma depressão na superfície externa dos cotilédones, composto por um grupo de células especializadas, em oposição direta ao antipit do tegumento, que é uma camada de células na superfície ventral do tegumento (Yaklich et al., 1984; 1986). Sementes com lesões de danos mecânicos imediatos e latentes, conforme caracterizadas no teste de tetrazólio, estão ilustradas nas Figuras 18 e 19.



Foto: José de Barros França-Neto

Figura 17. Sementes de soja com sintomas típicos de danos mecânicos imediatos.



Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 18. Sementes de soja com sintomas de danos mecânicos após a coloração com a solução de tetrazólio. A. esquerda: dano mecânico latente; direita: dano mecânico imediato; B. dano mecânico imediato na região da plúmula; C. dano mecânico latente no eixo embrionário, atingindo o córtex e o cilindro central; D. dano mecânico latente na região de inserção do eixo embrionário aos cotilédones, afetando a plúmula; e dano mecânico imediato (trinca) na radícula.

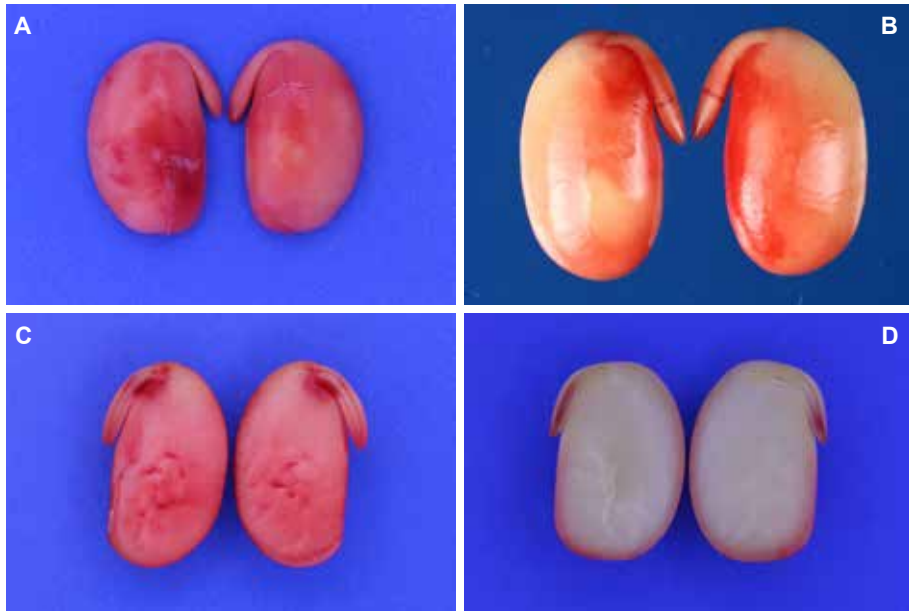


Figura 19. Sementes de soja com sintomas de danos mecânicos após a coloração com a solução de tetrazólio; A. dano mecânico imediato nos cotilédones; B. dano mecânico imediato na radícula; C. dano mecânico latente na região de inserção do eixo embrionário e hipocótilo; D. dano mecânico latente no eixo embrionário.

Deterioração por umidade

Conforme descrita por Moore (1973), Pereira e Andrews (1976) e França-Neto (1984), resulta da exposição das sementes de soja a ciclos alternados de condições ambientais úmidas e secas na fase final de maturação, antes da colheita (Figura 20). Tais danos apresentam uma maior magnitude, caso ocorram em ambientes quentes, típicos de regiões tropicais e subtropicais. Sementes com deterioração por umidade apresentam rugas características nos cotilédones (Figura 21), na região oposta ao hilo, ou sobre o eixo embrionário. Rupturas no tegumento (Figura 21) também estão associadas com esse tipo de dano. Após a coloração, essas sementes revelarão a presença de lesões de coloração vermelho intensa ou branco leitosa sobre os tecidos embrionários adjacentes a tais rugas. Frequentemente, tais lesões estão associadas com a infecção por certos fungos, como *Phomopsis* sp., *Fusarium pallidoroseum* (*F. semitectum*) e *Cercospora kikuchii*. As lesões podem ser profundas e caso o cilindro central esteja danificado, ou se mais de 50% dos tecidos de reserva dos cotilédones

estiverem deteriorados, a semente é considerada não viável. A deterioração por umidade apresenta uma característica muito típica, que é a simetria das lesões em ambos os cotilédones da semente (Figuras 22 e 23).

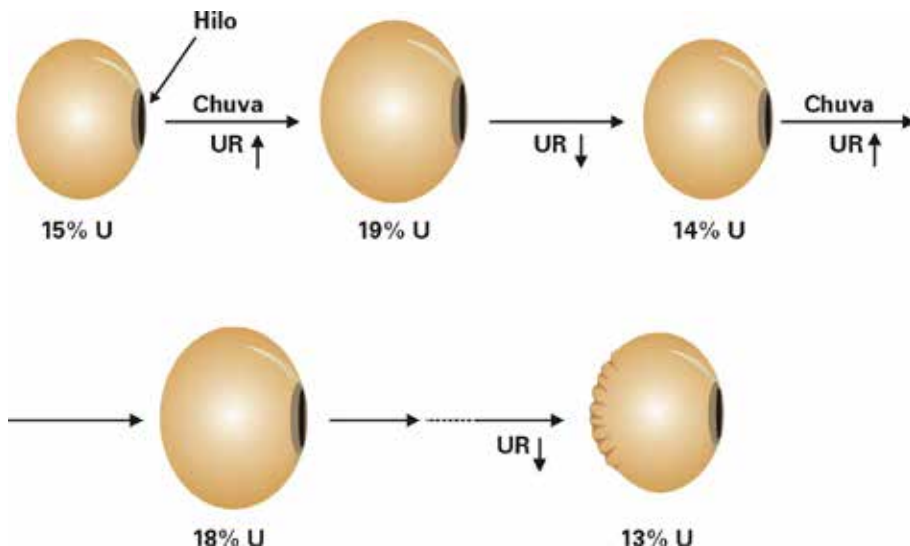


Figura 20. Processo de alterações físicas, devido à oscilação do teor de água da semente de soja em função das condições de umidade ambiental, que resultam no aparecimento de rugas na semente de soja, características da deterioração por umidade.

Fonte: França-Neto et al. (2016).



Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 21. Sementes de soja com sintomas típicos de deterioração por umidade; A. sementes secas com enrugamento devido a esse tipo de dano; B. sementes de soja com rupturas no tegumento.

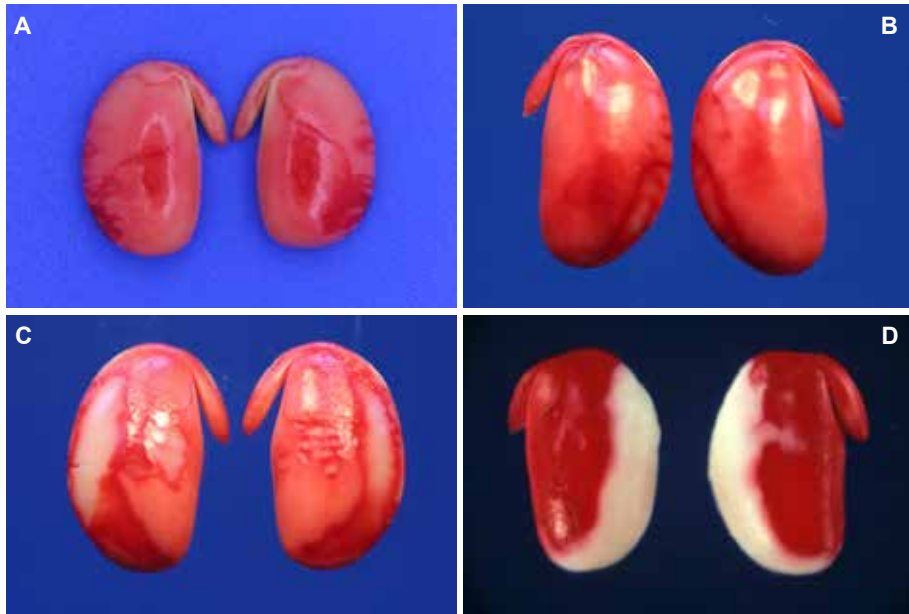
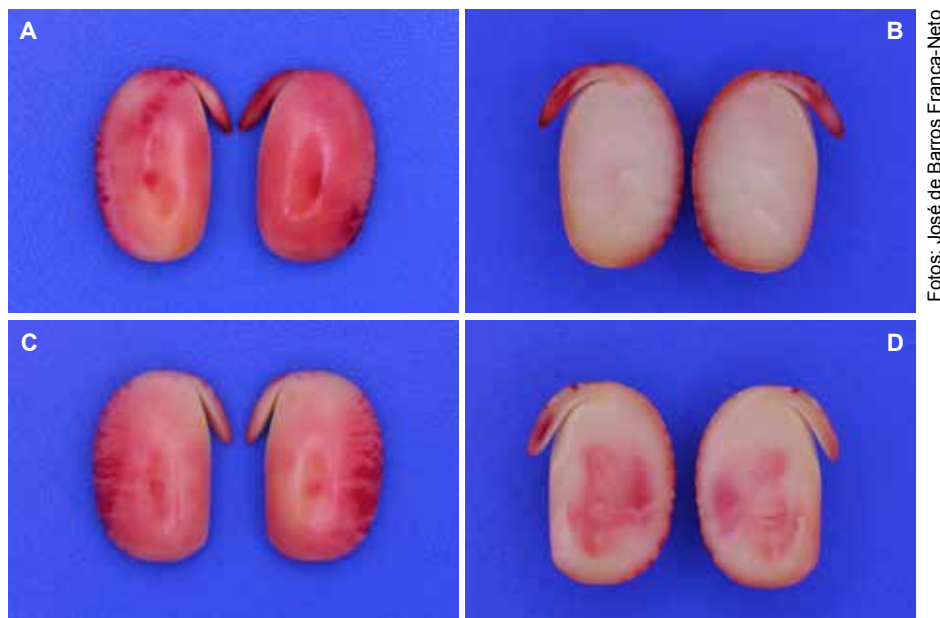


Figura 22. Sementes de soja com sintomas de deterioração por umidade, após a coloração com a solução de tetrazólio; notar a simetria dos danos em ambos os cotilédones. A. e B. lesões recentes; C. e D. lesões mais severas, após evolução na armazenagem.

Os danos por umidade nos eixos embrionários (Figuras 23B e 23D) são progressivos, da parte externa para a interna dos tecidos. Esses danos muitas vezes são confundidos por danos mecânicos latentes, quando as lesões são observadas apenas internamente às sementes; porém a característica de progressão do dano ajuda na correta identificação do tipo do dano. Ressalta-se a importância de sempre avaliar com atenção ambas as faces das sementes.

Assim como o dano mecânico latente, as lesões de deterioração por umidade também evoluem durante o armazenamento. Entretanto, a deterioração por umidade evolui numa taxa mais acentua em relação a qualquer outro tipo de dano (Moreano et al., 2011). Tal intensificação dependerá das condições de temperatura e de umidade relativa do ar durante o armazenamento: condições quentes e úmidas resultarão em severa deterioração. Como consequência dos processos de evolução desses danos na armazenagem, poderão ocorrer severas reduções de germinação e de vigor, principalmente nos meses finais do armazenamento.



Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 23. Sementes de soja com sintomas de deterioração por umidade, após a coloração com a solução de tetrazólio; notar a simetria dos danos em ambos os cotilédones. A. face externa de semente com danos por umidade nos cotilédones e eixo embrionário; B. face interna da mesma semente que em “A”, mostrando dano por umidade nos cotilédones e dano severo no eixo embrionário; C. face externa de semente com danos por umidade aparentemente superficiais nos cotilédones e eixo embrionário; D. face interna da mesma semente, mostrando dano severo na parte interna do eixo embrionário.

Os sinais de deterioração por umidade podem caracterizar tanto problemas de intempéries em pré-colheita, quanto problemas de armazenagem inadequada. Quando são observados elevados índices desse dano, para se diagnosticar com precisão se o problema foi originado no campo ou durante o armazenamento, realiza-se um teste de patologia de sementes, por exemplo o teste de papel de filtro (“blotter test”). A constatação de altos índices de fungos de armazenagem, como o *Aspergillus flavus* ou o *Penicillium* spp., caracteriza problemas de armazenagem; elevada infecção por fungos de campo, como *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., ou *Cercospora kikuchii*, caracteriza a deterioração no campo.

Danos de percevejo

Podem afetar seriamente a qualidade da semente de soja. Dentre as diversas espécies desse inseto, o percevejo verde *Nezara viridula* (L.) tem ocorrência generalizada na maioria das regiões produtoras de soja (Turnipseed; Kogan, 1976). Outras espécies, como *Piezodorus guildini* (Westwood), *Dichelops melacanthus* (Dallas) e *Euschistus heros* (Fabricius), podem também causar sérios danos às sementes. Ao se alimentar das sementes de soja, o percevejo as inocula com a levedura *Nematospora coryli* Peglion (Sinclair, 1982), que irá, então, colonizar os tecidos das sementes, deteriorando-os, o que resulta em severas reduções de vigor e de viabilidade (Bowling, 1980; Villas Bôas et al., 1982; Bueno et al., 2015). Essa infecção, associada com a ação de enzimas salivares do inseto, resulta em lesões circulares características, muitas vezes enrugadas e profundas (Figura 24).

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 24. Sementes de soja com danos causados por picada de percevejo, com danos típicos mostrando manchas de *Nematospora coryli*.

Os tecidos lesionados são mortos e flácidos, mostrando no teste de tetrazólio a lesão circular típica de dano de percevejo, com tecido morto no centro, de coloração branca leitosa, circundado por um anel de tecido em deterioração, de coloração vermelha intensa, que separa, na maioria dos casos, os tecidos mortos dos vigorosos. As lesões também podem ser também esverdeadas,

amareladas ou acinzentadas (Figuras 25 e 26). A extensão das lesões dependem do grau de umidade das sementes no momento da ocorrência da picada.

Lesões múltiplas podem ocorrer numa única semente e caso haja sobreposição das mesmas, o sintoma circular típico não será distinguível. Com frequência, uma pequena perfuração causada pelo inseto pode ser observada no centro das lesões circulares. Puncturas profundas podem ocorrer, resultando na inoculação dos tecidos centrais das sementes pelo fungo *N. coryli*. Tais lesões nem sempre podem ser observadas na superfície externa das sementes.

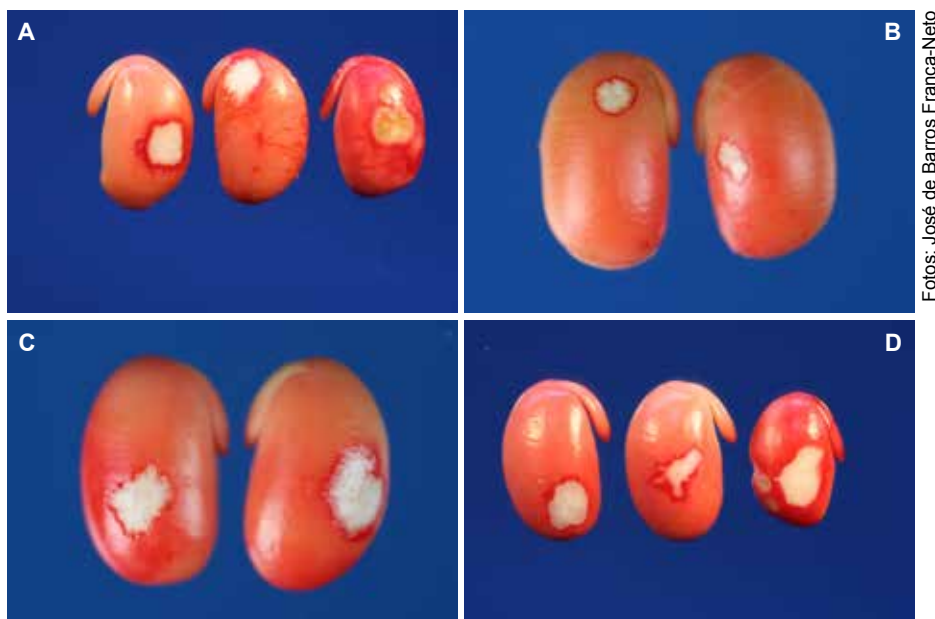


Figura 25. Sementes de soja com lesões típicas de danos causados por percevejos após coloração com a solução de tetrazólio. A. e B. lesões circulares, típicas desse dano; C. duas picadas na mesma semente, uma em cada cotilédone; D. diferentes tipos de lesões.

