

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO TESTE TETRAZÓLIO

METHODOLOGIES ALTERNATIVE TO THE TETRAZOLIUM TEST

Yazolina Rossin¹, Letícia Winke Dias², Andreia da Silva Almeida³, Andrea Bicca Noguez Martins⁴, Adamo de Souza Araújo⁵, Francisco Amaral Villela⁶

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja e sua produtividade aumenta a cada safra, graças a avanços científicos e tecnológicos. A determinação rápida do potencial fisiológico das sementes é fundamental, e testes para avaliação do vigor das sementes têm grande importância na tomada de decisão quanto ao armazenamento e à comercialização do produto. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar metodologias para a realização do teste de tetrazólio, na avaliação de viabilidade e vigor de sementes de soja. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial Ax B (Fator A: Tempos de tratamentos com tetrazólio (Pré-embebição: 8, 16, 24 e 72 h – Pré-condicionamento: 2 e 16 h) e Fator B: Cultivares (TMG 1176RR e TMG 133RR). Com quatro repetições. As variáveis analisadas foram realizadas através do teste de germinação, emergência a campo, teste de tetrazólio, considerando-se viabilidade, vigor e deterioração por umidade. O teste de tetrazólio pode ser utilizado na avaliação do vigor das sementes de soja, uma vez que a sua elevada correlação com a emergência de plântulas em campo confere confiabilidade para a classificação das cultivares. A avaliação da qualidade fisiológica (viabilidade e vigor) das sementes de soja por meio do teste de tetrazólio é eficiente com o emprego da metodologia da RAS e também pela metodologia de pré-embebição no período de tempo 16 horas e pré-condicionamento também por 16 horas.

Palavras chave: *Glycine max* L., potencial fisiológico, viabilidade.

ABSTRACT

Brazil is the second largest producer of soybeans and their productivity increases each season, thanks to scientific and technological advances. Rapid determination of seed physiological quality is paramount, and tests for evaluation of seed vigor have great importance in decision making regarding the storage and marketing of the product. Therefore, this study aimed to evaluate methodologies for conducting the tetrazolium test in the evaluation of viability and vigor of soybean seeds. The experiment was conducted in a completely randomized design in a factorial arrangement Ax B (Factor A: Times of treatment with tetrazolium (Pre-soak: 8, 16, 24 and 72 h - Preconditioning: 2 and 16 h) and Factor B: Cultivars (TMG 1176RR e

¹Mestre em Ciência e Tecnologia de Sementes pela UFPel

^{2,3,4}Doutoranda do PPG em Ciência e Tecnologia de Sementes pela UFPel

⁵Professor Unipampa, Dr. Em Ciência e Tecnologia de Sementes pela UFPel

⁶Professor no PPG em Ciência e Tecnologia de Sementes pela UFPel

TMG 133RR). With four replications. analyzed variables were performed by the germination, emergence the field, tetrazolium test, considering viability, vigor and deterioration. The tetrazolium test can be used to evaluate the effect of soybean seeds, since its high correlation with the emergence in the field provides reliability for the classification of cultivars. The evaluation of the physiological quality (viability and vigor) of soybean seeds by the tetrazolium test is efficient with the use of the methodology of RAS and also the methodology of pre-soaking time in 16 hours and also by preconditioning 16 hours.

Keywords: *Glycine max L., physiological, viability.*

INTRODUÇÃO

A importância econômica da soja [*Glycine max* (L) Merrill] é bem conhecida, já que o país está entre os maiores produtores mundiais, contribuindo com 32,4% do PIB do agronegócio brasileiro. O Brasil é o segundo maior produtor de soja, apresentando na safra de 2016/17 aproximadamente 113 milhões de toneladas produzidas e uma área semeada de cerca de 33,8 milhões de hectares (CONAB, 2017).

O aumento da produtividade das lavouras brasileiras é obtido, em parte, graças a avanços científicos e tecnológicos, aliados a disponibilidades de tecnologias ao setor agrícola, como a produção e utilização de sementes de alta qualidade (PESKE et al., 2012).

A determinação rápida do potencial fisiológico das sementes é fundamental para que as empresas utilizem seus recursos de forma racional, e testes para avaliação do vigor das sementes têm grande importância na tomada de decisão quanto ao armazenamento e à comercialização do produto (TEKRONY, 2003; CARVALHO et al., 2009). Assim, diferentes procedimentos para a avaliação da qualidade das sementes têm sido empregados, principalmente os que permitem a identificação de lotes com alto ou baixo vigor (MCDONALD, 1998; HAMPTON, 2002).

