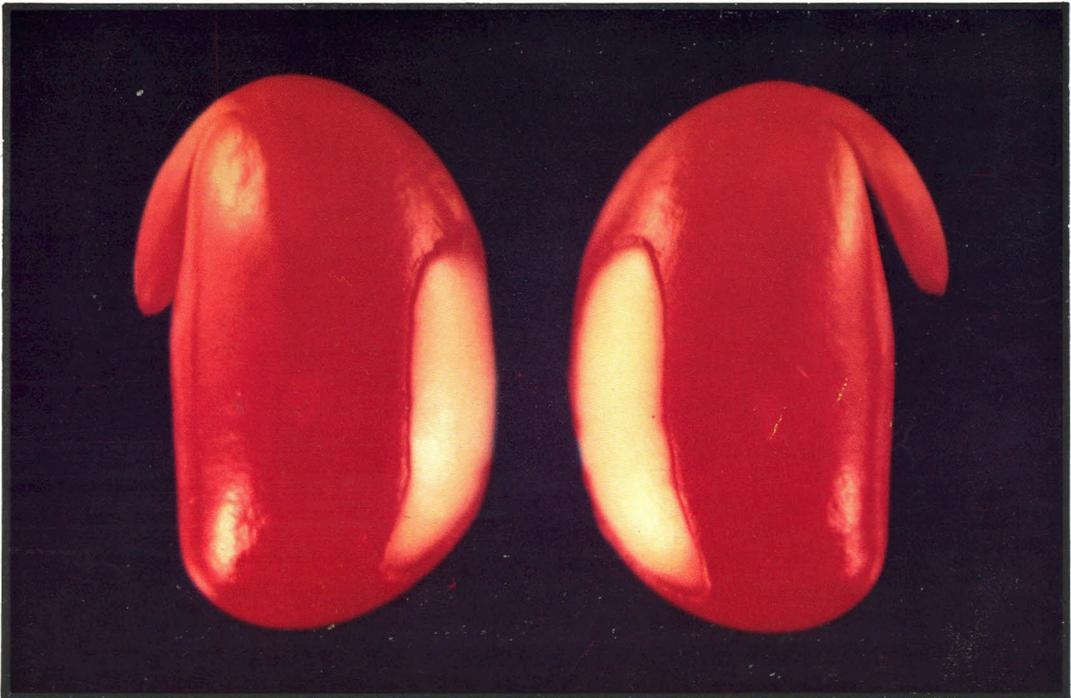




Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura e Reforma Agrária
Centro Nacional de Pesquisa de Soja – CNPSO
Londrina – PR.

METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE SOJA



Londrina, PR.
1988



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente Interino: Itamar Augusto Cautiero Franco

Ministro da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária: Lázaro Ferreira Barbosa



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA

Presidente: Murilo Xavier Flores

Diretores: Eduardo Paulo de Moraes Sarmiento

Manoel Malheiros Tourinho

Ivan Sérgio Freire de Souza

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA – CNPSo

Chefe: Flávio Moscardi

Chefe Adjunto Técnico: Áureo Francisco Lantmann

Chefe Adjunto Administrativo: Antonio Carlos Roessing

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa do Setor de Editoração do CNPSo.

ISSN 0101-5494



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Vinculada ao Ministério da Agricultura e Reforma Agrária

Centro Nacional de Pesquisa de Soja – CNPSo

Londrina – PR.

**METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO
EM SEMENTE DE SOJA**

José de Barros França Neto

† Luiz Antonio Geraldo Pereira

Nilton Pereira da Costa

Francisco Carlos Krzyzanowski

Ademir Assis Henning

Londrina, PR

1988

Exemplares desta publicação podem ser solicitado ao:

SETOR DE EDITORAÇÃO

Rod. Carlos João Strass (Londrina-Warta)
Acesso Orlando Amaral
Telefone: (0432) 20-4166
Telex: (432) 208
Fax: (0432) 20-4186
Caixa Postal, 1061
86.001-970 – Londrina, PR

Tiragem: 1ª impressão: 1988 – 500 exemplares
1ª reimpressão: 1992 – 1.000 exemplares

COMITÊ DE PUBLICAÇÕES

Léo Pires Ferreira (Presidente)
Álvaro M.R. Almeida
Carlos Caio Machado
Milton Kaster
Gedi J. Sfredo
Paulo R. Galerani
Ivania A.L. Donadio (Secretária)

Ilustração: Danilo Estevão

Foto Capa: José de B. França Neto

SETOR DE EDITORAÇÃO

Coordenação: Léo Pires Ferreira
Secretária: Yara Santos Cioffi
Digitação: Divina M. Boaventura
Composição: Sandra Regina
Revisão: Sara Piccinini Dotto
Arte Final: Danilo Estevão
Fotomecânica: Hélio Borini Zemuner
Impressão: Décio de Assis
Acabamento: Amauri Farias
Vendas: Arilda Batista de Araújo

Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja, por José de Barros França Neto e outros. Londrina, EMBRAPA-CNPSO., 1988.

60 p. EMBRAPA-CNPSO. Série Documentos, 32

1. Soja-semente-teste de tetrazólio. 2. Semente teste de tetrazólio. I. Pereira, Luiz Antonio Geraldo, colab. II. Costa, Nilton Pereira da, colab. III. Krzyzanski, Francisco Carlos, colab. IV. Henning, Ademir Assis, colab. V. Título. VI. Série.

CDD. 631-521

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. HISTÓRICO	10
3. PRINCÍPIOS	11
4. MATERIAL NECESSÁRIO	12
5. INTERPRETAÇÃO	14
Identificação dos Níveis de Viabilidade	16
Classe 1	16
Classe 2	17
Classe 3	20
Classe 4	25
Classe 5	29
Classe 6	30
Classe 7	30
Classe 8	33
Utilização da Ficha	34
Interpretação dos Resultados	34
6. PRECISÃO DOS RESULTADOS	35
7. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA SOJA	35
8. REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE	39

IN MEMORIAN

Luiz Antonio, você foi a semente deste conhecimento em nosso meio e como pesquisador, deixou-nos marcas profundas de saber, caráter, dedicação e humanismo. Nós, parceiros dessa jornada, ao editarmos esta publicação, concretizamos um dos seus ideais, o qual um dia, no laboratório da vida, tivemos a felicidade de coparticipar.

APRESENTAÇÃO

A crescente modernização da agricultura brasileira tem exigido uma constante adequação tecnológica, de forma a racionalizar o processo produtivo e compatibilizá-la com as demandas sociais e econômicas exigidas pela sociedade.

Entre os insumos agrícolas, a semente ocupa um papel de destaque, sendo fundamental para que toda a produção agrícola possa se desenvolver dentro dos parâmetros quantitativos e qualitativos que são esperados como desempenho do setor agrícola.

Sob este enfoque, a qualidade da semente ofertada ao agricultor assume importância ímpar, pois não se vislumbra uma agricultura moderna e eficiente se a base do processo – a semente – não preencher os requisitos de qualidade exigidos.

Determinar a qualidade da semente tem sido um desafio histórico para os cientistas que, arduamente, perseguiram métodos que atendessem, entre outros critérios, os quesitos de precisão e rapidez. A evolução científica nesta área ocorreu ao longo deste século redundando no teste de tetrazólio que representa o que de mais moderno dispõe a ciência no momento.

O Centro Nacional de Pesquisa de Soja se orgulha de haver contribuído para o aperfeiçoamento e a difusão desta técnica no Brasil, sendo que esta publicação tem a ambição de constituir-se em um completo manual que permitirá aos analistas de sementes usufruírem das vantagens do uso do teste de tetrazólio.

Ao ensejo desta edição, queremos enfatizar a importância do trabalho de nosso saudoso pesquisador Dr. Luiz Antonio Geraldo Pereira, precocemente falecido, que teve importância transcendental, com seu trabalho e dedicação, para que a agricultura brasileira pudesse se beneficiar deste avanço tecnológico.

Londrina, setembro de 1988.

DÉCIO LUIZ GAZZONI

Chefe do CNPSo

METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTE DE SOJA

*José de Barros França Neto*¹
+Luiz Antonio Geraldo Pereira
*Nilton Pereira da Costa*²
*Francisco Carlos Krzyzanowski*³
*Ademir Assis Henning*⁴

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de sementes de soja de alto padrão tem exigido da indústria de sementes um controle de qualidade mais versátil e dinâmico. Tal exigência tem sido parcialmente suprida pela rapidez com que são executados alguns testes, como pureza física e varietal, teor de umidade e índice de danos mecânicos.

Entretanto, o teste padrão de germinação, que é rotineiramente utilizado para determinar a qualidade fisiológica das sementes, apresenta sérias limitações. Além da demora em sua execução, este teste não fornece informações quanto ao vigor, não permite de forma precisa a identificação dos fatores que afetam a qualidade das sementes, e seus resultados são freqüentemente mascarados pela presença de fungos como *Phomopsis* sp. e *Fusarium semitectum*. 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.

O teste de tetrazólio é uma alternativa promissora devido a rapidez e a eficiência na determinação da viabilidade, do vigor, da deterioração por umidade e dos

¹ Eng^o Agr^o, Ph.D., CREA n^o 48.073/D. EMBRAPA—Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1.061, CEP 86001 - Londrina, PR.

² Eng^o Agr^o, M.Sc., CREA n^o 18.379/D. EMBRAPA—Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1.061, CEP 86001 - Londrina, PR.

³ Eng^o Agr^o, Ph.D., CREA n^o 32.133/D. EMBRAPA—Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1.061, CEP 86001 - Londrina, PR.

⁴ Eng^o Agr^o, Ph.D., CREA n^o 10.454/D. EMBRAPA—Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1.061, CEP 86001 - Londrina, PR.

danos mecânico, da secagem e por percevejo.

O referido teste é conhecido desde a década de 40, porém sua utilização é ainda muito limitada, uma vez que a literatura disponível é carente de detalhes sobre a metodologia.

2. HISTÓRICO

O desenvolvimento de testes rápidos, visando a determinação da qualidade fisiológica das sementes, tem sido um dos principais objetivos dos tecnólogos de semente há vários anos, principalmente a partir do final do século passado, quando o sistema de produção de semente começou a ser organizado em diversos países da Europa.

Diversos testes, baseados na observação da coloração, no aspecto, no peso volumétrico e na velocidade de embebição da semente, foram inicialmente utilizados, porém sem nenhuma precisão.

Em 1875, foi desenvolvida a técnica do ácido sulfúrico, que fornecia informações grosseiras sobre a qualidade da semente, uma vez que o teste se embasava na interpretação dos diferentes padrões de coloração dos tecidos vivos e deteriorados, após a embebição com o ácido. Em 1925, houve a tentativa da utilização de corantes, como o índigo carmin, que também não fornecia resultados confiáveis.

Nesta mesma época, atenção especial começou a ser dedicada a métodos baseados na atividade de enzimas específicas ou a grupos de enzimas. Estas, sendo bio-catalizadoras nos processos metabólicos, têm a sua presença ou a sua atividade muito relacionada com a viabilidade da semente. Neste sentido, estudos foram realizados com a peroxidase e a catalase, porém sem muito sucesso porque as sementes não eram individualizadas em tais avaliações. Esses testes, além de onerosos, requeriam a utilização de técnicas bioquímicas complicadas.

