

Ministério da Educação
Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes



Tese

**APERFEIÇOAMENTO METODOLÓGICO DO TESTE DE
TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE
ARROZ**

IRENI LEITZKE CARVALHO

Pelotas, 2015

IRENI LEITZKE CARVALHO

**APERFEIÇOAMENTO METODOLÓGICO DO TESTE DE TETRAZÓLIO
PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE ARROZ**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Sementes.

Orientador: Eng. Agr. Dr. Géri Eduardo Meneghello

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Lilian Vanussa Madruga de Tunes

Eng^a. Agr^a. Dr^a. Caroline Jacome Costa

Pelotas, 2015

APERFEIÇOAMENTO METODOLÓGICO DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE ARROZ

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

Banca examinadora:

.....
Eng. Agr. Dr. Geri Eduardo Meneghello
(FAEM/UFPEL, Orientador)

.....
Eng^a. Agr^a. Dr^a. Caroline Jacome Costa
(EMBRAPA, Coorientador)

.....
Prof. Dr. Francisco Amaral Villela (FAEM/UFPEL)

.....
Prof. Dr. Manoel de Sousa Maia (FAEM/UFPEL)

.....
Eng^a. Agr^a. Dr^a. Vanessa Nogueira Soares (FAEM/UFPEL)

*Ao meu esposo Sandro Olisio Outeiro Carvalho e
à minha filha Savannah Leitzke Carvalho*

Ofereço e dedico

Agradecimentos

A Deus por iluminar o meu caminho, guiar os meus passos e realizar este grande desafio.

À minha família, pais e irmãos, pelo incentivo.

Ao meu esposo e minha filha por todo o amor, apoio, incentivo e companheirismo nos momentos de conquistas e perdas.

Ao orientador, Eng. Agr. Dr. Geri Eduardo Meneghello, pela paciência, amizade, conselhos, disponibilidade e demonstração de confiança e segurança para execução do trabalho.

Às co-orientadoras Lilian Tunes e Caroline Jácome Costa, pela amizade, carinho, paciência e ajuda valiosa prestada para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, pelo conhecimento transmitido e experiências repassadas ao longo do curso.

À Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e Programa de Pós-graduação Ciência e Tecnologia em Sementes pela oportunidade de realizar o doutorado, desenvolver o presente trabalho e acréscimo profissional.

Aos estagiários, Lilian Barros, Ciro Moro e Scheila Ecker pela amizade e auxílio na execução dos experimentos.

À Andréia Almeida, Vanessa Soares, Jucilayne Vieira e Maria Luiza pelo incentivo, momentos de convívio e por terem me brindado com sua amizade e carinho.

A todos os colegas do curso, pelo apoio e harmonioso convívio.

Muito obrigada.

Nenhuma outra atividade econômica alimenta tantas pessoas, sustenta tantas famílias, é tão crucial para o desenvolvimento de tantas nações e apresenta mais impacto sobre o nosso meio ambiente. A produção de arroz alimenta quase a metade do planeta todos os dias, fornece a maior parte da renda principal para milhões de habitações rurais pobres, pode derrubar governos e cobre 11% da terra arável do planeta." (Ronald Cantrell, 2002).

Resumo

Carvalho, Ireni Leitzke. **Aperfeiçoamento metodológico do Teste de Tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de arroz** 2015. 95f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A calibração de metodologias capazes de identificar de forma rápida e eficiente a qualidade de um lote de sementes, mediante testes de viabilidade e de vigor como o teste de tetrazólio, cujo procedimento metodológico para a cultura do arroz ainda carece de ajustes. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar alternativas de preparo, pré-condicionamento e coloração das sementes de arroz para avaliação da viabilidade, e estabelecer classes de viabilidade, para estimar vigor de sementes de arroz. O trabalho foi conduzido em três etapas: a) ajuste de procedimentos de preparo das sementes de arroz para condução do teste de tetrazólio, para tanto foram utilizados sementes de quatro cultivares de arroz irrigado e duas de sequeiro, cada uma composta por dois lotes. Sendo testado quanto à necessidade da remoção da casca (pálea e lema) e corte das sementes; b) estudo de concentrações do sal de tetrazólio, período de pré-condicionamento e de coloração para avaliar a viabilidade de sementes de arroz. Nesta etapa foram utilizadas as mesmas cultivares da primeira etapa, cada uma composta por um lote, sendo utilizadas as metodologias que apresentaram os melhores resultados na etapa anterior. Foram avaliadas diferentes concentrações do Sal de Tetrazólio (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0%), três tempos de coloração (0,5; 1 e 2h), cinco períodos de hidratação (0,5; 1; 2; 3 e 4h) das sementes e duas temperaturas de embebição (35 e 40 °C); c) estimativa do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio, utilizando-se sementes de dez lotes da cultivar Irga 424. Foram estabelecidas quatro classes de viabilidade (sementes viáveis de alto vigor, viáveis de médio vigor, viáveis de baixo vigor e não viáveis e mortas). Os resultados indicaram que para a avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio é recomendável a remoção da pálea e lema, sendo mais eficiente o corte longitudinal na metade distal do eixo embrionário. O período de execução do teste de tetrazólio para sementes de arroz pode ser reduzido para três horas, utilizando hidratação das sementes por 1h a 40°C, 1h para as atividades de corte e avaliação e 1h para coloração na concentração de 0,25%. Dessa forma, é possível concluir que as metodologias propostas nessa pesquisa permitem avaliar a viabilidade de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio; para avaliação do vigor o teste se mostrou promissor, porém necessitando de aprimoramento metodológico.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; qualidade fisiológica, período de hidratação, tempo de Coloração