O teste de tetrazólio é promissor nesses casos, uma vez que é um teste rápido, que não sofre influência da dormência das sementes, por se basear apenas no processo respiratório das células, e que permite a avaliação tanto da viabilidade quanto do vigor das sementes (DESWAL & CHAND, 1997; SANTOS et al., 2007; DIAS & ALVES, 2008).

A qualidade fisiológica da semente de soja é afetada negativamente pela deterioração de campo por variação de umidade, especialmente quando associada a temperaturas elevadas, o processo de ganho e perda de água resulta em retrações e expansões do tegumento, originando “rugas” na região oposta ao hilo (FRANÇA-NETO et al., 2007).

A integridade física da semente de soja é fundamental para o seu pleno desempenho no campo quanto á germinação e a emergência de plântulas, tendo sementes sem danos mecânicos, pré-requisito de qualidade para propiciar o numero de plantas no campo requerido para se atingir níveis elevados de produtividade (FRANÇA-NETO & KZRYZANOWSKI, 2004).

Algumas cultivares de soja apresenta maior tolerância ao dano mecânico e a deterioração por umidade (FRANÇA-NETO & KZRYZANOWSKI, 2000). Os efeitos imediatos da injúria mecânica são verificados quando o dano é drástico, porém efeitos latentes dessa injúria, mesmo que superficial, apesar de não afetarem prontamente a germinação, causam reduções no vigor e no potencial de armazenamento das sementes (BAUDET et al., 1978).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar metodologias para a realização do teste de tetrazólio, na avaliação de viabilidade e vigor de sementes de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no município de Pedra Preta, no estado de Mato Grosso, cujas coordenadas geográficas são 16,5 °S e 53,3 °W e uma altitude de 750. O solo é classificado como latossolo vermelho-escuro distrófico a latossolo vermelho-amarelo distrófico, com textura argilosa. As cultivares utilizadas foi TMG 1176RR e TMG 133RR.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial AxB (Fator A: Tempos de tratamentos com tetrazólio (Pré-embrição: 8,16, 24 e 72 h – Pré-condicionamento: 2 e 16 h) e Fator B: Cultivares (TMG 1176RR e TMG 133RR). Com quatro repetições.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade e, posteriormente submetidos, à análise de variância ANOVA. O

fator qualitativo foi analisado por comparações de média através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o procedimento estatístico utilizou-se o programa R, versão 3.1.1. e o pacote de dados “agricolae” (MENDIBURU, 2014; R CORE TEAM, 2014).

Os tratamentos das sementes com tetrazólio foram adotados da seguinte forma:

Tratamento 1: Pré-embebição das sementes por 16 horas, após pré-condicionamento por 2 horas.

Tratamento 2: Pré-embebição das sementes por 8 horas, após pré-condicionamento por 16 horas e tetrazólio.

Tratamento 3: Pré-embebição das sementes por 16 horas, após pré-condicionamento por 16 horas e tetrazólio.

Tratamento 4: Pré-embebição das sementes por 24 horas, após pré-condicionamento por 16 horas e tetrazólio.

Tratamento 5: Pré-embebição das sementes por 72 horas, seguida de coloração direta.

Para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram analisadas através dos seguintes teste:

Germinação (G): realizado segundo as Regras para Análise de Sementes RAS (Brasil, 2009), por meio da sementeira de 200 sementes por unidade experimental, divididas em quatro repetições de 50 sementes, em rolo de papel tipo germitest previamente umedecido, com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram colocados em germinador à temperatura de 25°C, e a contagem foi realizada aos 8 dias após a sementeira, sendo os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

Emergência a campo (EC): para esta determinação foram semeadas 100 sementes por tratamento, distribuídas em quatro repetições de 50 sementes. A avaliação foi realizada em contagem única das plântulas normais aos 21 dias após a sementeira, sendo os resultados expressos em porcentagem (NAKAGAWA, 1999).

Teste de tetrazólio (TZ): foram utilizadas com 100 sementes, realizou-se o pré-umedecimento com as sementes intactas, por 6 horas a 41°C em rolo de papel e, em seguida, foi realizada a coloração das sementes em solução de 2,3,5 trifênil

tetrazólio na concentração de 0,1% por 3 horas a 35°C dentro de copos descartáveis, de acordo com a Regra para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram consideradas como vigorosas as sementes classificadas nas classes 1 a 3, viáveis da 1 a 5 e não viáveis classes 6, 7 e 8, conforme metodologia de FRANÇA NETO et al. (1998).

Tabela 1. Teste de tetrazólio: descrição da diferenciação dos tecidos em função da coloração.

