

EFICIÊNCIA DO TESTE DE TETRAZOLIO EM SEMENTES DE TRIGO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SAL

EFFICIENCY OF TETRAZOLIUM TEST IN WHEAT SEEDS AS A FUNCTION OF SALT CONCENTRATION

Dieli Witte Maass¹, Ireni Leitzke Carvalho², Raimunda Nonata Oliveira da Silva³, Geri Eduardo Meneghello⁴, Matheus Gatto⁵, Nicolas Bonato⁶, Leonardo Pandolfi⁷

RESUMO: O uso do teste de Tetrazólio têm-se tornado cada vez mais importante nos programas de controle de qualidade em diferentes etapas de produção, permitindo a rápida tomada de decisão, principalmente no período da pré-colheita. O objetivo do presente trabalho foi determinar a melhor concentração do sal de tetrazólio para avaliar a eficiência do teste de tetrazólio em sementes de trigo em relação ao teste padrão de germinação. Foram utilizadas sementes de duas cultivares de trigo, cada uma composta por 4 lotes. Inicialmente foi realizada a caracterização fisiológica dos lotes mediante os testes de teor de água, germinação e emergência de plântulas. Para o teste de tetrazólio, quatro subamostras de 50 sementes de cada lote foram embebidas entre papel por 18h a 20°C. Em seguida, foi realizado corte longitudinal através do centro do eixo embrionário, e descartando aproximadamente 1/2 da largura da semente, colocadas em copos plásticos e imersas nas concentrações 0,1; 0,5 e 1% de solução de cloreto 2, 3, 5 trifeniltetrazólio durante 2 h, no escuro, a 35°C. Após esse período as sementes foram avaliadas individualmente, mediante visualização em microscópio estereoscópico, levando em consideração a intensidade e uniformidade de coloração apresentadas nos tecidos. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para avaliação da eficiência metodológica do teste de tetrazólio, realizou-se comparação entre os resultados obtidos neste teste com o resultado do teste de germinação. Conclui-se que o teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade de sementes de trigo utilizando a concentração 0,5% do sal de tetrazólio.

Palavras-chave: *Triticumaestivum*, potencial fisiológico, viabilidade.

ABSTRACT: *The use of the tetrazolium test (TZT) has become increasingly important in the quality control programs at all stages of production, allowing rapid decision-making, especially in the pre-harvest period. The objective of this study was to determine the best tetrazolium salt concentration to evaluate the tetrazolium test efficiency on wheat seeds in relation to the standard germination test. Four lots of two wheat cultivars were used. The lots characterization was assessed by moisture content, germination test, and seedling emergence tests. For the TZT, four replications of 50 seeds of each lot were soaked in a*

¹Graduanda em Agronomia – Universidade Federal de Pelotas

²Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes – Universidade Federal de Pelotas

paper overnight (18 h) at 20°C. Then, a longitudinal cut was made through the center of the embryonic axis, discarding about 1/2 the width of the seed, placed in plastic cups and immersed in the concentrations 0.1; 0.5 and 1% solution of chloride 2,3,5-triphenyl tetrazolium for 2 h in the dark at 35°C. After this period, the seeds were evaluated individually by stereoscopic microscopy, taking into account the intensity and uniformity of staining presented in the tissues. The experimental model used was a randomized complete design with four replications. The comparison between standard germination and TZT results was made to evaluate the methodological efficiency of the tetrazolium test. On the basis of the results of this study, it can be concluded that the TZT is efficient for estimating the wheat seeds viability using the 0.5% tetrazolium salt concentration.

Key-words: *Triticumaestivum, physiological potential, viability.*

INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticumaestivum* L.) é um dos cereais mais produzidos no mundo, destacando-se como um dos alimentos mais importantes da humanidade, possuindo grande importância social e econômica. É responsável por 30% da oferta mundial de grãos, devido o alto consumo dos seus derivados (SOUZA et al., 2013). Na indústria, o trigo se destaca como fonte de matéria-prima para fabricação de farinha e produtos panificáveis (COSTA et al., 2008).

