

Londrina, PR
Maio, 2008

Autores

Nilton Pereira da Costa

Engenheiro Agrônomo, D.Sc.
Embrapa Soja, Caixa Postal 231
CEP 86001-970 Londrina, PR
nilton@cnpso.embrapa.br

Julio Marcos Filho

Engenheiro Agrônomo, Dr.
ESALQ - USP
Deptº. de Produção Vegetal
Avenida Pádua Dias, 11
CEP 13418-900 Piracicaba, SP
jmarcos@esalq.usp.br

José de Barros França Neto

Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Soja
jbfranca@cnpso.embrapa.br

Francisco Carlos Krzyzanowski

Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Soja
fck@cnpso.embrapa.br

Ademir Assis Henning

Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Embrapa Soja
henning@cnpso.embrapa.br

Teste de tetrazólio em semente de soja com precondicionamento abreviado - Série Sementes

Introdução

A determinação da qualidade da semente se constitui em desafio histórico para os cientistas que, arduamente pesquisaram métodos que atendessem, entre outros requisitos, as questões relativas à precisão e à rapidez. No Brasil, tem sido uma preocupação cada vez maior dos melhoristas de plantas incluir entre os parâmetros a serem aprimorados, o vigor da semente. Sabe-se que o vigor de uma semente é basicamente função de suas características genéticas e das condições edafoclimáticas de produção.



O teste de tetrazólio, além de avaliar a viabilidade e o vigor dos lotes de semente, fornece o diagnóstico das causas pela redução da qualidade, como danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejos, que são os principais problemas que afetam a qualidade fisiológica da semente de soja. Porém, além desses, os danos de secagem, de estresse hídrico e de geadas podem também ser facilmente identificados pelo teste. Aliás, o fornecimento desse diagnóstico tem sido o grande responsável pelo elevado índice de adoção do teste no Brasil, pois, além de apontar os problemas de redução de qualidade da semente, o mesmo, quando aplicado nas diferentes etapas do sistema de produção, pode identificar os pontos de origem desses problemas, permitindo que ações corretivas sejam adotadas, resultando na produção de sementes de alta qualidade. Com objetivo de ampliar o uso do teste de tetrazólio no controle de qualidade da semente de soja, estudaram-se os períodos de embebição de 6, 8 e 10 horas a 42°C (Costa e Marcos-Filho, 1994a) e 10 horas a 40°C (Costa e Marcos-Filho, 1994b), tendo sido observado que se a semente atinge 37% de grau de umidade é possível executar o teste de tetrazólio em sua plenitude. Posteriormente com base nesse conhecimento e avaliado em diversas cultivares de soja, o período de embebição foi abreviado para 6 horas a 41°C (Costa et al, 1997, 1998a e 1998b). O emprego do precondicionamento abreviado do tetrazólio, em programas de controle de qualidade, torna-se uma ferramenta imprescindível para tomada de decisão quanto à avaliação do potencial fisiológico de um lote de semente.

Precondicionamento abreviado para o teste de tetrazólio

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

Processo de embebição e coloração da semente pelo precondicionamento abreviado

O procedimento empregado para o precondicionamento consiste na embebição de 200 sementes (quatro sub-amostras com 50 sementes). A semente é embebida em papel toalha

(Figura 1A), previamente umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o seu peso e, posteriormente, submetida a acondicionamento durante 6h a 41°C. As sub-amostras são colocadas em caixas plásticas (gerbox), em bandeja de tela de arame, adicionando 50 ml de água, a fim de manter uniforme a umidade relativa do ar no interior das mesmas. As caixas de gerbox são fechadas e colocadas em incubadora previamente regulada a 41°C (Figura 1B). Após o período de 6h, as amostras de semente são retiradas da incubadora (Figura 1C), sendo duas sub-amostras utilizadas para monitorar o grau de umidade, pelo método de estufa, 105°C/24h (Brasil, 1992). As outras duas sub-amostras são empregadas para a avaliação da qualidade da semente, pelo tetrazólio, que, após a embebição, são colocadas em copos plásticos com capacidade de 50 ml (Figura 1D), onde são totalmente submersas em solução de tetrazólio na concentração de 0,075% (Figura 1E) e, em seguida, são mantidas em estufa a 40°C, no escuro, durante duas horas (Figura 1F).