Cor	Situação
Vermelho carmim	Tecido vivo e vigoroso
Vermelho carmim forte	Tecido em deterioração
Branco leitoso	Tecido morto

A viabilidade das sementes foi analisada através da coloração dos tecidos vivos na presença da solução do sal de tetrazólio. Para tanto, semente viável possui coloração suave em todos tecidos cuja viabilidade é indispensável para o desenvolvimento de uma plântula normal, enquanto tecidos deteriorados desenvolvem coloração vermelha intensa e os tecidos mortos, simplesmente não desenvolvem coloração (DELOUCHE et al., 1976).

Tabela 2. Teste de tetrazólio: descrição dos níveis de viabilidade.

Nível	Viabilidade
≥ 85%	Muito alto
75 a 84%	Alto
60 a 74%	Médio
50 a 59%	Baixo
≤ 49%	Muito baixo

O vigor de sementes compreende aquelas propriedades que determinam o potencial para a emergência rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais sob uma ampla faixa de condições ambientais (BRASIL, 2009).

Tabela 3. Teste de tetrazólio: descrição dos níveis de vigor.

Nível	Vigor
≥ 85%	Muito alto
75 a 84%	Alto
60 a 74%	Médio
50 a 59%	Baixo
≤ 49%	Muito baixo

A deterioração por umidade, juntamente com os danos mecânicos e por percevejo formam a porcentagem de perda de viabilidade, sendo considerada:

Tabela 4. Teste de tetrazólio: descrição da problemática em função da porcentagem de perda de viabilidade.

Nível	Porcentagem
Sem restrição	Inferior a 6%
Problema sério	Entre 7% e 10%
Problema muito sério	Superior a 10%

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultivar TMG 133RR, apresentou uma média de 96% de germinação e 86% de emergência a campo nas sementes de soja. Na avaliação de viabilidade e no vigor através teste de tetrazólio, apresentou diferenças significativas, sendo as metodologias indicadas pela RAS e a pré-embebição pelo tempo de 16 horas e pré-condicionadas também pelo tempo de 16 horas superiores as demais, seguidas pela realizada em 8 horas de pré-embebição e pré-condicionadas por 16 horas. Contudo a metodologia de pré-embebição pelo período de tempo de 72 horas e coloração

direta das sementes obteve um resultado que demonstrou ser inferior às demais metodologias (Tabela 5).

Porém, discrepâncias entre os resultados são aceitas e podem ocorrer por diversas razões (FRANÇA-NETO et al., 1998). Por se tratar de um teste rápido, que permite obter resultados, de maneira geral, em menos de 24 horas, está sujeito à interferência de vários fatores no resultado final, como o preparo das amostras para a coloração, o tempo de coloração, a temperatura, luminosidade e mesmo a concentração da solução do sal (COSTA et al., 1998). As sementes de uma mesma espécie ou até de um mesmo lote podem apresentar velocidade de coloração diferente (BARROS et al., 1990).

Tabela 5. Testes de tetrazólio, cultivar TMG 133RR.

Metodologia	Viabilidade-Tetrazólio	Vigor - Tetrazólio
RAS	99 a	91 a
8h/16h	95 b	83 b
16h/16h	98 a	91 a
24h/16h	94 bc	85 b
72h	93 c	77 c
Média Geral	96	86
CV (%)	6,83	4,95

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para cultivar TMG 1176RR, apresentou uma média de 93% de germinação e 81% de emergência a campo nas sementes de soja. Na avaliação de viabilidade pelo teste tetrazólio a metodologia RAS apresentou-se superior às demais metodologias testadas. As metodologias de pré-embebição por 8 horas e pré-condicionamento por 16 horas, pré-embebição por 16 horas e pré-condicionamento 16 horas e pré-embebição por 24 horas e pré-condicionamento 16 horas obtiveram respostas iguais às metodologias empregadas. Entretanto, a metodologia de pré-

embebição pelo período de tempo de 72 horas e coloração direta das sementes obteve um resultado inferior às demais metodologias (Tabela 5).

Na avaliação de vigor as metodologias RAS, pré-embebição 16 horas e pré-condicionadas por 16 horas e pré-embebição 24 horas e pré-condicionadas por 16 horas obtiveram vigor superior quando comparadas as demais metodologias. Por seguinte, as sementes pré-embebição por 8 horas e pré-condicionamento por 16 horas demonstraram maior vigor que quando comparada a metodologia empregada na pré-embebição pelo período de tempo de 72 horas e coloração direta (Tabela 6).