Abstract

Carvalho, Ireni Leitzke. **Methodological improvement of tetrazolium test to evaluate rice seed viability** 2015. 95f. Dissertation (PhD in Seeds Science and Technology) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Calibration methodologies able to identify quickly and efficiently the quality of a lot of seeds through viability and vigor tests is constantly searched by seed technology. One of the most widely used tests for this purpose is the tetrazolium test, which methodological procedure for the rice crop still needs adjustments. This research aimed to study the preparation of alternatives, preconditioning and staining of rice seeds to evaluate the viability and establishing classes of viability to estimate the vigor of rice seed. The experiment was conducted in three stages: a) adjustment preparation procedures of rice seeds for conducting the tetrazolium test for both irrigated and upland plant varieties, were used four irrigated rice plant variety and two of upland plant variety, each consisting of two lots. It is tested on the need for removal of the shell (palea and lemma) and cut the seeds; b) study tetrazolium salt concentrations, preconditioning period and staining to evaluate the viability of rice seeds. At this stage, we used the same cultivars of the first stage, each consisting of a lot being used methodologies that showed the best results in the previous step. They were evaluated different concentrations of tetrazolium salt (0.1, 0.25, 0.5 and 1.0%) three times of staining (0.5, 1 and 2h), five periods of hydration seeds (0.5; 1, 2, 3 and 4h) and two soaking temperatures (35 and 40 ° C); c) estimate of seed vigor by the tetrazolium test, using ten seed lots of plant variety Irga 424 were established four viability classes (viable seeds of high vigor, viable medium vigor, viable low vigor and no viable and dead). The results indicated for the evaluation of viability of rice seed by tetrazolium testing is recommended to remove palea and lemma thereof and slitting the distal half of the embryonic axis is more efficient. The tetrazolium test execution period for rice seeds can be reduced to three hours using seed hydration for 1h at 40 ° C, for 1h cutting and evaluation activities and staining for 1h at 0.25% concentration. Thus, it leads to conclude that the proposed methodologies in this research to allow to evaluate the viability of rice seeds by the tetrazolium test; in order to evaluate vigor the test showed promise but needing methodological improvement.

Keywords: *Oryza sativa*; physiological quality, hydration period, staining period.