Após 1930, atenção especial passou a ser dada ao grupo das desidrogenases, enzimas envolvidas nas reações de óxi-redução de muitos compostos orgânicos durante o processo respiratório (ciclo de Krebs). A atividade enzimática podia ser facilmente observável através das diferentes colorações de alguns destes compostos, quando na forma oxidada ou reduzida.

O método de selenito, amplamente estudado por Lakon, em 1940, na Alemanha, apresentava considerável precisão na determinação da viabilidade, pela obser-

vação individualizada da semente. Entretanto, possuía sérias limitações, pois o sal de selênio, além de ser muito caro, é extremamente tóxico, resultando em grande risco para o analista.

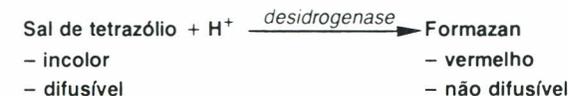
Kühn e Jerchel, em 1941, descobriram que os sais de tetrazólio se reduzem nos tecidos vivos, resultando em um composto de cor vermelha, o formazan. Ciente destes resultados, Lakon abandonou o teste de selenito e se dedicou a trabalhos com sais de tetrazólio. Ele se dedicou inicialmente ao milho e aos cereais pequenos, descobrindo que o melhor sal para a avaliação da viabilidade das sementes era o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio.

Em 1945, após a II Guerra, durante um interrogatório a cientistas alemães, o trabalho de Lakon foi descoberto e publicado em língua inglesa. Em seguida, a aplicação do teste em sementes de soja sofreu um grande impulso após diversos trabalhos realizados pelo Dr. D.F. Grabe da Universidade do Estado do Oregon, e pelo Dr. R. P. Moore da Universidade do Estado da Carolina do Norte, E.U.A.

No Brasil, esta metodologia foi introduzida por diversos pesquisadores, durante o convênio M.A. - Universidade do Estado de Mississipi, através do AGIPLAN destacando-se, entre eles, o Dr. Luiz Antonio Geraldo Pereira.

3. PRINCÍPIOS

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases as quais catalizam as reações durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) nos tecidos vivos. Quando a semente de soja é imersa na solução de tetrazólio, esta é difundida através dos tecidos, ocorrendo, nas células vivas, a reação de redução que resulta na formação de um composto vermelho, não-difusível, conhecido por formazan:



4. MATERIAL NECESSÁRIO

Para a realização deste teste é necessário o seguinte:

- a) reagente:
 - . sal de tetrazólio: normalmente comercializado em frascos com 10 g;
- b) vidraria:
 - . placa de Petri;
 - . frasco de vidro (becker) ou copos de plástico, volume \pm 50 ml;
 - . frasco de vidro, cor âmbar, para armazenar a solução de tetrazólio (reduz-se com a luz).

OBS.: Não utilizar frascos metálicos
- c) lâmina de barbear;
- d) estufa ou germinador, com temperatura de 35°C a 40°C;
- e) lupa de seis aumentos (6 x) com iluminação fluorescente, de preferência circular;
- f) refrigerador para armazenagem das amostras;
- g) papel toalha.

Preparo da solução

Com base na experiência de vários anos e no alto custo do sal de tetrazólio, sugere-se utilizar solução na concentração de 0,075%.

Prepara-se, inicialmente, a solução estoque a 1,0%, misturando 10,0 g do sal de tetrazólio em 1,0 l de água destilada. Esta solução deve ser armazenada em frasco de vidro de cor âmbar, em local escuro e fresco.

Quando necessário, prepara-se a solução de trabalho a 0,075%, que também deve ser armazenada com os mesmos cuidados da solução estoque:

$$1,0 \text{ litro de solução a } 0,075\% = 75 \text{ ml solução estoque } (1,0\%) + 925 \text{ ml de } H_2O.$$

A água utilizada no preparo da solução de trabalho pode ser destilada ou da rede de abastecimento, desde que apresente o pH entre 6 e 8, e não seja salobra.

Observação: com um vidro de 10 g de sal pode-se testar a viabilidade de até 190 lotes de semente, utilizando a solução a 0,075%.

Preparo das Sementes

. Amostragem

A amostra de trabalho deve ser representativa do lote e coletada conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (RAS).

. Número de Sementes

Para o teste de germinação padrão (em areia ou rolo de papel) as RAS recomendam a utilização de 400 sementes por amostra, (8 repetições com 50 sementes cada). Para o teste de tetrazólio é sugerida a utilização de 100 sementes (2 repetições com 50 sementes cada).

A necessidade de um menor número de sementes para o teste de tetrazólio é devida às condições homogêneas a que são submetidas todas as sementes durante o seu preparo, o que normalmente não ocorre durante a execução do teste padrão de germinação: os gradientes de umidade e temperatura comumente encontrados nos germinadores, e a possibilidade da disseminação de fungos nos rolos de papel podem resultar em menor precisão dos resultados.

. Pré-acondicionamento

As sementes devem ser embaladas em papel toalha umedecido e mantidas nestas condições por um período de 16 horas, na temperatura de \pm 25°C. Para evitar a perda de umidade as embalagens devem permanecer em câmara úmida, ou seja, em saco plástico, em germinador ou em dessecador com água em lugar de sílica-gel.

. Coloração

Após o pré-acondicionamento, as sementes são colocadas em frascos bequer ou copinhos de plástico, sendo totalmente submersas na solução de tetrazólio (0,075%). As sementes devem permanecer assim a uma temperatura de 35°C - 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.

. Lavagem da Amostra

Alcançada a coloração ideal, as sementes são retiradas do ambiente a

35°C - 40°C, e são em seguida lavadas com água comum e devem ser mantidas submersas em água até o momento a avaliação.

Caso as amostras não sejam avaliadas de imediato, devem ser mantidas em refrigerador, por até 12 horas.

5. INTERPRETAÇÃO

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 com o auxílio de uma lâmina de barbear, observando a ocorrência dos danos (mecânico, de secagem e por percevejo e deterioração por umidade nas partes externa e interna dos cotilédones, dando atenção especial ao eixo embrionário (radícula-hipocótilo) (Fig. 1). Deve-se observar detalhadamente se a ocorrência de determinado dano no eixo embrionário foi superficial, atingindo apenas o córtex, ou se afetou o cilindro central (Fig. 2).

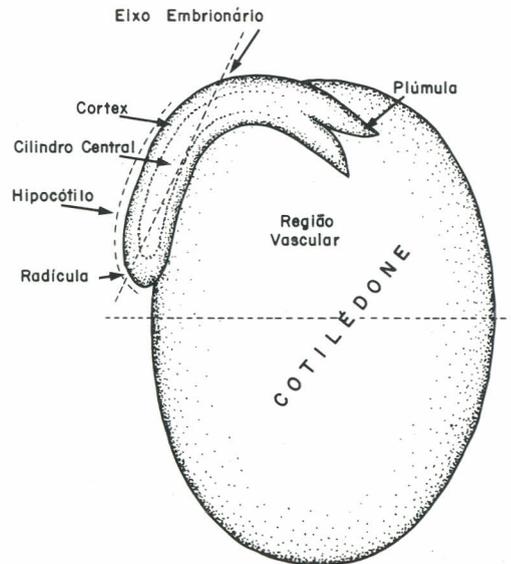


Fig. 1. Corte longitudinal de uma semente de soja, mostrando suas estruturas embrionárias. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1984.

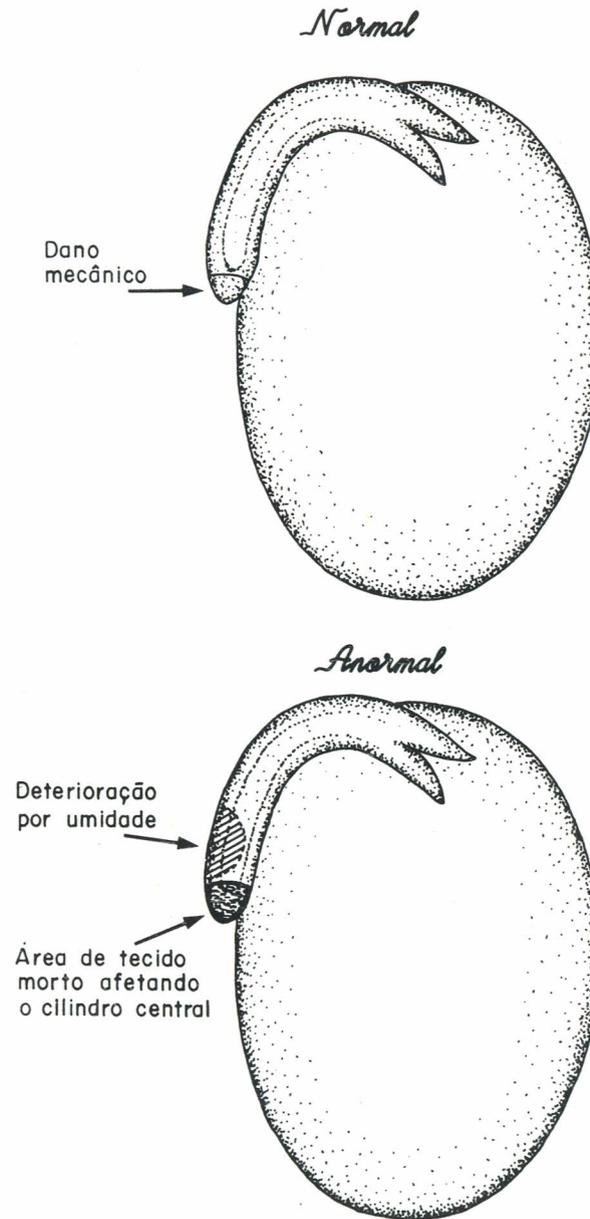


Fig. 2. Corte longitudinal de duas sementes de soja, mostrando a ocorrência de danos no eixo radícula-hipocótilo. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1984.

Além disso, deve-se levar em consideração a localização do dano nos cotilédones, ou seja, se ocorrem longe ou próximo ao eixo embrionário.

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

- . vermelho carmin: tecido vivo e vigoroso
- . vermelho carmin forte: tecido em deterioração
- . branco leitoso: tecido morto

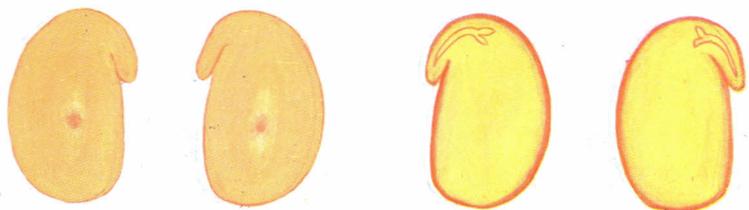
Deve-se ressaltar que normalmente a parte interna dos cotilédones apresenta-se descolorida (branca).