Então, o teste tetrazólio é eficiente para avaliação de viabilidade e vigor em várias espécies, autores têm abordado a adequação da metodologia do teste para várias espécies, como em sementes de canafístula (OLIVEIRA et al., 2005), em milho (CHAMMA & NOVEMBRE, 2007), em pinhão-manso (PINTO et al., 2009), em triticales (SOUZA et al., 2010), em leucena (COSTA & SANTOS, 2010) e café (CLEMENTE et al., 2011).

Tabela 6. Testes de tetrazólio, cultivar TMG 1176RR.

Metodologia	Viabilidade-Tetrazólio	Vigor - Tetrazólio
RAS	97 a	86 a
8h/16h	92 ab	79 b
16h/16h	96 ab	88 a
24h/16h	94 ab	87 a
72h	86 c	65 c
Média Geral	93	81
CV (%)	7,43	6,67

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Portanto, o teste de tetrazólio pode ser utilizado na avaliação do vigor das sementes de soja, uma vez que a sua elevada correlação com a emergência de plântulas em campo confere confiabilidade para a classificação das cultivares.

CONCLUSÕES

A avaliação da qualidade fisiológica (viabilidade e vigor) das sementes de soja por meio do teste de tetrazólio é eficiente com o emprego da metodologia da RAS e também pela metodologia de pré-embebição no período de tempo 16 horas e pré-condicionamento também por 16 horas.

REFERÊNCIAS

BARROS, A.S.R.; MARCOS FILHO, J. Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.10, p.1447-1459, 1990.

BAUDET, L; POPINIGIS, F.; PESKE, S. Danificações mecânicas em sementes de soja transportadas por um sistema de elevador secador. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.3, n.4, p. 29-38, 1978.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, p. 398, 2009.

CARVALHO, L.F. de; SEDIYAMA, C.S.; REIS, M.S.; DIAS, D.C.F.S.; MOREIRA, M.A. Influência da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, p. 9-17, 2009.

CHAMMA, H.M.C.P.; NOVENBRE, A.D. da L.C. Teste de tetrazólio para as sementes de milho: períodos de hidratação e de coloração das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, p.125-129, 2007.

CLEMENTE, A. da C.S.; CARVALHO, M.L.M. de; GUIMARÃES, R.M.; ZEVIANI, W.M. Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, p.38-44, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Safra 2014/15**, n. 10º Levantamento - Safra 2016/2017 - Grãos, Brasília, 2017, 170p.

COSTA, N. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PEREIRA, J. E. Avaliação de metodologia alternativa para o teste de tetrazólio para sementes de soja. **Scientia Agricola**, v.55, n.2, p. 302-312, 1998.

COSTA, C.J.; SANTOS, C.P. dos. Teste de tetrazólio em sementes de leucena. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, p.66-72, 2010.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, p. 103, 1976.

DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, p. 409-417, 1997.

DIAS, M.C.L. de L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p. 152-158, 2008.

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. de B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1-28.

FRANÇA NETO, J. B., KRZYZANOWSKI, F. C. Produção de sementes de soja:fatores de campo. **Seed News**, Pelotas, n.2, p. 20-24, 2000.

FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C. O **controle de qualidade inserido no sistema de produção de sementes**. Brasília: ABRASEM 2004. p. 34-38.

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

HAMPTON, J.G. What is seed quality? **Seed Science and Technology**, v.30, p. 1-10, 2002.

MCDONALD, M.B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, v.8, p.265-276, 1998.

MENDIBURU, F. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-0**. 2014.<http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.2.1-2.24.

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

PESKE, S.T.; BARROS, A.C.S.A.; SCHUCH, L.O.B. Produção de sementes. in: PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G.E. **Sementes: Fundamentos Científicos e tecnológicos**. 3.ed. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, p.13-104, 2012.

PINTO, T.L.F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V.A.; CARVALHO, C. de; GOMES JUNIOR, F.G.J. Avaliação da viabilidade das sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, p.195-201, 2009.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. URL <http://www.R-project.org/>.

SANTOS, J.F.; SANCHES, M.F.G.; BARBOSA, R.M.; LEÃO, E.F.; VIEIRA, R.D. Optimising tetrazolium test procedures to evaluate the physiological potential of peanut seeds **Seed Science and Technology**, v.40, p. 215-228, 2012.

SOUZA, C.R. de; OHLSON, O. de C.; GAVAZZA, M.I.A.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, p.163-169, 2010.

TEKRONY, D.M. Precision is an essential component in seed vigor testing. **Seed Science and Technology**, v.31, p. 435-447, 2003.