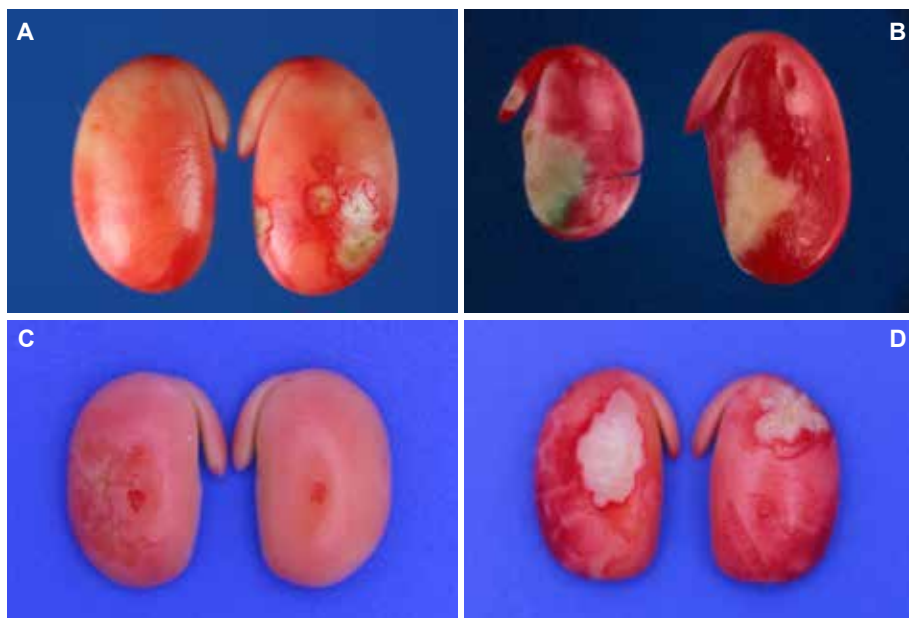


Figura 26. Sementes de soja com lesões típicas de danos causados por percevejos após coloração com a solução de tetrazólio. A e B. lesões amareladas ou esverdeadas; C. lesão recente de percevejo; D. múltiplas picadas de percevejo na mesma semente.

Danos por seca e altas temperaturas

Podem ser observados em sementes de algumas cultivares de soja (Figura 27), quando altas temperaturas (acima de 30 °C), associadas com períodos de baixa disponibilidade hídrica (seca), ocorrem durante a fase de enchimento de grãos (França-Neto et al., 1993). Os sintomas são variáveis: a lesão típica pode ser caracterizada pela presença de uma covinha nos cotilédones até o completo enrugamento das sementes. Algumas sementes produzidas sob tais condições de estresse podem tornar-se impermeáveis à água. Sementes com sintomas superficiais desse tipo de dano (covichas), após a coloração, podem apresentar lesões vermelho escuras ou brancas que podem ser confundidas com deterioração por umidade. A constatação dessas covinhas nas sementes secas pelos analistas evitará que interpretações errôneas desse tipo venham a ocorrer. Sementes enrugadas, após a coloração, podem ser deformadas e apresentam manchas vermelho escuras e esbranquiçadas espalhadas sobre os cotilédones, com maior concentração das mesmas na

região próxima ao eixo embrionário. Os tecidos mortos são flácidos e friáveis. Sementes severamente enrugadas normalmente não germinam em função da desintegração dos tecidos do eixo embrionário e das regiões superiores dos cotilédones.



Figura 27. A. sementes de soja com sintomas de enrugamento, causado por estresses de altas temperaturas e seca durante a fase de enchimento de grãos; B. sementes com esses sintomas, após coloração com a solução de tetrazólio; C. idem, associadas com deterioração por umidade.

Danos de secagem excessiva são consequência da secagem das sementes a graus de umidade abaixo de 10,0%. São caracterizados pela constatação de elevados índices de sementes de soja com trincas transversais nos cotilédones, sempre na mesma posição (Figura 28). Quando a semente de soja é secada excessivamente, ela está sujeita a quebrar preferencialmente nessa posição, quando exposta a um impacto mecânico.



Foto: José de Barros França-Neto

Figura 28. Sementes de soja com danos característicos de excesso de secagem, após coloração pela solução de tetrazólio.

Sementes de soja esverdeadas

São originadas quando ocorre morte prematura das plantas, devido a um estresse abiótico, como a seca, ou biótico, como uma ferrugem mal controlada ou uma enfermidade de raiz, como a fusariose (Figuras 29 e 30). Nessa situação, as sementes sofrem um processo de maturação forçada e, quando sob elevadas temperaturas ($\geq 30^{\circ}\text{C}$), as enzimas responsáveis pela degradação da clorofila (magnésio quelatase e clorofilase) não são ativadas, resultando na formação de sementes normalmente menores e esverdeadas (França-Neto et al., 2012). Sementes esverdeadas apresentam sérios problemas de qualidade fisiológica, pois seu vigor e germinação são afetados negativamente.

Danos por geada em sementes de soja, conforme descritos por Moore (1973), são mais comuns em regiões de clima temperado. A expressão desse tipo de dano depende do estágio de desenvolvimento das sementes, da temperatura e do período de exposição das mesmas às condições de baixa temperatura. Sementes imaturas geralmente morrem e permanecem verdes (Figura 30) com exposição a geadas. Por outro lado, sementes secas e já maduras resistem bem a esse tipo de estresse. Os tecidos danificados são identificados

no teste de tetrazólio pela coloração de eixos embrionários num vermelho carmim mais intenso e pela presença de um precipitado vermelho que se acumula nos tegumentos e na solução de tetrazólio. Tecidos danificados por geadas podem apresentar uma coloração vermelha com tons esverdeados ou marrons (Osorio, 1987).



Foto: Danilo Estevão

Foto: José de Barros França-Neto

Figura 29. A. Sementes esverdeadas de soja, resultantes da ocorrência de seca e altas temperaturas durante a fase final de enchimento de grão; B. sementes de soja esverdeadas e amarelas, com ilustração da coloração das mesmas com solução de tetrazólio.



Foto: José de Barros França-Neto

Figura 30. Semente de soja com sintomas de danos causados por geada, após coloração pela solução de tetrazólio.

Mais de um tipo de dano pode ocorrer em uma única semente: pode-se ter a combinação de danos por deterioração por umidade com dano mecânico, de deterioração por umidade com dano de percevejo, de dano mecânico com

dano de percevejo e de deterioração por umidade com dano mecânico e dano por percevejo numa mesma semente. (Figura 31).

A caracterização dos fatores que afetam a qualidade da semente de soja pode parecer complexa no início. Porém, com um bom treinamento e experiência, o analista de sementes poderá reconhecer e diferenciar com facilidade tais sintomas.

Fotos: José de Barros França-Neto

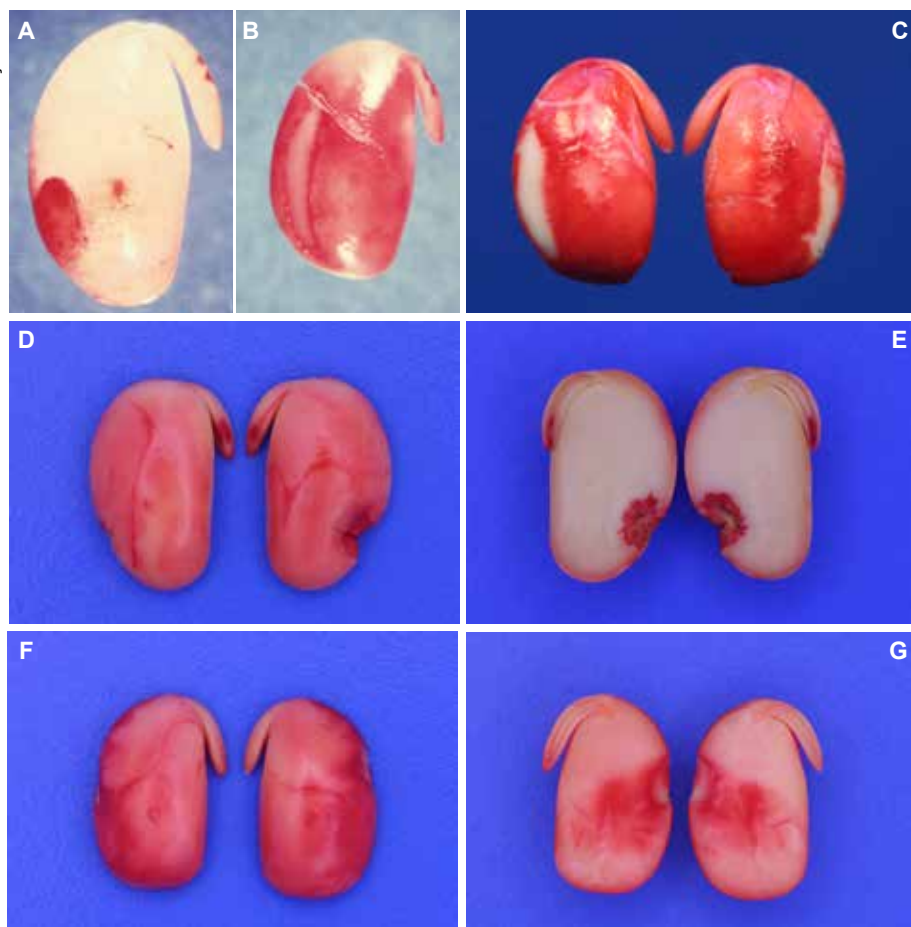


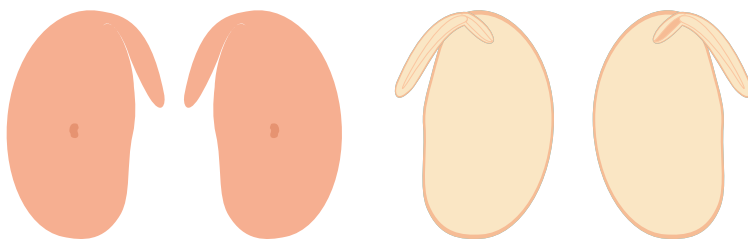
Figura 31. Sementes de soja com lesões de diferentes tipos de danos na mesma semente. A. dano por umidade com dano mecânico latente; B. dano por umidade com dano mecânico imediato; C. dano mecânico imediato com dano por umidade; D. dano de percevejo nos cotilédones, deterioração por umidade nos cotilédones e dano mecânico latente no eixo embrionário; E. face interna da mesma semente com os três tipos de dano; F. dano por umidade e dano mecânico imediato, ambos nos cotilédones; G. face interna da semente anterior com os dois tipos de dano.

Identificação da viabilidade e dos níveis de vigor

O teste de tetrazólio baseia-se na análise da condição de cada semente individualmente. Cada semente é classificada como viável ou não viável e os tipos de danos são anotados. Moore e Smith (1956), citados por Copeland et al., (1959) e Moore (1961; 1962b; 1967a; 1967b) definiram um sistema de classificação para sementes de milho e de soja, onde cada semente era qualificada nas classes de 1 a 5, caso viáveis, e de 6 a 8, se não viáveis. A presença, a localização e o tipo do dano, além das condições físicas das estruturas embrionárias, são utilizadas nesse sistema de classificação. Tal metodologia foi modificada e descrita em detalhes para sementes de soja por França-Neto et al. (1985; 1988; 1998d; 1999).

A seguir, é apresentada uma classificação de vigor em sementes de soja. Os aspectos apresentados nas ilustrações são, na experiência dos autores, considerados os mais comuns. Cada diagrama representa uma semente que foi seccionada longitudinalmente. A superfície externa da semente é ilustrada à esquerda e a interna à direita.

Ilustrações típicas de cada uma das oito classes estão contidas em diversas fotos no Apêndice dessa publicação.

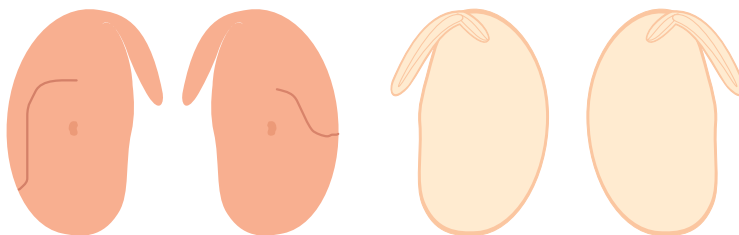
Classe 1: viável; mais alto vigor

1a. As sementes são caracterizadas pela coloração uniforme e superficial, devido à penetração lenta da solução do sal de tetrazólio; a parte interna (entre os cotilédones) não apresenta coloração, salvo nos bordos; todos os tecidos com aspectos normal e firme (Figuras 11, 15 e 32).

Fotos: José de Barros França-Neto



Figura 32. Semente de soja de alto vigor (Classe 1). A. face externa; B. face interna.

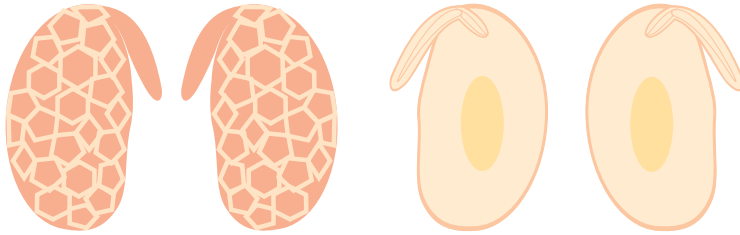


1b. As sementes possuem as mesmas características como ilustradas em **1a**, exceto a ocorrência de uma ou duas estrias mais intensamente coloridas por cotilédone (Figura 33). As estrias são superficiais (um a dois décimos de milímetro de profundidade) e são o resultado dos primeiros estágios de penetração de água durante o processo de deterioração por umidade.

Foto: José de Barros França-Neto



Figura 33. Semente de soja de alto vigor (Classe 1) com a presença de estrias que caracterizam o início de ocorrência do processo de deterioração por umidade.



1c. Semente cuja coloração tem o aspecto de mosaico devido a um processo lento de embebição (Figura 34); os tecidos se apresentam firmes e na face interna dos cotilédones, podendo aparecer uma cavidade central de coloração amarelada, indicando insuficiente absorção de água. Pode ocorrer em sementes semi-permeáveis. Tais sintomas podem também estar relacionados a uma embebição inadequada durante o pré-condicionamento, ou devido ao uso de sementes com grau de umidade muito baixo.

Foto: José de Barros França-Neto

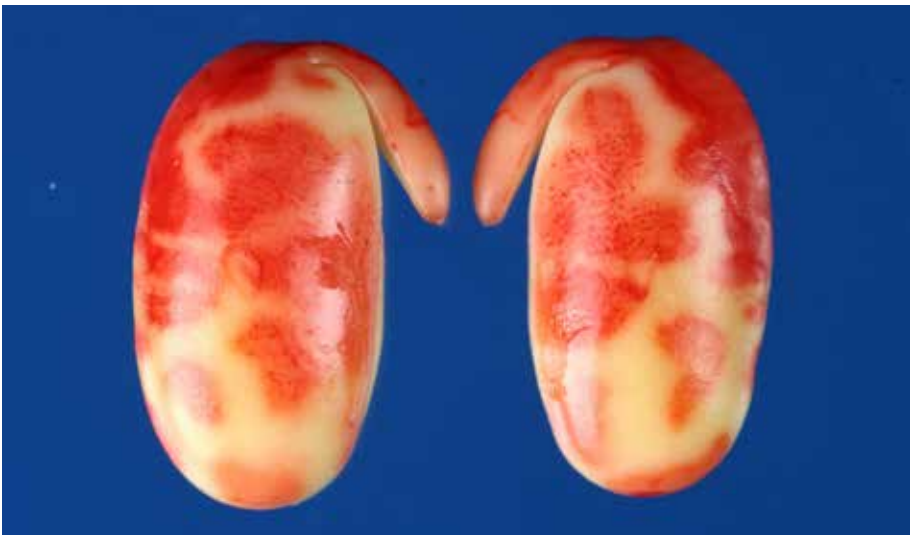
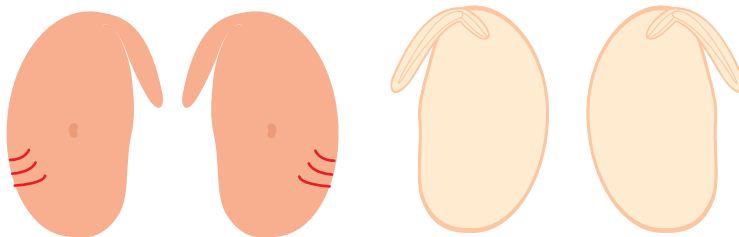
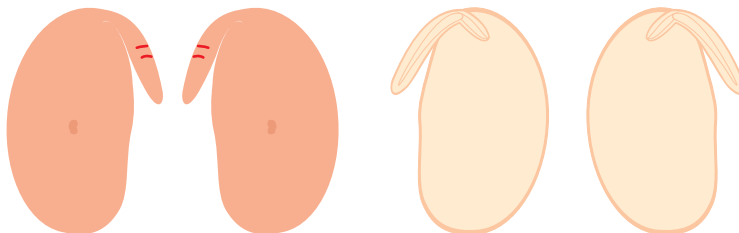


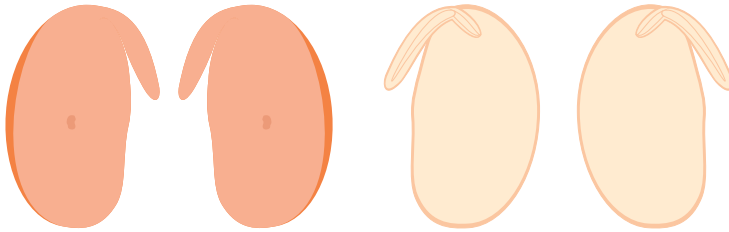
Figura 34. Semente de soja cuja coloração tem o aspecto de mosaico, após coloração pelo tetrazólio, devido à embebição inadequada durante o pré-condicionamento.

Classe 2: viável; alto vigor

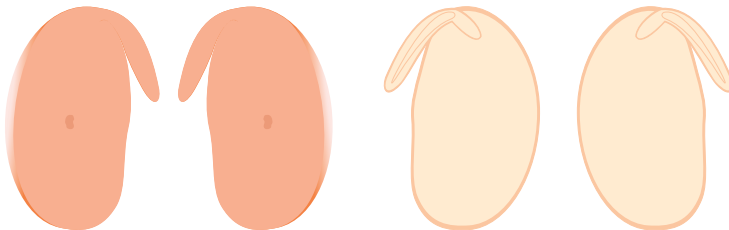
2a. Pequenas estrias localizadas na superfície externa dos cotilédones na região oposta ao eixo embrionário, as quais são originadas por pressão do tegumento sobre os cotilédones, causado por sucessivas hidratações (expansão) e desidratações (contração) de ambos em proporções diferentes. Isto resulta em enrugamento do tegumento e lesão nos cotilédones, onde a respiração e a atividade enzimática são mais intensas, ocasionando a evidência da cor vermelho carmim forte. As estrias não devem ter profundidade superior a 0,5 mm; a parte interna dos cotilédones apresenta-se como em **1a**. Danos nos cotilédones são geralmente simétricos.