Lista de Figuras

Figura 1	Corte longitudinal de um grão de arroz, representação das estruturas.....	18
Figura 2	Reação química de redução do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a Trifenil formazan.....	23
Figura 3	Corte longitudinal de semente de arroz, destacando o embrião.....	25
Figura 4	Preparação de sementes de arroz para o teste de tetrazólio: Sementes sem remoção da pálea e lema (A) e sementes após remoção de pálea e lema (B).....	35
Figura 5	Cortes em sementes de arroz: corte longitudinal (A), corte transversal (B), semente sem corte (C).....	37
Figura 6	Coloração de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio. Teste sem remoção da pálea e lema (A) e com remoção da pálea e lema (B).....	41
Figura 7	Viabilidade de sementes de arroz realizado com diferentes cortes: corte longitudinal (A), corte transversal (B) e sem corte (C).....	44
Figura 8	Representação das sementes após coloração, nos períodos de 0,5 h (A e B) e 1 a 2h de exposição ao sal de tetrazólio (C).....	57
Figura 9	Teores de água de sementes de arroz hidratadas por 0; 0,5; 1, 2; 3 e 4 horas sob temperaturas de 35 e 40°C	61
Figura 10	Cortes em sementes de arroz embebidas em diferentes temperaturas (35 e 40 °C) e períodos de hidratação: 0,5 e 1h de hidratação a 35 e 40 °C (A) e 1h a 40°C (B).....	63
Figura 11	Sementes de arroz: classe 1 (A); classe 2 (B); classe 3 (C); e classe 4 (D).....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados médios do teor de água de água (TA), emergência de plântulas (EP), plântula normais (PN), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) de 12 lotes de sementes de arroz.....	39
Tabela 2	Germinação (%), viabilidade (%) e eficiência (%) do teste de tetrazólio adotando diferentes metodologias, em sementes de 12 lotes de sementes de arroz	42
Tabela 3	Germinação (%), viabilidade (%) de diferentes cortes e eficiência dos processos (%) em relação à germinação, obtidas nos diferentes cortes em sementes de arroz pelo teste de tetrazólio	46
Tabela 4	Teor de água inicial e após pré-condicionamento de sementes de arroz com e sem remoção da pálea e lema.....	47
Tabela 5	Dados médios de teor de água, primeira contagem de germinação, (PCG) e germinação (G) de sementes de arroz.....	56
Tabela 6	Viabilidade de seis lotes de sementes de arroz (%) pelo teste de tetrazólio em função de variações nas concentrações do sal e no tempo de coloração.....	58
Tabela 7	Viabilidade de sementes de arroz submetidas ao teste de tetrazólio empregando diferentes cortes: corte longitudinal (A), corte transversal (B) e sem corte (C).....	60
Tabela 8	Viabilidade de seis lotes de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio empregando diferentes períodos de embebição nas temperaturas de 35 e 40 °C.....	64
Tabela 9	Eficiência do teste de tetrazólio (%) avaliados em diferentes períodos de embebição nas temperaturas de 35 e 40 °C....	65
Tabela 10	Dados médios do teor de água inicial, após remoção da pálea e lema e após pré-condicionamento (hidratação).....	66
Tabela 11	Viabilidade pelo teste de germinação e tetrazólio e eficiencia do teste de tetrazólio, em 8 lotes de sementes de arroz, cultivar BR Irga 424.....	67

Tabela 12	Teor de água inicial das sementes (sem remoção da pálea e lema), após remoção da pálea e lema (ARPL) e após hidratação (AH) das cariopses.....	78
Tabela 13	Dados médios da germinação (G), viabilidade pelo teste de tetrazólio e eficiência do teste de tetrazólio em dez lotes de sementes de arroz, cultivar Irga 424.....	79
Tabela 14	Dados médios da primeira contagem de germinação (PCG), emergência de plântulas (EP) teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA), germinação a 30 °C e vigor pelo teste de tetrazólio (TZ vigor 1 e TZ vigor 2), em dez lotes de sementes de arroz, cultivar BR Irga 424.....	80
Tabela 15	Coeficientes de correlação de Pearson entre os resultados dos testes de emergência de plântulas (EP), primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), tetrazólio viabilidade (TZ viab.), tetrazólio vigor 1 (TZ vg 1), tetrazólio vigor 2 (TZ vg 2), teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA) e germinação a 30 °C (G 30 °C) aplicados em 10 lotes de sementes de arroz, cultivar BR Irga 424.....	82

Sumário

1	Introdução geral.....	15
2	Revisão bibliográfica.....	17
2.1	Produção e consumo de arroz.....	17
2.2	A semente de arroz: aspectos morfológicos.....	18
2.3.	Qualidade de sementes.....	19
2.4	Teste topográfico de tetrazólio (TZ).....	20
2.4.1	Histórico do teste.....	21
2.4.2	Princípio do teste.....	22
2.4.3	Hidratação da semente: pré-condicionamento.....	23
2.4.4	Identificação das estruturas essenciais.....	24
2.4.5	Avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio.....	25
2.4.6	Aplicações do teste.....	26
2.4.7	Avaliação do vigor em sementes pelo teste de tetrazólio.....	27
2.4.8	Metodologias alternativas para o teste do tetrazólio.....	28
3	Capítulol.- Preparo da semente de arroz para realização do teste de tetrazólio.....	30
3.1	Introdução.....	30
3.2	Material e métodos.....	33
3.3	Resultados e discussão.....	39
3.4	Conclusões	48
4	Capítulo I I- Teste de tetrazólio em sementes de arroz: hidratação e coloração das sementes.....	49
3.1	Introdução.....	49
3.2	Material e métodos	51
3.3	Resultados e discussão.....	56

3.4	Conclusões.....	69
5	Capítulo III - Avaliação do vigor em sementes de arroz pelo teste de tetrazólio.....	70
5.1	Introdução.....	70
5.2	Material e métodos.....	72
5.3	Resultados e discussão.....	76
5.4	Conclusões.....	84
6	Considerações finais.....	85
	Referências.....	87

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos principais alimentos, consumido diariamente por mais da metade da população humana e o Brasil está entre os dez principais produtores mundiais, com cerca de 11 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2013; SOSBAI, 2014), sendo o maior produtor fora do continente Asiático.

