

Reportagem de capa do mês set/out 2015 - Ano XIX - N. 5

DIACOM: 35 Anos de capacitação nos testes de tetrazólio e patologia de sementes de soja



José de Barros França Neto
jose.franca@embrapa.br
Ademir Assis Henning, Francisco Carlos Krzyzanowski, Fernando Henning e Irineu Lorini

A utilização de semente de soja de alta qualidade, associada a boas práticas de semeadura, assegura o estabelecimento de uma população de plantas vigorosas, potencialmente com alto desempenho agrônômico, e em número adequado, sendo a base para o sucesso da lavoura, contribuindo para que máximas produtividades sejam alcançadas.

O uso de semente de baixa qualidade origina plantas fracas, de baixo desempenho agrônômico, o que compromete a obtenção de estande de plantas adequado, influenciando diretamente na produtividade da lavoura. Quando uma população de plantas abaixo da recomendada é obtida, poderá existir a necessidade do replantio, e tal prática está associada com sérios prejuízos referentes ao aumento do custo de produção e aos riscos inerentes a essa prática, como troca de cultivar, perda da melhor época de semeadura, problemas de eficiência de herbicidas ou riscos de sobreposição de herbicidas na área e possível ocorrência de fitotoxicidade, problemas com perdas dos fertilizantes aplicados, fatores esses que contribuem para menores produtividades da lavoura e rentabilidade ao produtor.

Produzir semente de soja de elevada qualidade requer a adoção de técnicas especiais de produção no campo, associadas a um bom programa de controle de qualidade, abrangendo da colheita até o processo final de entrega da semente ao cliente.

A qualidade da semente de soja pode ser influenciada por diversos fatores, que podem ocorrer durante a fase de produção no campo, na operação de colheita, na secagem, no beneficiamento, no armazenamento, no transporte e na semeadura. Tais fatores abrangem extremos de temperatura durante a maturação, flutuações das condições de umidade do ambiente, incluindo secas, deficiências na nutrição das plantas, ocorrência de insetos, além da adoção de técnicas inadequadas de colheita, secagem e armazenamento. Dentre esses, *Phomopsis* spp., *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii* e *Fusarium* spp. são alguns dos patógenos mais frequentemente associados com a semente de soja, principalmente quando ocorrem chuvas durante as fases de maturação e pré-colheita da soja.

Apesar de serem fatores distintos, a ação e a interação de todos esses fatores fisiológicos, físicos, entomológicos e patológicos contribuem para um resultado comum: a deterioração da semente. Esta é um processo natural que envolve a interação de mudanças citológicas, fisiológicas, bioquímicas e físicas da semente e que resultam na perda do vigor e da germinação da mesma.

A adoção de técnicas de controle de qualidade na produção de semente visa suprir de informações que auxiliem no processo de tomada de decisão em cada etapa do processo de produção, tendo em vista superar limitações impostas pelos diversos fatores que podem afetar a qualidade da semente. O Controle de Qualidade (CQ) é exercido em todas as etapas do sistema de produção, desde a seleção da área para a semeadura, na pré-colheita, colheita, recepção, secagem, beneficiamento, armazenagem, transporte e na pré-semeadura.

Os Laboratórios de Análise de Sementes (LAS) são as unidades centralizadoras do CQ, sendo, portanto, o coração da Empresa de Semente, tendo os analistas e responsáveis técnicos grande responsabilidade na condução dos diversos testes e nas tomadas de decisões quanto ao destino dos lotes de sementes. Dependendo do grau de capacitação desses técnicos, o CQ pode ser utilizado como instrumento para diagnosticar os pontos problemáticos no sistema de produção e apontar possíveis soluções para os mesmos.

Visando contribuir para o aprimoramento do CQ da semente de soja, a Embrapa Soja desenvolveu, em 1980, o DIACOM: Diagnóstico Completo da Qualidade da Semente de Soja, o qual envolve a realização conjunta dos testes de germinação, de emergência em areia, de tetrazólio e de patologia de sementes em diversas etapas do sistema de produção.

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. Além disso, diagnostica os principais problemas que podem afetar a qualidade da semente, que são a deterioração por umidade, o dano mecânico e o dano por percevejo.

O teste de patologia de sementes, por meio do método do papel de filtro, possibilita a identificação dos principais fungos que interferem no teste de germinação em rolo de papel [*Phomopsis* sp. e *Fusarium pallidoroseum* (syn. *semitectum*)]. Assim, por meio do DIACOM, é possível evitar o descarte de lotes de sementes cujas causas de baixa qualidade no teste de germinação sejam a infecção das sementes por esses dois fungos, podendo-se utilizar, nessas circunstâncias, o teste de emergência em areia, ao invés do teste de germinação em rolo de papel a 25° C.

Além disso, o diagnóstico dos problemas de qualidade propiciado pelo DIACOM possibilita que medidas corretivas possam ser adotadas no processo produtivo da semente, visando o aprimoramento da qualidade. Concomitantemente, podem-se identificar outros patógenos importantes que podem estar afetando a qualidade das sementes, permitindo a seleção de fungicidas mais adequados para o seu tratamento.