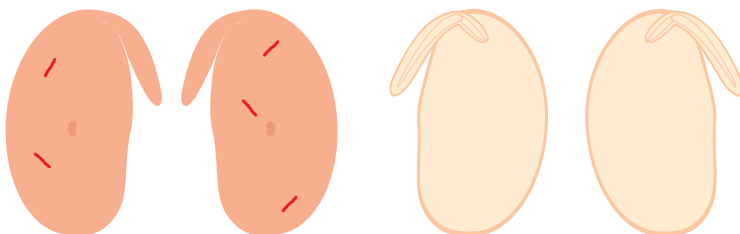
2b. Pequenas estrias devidas ao mesmo motivo referido em **2a.**, mas localizadas sobre o eixo embrionário. Tais lesões são superficiais e não são observadas nos tecidos internos do eixo embrionário, após seccioná-los, conforme ilustrado em **1a**. Danos nos cotilédones são geralmente simétricos.



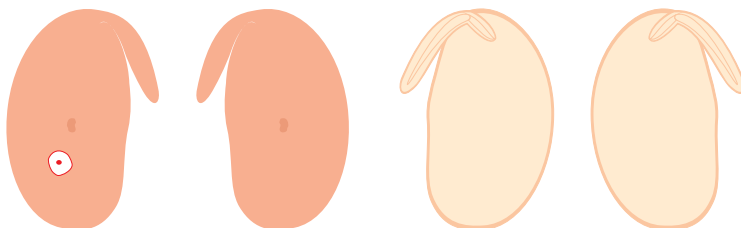
2c. Área de coloração mais intensa, não maior do que da ilustração, provavelmente devido à junção de pequenas estrias (**2a**), formando uma faixa contínua. A parte interna dos cotilédones apresenta-se como em **1a**. Danos nos cotilédones são geralmente simétricos.



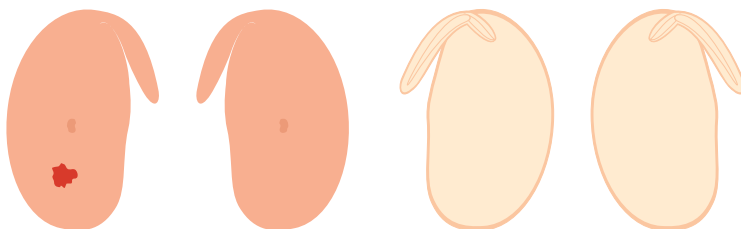
2d. Área de tecido sem coloração (branco leitoso) portanto, morto, não maior do que a da ilustração. A parte interna dos cotilédones como em **1a**. Todas as lesões referidas de **2a** e **2d**, em geral, se apresentam simetricamente nos dois cotilédones, sendo esta uma característica utilizada para diferenciar dano devido ao enrugamento do tegumento (deterioração por umidade) de outros tipos de dano.



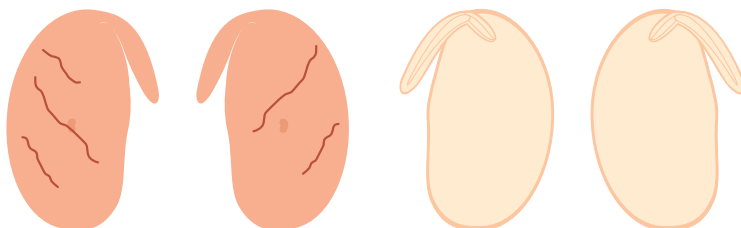
2e. Pequenos danos mecânicos sobre a superfície externa dos cotilédones. As lesões não deve exceder a profundidade máxima de 0,5 mm. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se como em **1a**.



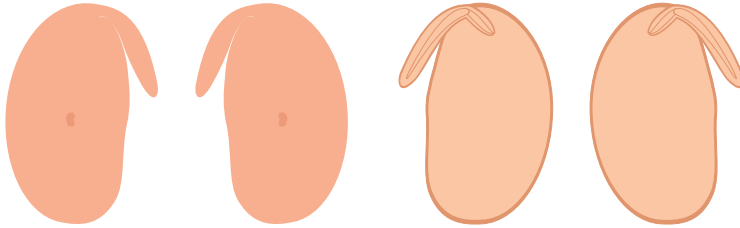
2f. Dano(s) devido(s) à picada de percevejo, com uma área total não maior do que a mostrada na ilustração e profundidade máxima de 0,5 mm. A localização deve ser afastada da região vascular, isto é, abaixo de uma linha imaginária, passando transversalmente pela metade do cotilédone. A região afetada apresenta-se mais ou menos necrosada (tecido morto, coloração esbranquiçada, de aspecto pulverulento, às vezes com o sinal da punctura bem visível, outras vezes não). Superfície interna dos cotilédones como em **1a**.



2g. Dano idêntico ao anterior mas com a região da(s) punctura(s) sem necrose. O aspecto é enrugado, de coloração vermelho carmim forte, sem partes esbranquiçadas. Este tipo de lesão é característico de picada que provavelmente ocorre em um estágio mais avançado da maturação, quando a semente já está em fase adiantada de desidratação.



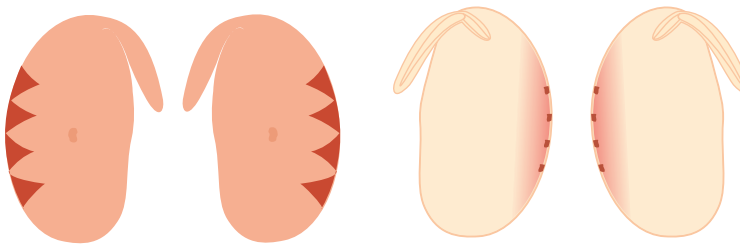
2h. Mais do que duas estrias por cotilédone (não profunda, como em **1b**). Superfície interna dos cotilédones como em **1a**.



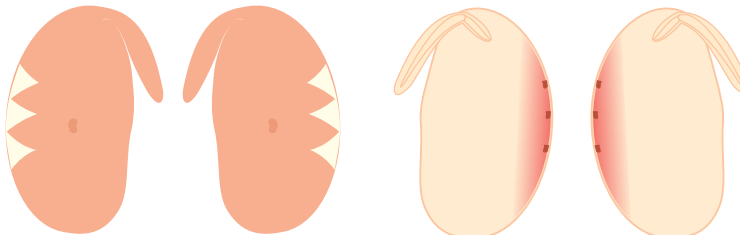
2i. Superfície externa dos cotilédones apresenta coloração normal como em **1a**. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se também com coloração uniforme devido à penetração da solução de tetrazólio através de um rompimento no tegumento.

Nota: as sementes classificadas nas Classes 1 e 2 não apresentam qualquer tipo de dano nas superfícies internas dos cotilédones.

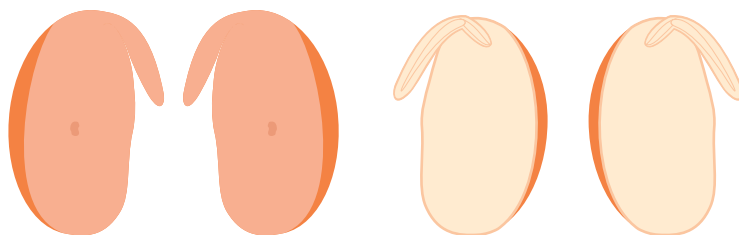
Classe 3: viável; vigor médio



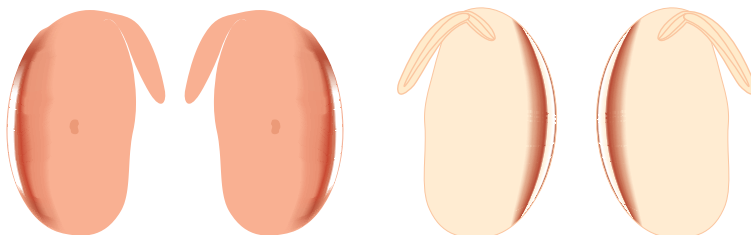
3a. Estrias de coloração vermelho carmim forte localizadas nos cotilédones, na região oposta ao eixo embrionário, com uma área total não maior do que à mostrada na ilustração. A superfície interna dos cotilédones pode apresentar pequenas áreas mais escuras, correspondentes às estrias externas e com uma espessura máxima de 0,5 mm.



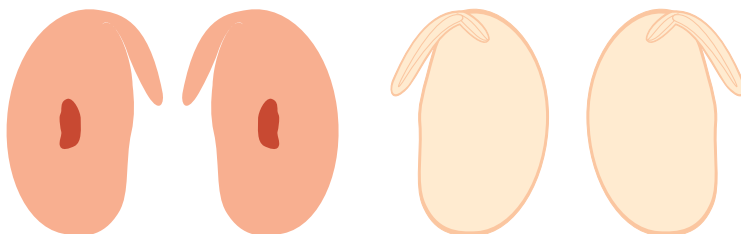
3b. Dano quase idêntico ao anterior, mas com as estrias podendo apresentar algumas áreas de coloração branco-leitosa, indicando tecidos mortos. Superfície interna dos cotilédones como em **3a**.



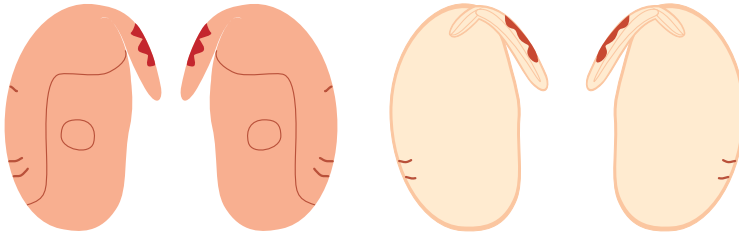
3c. Áreas de coloração mais intensa, não maiores que as mostradas na ilustração, provavelmente devido à junção de estrias formando uma faixa contínua. A superfície interna dos cotilédones pode apresentar, correspondentemente, uma faixa mais escura com espessura máxima de 0,5 mm.



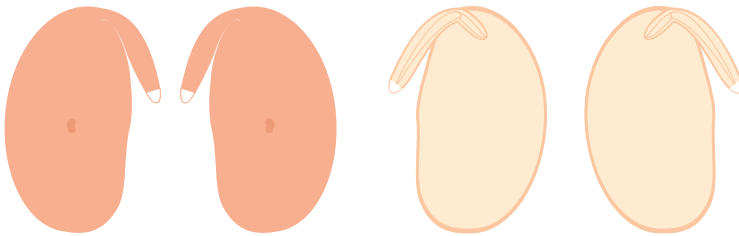
3d. Dano quase idêntico ao anterior, mas a faixa pode ser de tecido de coloração branco-leitosa (tecido morto) numa área não maior do que a da ilustração. Superfície interna com uma faixa de tecido morto numa espessura máxima de 0,5 mm.



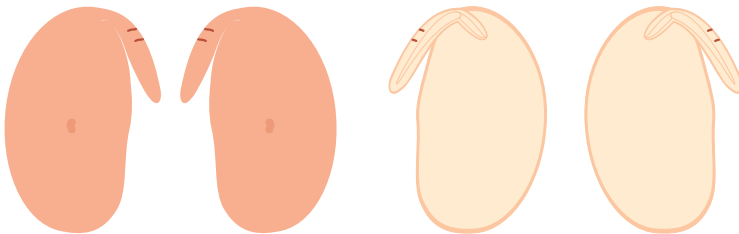
3e. Área de coloração vermelho intensa na superfície externa de um ou ambos os cotilédones. Danos característicos de abrasão, devido ao dano mecânico latente. O dano é superficial e com profundidade máxima de 0,5 mm. Superfície interna são como descritas em **1a**.



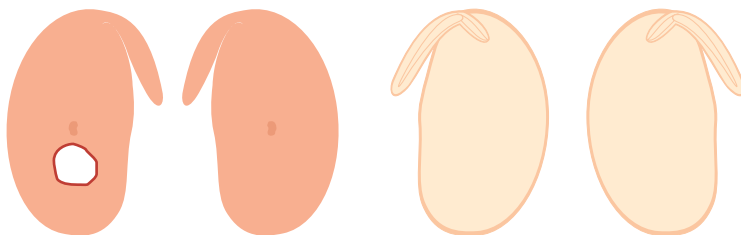
3f. Estrias localizadas na superfície do eixo embrionário não se aprofundando além do córtex, ou seja, sem afetar o cilindro central.



3g. Extremidade da radícula mostrando coloração branco-leitosa, indicando tecido morto, sem no entanto afetar o cilindro central.



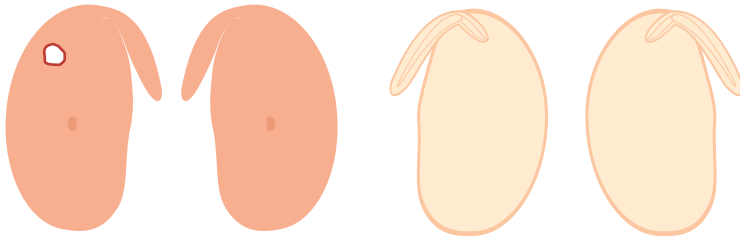
3h. Pequenas fraturas localizadas no eixo embrionário não afetando, porém, o cilindro central.



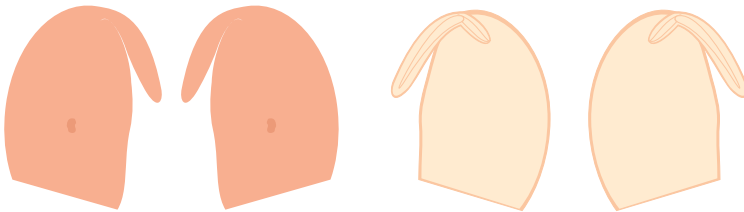
3i. Picada(s) de percevejo, com a parte central necrosada (tecido morto, ou seja, coloração branco-leitosa, com aspecto pulverulento) ou não. Esse dano é maior do que o ilustrado em **2f**, com área total não maior do que a mostrada na ilustração. Deve estar localizado na região abaixo de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone (região não vascular). O dano é superficial e não deve ter profundidade superior a 0,5 mm. Superfície interna dos cotilédones como descrita em **1a**.



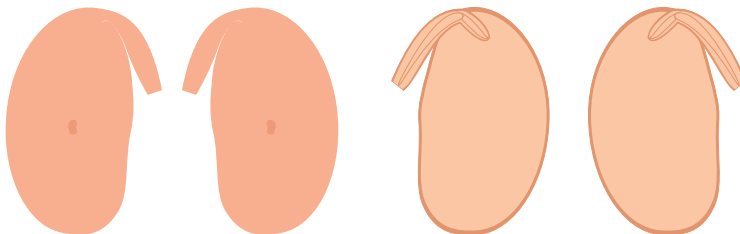
3j. Picada(s) de percevejo, com área total não maior do que a mostrada na ilustração, sem áreas necrosadas (mortas), localizada(s) abaixo de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone. Picada(s) afetando a superfície interna de um dos cotilédones que se mostra enrugado com pequenas pontuações vermelhas (áreas contínuas de coloração vermelho carmim forte ou áreas necrosadas). Um dos cotilédones com coloração superficial como em **2i**.



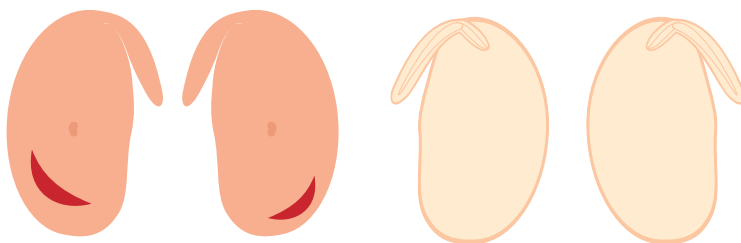
3k. Picada(s) de percevejo, com área total não maior do que a representada na ilustração, localizada acima de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone. A região lesionada não deve ser superior a 0,5 mm de profundidade e localizada de tal maneira a não afetar a região acima da linha imaginária (região vascular).



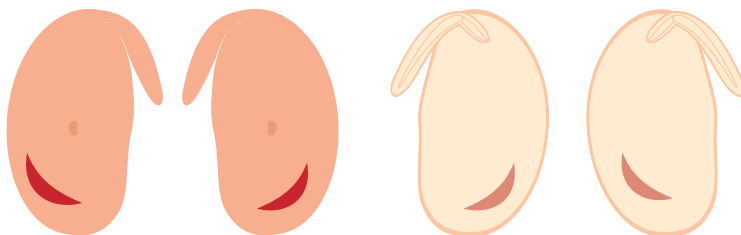
3l. Fratura dos cotilédones na região oposta ao ponto de ligação do eixo embrionário numa extensão máxima como a mostrada na ilustração. A superfície interna dos cotilédones pode se apresentar como em **1a** ou **2i**.



3m. Extremidade da radícula fraturada, porém, sem afetar o cilindro central. A superfície interna dos cotilédones pode se apresentar como em **1a** ou **2i**.