Para atingir altas produções, a utilização de sementes de alta qualidade é fator fundamental. Em paralelo, a indústria sementeira possui demanda por respostas rápidas sobre a qualidade das sementes. Neste contexto, o teste de tetrazólio surgiu como uma opção útil, rápida e confiável para avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

As técnicas gerais para o uso do teste de tetrazólio, para a cultura do arroz já estão definidas nas Regras e Manuais para Análise de Sementes (ISTA, 2003; BRASIL, 2009; AOSA, 2010) que recomendam pré-condicionamento de 18 h a 20 ou 25 °C, com posterior corte longitudinal e imersão das sementes em solução de tetrazólio com concentração de 0,1 a 1,0% durante 2 a 4 h a 30-35 °C, obtendo-se resultados em até 21h. Segundo França Neto et al.(2015), redução do tempo de execução do teste é importante para tomada de decisão, principalmente, na etapa da pré-colheita, onde amostragens diárias dos campos de produção podem ser realizadas antes da colheita e dependendo dos resultados obtidos, poderá ser decidido com segurança se o referido campo apresenta qualidade para ser colhido como semente ou deve ser destinado para a indústria alimentícia para ser utilizado como grão.

Outro fator importante a ser considerado, é a utilização de menor concentração do sal de tetrazólio, pois 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 (FRANÇA NETO et al., 1998).

Além da viabilidade, é possível também avaliar o vigor das sementes, com a mesma técnica empregada, diferindo na avaliação, que utiliza critérios mais específicos (sutis), de acordo com o grau de deterioração das sementes. Nesse contexto, o teste de tetrazólio também pode ser usado para fornecer uma avaliação rápida do vigor das sementes (CARVALHO et al.,2013a).

Objetivou-se nessa pesquisa, estudar ajustes na metodologia do teste de tetrazólio para sementes de arroz recomendada pelas RAS com o intuito de facilitar a execução do teste, reduzir o tempo de obtenção de resultados e determinar o vigor de sementes de arroz. Para tanto, a pesquisa foi dividida em três etapas: a primeira etapa foi realizada comparação da metodologia recomendada pelas Regras para Análise de Sementes (RAS) com metodologia alternativa que prevê remoção a pálea e lema (descascamento) previamente ao pré-condicionamento, a fim de melhorar a hidratação das e facilitar o corte das sementes e estudar a necessidade e a posição do melhor corte para a avaliação; na segunda etapa foram testadas diferentes concentrações do sal de tetrazólio, períodos de coloração e períodos de hidratação e na terceira etapa foram determinadas classes de viabilidade para estimar o vigor de sementes de arroz.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi estudar opções de preparo das sementes, período de hidratação e de coloração, e concentração do sal de tetrazólio para coloração visando reduzir o tempo de avaliação da viabilidade e obter classes de viabilidade, para estimar vigor de sementes de arroz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção e consumo de arroz

O arroz é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas, o que representa praticamente 50% da população mundial. É, juntamente com o milho e o trigo um dos cereais mais cultivado no mundo, ocupando área aproximada de 158 milhões de hectares, produzindo 746,7 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado (FAO, 2013; SOSBAI, 2014).

O consumo médio mundial de arroz é de 60 Kg. pessoa⁻¹ ano⁻¹, sendo que os países asiáticos, onde são produzidos 90% desse cereal, apresentam as médias mais elevadas, situadas entre 100 e 150 kg pessoa⁻¹ ano⁻¹, frente a um consumo médio anual é 45,3 Kg. pessoa⁻¹ ano⁻¹ no Brasil. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia (EMBRAPA, 2015).