A determinação da viabilidade e do vigor é realizada através da classificação de cada semente em uma das oito categorias descritas a seguir.

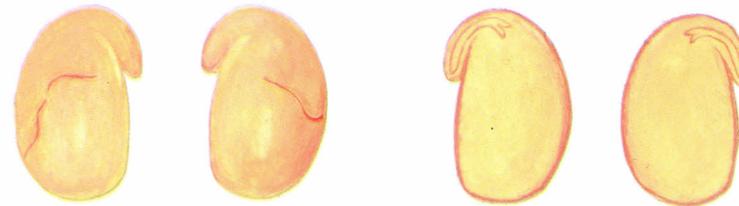
Identificação dos Níveis de Viabilidade

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.

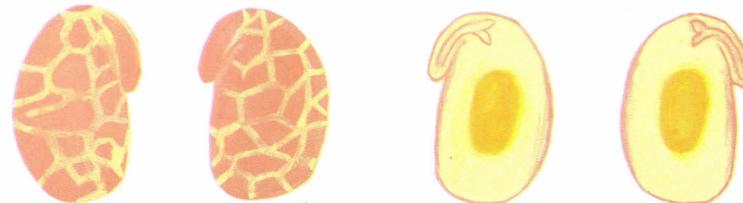
CLASSE 1 (mais alto vigor)



- 1a. Coloração uniforme e superficial, indicando penetração lenta do sal de tetrazólio; parte interna (entre os cotilédones) não apresentando coloração, salvo nos bordos, todos os tecidos com aspecto normal e firme.

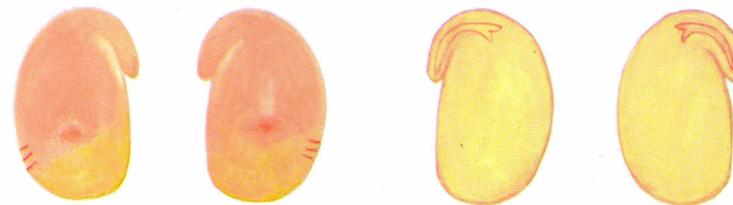


- 1b. Quase igual à anterior, exceto a ocorrência de faixas ou estrias mais intensamente coloridas, uma a duas por cotilédone devido à deterioração por umidade, as quais são superficiais (um a dois décimos de milímetro de profundidade).

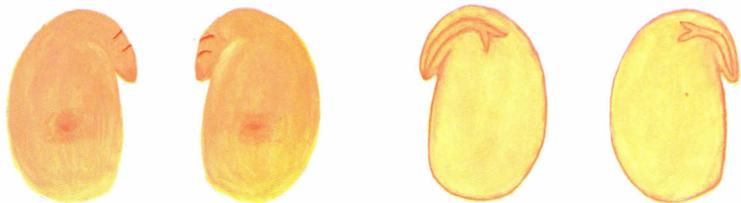


- 1c. Semente com aspecto de mosaico devido a um processo lento de embebição; os tecidos se apresentam firmes e na face interna dos cotilédones geralmente aparece uma cavidade central de coloração amarelada, indicando insuficiente absorção de água.

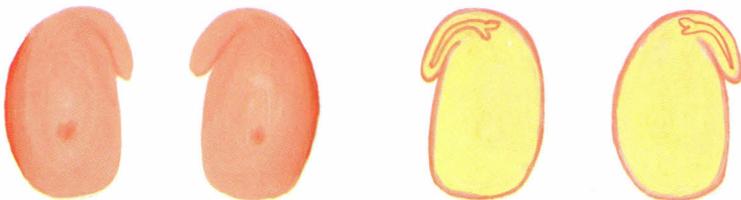
CLASSE 2 (alto vigor)



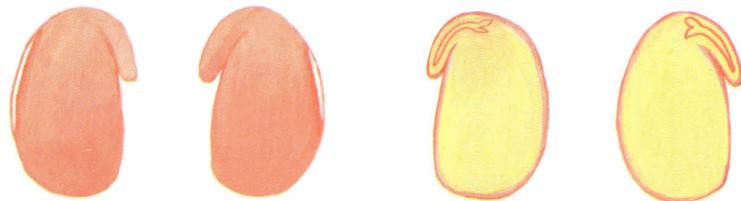
- 2a. Pequenas estrias localizadas nos cotilédones na região oposta ao eixo embrionário, as quais são originadas por pressão do tegumento sobre os cotilédones causado por sucessivas hidratações (expansão) e desidratações (contração) de ambos em proporções diferentes. Isto resulta em enrugamento do tegumento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



- 2b. Pequenas estrias devidas ao mesmo motivo referido em 2a., mas localizadas sobre o eixo embrionário. Tais lesões devem mostrar-se apenas superficialmente, não apresentando qualquer alteração interna, como em 1a.



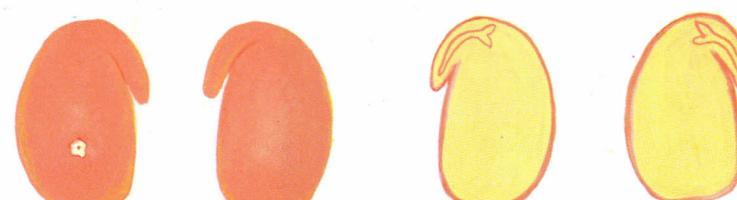
- 2c. Área de coloração mais intensa, não maior do que da ilustração, provavelmente devido à junção de pequenas estrias (2a), formando uma faixa contínua. A parte interna dos cotilédones apresenta-se como em 1a.



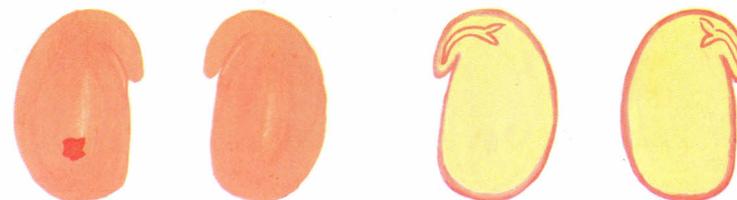
- 2d. Área de tecido sem coloração (branco leitoso) portanto, morto, não maior do que a da ilustração. A parte interna dos cotilédones como em 1a. Todas as lesões referidas de 2a e 2d, em geral, se apresentam simetricamente nos dois cotilédones, sendo esta uma característica utilizada para diferenciar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



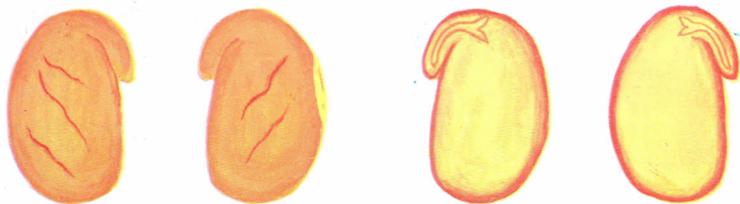
- 2e. Pequenos danos mecânicos sobre a superfície externa dos cotilédones e com uma profundidade máxima de 0,5 mm. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se como em 1a.



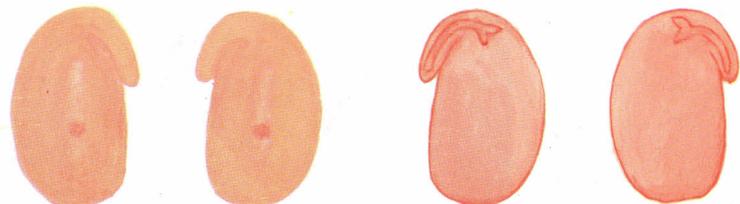
- 2f. Dano(s) devido(s) à picada de percevejo, com uma área total não maior do que a mostrada na ilustração e profundidade máxima de 0,5 mm. A localização deve ser afastada da região vascular (isto é, abaixo de uma linha imaginária, passando transversalmente pela metade do cotilédone). A região afetada 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 carmin 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.

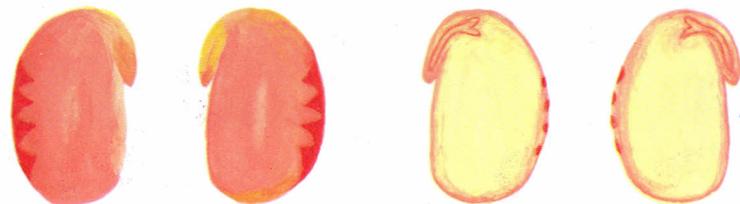


2h. Mais do que duas estrias por cotilédone (não profunda, como em 1b). Superfície interna dos cotilédones como em 1a.

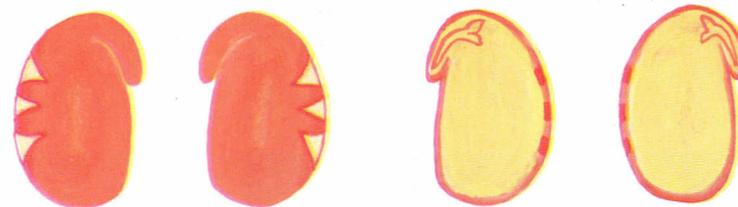


2i. Coloração da superfície externa dos cotilédones como em 1a. A superfície interna dos cotilédones apresenta-se também com coloração uniforme devido à penetração da solução de tetrazólio através de um rompimento no tegumento.

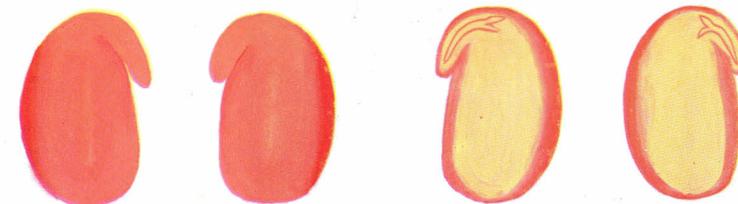
CLASSE 3 (vigor médio)



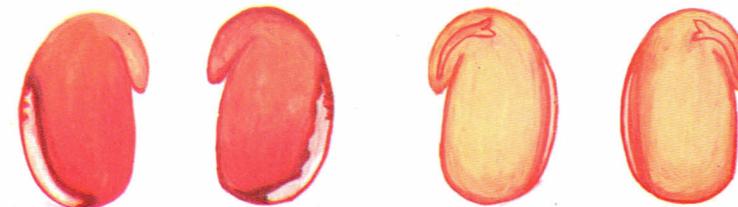
3a. Estrias de coloração vermelha carmin forte localizadas nos cotilédones, na região oposta ao eixo embrionário, com uma área total não maior do que a mostrada na ilustração. A superfície interna dos cotilédones pode apresentar pequenas áreas mais escuras, correspondentes às estrias externas e com uma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



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



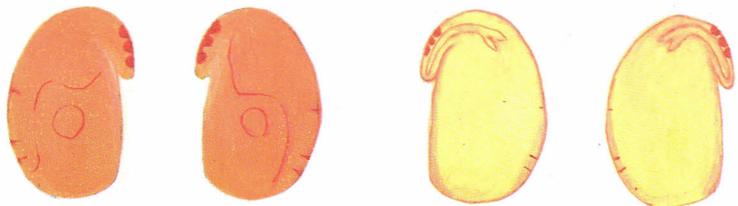
3c. Áreas de coloração mais intensa, não maiores que as mostradas na ilustração, provavelmente devido à junção de estrias formando uma faixa contínua. A superfície interna dos cotilédones pode apresentar, correspondentemente, uma faixa mais escura com espessura máxima de 0,5 mm.