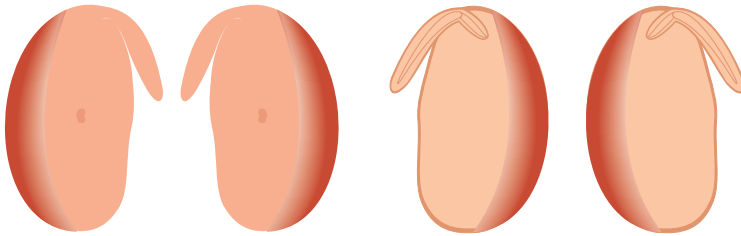
3n. Dano(s) de origem mecânica com ou sem tecido morto, com profundidade máxima de 0,5 mm ou sem afetar a região vascular. A superfície interna dos cotilédones como em 1a ou 2a.



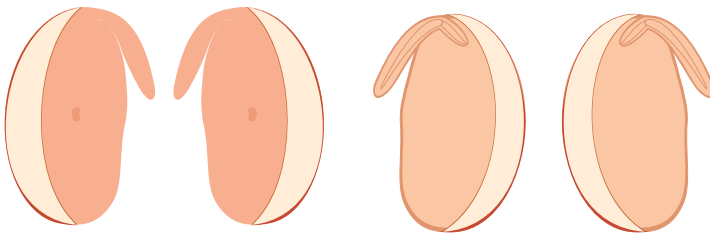
3o. Dano(s) de origem mecânica localizado(s) abaixo da região vascular, afetando a superfície interna dos mesmos como mostrado na ilustração.

Subclasse 3R: existe a opção de registrar uma subclasse adicional, conforme descrito por Zorato et al. (2001): quando observada a presença de danos mais intensos nos cotilédones, que abrangem mais tecidos de reserva e/ou danos localizados no eixo embrionário (plúmula, hipocótilo e radícula), situação essa que pode oferecer mais risco à qualidade das sementes, pode-se atribuir uma “restrição” (R), estabelecendo-se a Subclasse 3R, que potencialmente, ao longo do período de armazenamento, evoluirá para a Classe 4. Essa Subclasse pode ser incluída na ficha de anotação ou nos programas de computadores e de aplicativos utilizados para a anotação dos resultados.

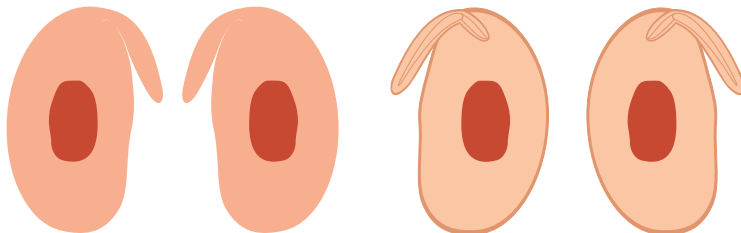
Classe 4: viável; vigor baixo



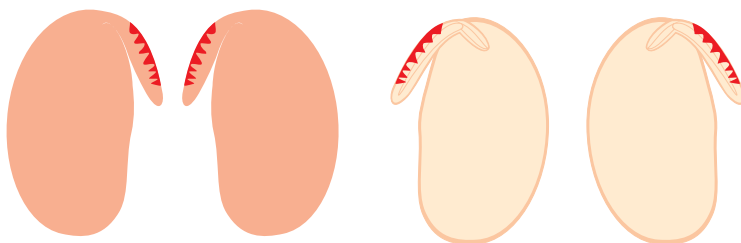
4a. Área de coloração vermelho carmim forte em ambos os cotilédones, cobrindo menos do que a metade dos mesmos. A superfície interna também apresenta área de coloração vermelho carmim forte. A região vascular, porém, não deve estar afetada.



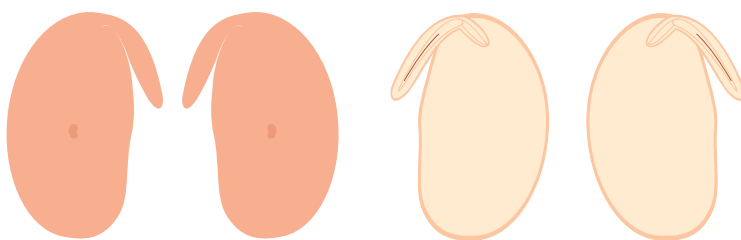
4b. Dano quase idêntico ao anterior, apresentando, porém, tecidos mortos (coloração branco-leitosa).



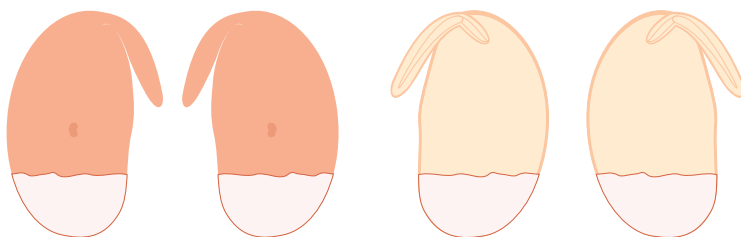
4c. Dano mecânico latente, caracterizado por área de coloração vermelho carmim forte no centro dos cotilédones (externa e internamente), afetando parte da região vascular. No entanto, próximo ao ponto de ligação, os vasos devem estar funcionais, permitindo o transporte das reservas dos cotilédones para o eixo embrionário.



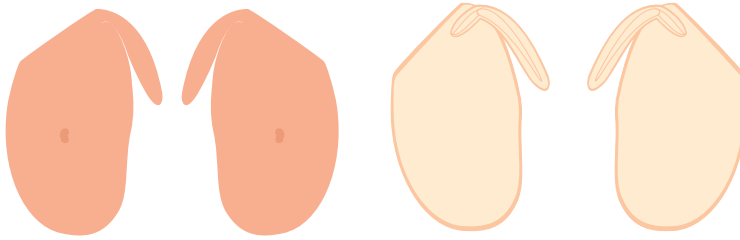
4d. Estrias localizadas sobre o eixo embrionário, afetando inclusive o cilindro central, porém, numa extensão menor do que a metade de sua espessura.



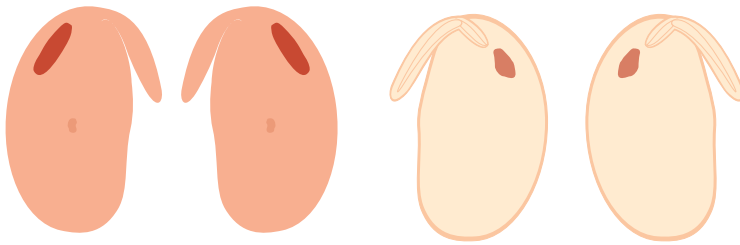
4e. Área de coloração vermelho carmim forte no eixo embrionário mas com as estrutura do cilindro central e do córtex ainda perfeitamente definidas, devido a dano mecânico latente.



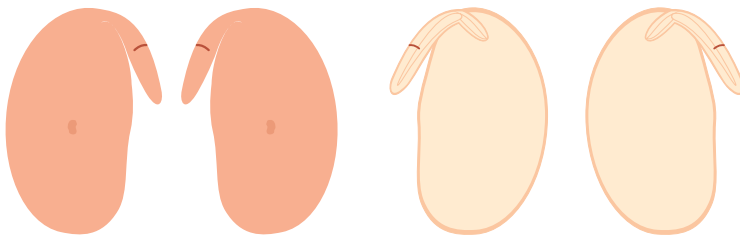
4f. Área de tecido morto numa extensão menor do que a metade da área total dos cotilédones.



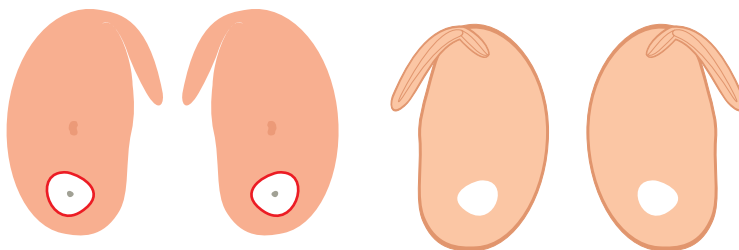
4g. Fratura de um ou ambos os cotilédones na região próxima ao ponto de ligação, mas deixando a região vascular em grande parte intacta.



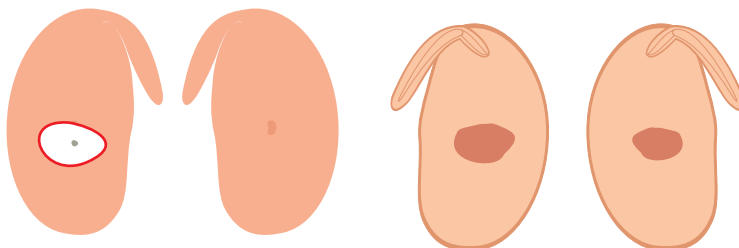
4h. Dano(s) de origem mecânica na região vascular dos cotilédones afetando a face interna e parte da região vascular. Os vasos, porém, devem permanecer funcionais próximos ao ponto de ligação dos cotilédones com o eixo embrionário.



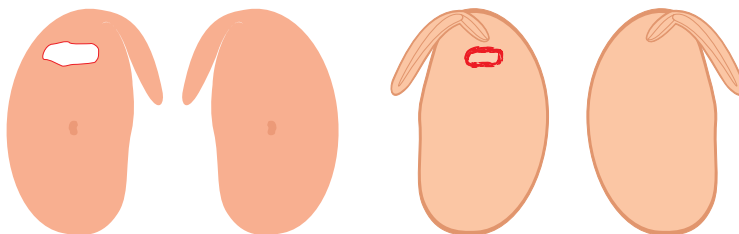
4i. Fraturas sobre o eixo embrionário, afetando o córtex e o cilindro central, porém, numa extensão menor do que a metade de sua espessura.



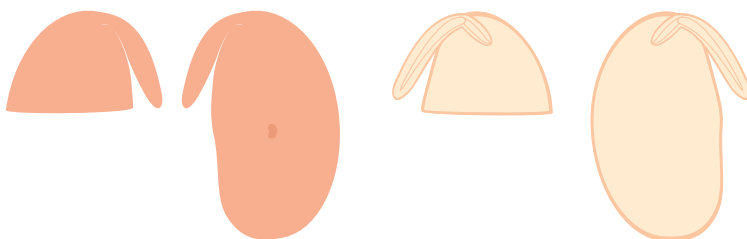
4j. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo com área necrosada (tecido morto), atingindo a parte interna dos cotilédones mas localizado(s) abaixo da região vascular. As lesões são profundas e podem ser detectadas na parte interna dos cotilédones.



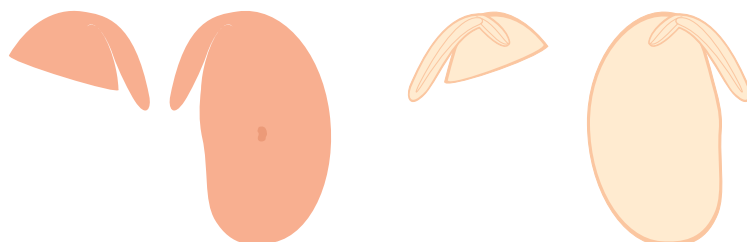
4k. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo localizado(s) em apenas um cotilédone, tornando-o praticamente não funcional e afetando apenas levemente o segundo cotilédone na face interna, e o qual se mantém quase integral.



4l. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo localizado(s) em um dos cotilédones, bloqueando completamente a região vascular, tornando-o não funcional. A plântula dependerá, para o seu estabelecimento, das reservas de apenas um cotilédone.



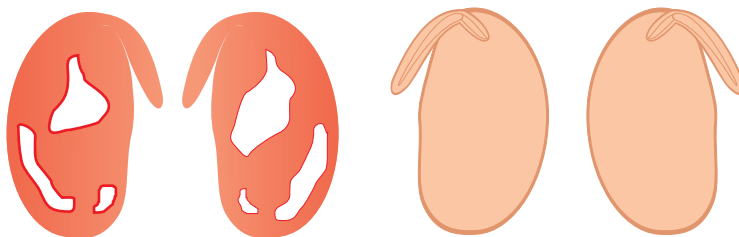
4m. Fratura de mais da metade de um dos cotilédones.



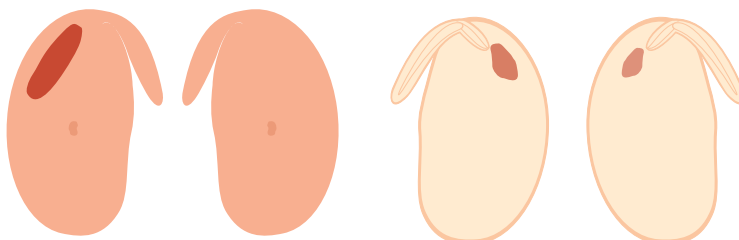
4n. Fratura de um dos cotilédones deixando, porém, intacto o eixo embrionário (inclusive a plúmula).



4o. Fratura de ambos os cotilédones, porém, numa extensão inferior à metade dos mesmos.

Classe 5: viável; vigor muito baixo

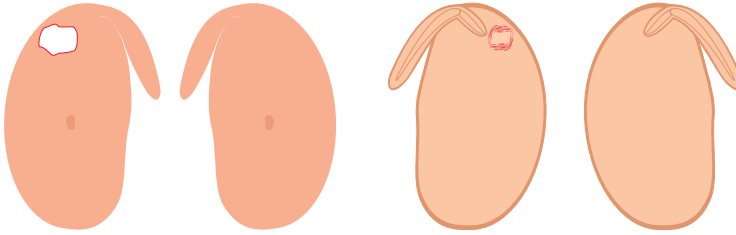
5a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando um aspecto de mosaico, com áreas de um colorido vermelho carmim forte entremeadas de áreas mais claras e até mortas. Os tecidos afetados atingem uma profundidade superior a 1 mm, mas inferior à metade da espessura dos cotilédones. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se também com algumas áreas de colorido mais intenso. O eixo embrionário apresenta-se bem definido com as estrutura do córtex e do cilindro central bem visíveis.



5b. Dano(s) de origem mecânica, afetando totalmente a região vascular próxima ao ponto de ligação de um dos cotilédones e lesionando, parcial e internamente, a área correspondente do segundo cotilédone.



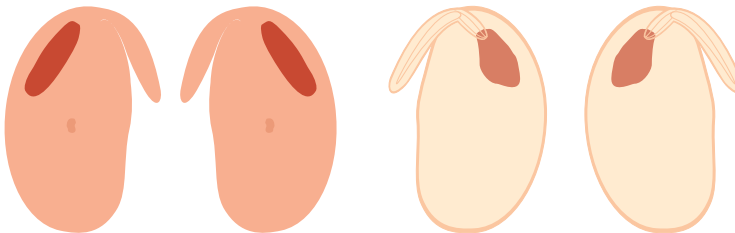
5c. Cotilédones fraturados de tal forma que é difícil saber se a parte remanescente é maior ou menor do que a metade do total da semente.



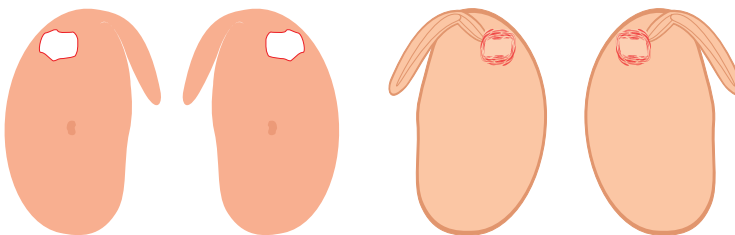
5d. Dano(s) devido(s) à picada de percevejo, afetando a região vascular como em **5b**.

Classe 6: não viável

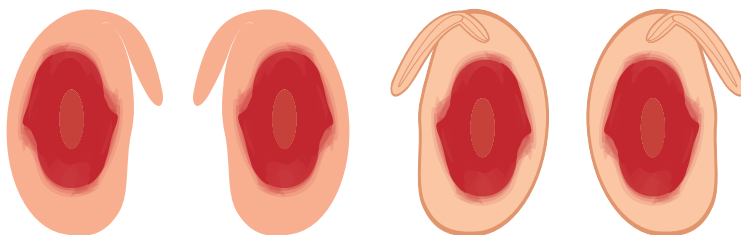
Sementes classificadas como Classe 6 exibem lesões semelhantes às da Classe 5 (vide ilustrações), porém, com maior extensão das áreas afetadas, o que as torna inviáveis.



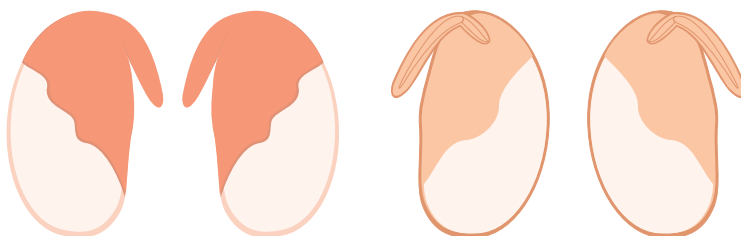
6a. Dano mecânico afetando ambos os cotilédones externa e internamente, alcançando a região vascular e parte da plúmula.



6b. Danos causados por percevejo, afetando os cotilédones externamente e internamente, atingindo a região vascular e parte da plúmula.