Ao alcançar o padrão de coloração, a semente é retirada da estufa, lavada em água comum e mantida submersa em água até o momento da leitura. A avaliação da qualidade da semente pode ser realizada conforme critérios descritos por França Neto et al. (1998). O procedimento adotado para a avaliação e a interpretação dos níveis de qualidade consiste no seccionamento longitudinal de cada semente com lâmina de barbear, o qual permite visualização perfeita, tanto do eixo radícula-hipocótilo como da região vascular, para fins de avaliação e interpretação do vigor, da viabilidade, de injúria mecânica, de lesões de percevejos e da deterioração por umidade. Por outro lado, deve-se enfatizar que, quando o grau de umidade da semente não atinge a faixa superior a 27%, geralmente ocorrem problemas de semente com manchas mosaico dificultando o desenvolvimento de coloração pelo tetrazólio (Figura 2). Esse fato geralmente tem sido observado com grau de umidade da semente abaixo de 24%, já testado anteriormente em semente de duas cultivares de soja.

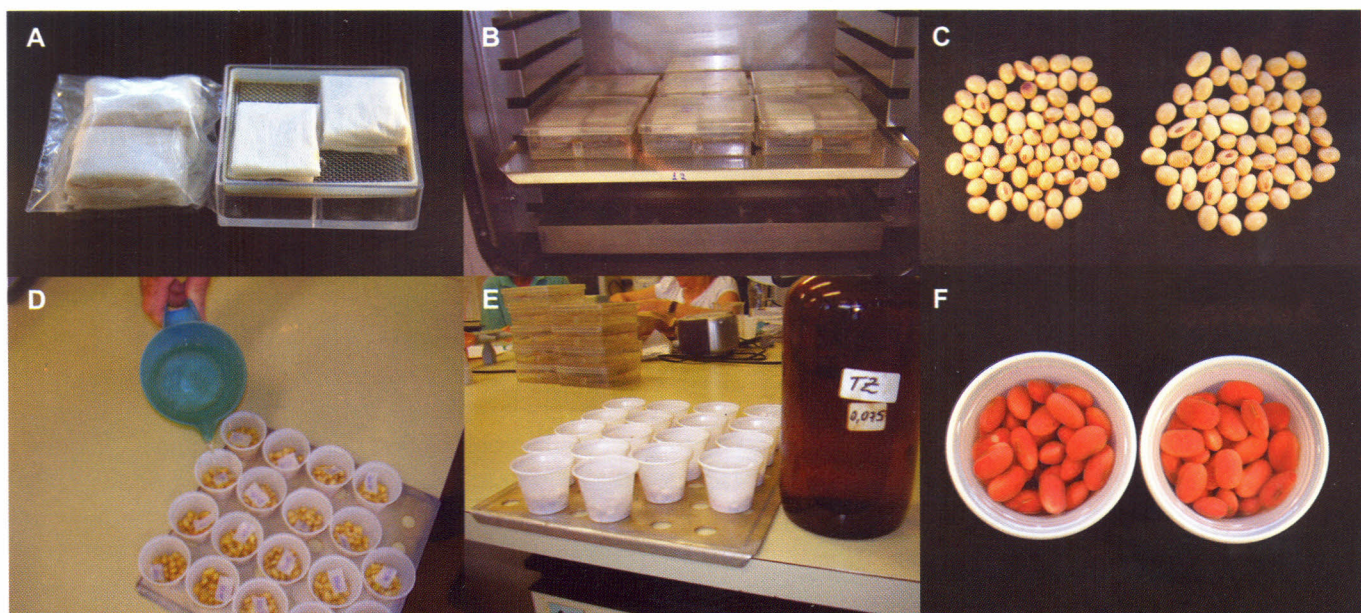


Figura 1. Procedimento indicado para o acondicionamento da semente em papel toalha pelo período de 6h à temperatura de 41°C para posterior desenvolvimento de coloração pelo teste de tetrazólio. A Figura 1C ilustra sementes de soja após acondicionamento de 6h/41°C (esquerda) e 16h/25°C (direita). Londrina,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