3d. Dano quase idêntico ao anterior, mas a faixa pode ser de tecido de coloração branco-leitoso (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.



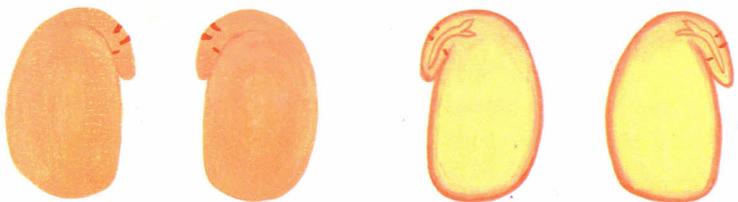
3e. Área de coloração vermelho intensa na superfície externa de ambos os cotilédones não maior do que a da ilustração e com profundidade máxima de 0,5 mm (dano mecânico). Superfície interna como em 1a.



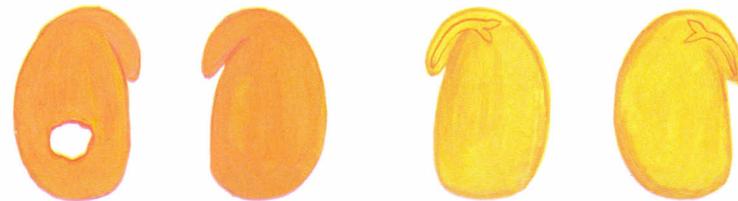
3f. Estrias localizadas na superfície do eixo embrionário não se aprofundando além do córtex, i.e., sem afetar o cilindro central.



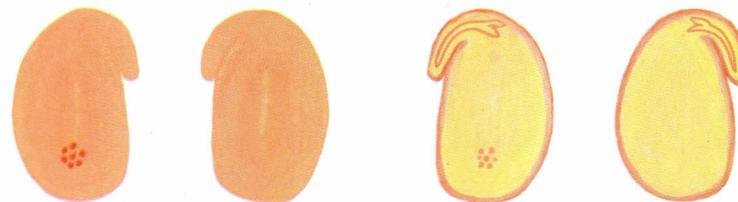
3g. Extremidade da radícula mostrando coloração branco-leitoso, indicando tecido morto, sem no entanto afetar o cilindro central.



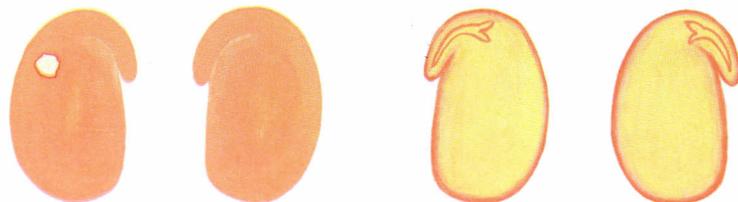
3h. Pequenas fraturas localizadas no eixo embrionário não afetando, porém, o cilindro central.



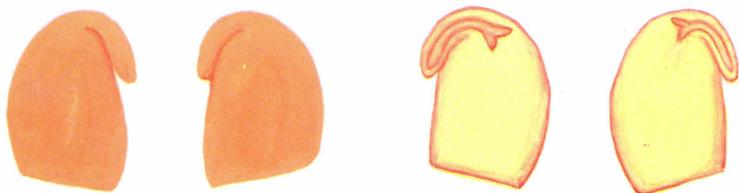
3i. Picada(s) de percevejo, com a parte central necrosada (tecido morto, i.e., coloração branco-leitoso, com aspecto pulverulento) ou não, com área total não maior do que a mostrada na ilustração. A área lesionada não deve ter profundidade superior a 0,5 mm e deve estar localizada na região abaixo de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone (região não vascular). Superfície interna dos cotilédones como 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 carmin forte ou áreas necrosadas). Um dos cotilédones com coloração superficial como em 2i.



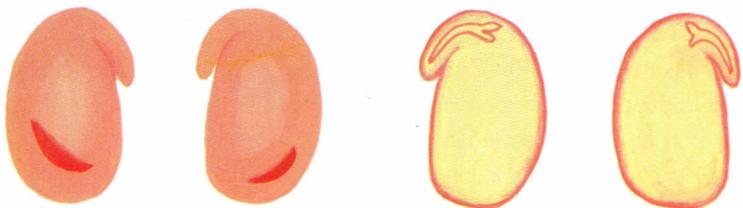
3k. Picada(s) de percevejo, com área total não maior do que a representada na ilustração, localizada acima de uma linha imaginária passando transversalmente pela metade do cotilédone. A região lesionada não deve ser superior a 0,5 mm de profundidade e localizada de tal maneira a não afetar a região acima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



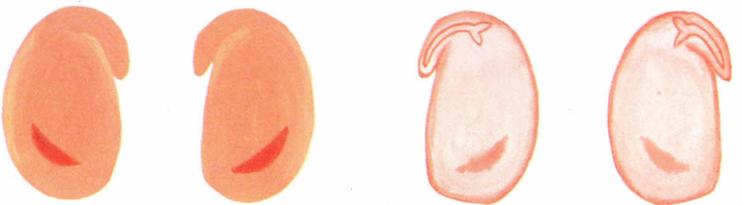
- 3l. Fratura dos cotilédones na região oposta ao ponto de ligação do eixo embrionário numa extensão máxima como a mostrada na ilustração. A superfície interna dos cotilédones pode se apresentar como em 1a. ou 2i.



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

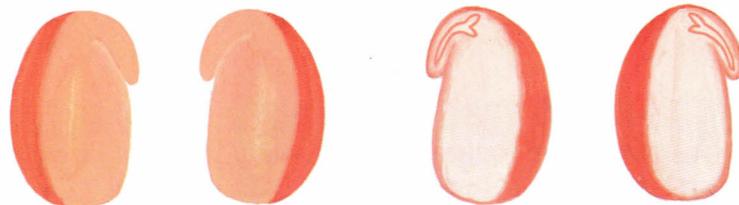


- 3n. Dano(s) de origem mecânica com ou sem tecido morto, com profundidade máxima de 0,5 mm ou sem afetar a região vascular. A superfície interna dos cotilédones como em 1a. ou 2a.

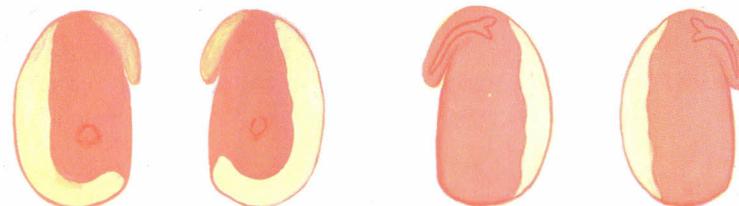


- 3o. Dano(s) de origem mecânica localizado(s) abaixo da região vascular, afetando a superfície interna dos mesmos como mostrado na ilustração.

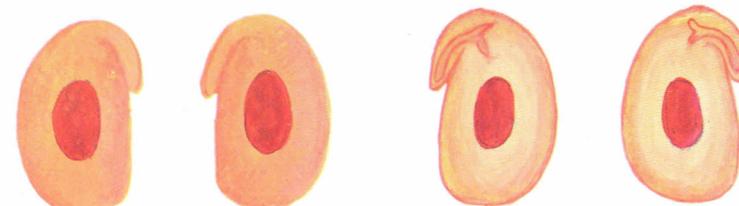
CLASSE 4 (vigor baixo)



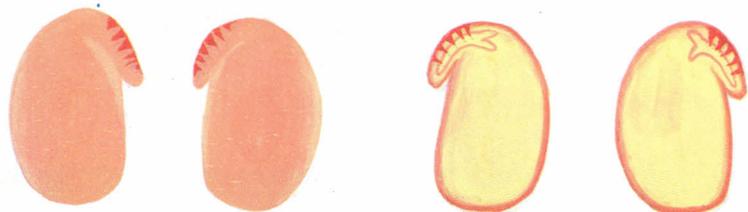
- 4a. Área de coloração vermelho carmin forte em ambos os cotilédones, cobrindo menos do que a metade dos mesmos. A superfície interna também apresenta área de coloração vermelho carmin forte. A região vascular, porém, não deve estar afetada.



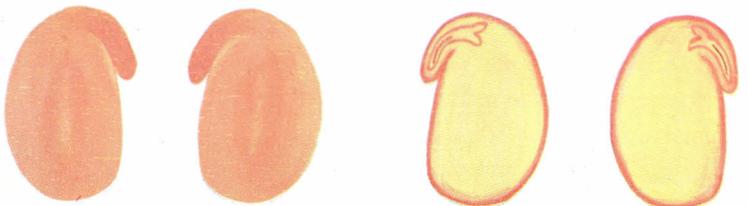
- 4b. Dano quase idêntico ao anterior, apresentando, porém, tecidos mortos (coloração branco-leitoso).



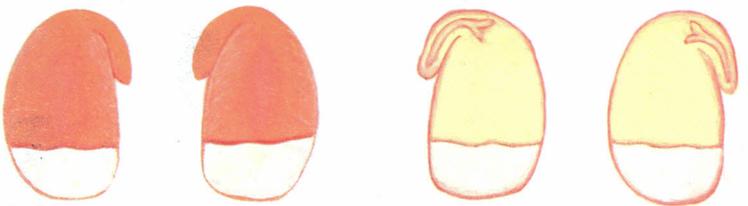
- 4c. Área de coloração vermelho carmin forte no centro dos cotilédones (externa e internamente), afetando parte da região vascular. No entanto, próximo ao ponto de ligação, os vasos devem estar funcionais, permitindo o transporte das reservas dos cotilédones para o eixo embrionário.



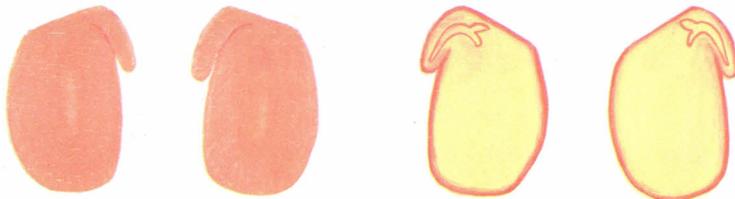
4d. Estrias localizadas sobre o eixo embrionário afetando inclusive o cilindro central, porém, numa extensão menor do que a metade de sua espessura.



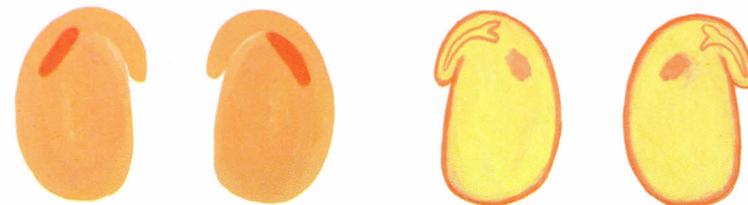
4e. Área de coloração vermelho carmin forte no eixo embrionário mas com as estruturas do cilindro central e do córtex ainda perfeitamente definidas.