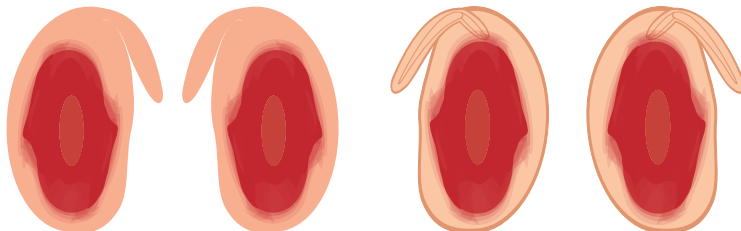


6c. Dano mecânico afetando ambos os cotilédones externamente e internamente, bloqueando parcialmente a região vascular. Área de tecidos lesionados nos cotilédones alcança mais da metade dos mesmos.

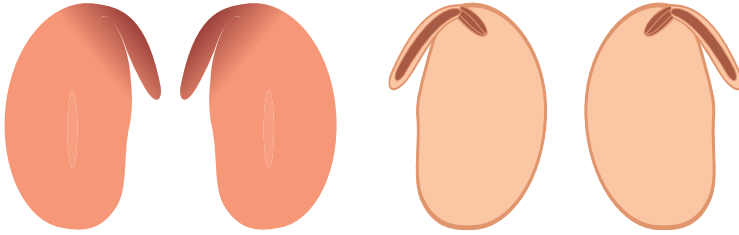


6d. Área de tecidos mortos nos cotilédones alcança mais de 50% dos tecidos de reserva.

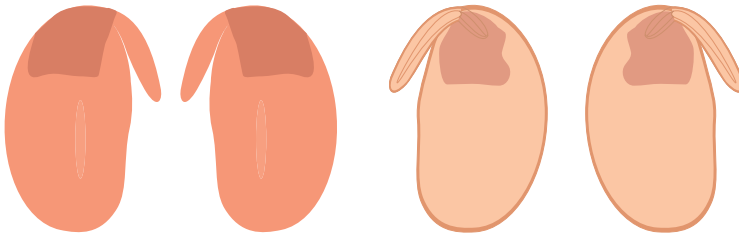
Classe 7: não viável



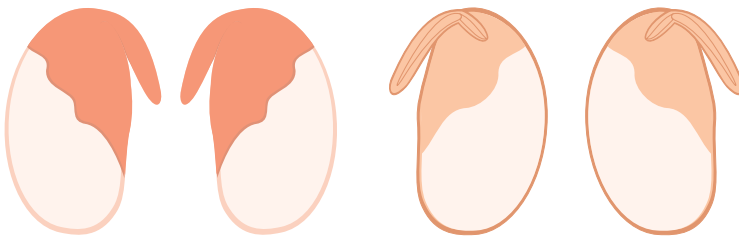
7a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando um aspecto de mosaico com áreas de um colorido vermelho carmim forte entremeadas de outras mais claras e mortas. Os tecidos afetados atingem a metade (ou mais) da espessura dos cotilédones, bloqueando completamente a região vascular.



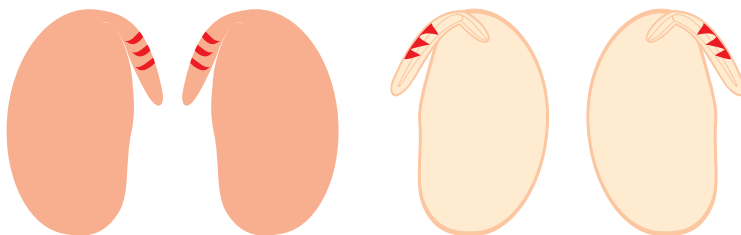
7b. Eixo embrionário apresentando uma coloração vermelho carmim forte, distribuída por toda a sua extensão, devido ao dano mecânico latente.



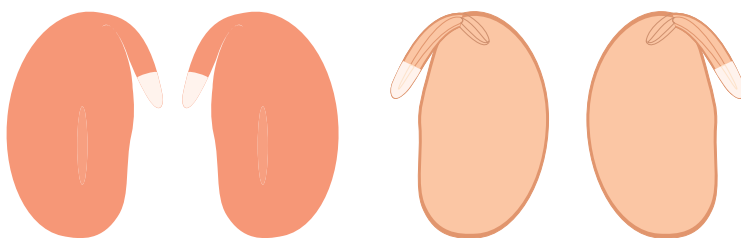
7c. Tecidos dos cotilédones com coloração vermelho carmim forte (ou branco leitoso) no ponto de ligação de ambos os cotilédones, atingindo a região vascular. Coloração branco-leitosa (indicativo de tecidos mortos) também pode ocorrer.



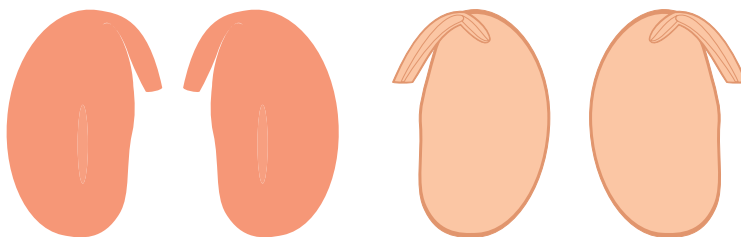
7d. Tecidos mortos de coloração branco-leitosa numa extensão superior à metade da superfície total da semente.



7e. Estrias de coloração vermelho carmim forte sobre o eixo embrionário, devido a dano por umidade, atingindo uma profundidade superior à metade da espessura do cilindro central.



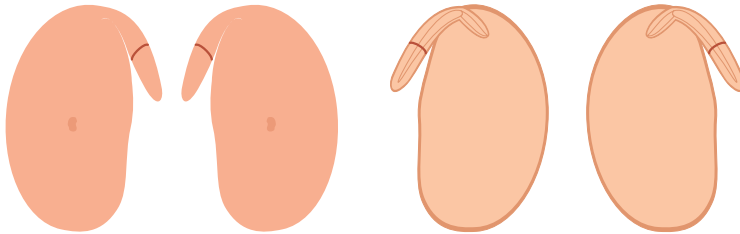
7f. Extremidade da radícula apresentando coloração branco-leitosa (tecido morto) atingindo não só o córtex, mas também o cilindro central.



7g. Fratura da extremidade da radícula, afetando não só o córtex, mas também o cilindro central.

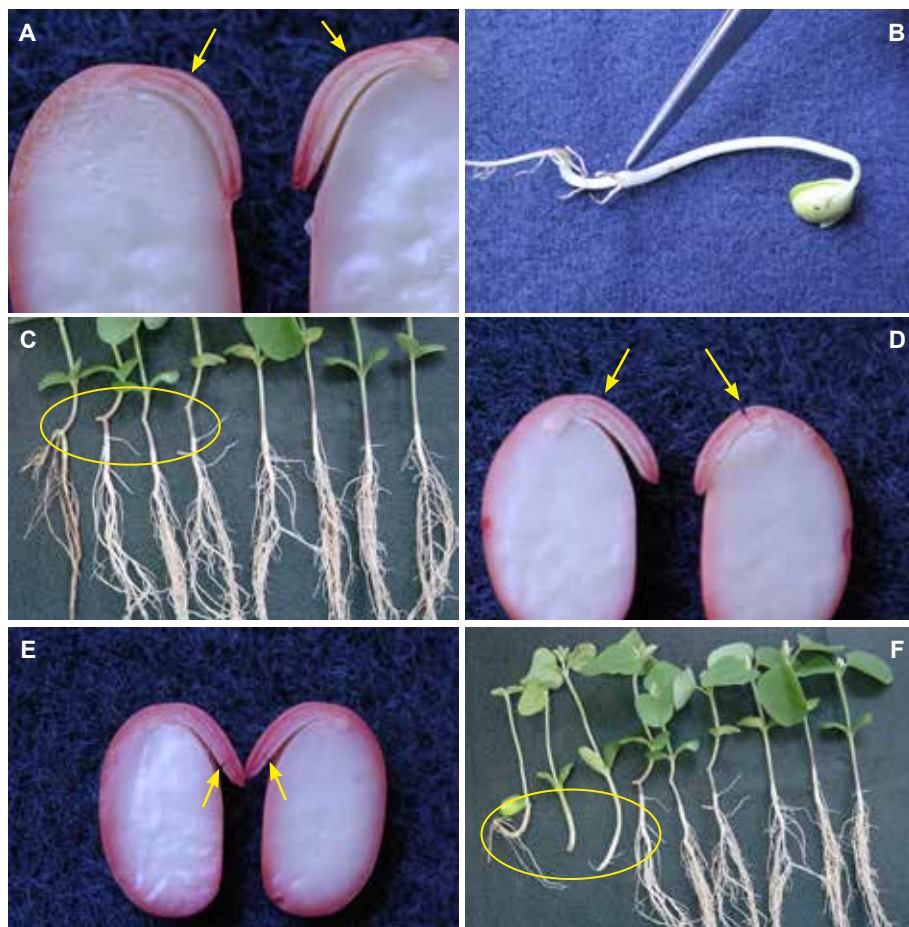


7h. Fratura dos cotilédones com a parte remanescente sendo inferior à metade da superfície total da semente.



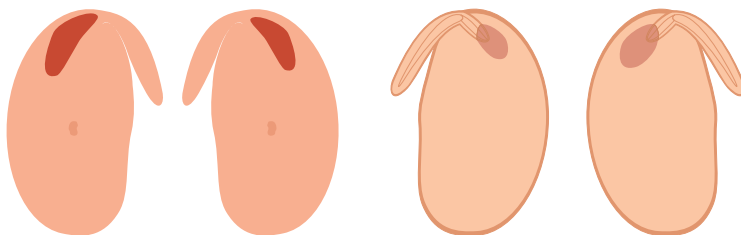
7i. Fratura do eixo embrionário, seccionando o cilindro central e córtex.

Existe uma única exceção a essa Classe 7i: quando ocorrem danos mecânicos imediatos com fraturas recentes que seccionam apenas o cilindro central, sem lesionar o córtex e o tegumento da semente (Figura 35A), devendo-se considerar essa semente na Classe 4 (viável, baixo vigor). Nessa situação, durante o processo de germinação, haverá uma regeneração dos tecidos lesionados, formando uma calosidade no hipocótilo, resultando na produção de uma plântula normal, de médio/baixo vigor (Figura 35B e 35C); porém, no caso de fraturas que seccionem totalmente o córtex e cilindro central no hipocótilo (Figura 35D) ou na radícula (Figura 35E), deve-se considerar a sementes como não viável (Classe 7), pois elas resultarão na produção de plântulas anormais (Figura 35F).

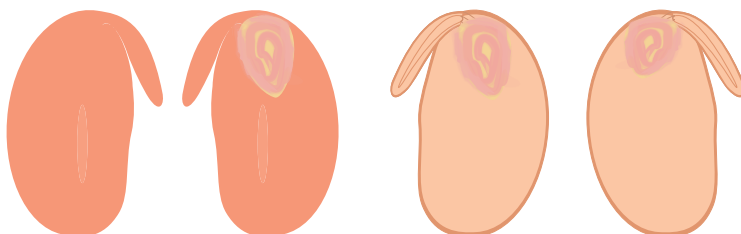


Fotos: José de Barros França-Neto

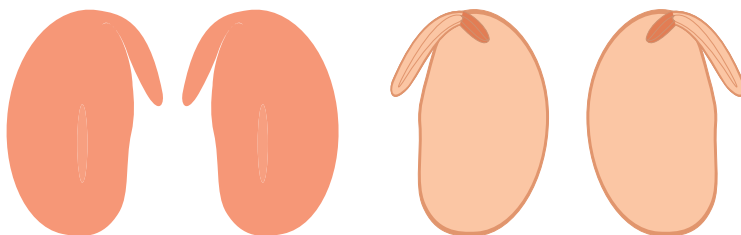
Figura 35. Ocorrência de fratura recente em eixos embrionários de sementes de soja. A. dano mecânico imediato com fratura recente que secciona apenas o cilindro central, sem lesionar o córtex; B. e C. formação de calosidade no hipocótilo, devido à regeneração dos tecidos lesionados, resultando na produção de uma plântula normal de médio/baixo vigor; D. fratura total do córtex e cilindro central no hipocótilo; E. fratura total do córtex e cilindro central na radícula; F. plântulas anormais devido aos problemas ilustrados em D e E.



7j. Dano(s) de origem mecânica, afetando a região vascular de ambos os cotilédones, próximo(s) ao ponto de ligação.



7k. Dano(s) devido a picada de percevejo, afetando a região vascular de ambos os cotilédones, próximo(s) ao ponto de ligação.



7l. Plúmula de coloração vermelho carmim forte (deteriorada), devido à deterioração por umidade (Figura 36).

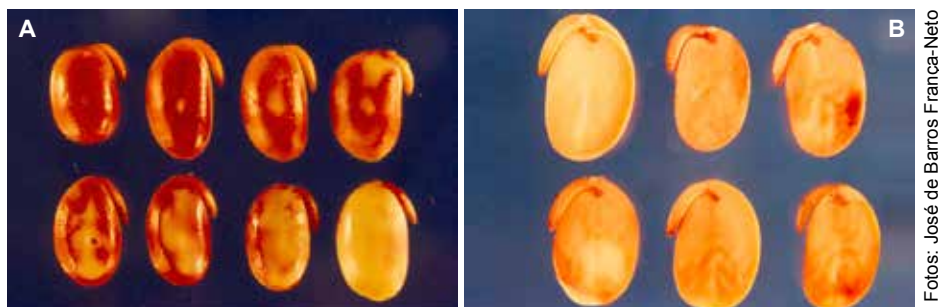


Figura 36. Sementes de soja coloridas pela solução do sal de tetrazólio, com sintomas de intensa deterioração por umidade na lateral dos cotilédones. A. ilustração da evolução dessas lesões nos cotilédones, da semente superior esquerda até a semente morta, inferior direita; B. face interna de sementes com esse tipo de deterioração, com as plúmulas coloridas em vermelho intenso, caracterizando a não viabilidade das sementes (Classe 7).

Classe 8: semente morta

Semente totalmente morta, usualmente branca e às vezes com tonalidade rósea. Os tecidos das sementes são friáveis e flácidos (Figura 37).

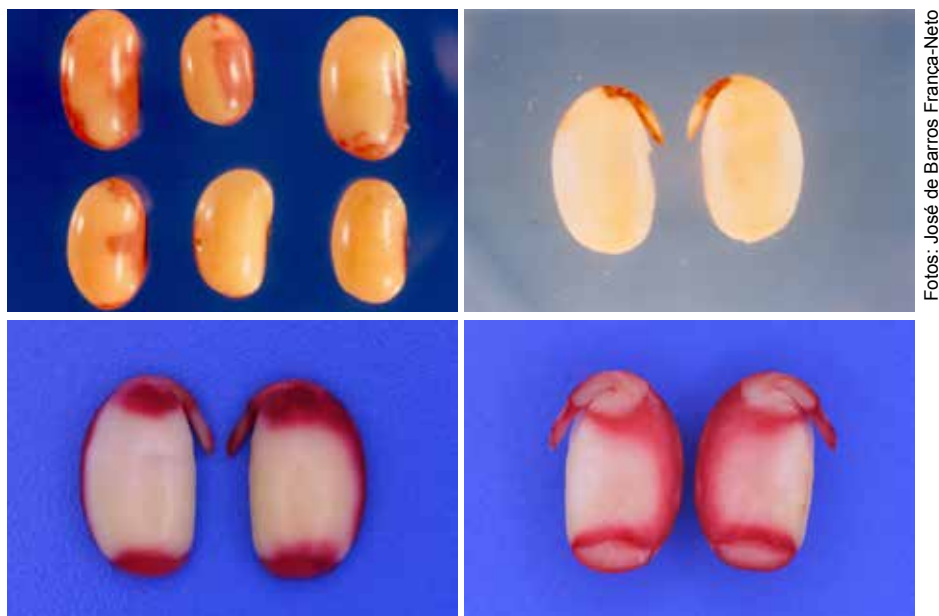


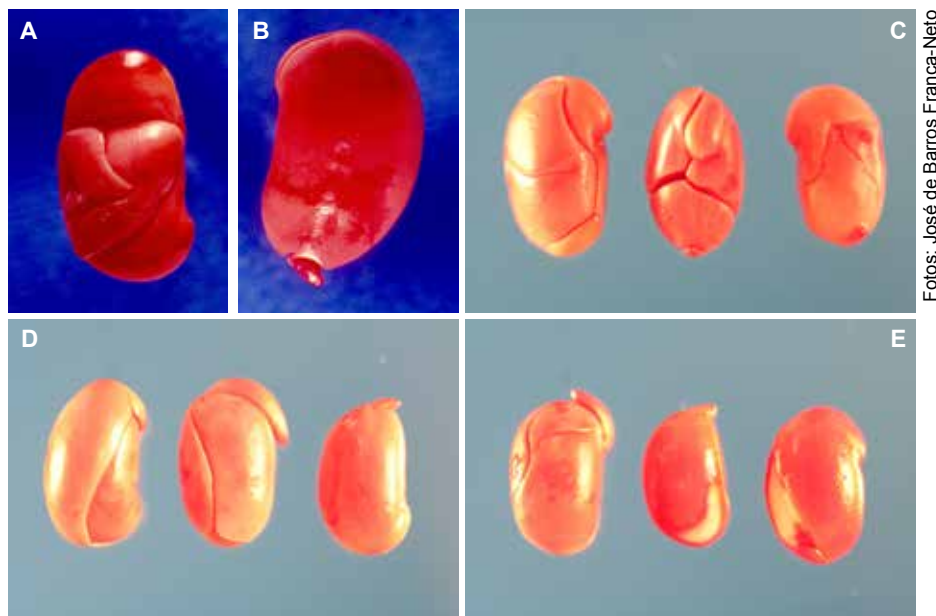
Figura 37. Sementes de soja mortas, após coloração pela solução de tetrazólio.