A cultura do trigo tem grande relevância para o agronegócio brasileiro, sendo considerado um cereal de inverno, sua maior produção se concentra principalmente na região sul do país, que é responsável por mais 90% da produção brasileira de trigo. Segundo o levantamento de dados da Companhia Nacional de Abastecimento, a área cultivada com trigo chegou a 2,115 milhões de hectares, com uma produção de grãos de 6,7 milhões de toneladas e produtividade média de 3.175 kg/há na safra 2016 (CONAB, 2017).

A utilização de sementes de alta qualidade é pressuposto primordial para que as plantas obtenham desempenho satisfatório no campo, assegurando o estabelecimento de uma população de plantas vigorosas, com potencial de alto desempenho agrônomico (FRANÇA NETO et al., 2015). Nesse sentido, a avaliação da qualidade fisiológica de sementes ocupa um papel estratégico na indústria sementeira, visando não somente determinar a qualidade das sementes que serão disponibilizadas no mercado, mas principalmente evitar que sementes de baixa qualidade cheguem ao agricultor.

O teste de germinação é o mais frequentemente utilizado na avaliação da viabilidade das sementes, determinando o potencial máximo de germinação de um lote, fornecendo informações sobre o valor das sementes para semeadura e gerando subsídios para diferenciação da qualidade dos lotes de sementes. Porém, este necessita de um tempo considerável para sua condução, no caso do trigo, este período pode atingir até oito dias (BRASIL, 2009; SOUZA et al., 2010). Adicionalmente, sua avaliação é influenciada pelo grau de dormência das sementes de trigo recém-colhidas, necessitando de tratamentos específicos para superação da dormência, prolongando assim a duração do teste (GAVAZZA et al., 2012; GAO; AYELE, 2014; CARVALHO et al., 2016).

Para satisfazer a necessidade da rapidez nas respostas sobre a qualidade das sementes, o uso de testes rápidos têm-se tornado cada vez mais importante nos programas de controle de qualidade em todas as etapas de produção, permitindo a rápida tomada de decisão (CARVALHO et al., 2009; SOUZA et al., 2010). O tempo e os recursos investidos no beneficiamento das sementes podem não ser bem empregados quando não se conhece com precisão o potencial fisiológico destas. Assim, a dormência presente nas sementes recém-colhidas de trigo pode ser um problema, uma vez que a análise imediata da viabilidade pelo teste de germinação é comprometida, fazendo-se necessário o armazenamento por um período de dois meses para superação da dormência.

O teste topográfico de tetrazólio é um método rápido capaz de estimar a viabilidade das sementes, baseando-se principalmente na coloração dos tecidos vivos do embrião, na presença da solução de tetrazólio, possibilitando a determinação da viabilidade das sementes em um período inferior a 24 horas. Esse teste também é indicado para espécies que apresentam germinação lenta e quando as sementes apresentam dormência, visto que nem todas as sementes classificadas como dormentes no teste de germinação são viáveis, podendo haver entre elas sementes mortas. Neste caso, a viabilidade das sementes classificadas como dormentes pode ser verificada pelo teste de tetrazólio após no término do mesmo (FRANÇA NETO et al., 1998; ISTA 2003; BRASIL 2009).

A eficiência do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica das sementes depende da adequação da metodologia para cada espécie (PINTO et al., 2009). Vários fatores podem influenciar no resultado final do teste, tais como a velocidade de coloração, temperatura e concentração da solução de tetrazólio. De acordo com

FRANÇA NETO et al.(1998), a utilização de uma menor concentração do sal de tetrazólio contribui para diminuição do custo da análise, e, para algumas espécies, inclusive, este procedimento possibilita melhora na visualização da coloração dos tecidos e dos diferentes tipos de danos.