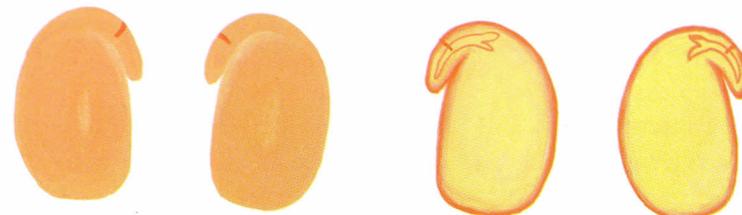
4f. Área de tecido morto numa extensão menor do que a metade da área total dos cotilédones.



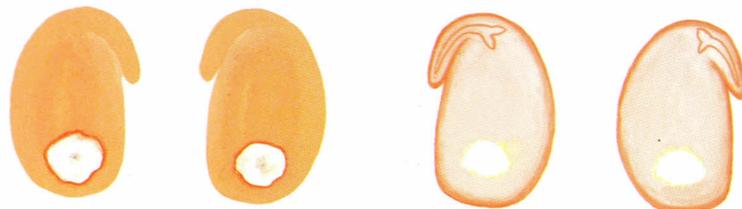
4g. Fratura de um ou ambos os cotilédones na região próxima ao ponto de ligação, mas deixando a região vascular em grande parte intacta.



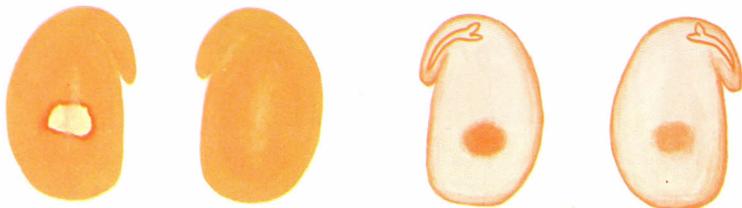
4h. Dano(s) de origem mecânica na região vascular dos cotilédones afetando a face interna e parte da região vascular. Os vasos, porém, devem permanecer funcionais próximos ao ponto de ligação dos cotilédones com o eixo embrionário.



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



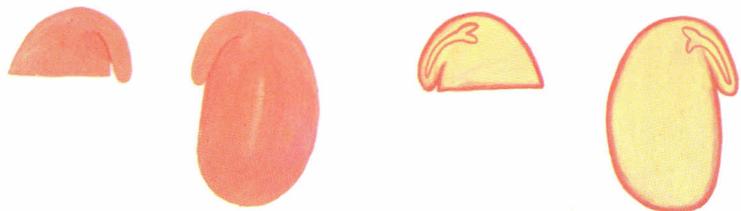
4j. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo com área necrosada (tecido morto), atingindo a parte interna dos cotilédones mas localizado(s) abaixo da região vascular.



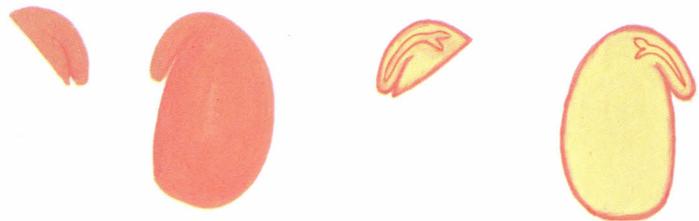
4k. Dano(s) devido(s) a picada de percevejo localizado(s) em apenas um cotilédone, tornando-o praticamente não funcional e afetando apenas levemente o segundo cotilédone na face interna, e o qual se mantém quase integral.



- 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).



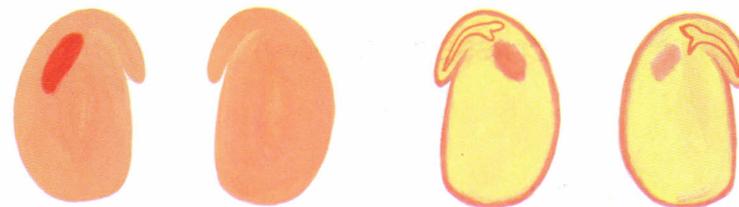
- 4o. Fratura de ambos os cotilédones, porém, numa extensão inferior a metade dos mesmos.

CLASSE 5 (Vigor muito baixo)

As classes de vigor 5 e 6 (esta última não viável) são as de interpretação mais problemática. Quando a amostra analisada comporta uma elevada porcentagem de sementes nessas classes, os resultados variam e discrepâncias são esperadas.



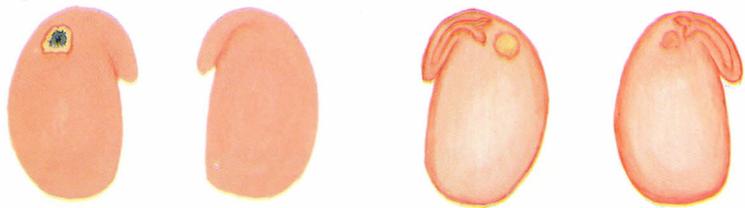
- 5a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando um aspecto de mosaico, com áreas de um colorido vermelho carmin forte entremeadas de áreas mais claras e até mortas. Os tecidos afetados atingem uma profundidade superior a 1 mm, mas inferior à metade da espessura dos cotilédones. A superfície interna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

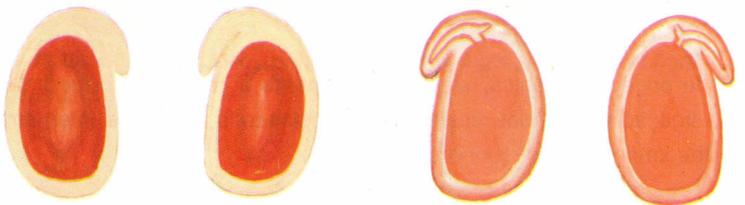


5d. Dano(s) devido(s) a picadas de percevejo, afetando a região do ponto de ligação como em 5b.

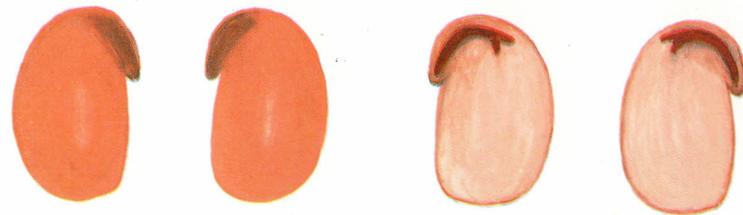
CLASSE 6 (não viável)

Os danos dessa classe são semelhantes aos da classe 5 (vide ilustrações), porém, com maior extensão das áreas afetadas, o que torna a semente inviável.

CLASSE 7 (não viável)



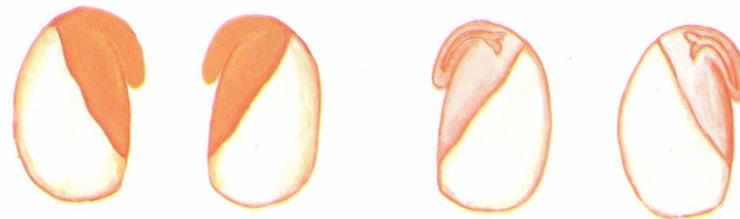
7a. Sementes com ambos os cotilédones mostrando um aspecto de mosaico com áreas de um colorido vermelho carmin forte entremeadas de outras mais claras e mortas. Os tecidos afetados atingem a metade (ou mais) da espessura dos cotilédones, bloqueando completamente a região vascular.



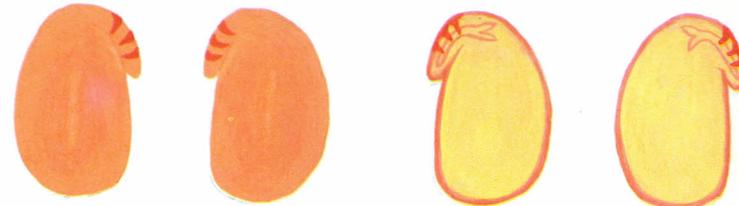
7b. Eixo embrionário apresentando uma coloração vermelho carmin forte, distribuída por toda a sua extensão.



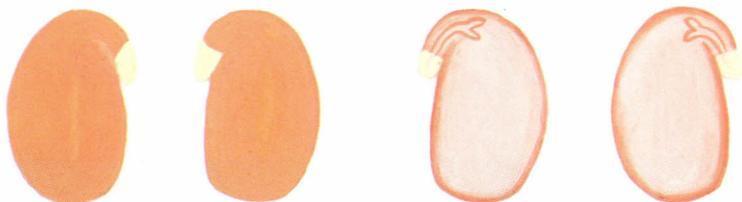
7c. Coloração vermelho carmin forte no ponto de ligação de ambos os cotilédones, atingindo a região vascular. Coloração branco-leitoso (indicativo de tecidos mortos) também pode ocorrer.



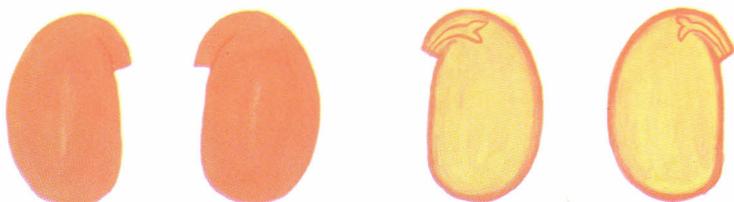
7d. Tecidos mortos de coloração branco-leitoso numa extensão superior à metade da superfície total da semente.



7e. Estrias de coloração vermelho carmin forte, sobre o eixo embrionário, atingindo uma profundidade superior à metade da espessura do cilindro central.



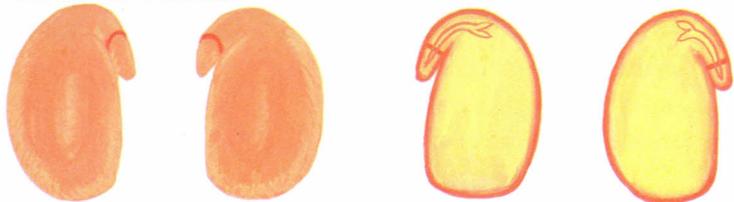
- 7f. Extremidade da radícula apresentando coloração branco-leitosa (tecido morto) atingindo não só o córtex, mas também o cilindro central.



- 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.



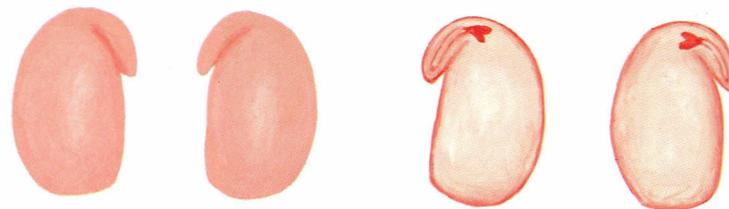
- 7i. Fratura do eixo embrionário, seccionando o cilindro central.