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

Princípio do teste de tetrazólio

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



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

Interpretação do condicionamento abreviado

A classificação dos níveis de vigor (TZ 1-3) é feita de acordo com França Neto et al. (1998):

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

Obs:

* Os valores obtidos para viabilidade (TZ 1-5) devem receber a mesma interpretação dos alcançados no teste de germinação

* As percentagens de danos mecânicos, deterioração por umidade e de lesões de percevejos nos níveis 6-8, indicam os índices de perdas de viabilidade ocasionada pelos referidos danos, sendo consideradas com relação a qualidade de semente como:

**sem restrição: inferior a 6%

**problema sério: entre 7% a 10%

**Problema muito sério: superior a 10%

Vantagens e limitações do condicionamento abreviado do TZ

Vantagens

- a) o teste não é afetado por diversas condições que geralmente afetam o teste de germinação
- b) foca atenção às condições físicas e fisiológicas do embrião de cada semente individualizada
- c) permite rápida avaliação da viabilidade e do vigor
- d) possibilita a identificação de diferentes níveis de viabilidade
- e) fornece o diagnóstico da causa da queda de viabilidade das sementes
- f) o equipamento necessário é simples e barato; e
- g) um analista experiente pode ter um rendimento de quatro a cinco amostras (2x50 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 horas de trabalho que o teste de germinação padrão.
- d) não mostra a eficácia de tratamentos químicos, nem as injúrias que estes possam causar; e
- e) requer do analista capacidade de decisão pelas características do teste.

Avaliação

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

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

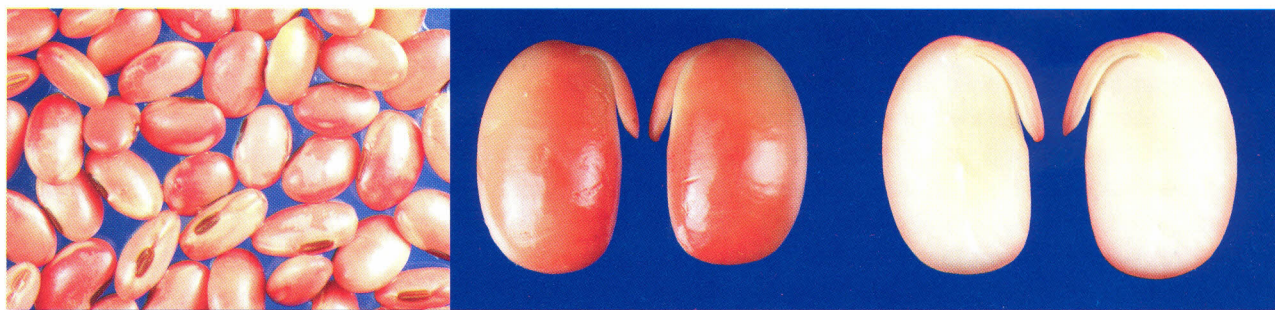


Figura 3. Semente de soja apresentando bom aspecto de coloração pelo teste de tetrazólio, quando submetidas ao período de condicionamento de 6h/41°C. Londrina, PR, 2007.