Assim, tornam-se necessários estudos mais aprofundados sobre os ajustes na concentração do sal para avaliação da viabilidade em sementes de trigo. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi determinar a melhor concentração do sal de tetrazólio para avaliar a eficiência do teste de tetrazólio em sementes de trigo em relação ao teste padrão de germinação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas sementes de trigo das cultivares Quartzo e Pioneiro, cada uma representada por quatro lotes. As sementes foram submetidas às seguintes análises para caracterização fisiológica:

Teor de água – realizado conforme as Regras para Análise de Sementes, utilizando duas subamostras por repetição para cada amostra de 4,5 g de sementes, colocadas em cápsulas de alumínio em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas e os resultados expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

Germinação (G): conduzido utilizando-se 200 sementes, divididos em quatro subamostras de 50 sementes. As sementes foram colocadas em papéis umedecidos com água destilada equivalente a 2,5 o peso do papel seco e logo em seguida transferidas para germinador com temperatura a 20°C . A avaliação foi realizada no oitavo dia após a instalação do teste, considerando a porcentagem de plântulas normais, de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Emergência de plântulas (EP): quatro amostras de 50 sementes de cada lote foram semeadas em caixas plásticas (tipo gerbox), utilizando solo como substrato e temperatura constante de 20°C . A avaliação foi realizada aos 14 dias após a semeadura, computando-se o número de plântulas emergidas.

Teste de Tetrazólio- 200 sementes de cada lote, divididos em quatro subamostras de 50 sementes, foram hidratadas em papel germiteste umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco por um período de 18h à temperatura de 20° C (BRASIL, 2009). Decorrido esse período realizou-se um corte longitudinal no centro do eixo embrionário, com auxílio de uma lâmina, retirando e descartando 1/2 da largura da semente, sendo posteriormente colocadas em solução 0,1; 0,5 e 1,0% de cloreto 2, 3, 5 trifeniltetrazólio por duas horas, no escuro e a 35°C com adaptações de Carvalho et al. (2013).

Para a avaliação da viabilidade, as sementes foram lavadas em água corrente, avaliadas individualmente, analisando e observando estruturas e coloração do embrião, com o auxílio de uma lupa com aumento de seis vezes. As sementes foram classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com a coloração apresentada no embrião, computando-se a porcentagem de sementes viáveis.

Para análise da eficiência dos procedimentos utilizados no teste de tetrazólio no presente estudo, conforme fórmula proposta por Carvalho et al. (2017):

Eficiência $TZn = [1 - (|G - TZn|) / G] 100$, levando em consideração o resultado da germinação das sementes: sendo $G = \%$ de plântulas normais obtidas no teste de germinação e $TZn = \%$ de sementes viáveis obtidas nos testes de tetrazólio.

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (lotes) e quatro repetições. Para cada cultivar realizou-se um experimento separadamente. Os dados de cada experimento foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e, quando significativas, as mesmas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos testes para caracterização da qualidade fisiológica dos lotes de sementes de trigo. O teor inicial de água das sementes variou de 9,4 a 11,7% na cultivar Pioneiro e de 11,3 a 12,8 na cultivar Quartzzo. Pode-se observar que a variação máxima do teor de água para os lotes, foi de 2,3 pontos percentuais para a cultivar Pioneiro e de 1,5 pontos percentuais para a cultivar Quartzzo. Ao se realizar um teste para avaliação da qualidade fisiológica é recomendado que as

sementes apresentem teor de água semelhante, sendo este um fator imprescindível para a uniformização e obtenção de resultados consistentes. De acordo com a literatura pequenas variações de até 2% não são consideradas comprometedoras (MARCOS FILHO, 1999; VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Apesar das sementes da cultivar Pioneiro terem apresentado uma variação maior que 2%, neste estudo constatou-se que não houve interferência nos resultados.

A partir do teste de germinação foi possível observar a similaridade dos lotes para ambas as cultivares, com exceção do lote 4 da cultivar Pioneiro que apresentou menor percentual de germinação (90%) em comparação aos demais. (Tabela 1). Verificou-se que os mesmos apresentaram alta qualidade fisiológica, com valores médios de germinação variando de 90 a 97% para a cultivar Pioneiro e de 92 a 95% para a cultivar Quartzo, estando todos os lotes bem acima do mínimo exigido no padrão de comercialização de sementes de trigo que é de 80%, estabelecido pela Instrução Normativa n.º 45 (BRASIL, 2013).