- 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 carmin forte (deteriorada).

CLASSE 8 (semente morta)



Semente totalmente morta (branca, apresentando tecidos flácidos).

Utilização da Ficha

É sugerida a utilização de uma ficha para a avaliação do teste de tetrazólio, (ver apêndice). Após a avaliação de cada semente, deve-se registrar nessa ficha o nível de viabilidade e a identificação do(s) tipo(s) de dano(s) que possa(m) ter determinado o referido nível. Sugere-se utilizar a seguinte simbologia:

- X : sem dano
- L : dano mecânico (DM)
- Γ : dano causado por percevejo (DP)
- P : dano causado por umidade (DU)
- L̄ : DM + DP
- P̄ : DM + DU
- P̄ : DU + DP
- L̄ : DU + DM + DP

Após a avaliação de todas as sementes, determina-se a porcentagem das classificadas em cada nível de viabilidade, calculando o potencial de germinação (somatório dos valores classificados nos níveis 1 a 5) e o vigor (somatório dos níveis 1 a 3), conforme ilustrados nas fichas preenchidas (ver apêndice).

Interpretação dos Resultados

O nível de vigor pode ser interpretado através da seguinte classificação:

- vigor muito alto: superior a 80%
- vigor alto: entre 79% e 70%
- vigor médio: entre 69% e 50%
- vigor baixo: entre 49% e 30%
- vigor muito baixo: inferior a 29%

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

As porcentagens de danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejo nos níveis 6 a 8, indicam a porcentagem de perda de viabilidade ocasionada pelos referidos danos, sendo consideradas com relação à qualidade de semente como:

- sem restrição: inferior a 6%
- com restrição: entre 7% a 10%
- com restrição séria: superior a 10%

6. PRECISÃO DOS RESULTADOS

Em condições normais, os resultados de viabilidade obtidos nos testes padrão de germinação e 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
- e) sementes infectadas por fungos, tais como *Phomopsis* sp. e *Fusarium semitectum*

7. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA A SOJA

. Vantagens

- a) o teste possibilita conhecer as condições internas das estruturas do embrião;
- b) permite rápida avaliação da viabilidade e do vigor (19 horas para a soja);
- c) permite a identificação de diferentes níveis de viabilidade
- d) fornece o diagnóstico da causa da queda da viabilidade das sementes;
- e) o equipamento necessário é simples e barato; e
- f) um analista experiente pode ter um rendimento de quatro a cinco amostras (2 x 50 sementes) por hora de trabalho.

. Limitações

- a) requer treinamento especial sobre a estrutura embrionária da semente e sobre técnicas de interpretação;
- b) é relativamente tedioso, uma vez que as sementes são avaliadas uma a uma, requerendo, desta forma, experiência e paciência;
- c) embora seja um teste relativamente rápido, ele consome um maior número de homem-hora que o teste de germinação padrão;
- d) em lotes que apresentam sementes duras, o resultado do teste é compatível com o total de sementes germinadas mais sementes duras, pelo teste de germinação-padrão;
- e) não mostra a eficácia de tratamentos químicos, nem as injúrias que estes possam causar;

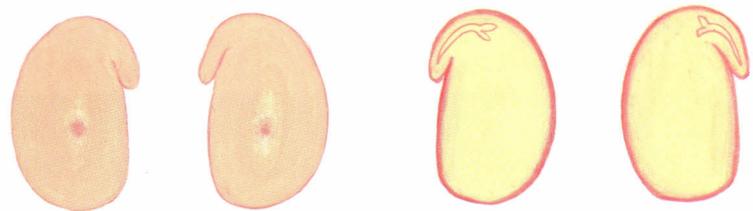
- f) não detecta a presença de patógenos nas sementes;
- g) apresenta dificuldade na identificação de danos recentes causados por secagem e impactos mecânicos; e
- h) requer do analista capacidade de decisão pelas características do teste.

8. REFERÊNCIAS

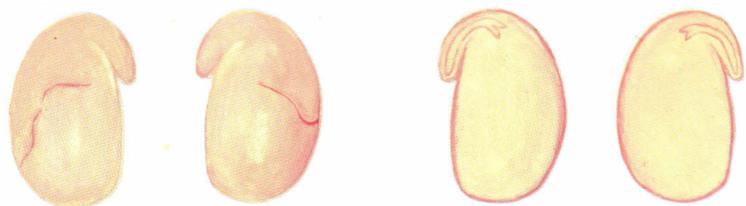
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1976. 198p.
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M. & LIENHARD, M. **The tetrazolium test for seed viability**. Mississippi State University, 1962. 63p. (Technical Bulletin, 51).
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M. & LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Trad. de Flávio Rocha. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103p.
- FRANÇA NETO, J.B. **Princípios do teste de tetrazólio para a semente de soja**. Curitiba, TECPAR, 1981. 14p. (Boletim LASP).
- FRANÇA NETO, J.B.; PEREIRA, L.A.G. & COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: Metodologia dos Testes de Tetrazólio e Sanidade em Sementes de Soja (Versão Preliminar). EMBRAPA-CNPSO, Londrina, PR. p. 01-30. 1984.
- GRABE, D.F. **Tetrazolium testing handbook for agricultural seed**. s.1., Association of Official Seed Analysts, 1970. 62p.
- GRABE, D.F. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Trad. de Flávio Rocha. Brasília, AGIPLAN, 1976. 85p.
- 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**, 2(3):9-22, 1980.
- MOORE, R.P. TZ checks your seed for quality. **Crops Soils**, 15(1):10-12, 1962.

- MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. **Seed ecology**. London, Butterworth, 1973. p.347-366.
- PEREIRA, L.A.G. **Comparisons of selected vigor tests for evaluating soybean seed quality**. Mississippi, Mississippi State University, 1974. 74p. Tese Mestrado.
- PEREIRA, L.A.G. & ANDREWS, C.H. Comparação de alguns teste de vigor para avaliação da qualidade de sementes de soja. **Semente**, 2(2):15-25, 1976.