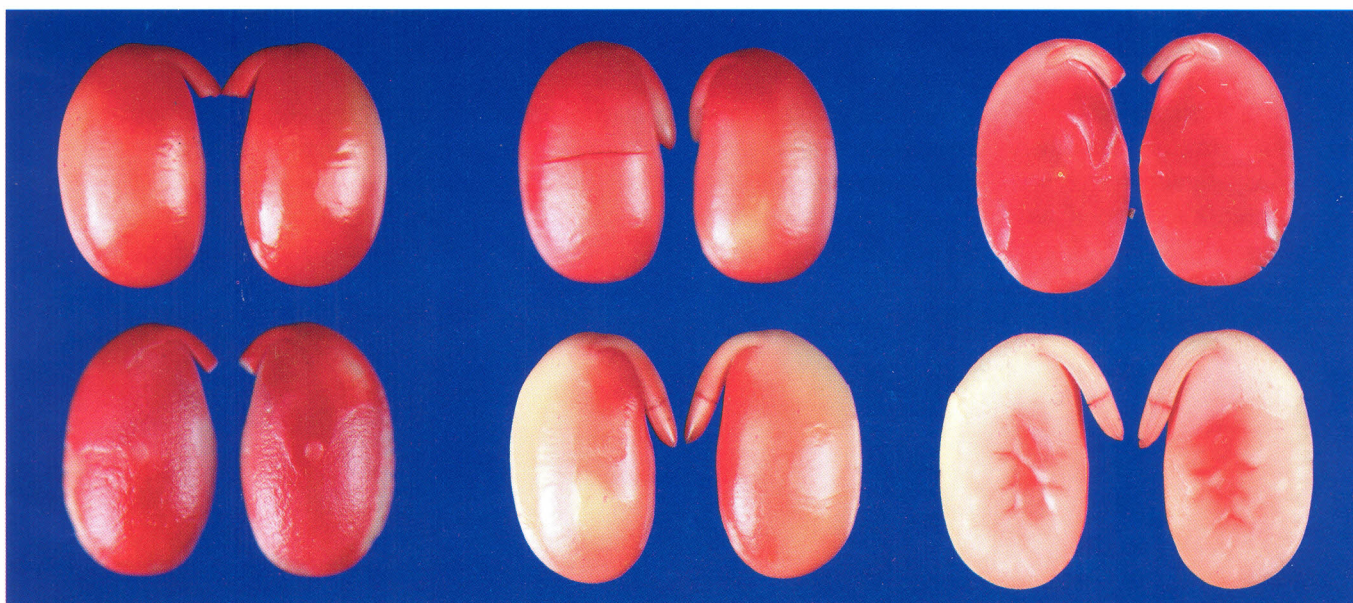


Figura 4. Semente de soja apresentando incidência de dano mecânico imediato identificado pelo teste de tetrazólio, após o período de condicionamento de 6h/41°C. Londrina, PR, 2007.

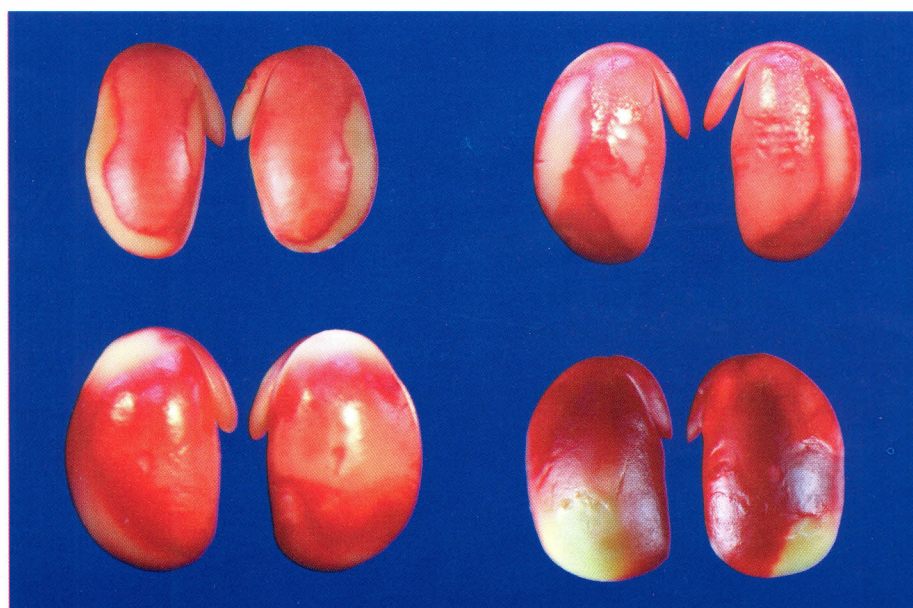


Figura 5. Sementes de soja, com problemas de deterioração por umidade identificada pelo teste de tetrazólio, submetidas ao período de condicionamento de 6h/41°C. A foto inferior à direita ilustra sementes com deterioração por umidade causada pelo problema de semente esverdeada. Londrina, PR, 2007.