Sementes duras (SD)

A ocorrência de sementes duras (impermeáveis à água) em lotes de sementes de soja é um aspecto genético, ou seja, depende da cultivar, e depende também das condições climáticas em pré-colheita: déficit hídrico na fase final do enchimento de grãos e em pré-colheita podem resultar na produção de sementes duras (França-Neto; Potts, 1979). Esse fenômeno deve-se e à deposição de suberina no tegumento da semente de soja, deixando-a impermeável à água. Essas sementes não embebem água no processo de pré-condicionamento, conforme descrito anteriormente. A constatação da presença de sementes duras na amostra pode requerer procedimentos especiais. Quando uma amostra apresentar um baixo índice de sementes duras, ou seja de 1% a 5%, as mesmas podem ser consideradas como viáveis e vigorosas, podendo ser anotadas na Classe 1. Porém, caso o índice de sementes impermeáveis seja superior a 5%, as mesmas devem ser escarificadas com lixa “fina”, sendo novamente pré-condicionadas e coloridas, realizando-se a seguir a leitura das mesmas. Mesmo realizando a escarificação das sementes duras, é importante anotar o percentual das mesmas na ficha da amostra, uma vez que essas sementes têm uma menor velocidade de germinação e de emergência no campo.

Anormalidades embrionárias

Alguns tipos malformações embrionárias podem ser constatadas no teste de tetrazólio (Figura 38). É comum a constatação da presença de três ou mais cotilédones, cotilédones deformados ou dobrados e o posicionamento do eixo embrionário em local inadequado. A maioria dessas sementes não produzem plântulas normais, conforme a exemplificado na Figura 38A. Entretanto, sementes com a anormalidade ilustrada na Figura 38B podem resultar em plântulas normais, desde que não apresentem danos sérios em seus componentes vitais.



Fotos: José de Barros França-Neto

Figura 38. Sementes de soja com anormalidades embrionárias; A. sementes com cotilédone retorcido/dobrado; B. observar a localização inapropriada do eixo embrionário. C, D e E. anormalidades embrionárias.

Anotação e interpretação dos resultados

Cada semente da amostra é classificada na classe de viabilidade apropriada e o(os) tipo(s) de dano(s) de cada semente é(são) registrado(s) utilizando-se ficha de resultados apropriada (Figura 39). Sugere-se utilizar a seguinte simbologia:

- X : sem dano
- L : dano mecânico (DM)
- ∩ : dano causado por percevejo (DP)
- P : dano por umidade (DU)
- ∟ : DM + DP
- ℒ : DM + DU
- ∩̂ : DU + DP
- ℒ̂ : DU + DM + DP


		FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO							
AMOSTRA:				LOCAL:					
Nº DE SEMENTES TESTADAS:				PROJETO:					
DATA:				ANALISTA:					
								(%)	
1.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
2.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
3.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
4.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
5.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
DURAS	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
								(%)	
6.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
7.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
8.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
Nível de vigor 1-3: _____ (%)				Viabilidade (1-5): _____ (%)					
								(%)	
1.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
2.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
3.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
4.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
5.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
DURAS	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
								(%)	
6.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
7.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
8.	////	////	////	////	////	////	////	////	x2 _____
Nível de vigor 1-3: _____ (%)				Viabilidade (1-5): _____ (%)					
REPETIÇÕES	DANO MECÂNICO		UMIDADE		PERCEVEJO		DURAS x2	VIGOR (1-3)	VIAB. (1-5)
	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2			
I									
II									
MÉDIAS									
OBS.: P = umidade L = dano mecânico Γ = percevejo									

Figura 39. Ficha para anotação dos resultados do teste de tetrazólio para semente de soja.

Observação importante: conforme já mencionado, pode ocorrer mais de um tipo de dano na mesma semente (Figura 31). Caso isso ocorra em sementes classificadas como não viáveis (Classes 6 a 8), e apenas um tipo de dano for responsável pela perda de viabilidade, tal dano deve ser marcado na ficha com um traço mais forte. Por exemplo: uma semente apresenta um dano mecânico que fraturou totalmente o eixo embrionário, suficiente para causar a perda de viabilidade; esta mesma semente apresenta também uma deterioração por umidade nos cotilédones, longe das zonas vitais, dano este não suficiente para que a semente seja classificada como não viável (Figura 40). Ao anotar esta semente na ficha como Classe 7 (não viável), deve-se marcar a simbologia de dano mecânico com maior intensidade que o símbolo de deterioração por umidade. Isto deve ser realizado sempre que situações semelhantes ocorrerem, marcando-se os danos que efetivamente forem responsáveis pela perda de viabilidade com maior intensidade na ficha e os danos mais superficiais, não suficientes para resultar em perda de viabilidade, em intensidade normal, conforme ilustram as fichas de resultados no final desta seção por exemplo (Figuras 41, 42 e 43).

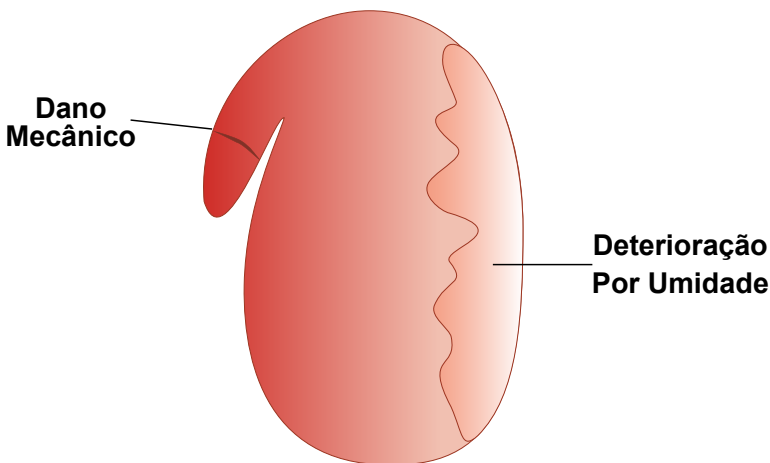


Ilustração: Thais Sofia Ribeiro Santos

Figura 40. Esquema de semente de soja com deterioração por umidade nos cotilédones e com dano mecânico severo, que fraturou o eixo embrionário.

Após a avaliação de todas as 100 sementes (2 repetições X 50) da amostra, determina-se a porcentagem das sementes classificadas em cada Classe (1 a 8). A viabilidade (potencial de germinação) é calculada pelo somatório dos valores percentuais classificados nas Classes 1 a 5. O nível de vigor é esti-

mado pelo somatório dos valores percentuais das sementes das Classes 1 a 3, conforme ilustrados nas fichas preenchidas (Figuras 41, 42 e 43).

No rodapé da ficha, anotam-se os resultados das duas subamostras, calculando-se as médias do vigor e da viabilidade. Calculam-se também os percentuais de todos os tipos de danos (mecânico, deterioração por umidade e de percevejo) anotados para os níveis (1-8) e (6-8). Para o nível (1-8), calcula-se, em cada subamostra, o número de sementes que apresentaram sinais de danos mecânicos, por exemplo; multiplica-se o total por “2”, para obter-se o valor percentual. Faz-se o mesmo para a segunda subamostra, calculando-se a seguir a média desses dois valores. O mesmo procedimento deve ser seguido para os outros tipos de danos.

Para os níveis de classificação (6-8), faz-se o mesmo, porém, no caso de sementes que apresentem mais de um tipo de dano, deve-se computar apenas aqueles danos que efetivamente contribuíram para a perda de viabilidade, ou seja, que foram marcados com maior intensidade. Veja as fichas contidas nas Figuras 41, 42 e 43.

Além disso, pode-se calcular os percentuais dos danos em quaisquer outras combinações de classes. Por exemplo, o somatório em porcentagem dos danos de deterioração por umidade nas Classes 4 e 5 (DU 4-5) são muito úteis para estimar o potencial fisiológico de deterioração que poderá evoluir durante a armazenagem das sementes de soja, conforme comprovado por Moreano et al. (2011), principalmente em sementes esverdeadas dessa espécie (Zorato et al., 2007).

Os resultados podem também ser registrados diretamente no teclado de computadores, que dispões de programas específicos para essa finalidade, ou mesmo em “tablets” ou por aplicativos disponíveis hoje no mercado. Cada semente será registrada com as anotações de classe de viabilidade e tipo(s) de dano(s). A vantagem desses sistemas é que todas as estimativas de viabilidade, vigor e dos índices de danos mecânicos, de deterioração por umidade e dos danos causados por percevejos são instantaneamente calculados e sumarizados para cada amostra.

Necessidade de reanálise

A amostra deverá ser reanalisada quando os resultados de viabilidade obtidos para as duas subamostras diferirem entre si em 10% ou mais.

Interpretação dos resultados

O nível de vigor pode ser interpretado por meio da seguinte classificação:

- Vigor muito alto: igual ou superior a 90%;
- Vigor alto: entre 85% a 89%;
- Vigor médio: entre 75% a 84%;
- Vigor baixo: igual ou inferior a 74%.

Esses valores foram estabelecidos com base nos resultados de vigor determinado pelo teste de tetrazólio em 1.847 lotes provenientes da avaliação da qualidade de sementes de soja produzidas no Brasil em três safras (2014/15, 2015/16 e 2016/17), conforme França-Neto et al. (2018).

Os valores obtidos para viabilidade devem receber a mesma interpretação dos alcançados no teste de germinação.

O diagnóstico da(s) causa(s) da baixa qualidade da semente pode ser obtida pela determinação da porcentagem de sementes afetadas por cada tipo de dano, tal como danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de per-cevejo, nas Classes 6 a 8. Esses números documentam a porcentagem de redução em viabilidade ocasionada por cada tipo de dano. Deve-se atentar que os danos aqui computados sejam aqueles que efetivamente causaram perda de viabilidade às sementes, conforme anotado na ficha de resultados. Esses níveis de danos podem ser interpretados de acordo com a seguinte classificação, estabelecida com base também nas avaliações mencionadas acima, realizadas por França-Neto et al. (2018):

- Sem problema sério (aceitável): inferior a 4%;
- Problema sério: entre 5% a 8%;
- Problema muito sério: superior a 8%.

Vale destacar que essa classificação dos níveis de danos nas Classes 6 a 8, deve ser utilizada para o diagnóstico de cada um dos tipos de danos individualmente. Com base nesse diagnóstico, medidas corretivas poderão ser adotadas visando minorar a ocorrência desses problemas, conforme relatado a seguir.

Se um problema sério ou muito sério é diagnosticado pelo analista de sementes através do teste de tetrazólio, por exemplo, um alto nível de ocorrência de danos mecânicos, ou danos de percevejos, uma ação corretiva pode ser adotada, para melhorar a qualidade das sementes produzidas. O produtor de sementes pode ser orientado, por exemplo, a ajustar o sistema de trilha da sua máquina colhedora, ou a melhorar o sistema de controle de percevejos.

Exemplos de resultados obtidos pelo teste de tetrazólio estão ilustrados na Tabela 1. O lote nº 1 apresenta viabilidade de 96% e vigor muito alto, de 91%, não apresentando problemas sérios relativos a nenhum dos tipos de danos (mecânico, percevejo ou umidade). O lote nº 2 tem viabilidade de 88%, sendo o vigor (78%) classificado como médio, devido principalmente a problemas sérios (8%) com danos mecânicos. O lote nº 3 tem 81% de viabilidade e vigor baixo (70%), devido a problemas muito sérios (10%) de deterioração por umidade e sérios de danos de percevejo (7%). As fichas utilizadas para anotar os resultados para estes três lotes estão ilustradas nas Figuras 41, 42 e 43.

Tabela 1. Resultados do teste de tetrazólio obtidos em três lotes de sementes de soja.

Parâmetro	Lote nº 1	Lote nº 2	Lote nº 3
Viabilidade	96	88	81
Vigor ¹	91	78	70
Danos Mecânicos ²	1	8	2
Deterioração por Umidade ²	2	2	10
Danos de Percevejo ²	1	2	7

¹Nível de vigor: muito alto: $\geq 90\%$; alto: 85 a 89%; médio: 75 a 84%; baixo: $\leq 74\%$.

² Porcentagem de perda de viabilidade causada pelo respectivo tipo de dano.

O ideal é que esses níveis de danos (mecânicos, deterioração por umidade e os causados por percevejos) sejam mínimos e, conseqüentemente, os valores de viabilidade e de vigor sejam os maiores possíveis. Existe um conjunto de tecnologias de produção de sementes, que, quando adotados, propiciam

a produção de lotes de sementes de soja nos maiores patamares de qualidade (França-Neto et al., 2016). Dando suporte a essa afirmativa, França-Neto et al. (2017) relataram nos levantamentos de qualidade da semente de soja produzidas na safra 2015/16 diversos lotes que, próximo da época de semeadura, apresentaram 100% de viabilidade, 100% de vigor, com 0% de danos mecânicos, 0% de deterioração por umidade e 0% de danos causados por percevejos, nas Classes 6 a 8.

Embrapa		FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO							
AMOSTRA: Lote nº 1				LOCAL: LONDRINA-PR					
Nº DE SEMENTES TESTADAS: 2x50				PROJETO: QUALIGRÃOS					
DATA: 11/10/2018				ANALISTA: VILHA					
1. XXXXX XXXXX XXXXX XXXXX X III IIIII IIIII IIIII IIIII x2 42 ^(%) 2. PPPPL PPPPP PPPPP P III IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 32 3. PPPPP P PPP IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 18 4. P III IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 2 5. IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 DURAS IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 6. IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 7. P P P IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 6 8. IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 Nível de vigor 1-3: 92 (%) Viabilidade (1-5): 94 (%)									
1. XXXXX XXXXX XXXXX XXXXX X III IIIII IIIII IIIII IIIII x2 42 ^(%) 2. PPP P P PPP PPPPP IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 28 3. L PPP PPPPL IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 20 4. P P P IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 8 5. IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 DURAS IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 6. IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 7. P III IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 2 8. IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII IIIII x2 0 Nível de vigor 1-3: 90 (%) Viabilidade (1-5): 98 (%)									
REPETIÇÕES	DANO MECÂNICO		UMIDADE		PERCEVEJO		DURAS x2	VIGOR (1-3)	VIAB. (1-5)
	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2			
I	12	2	52	2	4	2	0	92	94
II	6	0	50	2	8	0	0	90	98
MÉDIAS	9	1	51	2	6	1	0	91	96

OBS.: P = umidade L = dano mecânico P = percevejo

Figura 41. Resultados do teste de tetrazólio para o Lote nº 1 de sementes de soja.

Embrapa		FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO							
AMOSTRA: LOTE Nº 2				LOCAL: LONDRINA - PR					
Nº DE SEMENTES TESTADAS: 2 x 50				PROJETO: QUALIGRAOS					
DATA: 11/10/2018				ANALISTA: GEORGE					
1. XXXXX X///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 ^(%) 12 2. PLPLP PLLPP PPBP PL///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 32 3. PPLPP LPPPP PLPPP PPLI ///// ///// ///// ///// ///// x2 36 4. PPLPP ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 10 5. ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 0 DURAS ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 0 6. ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 0 7. PLPLP ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 10 8. ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 0 Nível de vigor 1-3: 80 (%) Viabilidade (1-5): 90 (%)									
1. YYYYY ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 ^(%) 10 2. PLPLP PLPPP PPLI ///// ///// ///// ///// ///// x2 28 3. LPLPL PPLPP PPLPP PLPLI ///// ///// ///// x2 38 4. PLPLP ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 10 5. ///// ///// ///// ///// ///// ///// x2 0 DURAS ///// ///// ///// ///// ///// x2 0 6. ///// ///// ///// ///// ///// x2 0 7. PLPLP LPLI ///// ///// ///// x2 14 8. ///// ///// ///// x2 0 Nível de vigor 1-3: 76 (%) Viabilidade (1-5): 86 (%)									
REPETIÇÕES	DANO MECÂNICO		UMIDADE		PERCEVEJO		DURAS x2	VIGOR (1-3)	VIAB. (1-5)
	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2	(1-8)x2	(6-8)x2			
I	30	6	80	2	10	2	0	80	90
II	28	10	76	2	12	2	0	76	86
MÉDIAS	29	8	78	2	11	2	0	78	88

OBS.: P = umidade L = dano mecânico Γ = percevejo

Figura 42. Resultados do teste de tetrazólio para o Lote nº 2 de sementes de soja.

Um exemplo do valor do retorno da informação do teste de tetrazólio para o produtor é ilustrado por Costa et al. (1987). Alta porcentagem de dano mecânico foi determinada na semente de soja produzida no estado do Paraná. Após a identificação do problema, os produtores foram orientados como melhorar os ajustes de trilha das colhedoras. Para tanto, foi organizado treinamento através de um grande programa de extensão. Em dois anos o nível de dano mecânico em semente de soja reduziu para níveis aceitáveis.

Essa mesma tendência foi relatada mais recentemente no Brasil (França-Neto et al., 2018) nos levantamentos de qualidade de sementes coordenados pela Embrapa Soja. Mediante o diagnóstico dos problemas de qualidade, e com diversos treinamentos sobre técnicas de produção de sementes de soja realizados por diversas instituições e com a participação das associações estaduais e nacionais de produtores de sementes, verificou-se uma melhoria na qualidade das sementes devido principalmente à redução dos índices de ocorrência de danos mecânicos nas sementes.