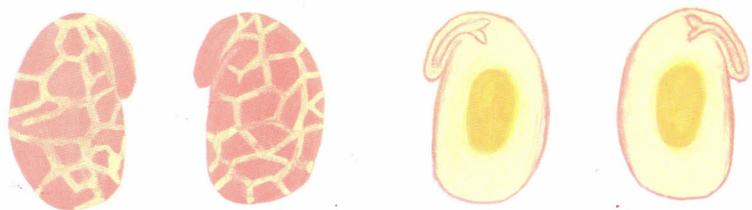
APÊNDICE



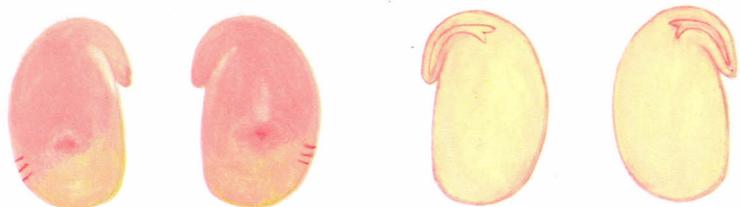
- 1 A -



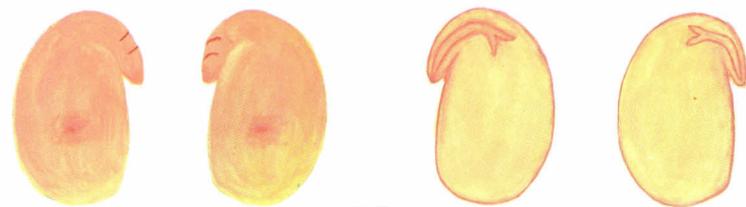
- 1 B -



- 1 C -



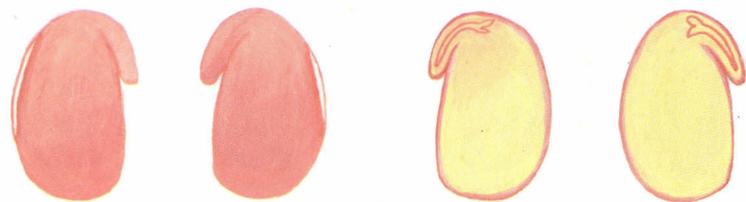
- 2 A -



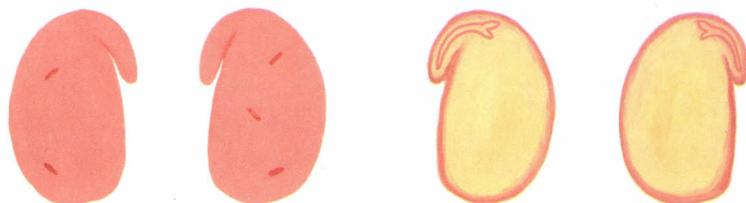
- 2 B -



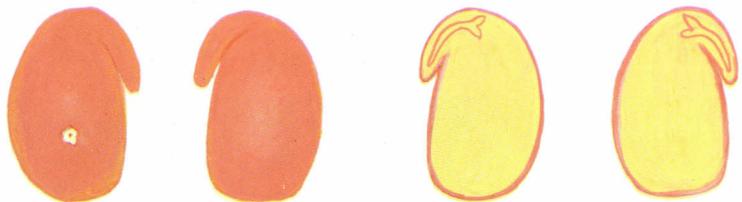
- 2 C -



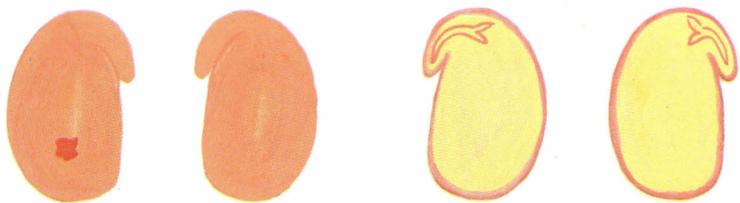
- 2 D -



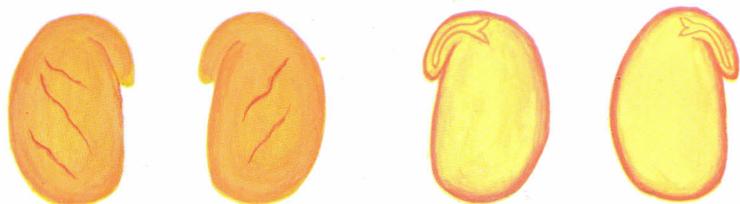
- 2 E -



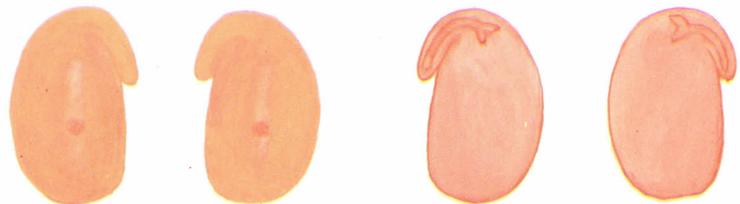
- 2 F -



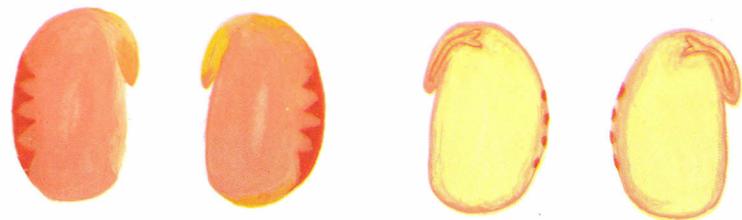
- 2 G -



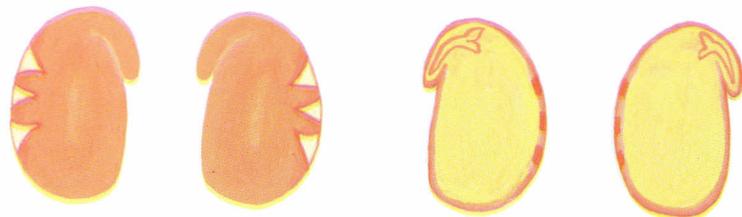
- 2 H -



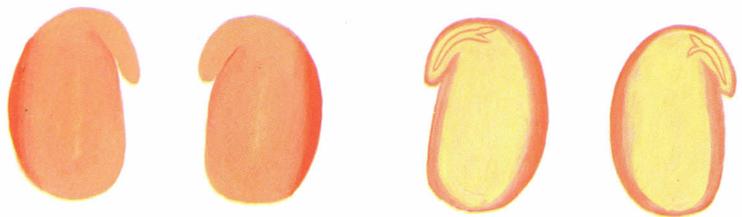
- 2 I -



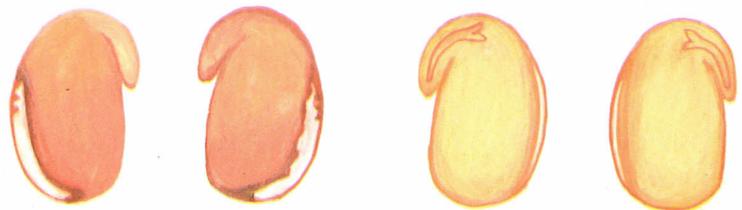
- 3 A -



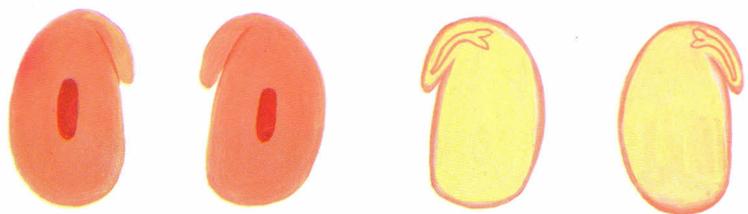
- 3 B -



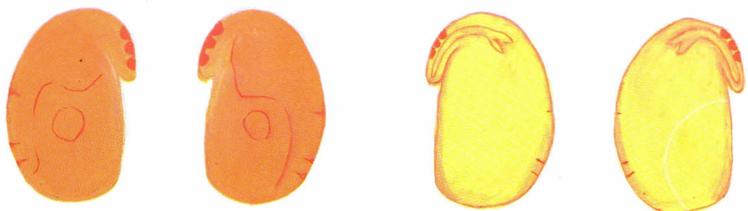
- 3 C -



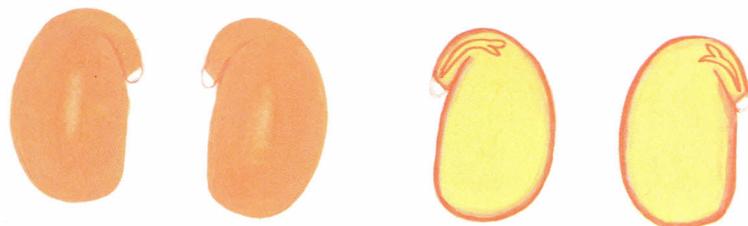
- 3 D -



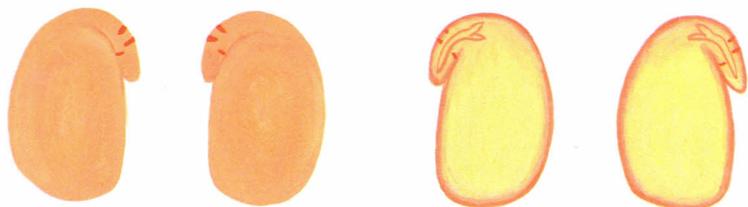
- 3 E -



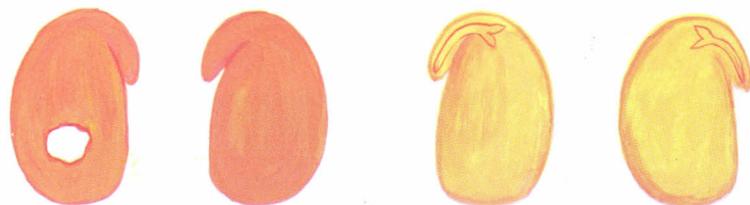
- 3 F -



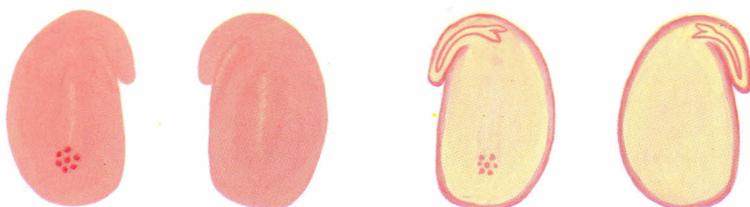
- 3 G -



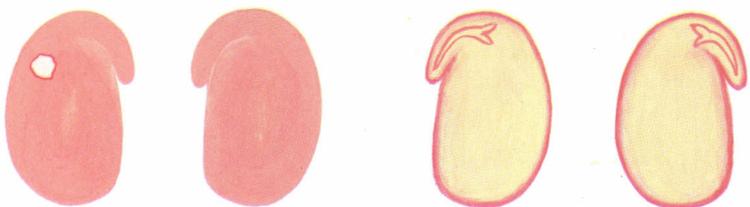
- 3 H -



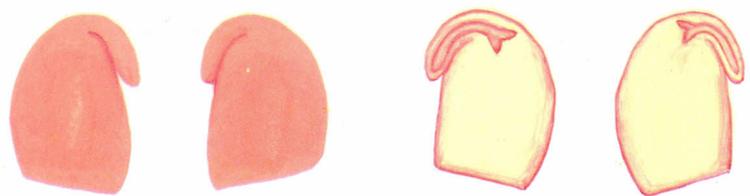
- 3 I -



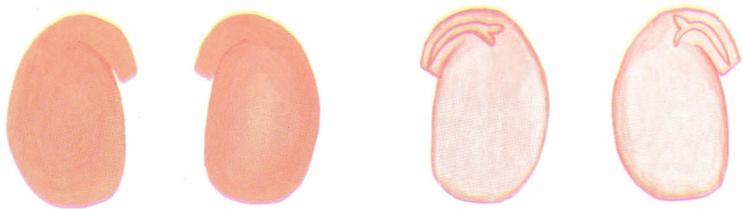
- 3 J -



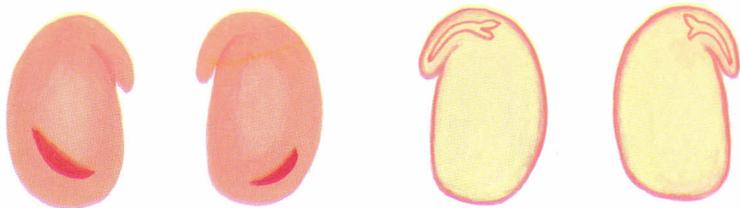
- 3 K -



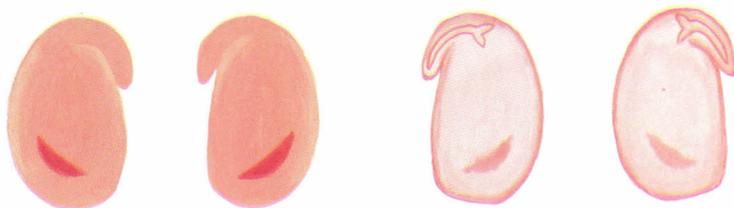
- 3 L -



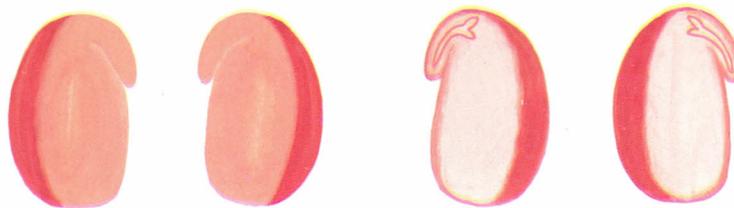
- 3 M -



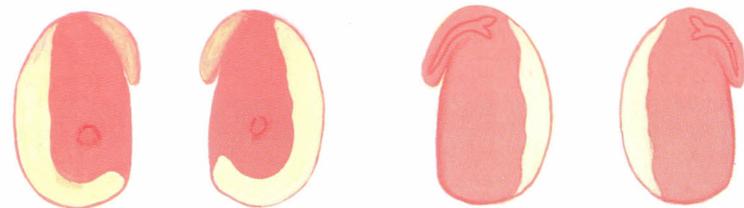
- 3 N -



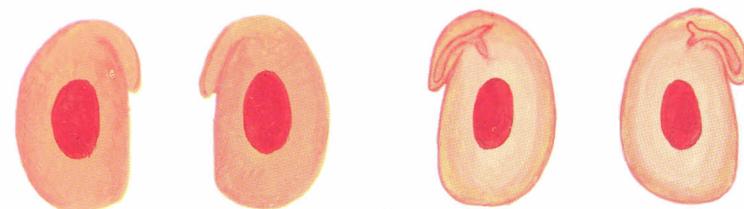
- 3 O -



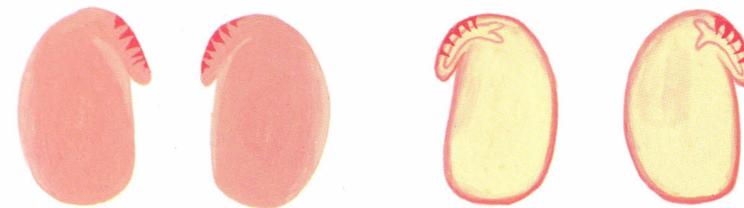
- 4 A -



- 4 B -



- 4 C -



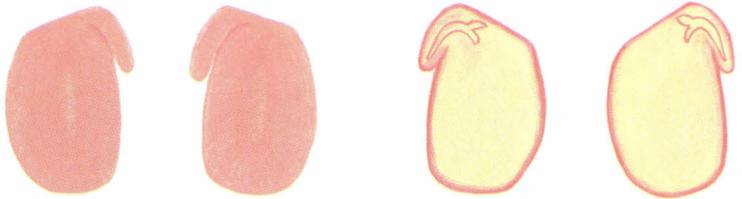
- 4 D -



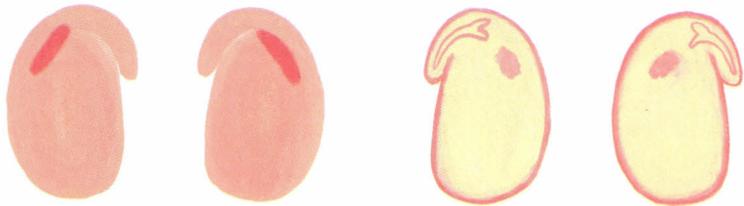
- 4 E -



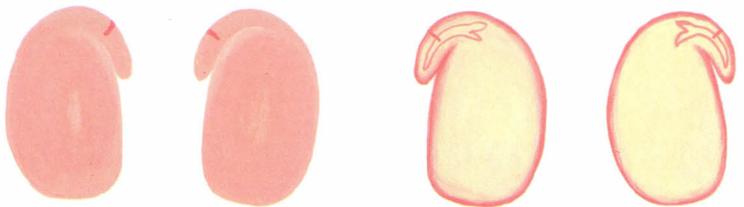
- 4 F -



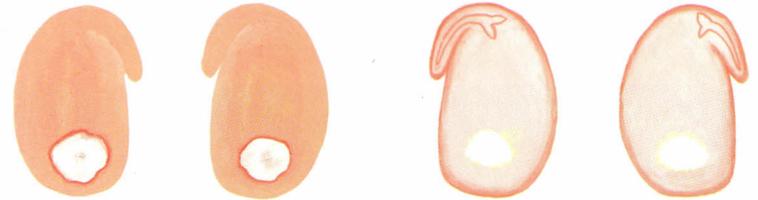
- 4 G -



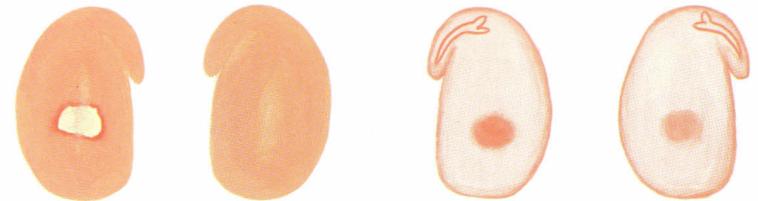
- 4 H -



- 4 I -



- 4 J -



- 4 K -



- 4 L -



- 4 M -



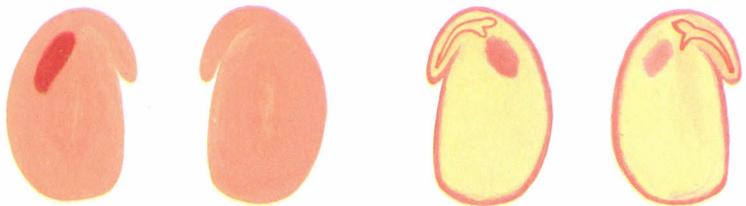
- 4 N -



- 4 O -



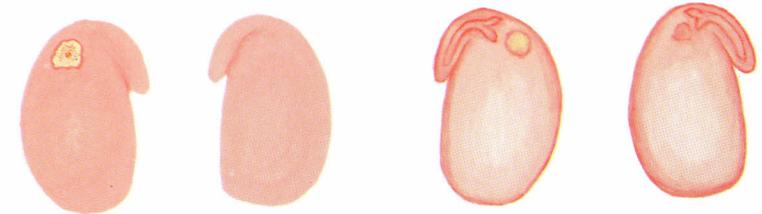
- 5 A -



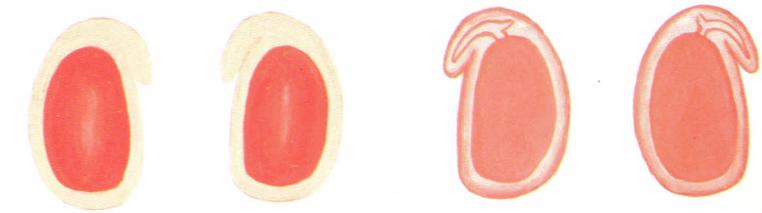
- 5 B -



- 5 C -



- 5 D -



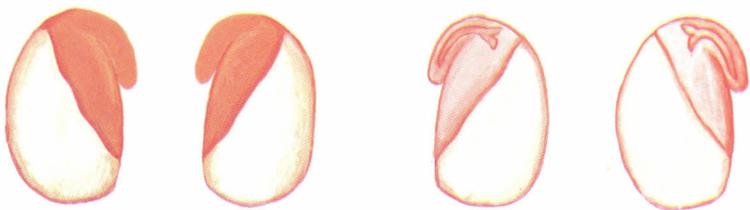
- 7 A -



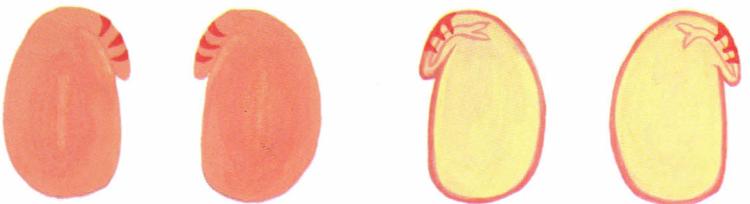
- 7 B -



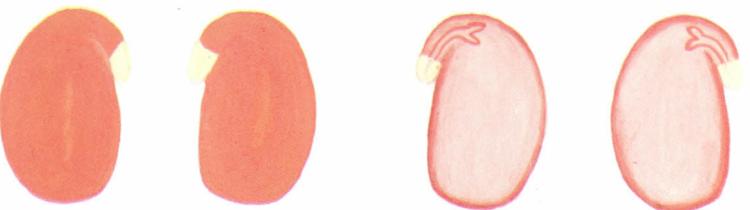
- 7 C -



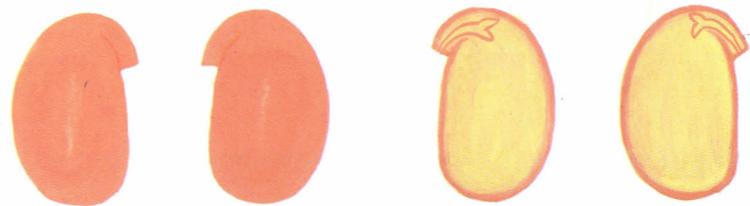
- 7 D -



- 7 E -



- 7 F -



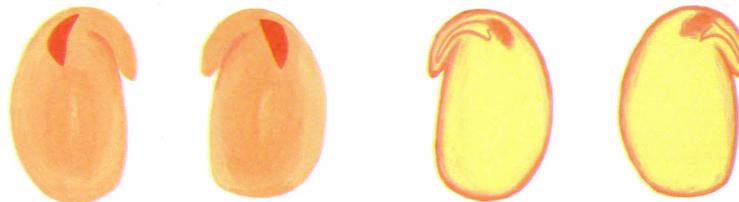
- 7 G -



- 7 H -



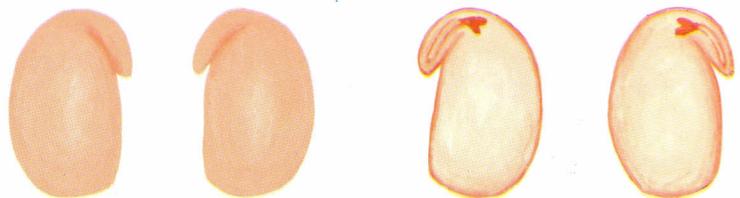
- 7 I -



- 7 J -



- 7 K -



- 7 L -

EMBRAPA		FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO							
AMOSTRA: 1				LOCAL: Londrina/PR					
Nº DE SEMENTES TESTADAS: 2 x 50				CONC. DA SOLUÇÃO: 0,075%					
DATA: 03/08/88				ANALISTA:					
1. XXXXX XXXXX XXXXX		/////		/////		/////		30	