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

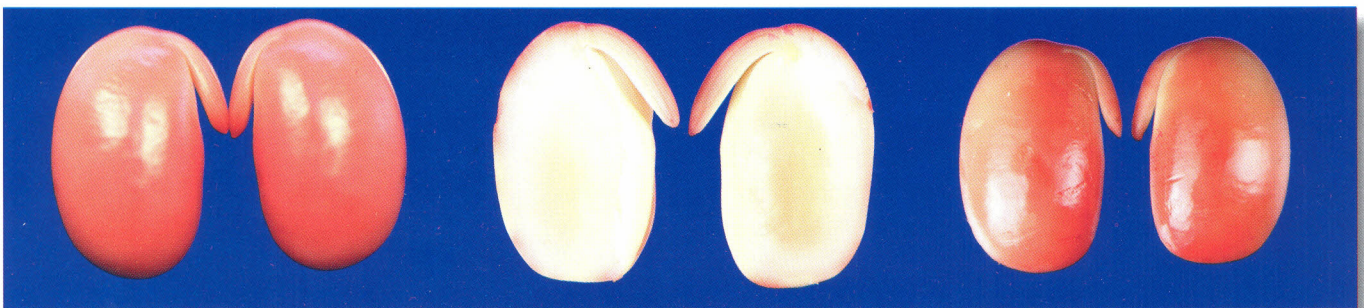


Figura 7. Semente de soja apresentando altos índices de vigor e viabilidade, avaliadas pelo teste de tetrazólio e condicionadas por 16h/25°C. Londrina, PR, 2007.

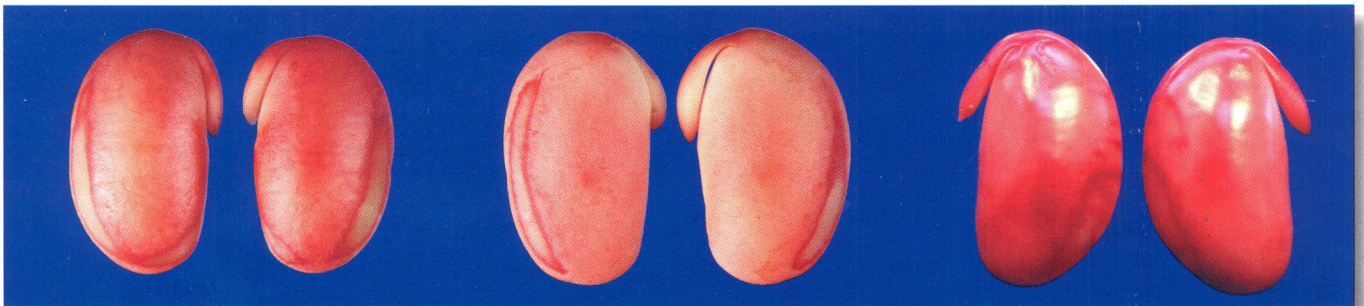


Figura 8. Sementes de soja apresentando sintomas de deterioração por umidade, pela utilização do condicionamento de 16h/25°C. Londrina, PR, 2007.

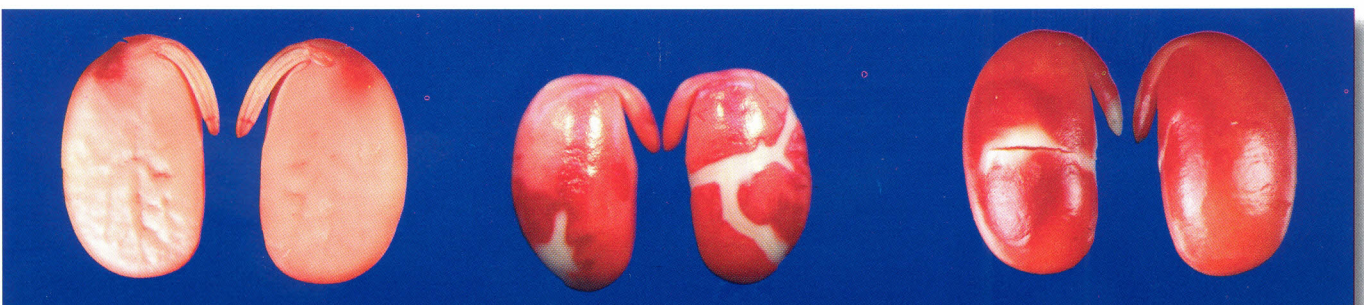


Figura 9. Semente de soja apresentando incidência de dano mecânico, pela utilização do condicionamento de 16h/25°C. Londrina, PR, 2007.