Tabela 1 – Valores médios de teor de água (TA), germinação (GER) e emergência de plântulas (EP) de sementes de quatro lotes cultivar Pioneiro e quatro lotes da cultivar Quartzo. Pelotas, RS, 2017

Cultivar	Lote	TA (%)	GER (%)	EP (%)
PIONEIRO	1	9,4	97a	94 ^{ns}
	2	11,5	95 a	93
	3	11,4	95 a	92
	4	11,7	90 b	91
CV%	-	-	2,4	2,14
QUARTZO	1	11,3	95 ^{ns}	93 ^{ns}
	2	12,3	95	93
	3	12,2	94	92
	4	12,8	92	89
CV%	-	-	1,56	2,92

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem pelo teste tukey a 5% de probabilidade; ns: não significativo.

O teste de emergência de plântulas não foi sensível para ranquear os lotes em diferentes níveis de qualidade para ambas as cultivares (Tabela 1). Esses resultados podem ser justificados provavelmente em função de que as condições durante a realização do teste foram consideradas favoráveis, possivelmente em condições adversas poderia ter sido observado uma maior estratificação entre os lotes testados.

Para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio em função das concentrações verificou-se de maneira geral, que os valores médios de viabilidade foram superiores aos obtidos no teste de germinação para ambas as cultivares (Tabela 2).

Apesar dos valores da viabilidade terem sido numericamente superiores aos do teste de germinação, verificou-se que a diferença máxima entre o teste de germinação e tetrazólio foi de apenas 4 pp (Tabela 6) nas concentrações estudadas e lotes avaliados em ambas as cultivares. Este resultado indica que o teste de tetrazólio é tão eficiente quanto o de germinação para avaliar a qualidade dos lotes de sementes de trigo. Estes resultados concordam com Silveira (2008) que obteve diferença média de 4 pontos percentuais (pp) entre as determinações de germinação e tetrazólio em sementes de azevém. Já Carvalho et al. (2017), verificou diferença máxima de 2 pp entre as determinações de germinação e tetrazólio em sementes de arroz.

Tabela 2 – Viabilidade de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio em função de variações nas concentrações do sal (0,1; 0,5 e 1,0%) de quatro lotes da cultivar Pioneiro e quatro lotes da cultivar Quartzo. Pelotas, RS, 2017

Cultivar	Lote	TZ 0,1%	TZ 0,5%	TZ 1,0%
PIONEIRO	1	99 a	99 a	97 a
	2	99 a	98 a	97 a
	3	97 ab	97 a	96 a
	4	92 b	89 b	92 b
C.V.(%)	-	3,12	2,17	3,13
QUARTZO	1	99 a	99 a	98 a
	2	98 a	98 a	96 ab
	3	97 a	97 a	93 bc

	4	96 a	96 a	92 c
C.V.(%)	-	1,7	1,68	2,49

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem pelo teste tukey a 5% de probabilidade; ns: nao significativo.

Quanto à avaliação da viabilidade das sementes em função das diferentes concentrações, verificou-se que todas as concentrações apresentaram resultados semelhantes aos obtidos no teste de germinação em ambas as cultivares, com exceção da concentração 1,0% na cultivar Quartzo que obteve resultados distintos do teste de germinação. No entanto, destaca-se que na concentração 0,5% verificou-se uma melhor visualização na coloração dos tecidos em comparação as demais concentrações. Outro ponto importante é a redução da quantidade de sal utilizado quando comparado com a concentração de 1,0% do sal. De acordo com Silva et al. (2013), metodologias eficientes, com utilização de solução de tetrazólio em baixas concentrações, são importantes para otimizar a aplicação dos recursos dentro dos laboratórios e possibilitar a análise de mais amostras com menor custo.