2. PPPLP PPPPP LPP/		/////		/////		/////		30	
3. PPLPP PPLLP		/////		/////		/////		20	
4. PL/P/		/////		/////		/////		08	
5. PPI/		/////		/////		/////		04	
S.D.		/////		/////		/////			
6. /////		/////		/////		/////			
7. P/LP/		/////		/////		/////		08	
8. /////		/////		/////		/////			
Nível de Vigor 1-3: 80				Potencial de Germinação: 92					
1. XXXXX XXXXX XXXXX		X/////		/////		/////		32	
2. P/LP/ PPPPP L/P/		/////		/////		/////		30	
3. LPP/ P/LP/		/////		/////		/////		20	
4. P/LP/		/////		/////		/////		08	
5. /////		/////		/////		/////			
S.D.		/////		/////		/////			
6. /////		/////		/////		/////			
7. P/P/		/////		/////		/////		10	
8. /////		/////		/////		/////			
Nível de Vigor 1-3: 82				Potencial de Germinação: 90					
REPETIÇÕES	DANO MECÂNICO		UMIDADE		PERCEVEJO		DURAS	VIGOR	P.G.
	1-8	6-8	1-8	6-8	1-8	6-8			
I	18	02	48	04	10	02	-	80	92
II	22	04	40	04	16	02	-	82	90
MÉDIAS	20	03	44	04	13	02	-	81	91

 EMBRAPA	FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO
---	--

AMOSTRA: 04	LOCAL: Londrina/PR
Nº DE SEMENTES TESTADAS: 2 x 50	CONC. DA SOLUÇÃO: 0,075%
DATA: 03/08/88	ANALISTA:

1.	X///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	02
2.	PPPP/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	08
3.	PPPPP PPI/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	14
4.	PLPPL/ P/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	12
5.	PLPL/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	10
S.D.	X///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	02
6.	///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	
7.	PLPPP PLPLP PPPPP LPLP/ PLPL P/ ///// ///// ///// /////	52
8.	///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	
Nível de Vigor 1-3: 24 + 2		Potencial de Germinação: 48

1.	X///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	02
2.	PPLPP/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	10
3.	PPPPP PPI/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	14
4.	PLPL/ P/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	12
5.	LPLE/ ///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	10
S.D.	X///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	02
6.	///// ///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	
7.	PLPLP PPLP PPPPP LPPL/ PLPL/ ///// ///// /////	50
8.	///// ///// ///// ///// ///// ///// /////	
Nível de Vigor 1-3: 26		Potencial de Germinação: 50

REPETIÇÕES	DANO MECÂNICO		UMIDADE		PERCEVEJO		DURAS	VIGOR	P.G.
	1-8	6-8	1-8	6-8	1-8	6-8			
I	28	14	70	28	18	10	02	26	48
II	26	10	72	32	16	08	02	26	50
MÉDIAS	27	12	71	30	17	09	02	26	49



1ª impressão: 1988 (500 exemplares)
1ª reimpressão: 1992 (1000 exemplares)

Impresso na Editora da UEL