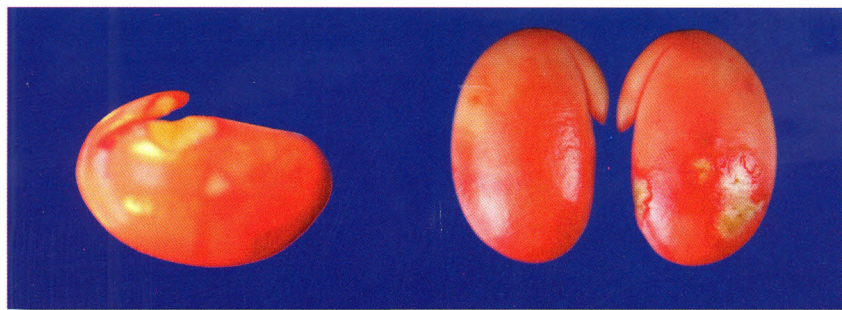


Figura 10. Semente de soja apresentando sintomas de lesões de percevejos, pela utilização do acondicionamento de 16h/25°C Londrina, PR, 2007.

Observações importantes

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

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

Considerações Gerais

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

metidas ao teste de tetrazólio e d) o teor de água da semente superior a 27%, permite bom desenvolvimento de coloração na solução de tetrazólio.

Referências

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

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PEREIRA, J. E. Determinação do nível crítico de umidade de sementes de soja para o desenvolvimento de coloração pelo teste de tetrazólio. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 9, v. 1/2, p. 132, jul./ago.1999. Número especial, ref. 204. Resumo apresentado no XI Congresso Brasileiro de Sementes.

COSTA, N. P.; MARCOS-FILHO, J. M. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean se-

eds. **Seed Science and Technology**, Zurique, v. 22, p. 9-17. 1994a.

COSTA, N. P.; MARCOS-FILHO, J. M. Aferição do teor de umidade (%) de sementes de soja para execução do teste de tetrazólio. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 37, n. 3, p. 693-701. 1994b.

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

DIACOM - Tecnologia para semente de soja de alta qualidade

OBJETIVO DO CURSO

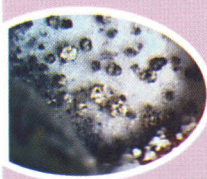
O DIACOM é uma tecnologia adequada para avaliar corretamente a qualidade das sementes de soja e identificar as causas de descarte de seus lotes devido à baixa germinação no teste de laboratório.

O teste de tetrazólio permite conhecer a viabilidade e o vigor da semente sem as interferências do processo de infecção causado por patógenos que a acompanham.

O teste de patologia de sementes, através do método do papel-de-filtro umedecido, permite identificar os principais fungos que interferem no teste padrão de germinação.

As informações fornecidas por estes dois testes permitem o *Diagnóstico Completo* (DIACOM) da(s) causa(s) do(s) problema(s) de qualidade na semente de soja, ao nível de laboratório de análise. Assim, através do DIACOM, é possível evitar o descarte de lotes cujas causas de baixa qualidade no teste de germinação sejam *Phomopsis sojae* e *Fusarium semitectum*.

Concomitantemente, pode-se identificar patógenos importantes para a qualidade da semente, permitindo a seleção do(s) fungicida(s) mais adequados para o seu tratamento.



Circular Técnica, 56

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

1ª edição
1ª impressão (2008): tiragem 2000 exemplares

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Governo Federal

Comitê de Publicações

Presidente: José Renato Bouças Farias
Secretário Executivo: Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros: Antonio Ricardo Panizzi, Claudine Dinali Santos Seixas, Francismar Corrêa Marcelino, Ivan Carlos Corso, Maria Cristina Neves de Oliveira, Norman Neumaier, Rafael Moreira Soares, Sérgio Luiz Gonçalves

Expediente

Coordenador de edição: Odilon Ferreira Saraiva
Bibliotecário: Ademir Benedito Alves de Lima
Edição eletrônica: Neide Makiko Furukawa