A tecnologia foi desenvolvida para proporcionar a correta avaliação da qualidade da semente de soja, possibilitando identificar as causas de descarte de seus lotes devido à baixa germinação no teste de laboratório e indicando possíveis soluções para os problemas encontrados.

O teste de tetrazólio

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

Porém, além desses, os danos de secagem, de estresse térmico e de geada podem também ser facilmente identificados pelo teste. Aliás, o fornecimento desse diagnóstico tem sido o grande responsável pelo elevado índice de adoção do teste no Brasil.

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs). Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos.

Quando a semente de soja é imersa na solução incolor de TCT, esta é difundida através dos tecidos, ocorrendo nas células vivas a reação de redução, que resulta na formação de um composto vermelho, estável e não difusível, conhecido por trifênilformazan.



Semente de soja colorida pelo sal de tetrazólio, ilustrando danos típicos causados por picadas de percevejo. (Foto: J.B. França-Neto).



Semente de soja colorida pelo sal de tetrazólio, ilustrando danos típicos causados por deterioração em pré-colheita (dano por umidade). (Foto: J.B. França-Neto).



Semente de soja colorida pelo sal de tetrazólio, ilustrando danos típicos causados por impactos mecânicos que ocorrem nas operações de colheita e transporte da semente. (Foto: J.B. França-Neto).



Plântula de soja infectada por *Cercospora kikuchii*. (Foto: A.A. Henning).



Aula prática sobre o teste de patologia de sementes durante o 3º Curso DIACOM: Tetrazólio e Patologia de Sementes, realizado na Embrapa Soja, Londrina, PR, no período de 16 a 19 de outubro de 1984 (Foto: J.B. França-Neto).



Aula prática do X Curso de Vigor em Sementes de Soja, realizado na Embrapa Soja, Londrina, PR, no período de 20 a 20 de julho de 2015. (Foto: J.B. França-Neto).

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

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

Um breve histórico do teste

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

Diversos testes, baseados na observação da coloração, do aspecto, do peso volumétrico, da densidade, da velocidade de embebição, da condutividade elétrica e da intensidade respiratória das sementes, da atividade de diversas enzimas, do uso de diversos corantes, foram inicialmente utilizados, visando à rápida avaliação da viabilidade das mesmas, porém sem nenhuma precisão. As primeiras tentativas que apresentaram sucesso na avaliação da viabilidade das sementes com bio-corantes foram realizadas por Turina, na Iugoslávia, em 1922, e por Neljubow, na Rússia, em 1925. Turina trabalhou com a redução de sais de telúrio e de selênio nas células das sementes e Neljubow relatou algum sucesso com a utilização de índigo carmine.

O dr. Georg Lakon, nascido em Atenas, Grécia, trabalhou em Hohenheim, Alemanha, desde o início da década de 1920. Dedicou grande parte de sua vida profissional aos trabalhos na área de fisiologia de sementes. Ele aperfeiçoou o método do selênio, culminando com o desenvolvimento do método "topográfico" do selênio para a determinação da viabilidade de sementes. Quando tomou conhecimento dos efeitos tóxicos do selênio aos analistas de sementes, Lakon procurou por um sal similar, porém não tóxico, que poderia ser utilizado com a mesma finalidade. Ele testou vários sais de tetrazólio e concluiu que o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio era o mais apropriado para o teste topográfico. Lakon desenvolveu a metodologia para sementes de várias espécies de cereais e para milho. Foi o dr. Lakon quem pela primeira vez utilizou o termo "viabilidade de sementes", que era definido como um potencial de germinação e, por conseguinte, via em uma semente em repouso como um tipo de potencial de plântulas.

Avanços significativos sobre o teste ocorreram nas décadas de 1950 e 1960, mediante diversos estudos realizados nas universidades estaduais de Iowa, da Carolina do Norte, de Idaho, do Mississippi e do Oregon (Estados Unidos) e na Universidade de Hohenheim, Alemanha.

Em 1956, o Comitê de Tetrazólio da ISTA (Associação Internacional de Análise de Sementes) foi fundado, sendo que o mesmo contribuiu para significativos desenvolvimentos no teste, bem como diversos treinamentos sobre o mesmo. Em 1966, o "Capítulo 6: Teste Bioquímico para Viabilidade – o Teste Topográfico do Tetrazólio" foi incorporado à Regras para Análise de Sementes da ISTA.

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

Importantes contribuições foram dadas pela AOSA (Associação de Analistas Oficiais de Sementes dos Estados Unidos) mediante a edição do seu Manual do Teste de Tetrazólio, que tem edição atualizada até os dias atuais. Em 2003, a ISTA publicou as "ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing" (Fichas de Trabalho do Teste de Tetrazólio da ISTA), em dois volumes: Vol. 1 para sementes de espécies agrícolas e oleícolas, e o Vol. 2 para sementes de espécies florestais e arbustivas.