Precisão dos resultados

Um bom nível de precisão e confiabilidade do teste de tetrazólio foi demonstrado por França-Neto et al. (1986). Várias amostras de sementes de soja foram enviadas a 41 laboratórios de sementes, com instruções específicas para a execução dos seguintes testes: a) germinação, de acordo com as RAS (Brasil, 1976); b) envelhecimento acelerado através do método de “gerbox” de acordo com o Manual de Vigor de Sementes da AOSA (AOSA, 1983); c) teste de tetrazólio, conforme descrito por França-Neto et al. (1985); e d) emergência em areia de acordo com procedimentos específicos enviados com as amostras. Após o teste de germinação, o teste de tetrazólio foi classificado como o mais preciso, superando os outros dois testes avaliados. França-Neto et al. (2001; 2002) conduziu um teste de referência envolvendo 27 laboratórios, concluindo que o teste de tetrazólio foi tão preciso quanto o teste de germinação na determinação da viabilidade das sementes de soja. Quando comparado com o teste de envelhecimento acelerado foi mais preciso na determinação do vigor.

França-Neto et al. (2003), avaliando 1.117 lotes de sementes de soja no período de 1997 a 2002 no Brasil, concluíram que o valor de vigor (%) determi-

nado pelo teste de tetrazólio se mostrou confiável para estimar o potencial de emergência no campo (PEC), quando o teste é conduzido entre 3 a 4 semanas antes da semeadura. Uma equação foi desenvolvida ($PEC = 0,6165 \times TZ\text{-Vigor} + 35,716$) e testada para 100 lotes em 2002 resultou num coeficiente de regressão de 0,79, o qual foi altamente significativo ($p \leq 0,001$). Esta equação vem sendo avaliada por empresas produtoras de sementes no Brasil.

Em condições normais, os resultados de germinação, obtidos nos testes de germinação, e os de viabilidade, obtidos no teste de tetrazólio, devem ser semelhantes, permitindo diferenças de até 5% entre os mesmos. Entretanto, discrepâncias maiores entre os resultados podem ocorrer, sendo explicadas por uma das seguintes razões: a) diferenças de amostragem; b) técnicas impróprias no teste de germinação; c) técnicas impróprias no teste de tetrazólio; d) presença de sementes duras nas amostras; e) uso de lotes de sementes com vigor médio ou baixo; f) presença de sementes com elevados índices de danos mecânicos, de deterioração por umidade ou por danos causados por percevejo; g) sementes infectadas por fungos, tais como *Phomopsis* spp., *Fusarium semitectum*, ou *Colletotrichum truncatum*.

Lakon, conforme citado por Gadd (1950, p. 253), mencionou que sua “longa experiência em comparar os resultados do teste de tetrazólio com os de germinação demonstrou que quando havia diferenças entre os resultados, o problema estava sempre ligado ao teste de germinação.”

Vantagens e limitações do teste para sementes de soja

Listadas abaixo estão as maiores vantagens e desvantagens do teste de tetrazólio:

Vantagens

As maiores vantagens do teste de tetrazólio são:

- O teste não é afetado por diversas condições que podem afetar o desempenho de testes de crescimento, como o de germinação;

- Foca atenção às condições físicas e fisiológicas do embrião de cada semente individualizada;
- Permite rápida avaliação da viabilidade e do vigor (8 horas para a soja);
- Permite a identificação de diferentes níveis de viabilidade e vigor;
- Fornece o diagnóstico das possíveis causas da redução da qualidade das sementes;
- O equipamento necessário é simples e barato;
- Não é influenciado por fatores como dormência;
- Um analista experiente pode ter um rendimento de quatro a cinco amostras (2 x 50 sementes) por hora de trabalho.

Limitações

As maiores desvantagens do teste de tetrazólio são:

- 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;
- Consome mais tempo por amostra do que o teste de germinação, embora seja um teste rápido; entretanto, o teste de tetrazólio propicia um maior número de informações em relação ao teste de germinação;
- Não mostra a eficácia de tratamentos químicos, nem a sua fitotoxicidade potencial;
- Requer do analista capacidade de decisão pelas características do teste.

Mason et al. (1982) reportou que o teste de tetrazólio não foi eficaz na detecção de danos mecânicos recentes. Tal limitação pode ser facilmente superada com a utilização de uma solução de tetrazólio de menor concentração, ou seja, 0,075, conforme sugerida no presente manual.

Quando aplicar o teste de tetrazólio

O teste pode ser aplicado em todas as etapas do sistema de produção de sementes, visando aprimorar o controle de qualidade, ou seja, na colheita, na recepção, antes e após o beneficiamento e a secagem, durante o armazenamento e antes da semeadura. Deve-se enfatizar que os resultados obtidos no teste refletem a qualidade fisiológica atual das sementes.

O teste tem sido utilizado com sucesso já a partir da pré-colheita: cerca de seis a sete dias antes da colheita, diariamente, fazem-se amostragens de plantas dos campos de produção, trilhando-se as sementes manualmente. Por meio da avaliação dessas sementes pelo teste de tetrazólio, pode-se verificar o nível de vigor, a viabilidade e a ocorrência de danos de perceivero e de deterioração por umidade. Dependendo dos resultados obtidos, poderá ser decidido com segurança se o referido campo apresenta qualidade para ser colhido como semente ou como grão. Isto pode resultar em economias significativas aos produtores de sementes, no que se refere a evitar despesas desnecessárias de transporte, secagem, beneficiamento, embalagem e armazenamento de lotes de sementes de baixa qualidade.

O teste de tetrazólio pode ser realizado em amostras de sementes tratadas com agroquímicos, como por exemplo fungicidas, inseticidas, nematicidas, micronutrientes, seguindo-se alguns procedimentos técnicos e de segurança. As sementes tratadas devem ser inicialmente pré-condicionadas em papel de germinação, conforme os procedimentos já relatados. Após, enxaguam-se as sementes em água corrente, antes de serem colocadas para coloração na solução de trabalho do sal de tetrazólio, visando remover parte dos produtos utilizados no tratamento. Após a coloração, enxaguam-se novamente as sementes, não apenas para remover a solução de tetrazólio, mas também para remover os produtos do tratamento. Luvas cirúrgicas, guarda-pó e máscara devem ser utilizados pelo analista. Caso algum dos produtos utilizados no tratamento interfira com a qualidade da coloração do tetrazólio, a solução de trabalho deverá ser preparada utilizando-se o tampão de fosfato, ao invés de água, conforme já relatado.

Áreas para melhorias

A utilização dos resultados do teste de tetrazólio, como em qualquer teste de vigor, pode auxiliar na categorização do nível de vigor para diferentes lotes de sementes e estimar o desempenho desses lotes no campo sob condições ótimas e desfavoráveis. Testes de aferição para determinar a exatidão e precisão do método devem ser realizados para verificar a precisão das interpretações do teste de tetrazólio.

Agradecimentos

Agradecemos a Srt^a. Neia Sussai pelo desenho dos esquemas das distintas classes do teste de tetrazólio, constantes neste livro.

Referências

AOSA. Association of Official Seed Analysts. **Seed vigor testing handbook**. Stillwater: Seed Vigor Test Committee of the Association of Official Seed Analysts, 1983. 93 p. (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 32).

BAALBAKI, R.; ELIAS, S.; MARCOS-FILHO, J.; MCDONALD, M. B. (Ed.). **Seed vigor testing handbook**. Ithaca: Association of Official Seed Analysts, 2009. 341 p. (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 32).

BHERING, M. C.; SILVA, R. F.; ALVARENGA, E. M.; DIAS, D. C. F. S. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8.3-1-8.3.10.

BITTENCOURT, S. R. M.; VIEIRA, R. D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8.2-1-8.2.8.

BOWLING, C. C. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the southern green stink bug on soybeans. **Journal of Economic Entomology**, v. 73, p. 1-3, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 1976. 188 p.

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

BUENO, A. F.; BORTOLOTTI, O. C.; POMARI-FERNANDES, A.; FRANÇA-NETO, J. B. Assessment of a more conservative stink bug economic threshold for managing stink bugs in Brazilian soybean production. **Crop Protection**, v. 71, p. 132-137, 2015.

BULAT, H. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 26, p. 686-696, 1961.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos. Safra 2017/18, v. 5, n. 10. décimo levantamento. Brasília, DF. jul. 2018. 145 p.

COPELAND, T. G.; BRUCE, C. F.; MIDYETTE, J. W. The unofficial application of tetrazolium tests as an aid in checking germination claims. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 49, p. 134-141, 1959.

COSTA, N. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; OLIVEIRA, M. C. N. Procedimento alternativo no teste de tetrazólio em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 869-877, 1998.

COSTA, N. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; PEREIRA, L. A. G.; HENNING, A. A. Avaliação da qualidade da semente de soja produzida no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 1157-1165, 1987.

COSTA, N. P.; MARCOS-FILHO, J. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seed. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 9-17, 1994.

COSTA, N. P.; MARCOS-FILHO, J.; FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. **Teste de tetrazólio em sementes de soja com acondicionamento abreviado** – Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 56).

COTTRELL, H. J. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. **Annals of Applied Biology**, v. 25, p. 123-131, 1948.

CRAVIOTTO, R. M.; FARED, M.; MONTERO, M. **Prueba topografica por tetrazolio**: patrones para la especie soja. Santa Fé: INTA, Centro Regional Santa Fé, E. E. A. Oliveros, 1995. 20 p.

CRAVIOTTO, R. M.; PEREARNAU, M. A.; GALLO, C. **Prueba topográfica por tetrazólio en soja**. Santa Fé: INTA, Centro Regional Santa Fé, E. E. A. Oliveros, 2008a. 96 p.

CRAVIOTTO, R. M.; PEREARNAU, M. A.; GALLO, C. **Topographic tetrazolium test for soybean**. Santa Fé: INTA, Centro Regional Santa Fé, E. E. A. Oliveros, 2008b. 96 p.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **The tetrazolium test for seed viability**. Mississippi State: Mississippi State University, 1962. 64 p. (Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 51).

DIAS, M. C. L. L.; BARROS A. S. R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8.4-1-8.4.10.

FIALA, F. **Handbook of vigour test methods**. 2nd. ed. Zurich: International Seed Testing Association, 1987. 71 p.

FRANÇA-NETO, J. B. Methodology of the tetrazolium test for soybean seeds. In: **Complete diagnosis of soybean quality problems**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Services, USDA-ARS, 1989. p. 6-51.

FRANÇA-NETO, J. B. Princípios do teste de tetrazólio para a semente de soja. **Boletim LASP**, Curitiba, v.3, n.1, p.1-8, 1981.

FRANÇA-NETO, J. B. Qualidade fisiológica da semente. In: FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. (Ed.). **Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 1984. p. 5-24. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 9).

FRANÇA-NETO, J. B.; DIAS, M. C. L. L.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. Soybean seed quality referee test in Brazil. **Association of Official Seed Analysts Newsletter**, v. 60, n. 3, p. 17, 1986.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **El test de tetrazolio en semillas de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 1998c. 72 p. (EMBRAPA-CNPSo, Documentos, 117).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8.5-1-8.5.28.

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

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

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P.; HENNING, A. A.; PÁDUA, G. P. Adequação de metodologia de testes de vigor para sementes de soja (Subprojeto 04.2000.327-02). In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SARAIVA, O. F. (Org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2002: sementes e transferência de tecnologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2003. p. 25-32. (Embrapa Soja. Documentos, 211).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. **Suscetibilidade das principais cultivares de soja utilizadas no Brasil ao dano de embebição no teste de germinação**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998a. 10p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 60).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. Aferição da metodologia dos testes de tetrazólio e de envelhecimento acelerado para a avaliação da qualidade de sementes de soja. In: REUNIAO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIAO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.191-192. (Embrapa Soja. Documentos, 157).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. Avaliação da utilização rotineira dos testes de tetrazólio e de envelhecimento acelerado para a semente de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2.; MERCOSOJA 2002, 2002, Foz do Iguaçu. **Perspectivas do agronegócio da soja: resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 363. (Embrapa Soja. Documentos, 181).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PADUA, G. P.; LORINI, I.; HENNING, F. A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82 p. (Embrapa Soja. Documentos, 380).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; WEST, S. H.; MIRANDA, L. C. Soybean seed quality as affected by shriveling due to heat and drought stresses during seed filling. **Seed Science and Technology**, v. 21, p. 107-116, 1993.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P. Características fisiológicas da semente: vigor, viabilidade, germinação, danos mecânicos tetrazólio, deterioração por umidade tetrazólio, dano por percevejo tetrazólio e sementes verdes. In: LORINI, I. **Qualidade de**

sementes e grãos comerciais de soja no Brasil – safra 2015/16. Londrina: Embrapa Soja, 2017. p. 35-61. (Embrapa Soja, Documentos, 393).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; PÁDUA, G. P.; LORINI, I. Características fisiológicas da semente: vigor, viabilidade, germinação, danos mecânicos tetrazólio, deterioração por umidade tetrazólio, dano por percevejo tetrazólio e sementes verdes. In: LORINI, I. **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil – safra 2016/17.** Londrina: Embrapa Soja, 2018. p. 31-59. (Embrapa Soja, Documentos, 403).

FRANÇA-NETO, J. B.; PÁDUA, G. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; CARVALHO, M. L. M.; HENNING, A. A.; LORINI, I. **Semente esverdeada de soja: causas e efeitos sobre o desempenho fisiológico** – Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 15p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 91).

FRANÇA-NETO, J. B.; PEREIRA, L. A. G.; COSTA, N. P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. (Ed.). **Diagnóstico completo da qualidade da semente de soja - Versão Preliminar.** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1985. p. 9-43.

FRANÇA-NETO, J. B.; PEREIRA, L. A. G.; COSTA, N. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. **Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja.** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1988. 58 p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 32).

FRANÇA-NETO, J. B.; POTTS, H. C. Efeitos da colheita mecânica e da secagem artificial sobre a qualidade da semente dura em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 1, n. 2, p. 64-77, 1979.

FRANÇA-NETO, J. B.; WEST, S. H. Effects of *Colletotrichum truncatum* and *Cercopora kikuchii* on viability and quality of soybean seed. **Journal of Seed Technology**, v. 13, n. 2, p. 136-149, 1989b.

FRANÇA-NETO, J. B.; WEST, S. H. Problems in evaluating viability of soybean seed infected with *Phomopsis* spp. **Journal of Seed Technology**, v. 13, n. 2, p. 122-135, 1989a.

GADD, I. Biochemical tests for seed germination. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 16, p. 235-253, 1950.

GRABE, D. F. **Tetrazolium testing handbook for agricultural seed.** Stillwater: Association of Official Seed Analysts, 1970. 62 p.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods.** 3rd. ed. Zurich: International Seed Testing Association, 1995. 117 p.

HASEGAWA, K. On the determination of viability in seed by reagents. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 7, p. 148-153, 1935.

HENNING, A. A.; FRANÇA-NETO, J. B. Problemas na avaliação da germinação de semente de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 5, n. 2, p. 9-22. 1980.

ISELEY, D. Employment of tetrazolium chloride for determining viability of small grain seeds. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 42, p. 143-153, 1952.

ISTA. **International rules for seed testing.** Bassersdorf: International Seed Testing Association, 2017. 296 p.

LAKON, G. Germination potential and germination tendency according to the present state of research. **Saalgutwirtsch**, v. 5, p. 180-183, 205-207, 1953.

LAKON, G. The topographical selenium method, a new method for the establishment of viability of cereal seed without a growth test. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 12, p. 1-18, 1940.

LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. **Plant Physiology**, v. 24, p. 389-394, 1949.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 425 p.

LEIST, N.; KRAMER, S.; JONITZ, A. **ISTA working sheets on tetrazolium testing**. Volumes I e II. Zurich: International Seed Testing Association, ISTA Tetrazolium Committee, 2003.

LINDENBEIN, W. Tetrazolium testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 30, p. 89-97, 1965.

MANSON, S. C.; VORST, J. J.; HANKINS, B. J.; HOLT, D. A. Standard, cold, and tetrazolium germination tests as estimators of field emergence of mechanically damaged soybean seed. **Agronomy Journal**, v. 74, p. 546-550, 1982.

MILLER, A.L. (Ed.). **AOSA/SCST Tetrazolium Testing Handbook**, 2010 edition. Moline, IL: Association of Official Seed Analysts and Society of Commercial Seed Technologists, 2010. 402 p.

MOORE, R. P. Freeze injury to seed corn as evaluated in tetrazolium and growth tests. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 57, p. 138-140, 1967a.

MOORE, R. P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zurich: International Seed Testing Association, 1985. 99 p.

MOORE, R. P. History supporting tetrazolium seed testing. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 34, p. 233-242, 1969.

MOORE, R. P. Seed facts from tetrazolium tests: freeze injury to seed corn as evaluated in tetrazolium and growth tests. In: 1967 SHORT COURSE FOR SEEDSMEN AND SEED TECHNOLOGY LABORATORY. **Proceedings...** Mississippi State: Mississippi State University, 1967b. p. 73-78.

MOORE, R. P. Soybean germination. **Seedsmen's Digest**, v. 11, n. 3, p. 12, 52, 54-55, 1960.

MOORE, R. P. Tetrazolium as a universally acceptable quality test of viable seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 27, p. 795-805, 1962a.

MOORE, R. P. Tetrazolium best method for evaluating seed life. **Seedsmen's Digest**, v. 17, n. 11, p. 38-40. 1966.

MOORE, R. P. Tetrazolium evaluation of the relationship between total germination and seed quality. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, v. 51, p. 127-130, 1961.

MOORE, R. P. Tetrazolium seed testing developments in North America. **Journal of Seed Technology**, v. 1, p. 17-30, 1976.

MOORE, R. P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. (Ed.). **Seed Ecology**. London: Butterworth, 1973. p. 347-366.

MOORE, R. P. TZ checks your seed for quality. **Crops and Soils**, v. 15, n. 1, p. 10-12, 1962b.