Quanto à eficiência metodológica (Tabela 3), verificou-se que nas concentrações 0,1 e 0,5% obteve uma eficiência acima de 96% para ambas as cultivares, que significa dizer que houve acerto maior que 96 % nos resultados do teste de tetrazólio e que ocorreu erro menor que 4 pp. Esses resultados corroboram com os encontrados por Carvalho et al. (2017), trabalhando com sementes de arroz, obteve eficiência de mínima de 97%, concluindo que o teste de tetrazólio é eficiente para avaliação da viabilidade em sementes de arroz.

Tabela 3 - Eficiência (%) do teste de tetrazólio em função de variações nas concentrações do sal de tetrazólio em duas cultivares de trigo

CULTIVAR	TZ 0,1%	TZ 0,5%	TZ 1%
PIONEIRO	97,4	96,2	97,8
QUARTZO	96,5	96,3	93,3

Para escolha do melhor método, considerou-se que a metodologia mais eficiente foi aquela que apresentou maiores resultados quanto à eficiência, nesse sentido,

constatou-se que as concentrações 0,1 e 0,5% foram eficientes para ambas as cultivares. Neste caso, considerou-se mais eficiente a concentração 0,5% que possibilitou melhor visualização da coloração dos tecidos.

CONCLUSÃO

O teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade de sementes de trigo utilizando a concentração 0,5% de sal de tetrazólio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuaria. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

BRASIL. Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. **Padrões para a Produção e a Comercialização de Sementes**. Brasília: Diário Oficial da União, 20 set. 2013

CARVALHO, L. F. SEDIYAMA, C. S.; REIS, M. S.; DIAS, D. C. F.; MOREIRA, M. A. Influencia da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.09-17, 2009.

CARVALHO, T.C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. **Journal of Seed Science**, v.35, n.3, p.361-367, 2013.

CARVALHO, T. C.; OHLSON, O. C.; PANOBIANCO, M. Alternative treatment to stimulate the germination of recently harvested wheat seeds. **Journal of Seed Science**, v.38, n.4, p.344-349, 2016.

CARVALHO, I. L.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. V. M.; JÁCOME, C. J.; SOARES, N. S. Methodological adjustments to the tetrazolium test in rice seeds. **Journal of Seed Science**, v.39, n.1, p.041-049, 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento safra brasileira de grãos, v. 4 - Safra 2016/17, n. 10 – Décimo Levantamento, jul. 2017. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/](https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf)

17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf. Acesso: 19 de ago. 2017.

COSTA, M. G. da; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, S. A. C. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 1, p. 220-225, 2008.

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

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F.C.; LORINI, IRINEU. Diacom: 35 anos de capacitação nos testes de tetrazólio e patologia de sementes de soja, **Revista Seed News**, Pelotas, v.19 , n. 5, p.30-35, 2015.

GAO, F.; AYELE, B.T. Functional genomics of seed dormancy in wheat: advances and prospects. **Plant Science**, v.5, p.1-11, 2014.

GAVAZZA, M.I.A.; BASSOI, M.C.; CARVALHO, T.C.; BESPALHOK FILHO, J.C.; PANOBIANCO, M. Methods for assessment of preharvest sprouting in wheat cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.7, p.928-933, 2012.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. In: **ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing**. Bassersdorf: ISTA, v.1, 2003. 171p.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3, p.1-24.

PINTO, T. L. F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios x. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, N. 2, P.195-2001, 2009.

SILVA, R. C.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; FRANÇA-NETO, J. DE B.; PANOBIANCO, M. Adaptação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de girassol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.1, p.105-113, 2013.

SILVEIRA, M. A. M. Teste de tetrazólio como rotina para avaliar germinação em sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.14, n.2, p.113-118, 2008.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. C.; GAVAZZA, M. I. A.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium Test for Evaluating Triticale Seed Viability. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3, p.163-169, 2010.

SOUZA, J. L. M.; GERSTEMBERGER, E.; ARAUJO, M. A. Calibração de modelos agrometeorológicos para estimar a produtividade da cultura do trigo, considerado sistemas de manejo do solo, em Ponta Grossa-PR. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 28, n. 4, p. 409-418, 2013.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 4, p.1-26.