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

No caso específico de sementes de soja, o teste de tetrazólio foi aperfeiçoado para a determinação de vigor pelos pesquisadores em tecnologia de sementes da Embrapa Soja, que publicaram o primeiro manual sobre o teste em 1981 e mais outros quatro, contendo procedimentos específicos para o teste, sendo um deles publicado em três idiomas: Inglês; Espanhol; e Português.

Procedimentos detalhados para o teste de tetrazólio visando a determinação do vigor em sementes foram publicados em 1999 pela ABRATES (Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes) para sementes de algodão, de amendoim, de feijão, de milho e de soja, na publicação Vigor em Sementes: conceitos e testes, editado em 1999.

A metodologia do teste de tetrazólio para a determinação do vigor em sementes de soja foi recentemente validada pelo Comitê de Vigor da ISTA. A metodologia está sendo proposta para ser incorporada às Regras Internacionais para Análise de Sementes dessa instituição. Esses trabalhos foram coordenados por pesquisadores do INTA (Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária da Argentina) e da Embrapa Soja.

Aplicabilidade do teste de tetrazólio

Ele tem sido utilizado com sucesso já a partir da pré-colheita: amostragens diárias dos campos de produção podem ser realizadas, a partir de sete dias antes da colheita; faz-se uma amostragem de plantas do campo de produção, trilhando-se as sementes manualmente. Dependendo dos resultados obtidos, poderá ser decidido com segurança se o referido campo apresenta qualidade para ser colhido como semente ou como grão. Isto pode resultar em economias significativas aos produtores de sementes, no que se refere a evitar despesas desnecessárias de transporte, secagem, beneficiamento, embalagem e armazenamento de lotes de sementes de baixa qualidade.

Vantagens e limitações do teste de tetrazólio para sementes de soja

Vantagens:

- o teste não é afetado por diversas condições que podem afetar o testes que se baseiam no crescimento de plântulas, como o teste de germinação;
- foca atenção às condições físicas e fisiológicas do embrião de cada semente individualizada;
- permite rápida avaliação da viabilidade e do vigor (18 horas para a soja);
- permite a identificação de diferentes níveis de viabilidade;
- fornece o diagnóstico da causa da queda da viabilidade das sementes;
- o equipamento necessário é simples e barato; e
- não é afetado por fatores como dormência;
- um analista experiente pode ter um rendimento de quatro a cinco amostras (2 x 50 sementes) por hora de trabalho.

Limitações:

- requer treinamento especial sobre a estrutura embrionária da semente e sobre técnicas de interpretação;
- é relativamente tedioso, uma vez que as sementes são avaliadas uma a uma, requerendo, desta forma, experiência e paciência;

- embora seja um teste relativamente rápido, ele consome um maior número de horas de mão de obra que o teste de germinação;

- não mostra a eficácia de tratamentos químicos, nem as injúrias que estes possam causar.

Capacitações e emprego do teste

Desde 1980, a Embrapa Soja vem oferecendo treinamentos sobre o teste de tetrazólio e, a partir de 1984, os tradicionais Cursos DIACOM: Tetrazólio e Patologia de Sementes, que em 2015 completaram a sua 62ª edição. Por meio desses cursos, foram treinados 1.269 técnicos envolvidos com o Controle de Qualidade.

Além desses, desde 2006, a Embrapa Soja já ofereceu 10 edições do Curso de Vigor em Sementes de Soja, capacitando 335 profissionais da área de sementes.

O curso de vigor conta com a colaboração de professores da USP/Esalq, Piracicaba, e da Unesp, Jaboticabal. Outros nove treinamentos foram oferecidos sobre o teste de tetrazólio, contemplando 193 participantes. No total, a Embrapa Soja já ofereceu 81 treinamentos formais, onde foram treinados 1.797 técnicos, o que representa uma importante contribuição ao setor de Controle de Qualidade de sementes do Brasil e de diversos países.

No Brasil, nos últimos anos, a utilização do teste de tetrazólio tem assumido proporções jamais registradas mesmo nos países onde o teste foi desenvolvido. A sua metodologia tem sido aprimorada, principalmente no que se refere à determinação do índice de vigor, tornando o teste muito mais atrativo. No caso da soja, é notório que o teste é executado em todos os laboratórios de análise de sementes brasileiros que trabalham com tal espécie. Em consequência, hoje, pode-se dizer que o Brasil é o líder mundial de utilização do teste de tetrazólio na rotina da análise de semente de soja.

Alguns números podem ilustrar a significância de tal liderança, pois para a semeadura dos quase 32 milhões de hectares da safra 2014/15 foram necessárias cerca de um 2,1 milhões de toneladas de sementes de soja, o que representa ao redor de 80.000 lotes. Caso esses lotes sejam analisados pelo menos três vezes pelo teste de tetrazólio, durante o processo de controle de qualidade, e considerando análises realizadas em pré-colheita dos campos de sementes, isto resulta em cerca de 300.000 análises realizadas anualmente no Brasil, apenas com a soja.

www.seednews.inf.br