MOORE, R. P.; SMITH, E. Tetrazolium: a useful research tool in studying causes for seed germination difficulties. In: ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION OF SEED CONTROL OFFICIALS OF THE SOUTHERN STATES, 13., Nashville, 1956. p. 15-22.

MOREANO, T. B.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARQUES, O. J. Changes in the effects of weathering and mechanical damage on soybean seed during storage. **Seed Science and Technology**, v. 39, p. 604-611, 2011.

OSORIO, J. A. **Freezing injury in soybean seeds and relationships to germination and fungal colonization**. 1987. 86 f. Thesis (Master) - Iowa State University, Ames.

PEREIRA, L. A. G.; ANDREWS, C. H. Comparação de alguns testes de vigor para avaliação da qualidade de sementes de soja. **Semente**, v. 2, n. 2, p. 15-25, 1976.

PERRY, D. A. **Handbook of vigour test methods**. Zurich: International Seed Testing Association, 1981. 72 p.

PETERS, J. (Ed.). **Tetrazolium testing handbook**. Ithaca: Association of Official Seed Analysts, 2007. 88 p. (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 29).

PORTER, R. H.; DURREL, M.; ROMM, H. J. The use of 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride as a measure of seed germinability. **Plant Physiology**, v. 22, p. 149-159, 1947.

SINCLAIR, J. B. **Compendium of soybean diseases**. 2nd ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1982. 104 p.

SMITH, F. G. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. **Plant Physiology**, v. 27, p. 445-456, 1952.

SMITH, F. G.; THRONEBERRY, G. O. The tetrazolium test and seed viability. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, v. 40, p. 105-109, 1951.

STEINER, A. M. Chemistry of tetrazolium salts and biochemistry of tetrazolium reduction. In: DON, R.; LEIST, N.; STEINER, A. M. (Ed.). ISTA Tetrazolium Workshop 1997. **Proceedings...** Edinburgh: ISTA, 1997c. p. 55-68.

STEINER, A. M. History of the development of biochemical viability determination in seeds. In: DON, R.; LEIST, N.; STEINER, A. M. (Ed.). ISTA Tetrazolium Workshop 1997. **Proceedings...** Edinburgh: ISTA, 1997a. p. 7-16.

STEINER, A. M. Seed vigour determination by means of the topographical tetrazolium test. In: DON, R.; LEIST, N.; STEINER, A. M. (Ed.). ISTA Tetrazolium Workshop 1997. **Proceedings...** Edinburgh: ISTA, 1997b. p. 27-37.

STEINER, A. M.; KRUSE, M. On the origin and rise of topographical tetrazolium testing – a brief historical retrospect. In: LEIST, N.; KRAMER, S.; JONITZ, A. (Ed.). **Working Sheets on Tetrazolium Testing**, Volume I. Bassersdorf: ISTA Tetrazolium Committee, 2003. p. 1-5.

TOLEDO, M., Z.; CAVARIANI, C.; FRANÇA-NETO, J. B.; NAKAGAWA, J. Imbibition damage in soybean seeds affected by initial moisture content, cultivar and production location. **Seed Science and Technology**, v. 38, p. 399-408, 2010.

TURNIPSEED, S. G.; KOGAN, M. Soybean entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 21, p. 247-282, 1976.

VERTUCCI, C. W.; LEOPOLD, C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. **Plant Physiology**, v. 84, p. 1038-1043, 1987.

VIEIRA, M. G. G. C.; VON-PINHO, E. V. R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 8.1-1-8.1.13.

VILLAS BOAS, G. L.; GAZZONI, D. L.; FRANÇA-NETO, J. B.; COSTA, N. P.; HENNING, A. A.; ROESSING, A. C. **Efeito de cinco populações de percevejos sobre diversas características da soja cv. UFV-1**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 1982. 13 p. (EMBRAPA-CNPSo. Pesquisa em Andamento, 3).

YAKLICH, R. W.; VIGIL, E. L.; WERGIN, W. P. Scanning electron microscopy of soybean seed coat. **Scanning Electron Microscopy**, v. 2, p. 991-1000, 1984.

YAKLICH, R. W.; WERGIN, W. F.; VIGIL, E. L. Special secretory cells in the soybean seed coat. **Protoplasma**, v. 34, p. 78-87, 1986.

ZORATO, M. F.; FRANÇA-NETO, J. B.; ASTAFEIF, N. C.; TAKEDA, C. Nova interpretação na metodologia do teste de tetrazólio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., Curitiba. **Informativo ABRATES**, v. 11, n. 2, p. 216, 2001.

ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; FRANÇA-NETO, J. B. Sementes esverdeadas em soja: testes alternativos para determinar sua qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2007.

Apêndice

Ilustrações típicas das oito Classes de sementes de soja coloridas pelo tetrazólio.

As fotos de cada par são das faces externa (esquerda) e interna (direita) da mesma semente.

Fotos: José de Barros França-Neto

Classe 1



Face externa semente Classe 1.



Face interna semente Classe 1.



Face externa semente Classe 1.



Face interna semente Classe 1.



Face externa semente Classe 1.



Face interna semente Classe 1.



Face externa semente Classe 1, com estria de início de dano por umidade.



Face interna semente Classe 1, sem sinais desse dano.

Classe 2



Face externa semente Classe 2, com dano por umidade.



Face interna semente Classe 2, sem sinais desse dano.



Face externa semente Classe 2, com dano por umidade.



Face interna semente Classe 2, sem sinais desse dano.



Face externa semente Classe 2, com dano por umidade na lateral e leve dano mecânico latente na parte central do cotilédone.



Face interna semente Classe 2, sem sinais desses danos.

Classe 3



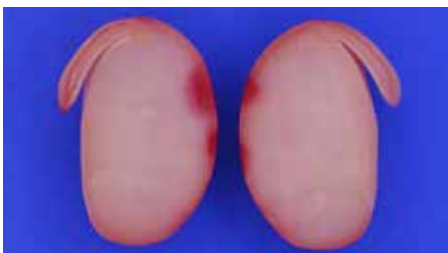
Face externa semente Classe 3, com dano por umidade.



Face interna semente Classe 3, com leve sombreamento do dano por umidade.



Face externa semente Classe 3, com danos por umidade e mecânico latente na lateral.



Face interna semente Classe 3, com dano mecânico latente.



Face externa semente Classe 3, com danos por umidade e mecânico latente.



Face interna semente Classe 3, com danos por umidade nos cotilédones e eixo embrionário e dano mecânico latente no cotilédone.



Face externa semente Classe 3, com danos por percevejo, por umidade e mecânico latente.

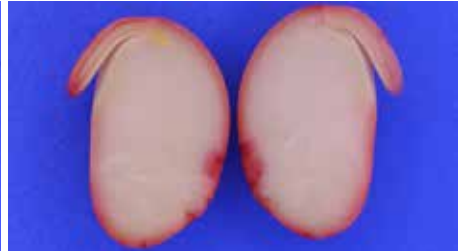


Face interna semente Classe 3, com dano mecânico latente e leve sombreamento de dano por umidade.

Classe 3



Face externa semente Classe 3, com danos mecânico latente e por umidade.



Face interna semente Classe 3, com dano mecânico latente e leve sombreamento de dano por umidade.



Face externa semente Classe 3, com dano por umidade.



Face interna semente Classe 3, com leve sombreamento de dano por umidade.



Face externa semente Classe 3, com danos por percevejo e umidade.



Face interna semente Classe 3, com dano por percevejo e dano por embebição.



Face externa semente Classe 3, com estria de dano por umidade e dano por percevejo



Face interna semente Classe 3, com dano por percevejo e leve sombreamento de dano por umidade.

Classe 4



Face externa semente Classe 4, com danos por umidade nos cotilédones e mecânico latente na radícula.



Face interna semente Classe 4, com sombreamento de dano por umidade e dano mecânico latente na radícula.



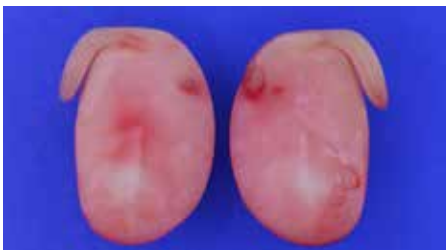
Face externa semente Classe 4, com dano por umidade e dano por percevejo na região vascular.



Face interna semente Classe 4, com leve sombreamento de dano por umidade.



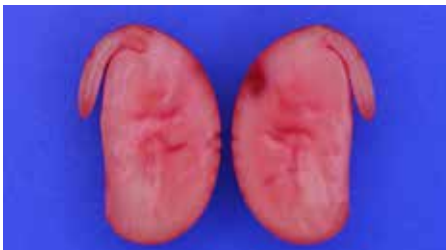
Face externa semente Classe 4, com danos por percevejo.



Face interna semente Classe 4, com danos por percevejo.



Face externa semente Classe 4, com danos por umidade e mecânico latente.



Face interna semente Classe 4, com danos por umidade e mecânico latente.

Classe 4



Face externa semente Classe 4, com danos por umidade e mecânico imediato.



Face interna semente Classe 4, com dano mecânico imediato e sombreamento de dano por umidade.



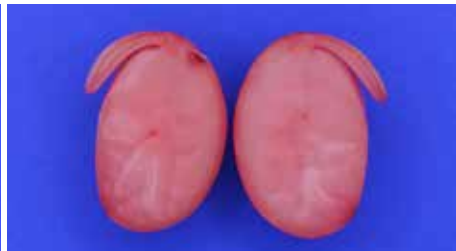
Face externa semente Classe 4, com danos por umidade e mecânico latente.



Face interna semente Classe 4, com coloração interna dos cotilédones, devido ao dano mecânico.



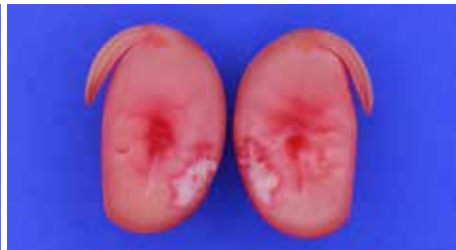
Face externa semente Classe 4, com danos por umidade e mecânico latente na parte superior do cotilédone.



Face interna semente Classe 4, com dano mecânico latente e sombreamento por dano por umidade.



Face externa semente Classe 4, com danos por percevejo e por umidade.



Face interna semente Classe 4, com danos por percevejo e sombreamento devido ao dano por umidade.

Classe 5



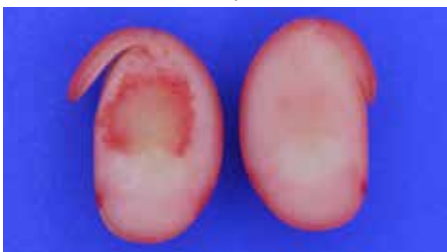
Face externa semente Classe 5, com danos mecânico imediato e por umidade.



Face interna semente Classe 5, com coloração interna dos cotilédones e sombreamento dos danos mecânico e por umidade.



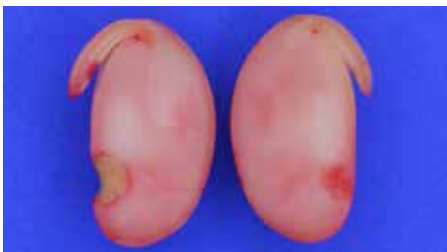
Face externa semente Classe 5, com danos por percevejo, umidade e mecânico latente.



Face interna semente Classe 5, com dano por percevejo na região vascular e sombreamento por dano mecânico.



Face externa semente Classe 5, com danos por umidade, percevejo e mecânico latente.



Face interna semente Classe 5, com danos por percevejo, mecânico na radícula e sombreamento do dano por umidade.



Face externa semente Classe 5, com danos por percevejo e por umidade.

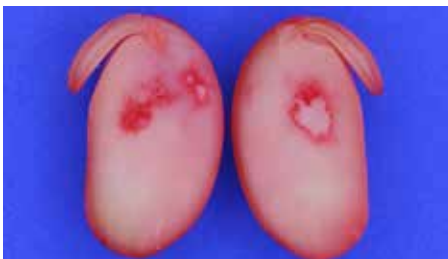


Face interna semente Classe 5, com danos por percevejo e sombreamento do dano por umidade.

Classe 5



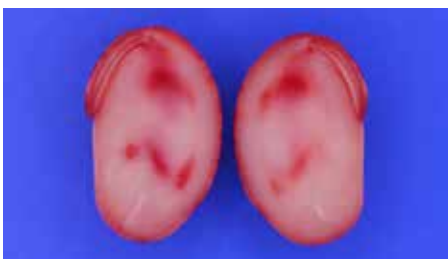
Face externa semente Classe 5, com danos por percevejo na região vascular e por umidade.



Face interna semente Classe 5, com dano por percevejo.



Face externa semente Classe 5, com danos por umidade e percevejo.



Face interna semente Classe 5, com sombreamento devido aos danos por umidade e percevejo.



Face externa semente Classe 5, com danos por umidade e mecânico imediato e latente.



Face interna semente Classe 5, com danos mecânico e estrias de dano por umidade.



Face externa semente Classe 5, com danos por percevejo, umidade e mecânico latente.



Face interna semente Classe 5, com danos por percevejo e coloração dos cotilédones devido a todos os danos.

Classe 6



Face externa semente Classe 6, com danos por umidade e mecânico latente.



Face interna semente Classe 6, com dano mecânico latente e coloração na plúmula.



Face externa semente Classe 6, com danos por umidade e mecânico latente.



Face interna semente Classe 6, com dano mecânico na radícula e sombreamento do dano por umidade.



Face externa semente Classe 6, com danos por umidade e mecânico latente na radícula.



Face interna semente Classe 6, com dano mecânico na radícula.



Face externa semente Classe 6, com danos por percevejo e umidade.



Face interna semente Classe 6, com danos severos de percevejo e sombreamento devido ao dano por umidade.

Classe 7



Face externa semente Classe 7, com dano por umidade intenso.



Face interna semente Classe 7, com dano por umidade intenso no eixo embrionário.



Face externa semente Classe 7, com danos por umidade e mecânico latente no eixo embrionário.



Face interna semente Classe 7, com dano mecânico no eixo embrionário e sombreamento devido ao dano por umidade.



Face externa semente Classe 7, com dano por umidade e por percevejo no eixo embrionário.



Face interna semente Classe 7, com dano por percevejo no eixo embrionário e sombreamento devido ao dano por umidade.



Face externa semente Classe 7, com dano por umidade e mecânico latente no hipocótilo.

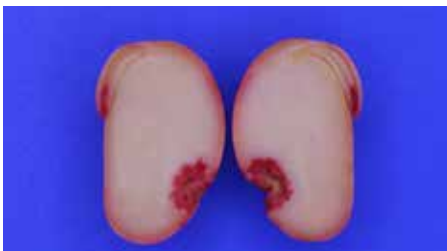


Face interna semente Classe 7, com dano mecânico no hipocótilo e sombreamento devido ao dano por umidade.

Classe 7



Face externa semente Classe 7, com danos por percevejo, por umidade e mecânico latente na radícula.



Face interna semente Classe 7, com danos por percevejo e mecânico na radícula.



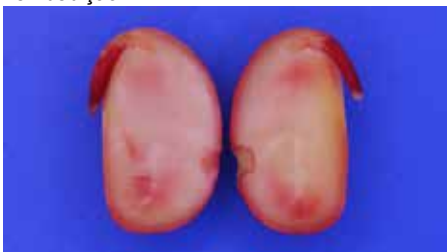
Face externa semente Classe 7, com danos intensos por umidade.



Face interna semente Classe 7, com danos intensos por umidade no eixo embrionário e fissuras nos cotilédones por dano de embebição.



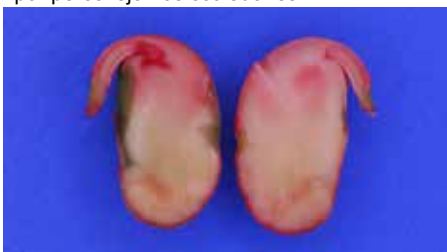
Face externa semente Classe 7, com danos por umidade e percevejo.



Face interna semente Classe 7, com dano intenso de umidade no eixo embrionário e por percevejo nos cotilédones.

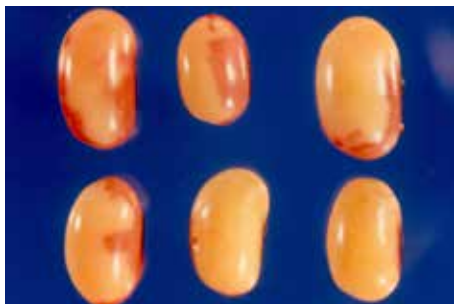


Face externa semente Classe 7, com danos por umidade e percevejo (semente esverdeada).



Face interna semente Classe 7, com danos severos por percevejo e umidade.

Classe 8



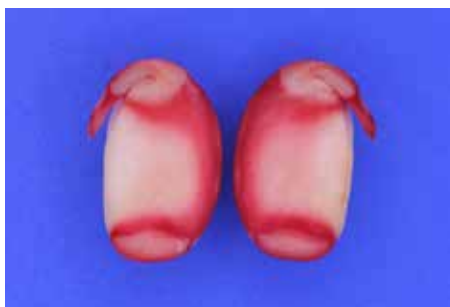
Face externa de sementes mortas (Classe 8) devido ao dano por umidade.



Face externa de semente morta (Classe 8) devido ao dano por umidade.



Face externa de semente morta (Classe 8) devido ao dano por umidade



Face interna de semente morta (Classe 8) devido ao dano por umidade.

Embrapa

Soja

Patrocínio

Cool seed

TECNOLOGIAS DE PÓS-COLHEITA