O Brasil se destaca como maior produtor do continente americano, o sexto maior produtor do mundo (SOSBAI,2014), sendo que a área cultivada com a cultura na safra 2014/15 foi de 2,35 milhões de hectares, com produção estimada de 12,15 milhões de toneladas. O Rio Grande do Sul, o maior produtor nacional, foi responsável pela produção de cerca de 8,4 milhões de toneladas, o que representa aproximadamente 67,5% da produção nacional, com uma área cultivada de 1,12 milhões de hectares na safra 2014/15 (CONAB, 2015).

A grande expansão na produção do arroz deve-se, em parte, à crescente necessidade de alimento, acarretando num desafio de alcançar altos padrões de qualidade e de produtividade (MIELEZRSKI et al., 2009). Por outro lado, o uso de semente de boa qualidade é extremamente importante, por ser um insumo básico em qualquer sistema de produção agrícola para alcançar altas produtividades de grãos (NUNES, 2011).

2.2 A semente de arroz: aspectos morfológicos

A semente de arroz (Figura 1) consiste da cariopse e de uma camada protetora, a casca. A casca é composta por duas folhas modificadas, a pálea e a lema, sendo composta por minerais (silício) e celulose, correspondem por cerca de 20% da massa da semente. A pálea e a lema estão ligadas à raquila, tendo duas glumas localizadas abaixo. A cariopse do arroz também está ligada, em sua base, à ráquila, onde, após a maturação, forma-se uma frágil zona de abscisão, sendo nessa região, durante o descascamento do arroz, que ocorre o desprendimento da cariopse (NEDEL et al., 2004). Segundo Nedel et al. (2004), a semente de arroz é na realidade um fruto (cariopse), envolto por duas brácteas: a pálea e a lema. A lema é a bráctea maior e representa cerca de dois terços da superfície total da estrutura chamada semente.

A cariopse é formada pelo pericarpo, tegumento, camada de aleurona, endosperma e embrião. O embrião ou gérmen está localizado no lado ventral na base da caripse, é rico em proteínas e lipídios, e representa 2-3% das sementes, apresentando um comprimento variando de 1,8 a 2,1 mm e peso aproximado de 0,4 mg. O endosperma forma a maior parte da semente (89-94%), é fundamentalmente o tecido de reserva da semente e consiste de células ricas em grânulos de amido, consideradas células mortas, e com alguns corpos proteicos (JULIANO e BECHTEL, 1985; NEDEL et al., 2004; BRASIL, 2009).

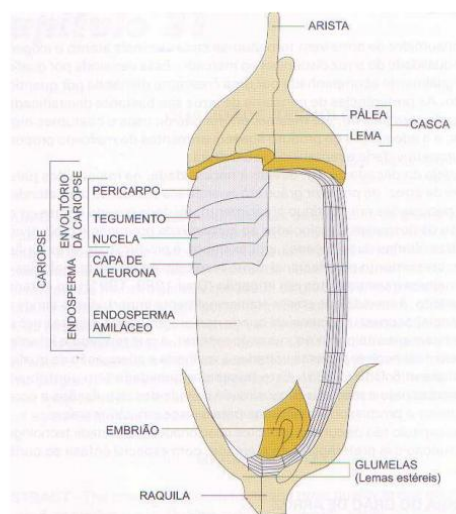


Figura 1- Corte longitudinal de uma semente de arroz, representação das estruturas
Fonte: Vieira e Rabelo (2006)

De acordo com Piña-Rodrigues e Valentini (1995), o conhecimento da estrutura e morfologia das sementes são essenciais para avaliação da viabilidade de sementes a partir do teste de tetrazólio, pois permite padronizar condições de preparo e coloração das sementes, como avaliar a extensão dos danos indicados pela localização das manchas sem coloração ou intensamente coloridas, a partir de observações das partes vitais, eixo embrionário (radícula, hipocótilo, epicótilo e plúmula) e tecido de reserva, conforme a espécie em estudo.

Aspectos morfológicos ou características físicas podem estar relacionados à qualidade fisiológica das sementes (CICERO, 2010).

2.3 Qualidade de sementes

A utilização de sementes de alta qualidade é um fator imprescindível para o estabelecimento adequado da população de plantas no campo, seu pleno desenvolvimento e produção, sendo um insumo básico em qualquer sistema de produção agrícola (DELOUCHE, 2005). A qualidade das sementes está alicerçada nos seguintes atributos: genéticos (que envolve além da pureza varietal, outros aspectos como influência do ambiente como potencial de produtividade, resistência a pragas e moléstias, precocidade, qualidade do grão e resistência a condições adversas de solo e clima, entre outros); físicos (pureza física, umidade, danos mecânicos, massa de 1000 sementes, aparência e peso volumétrico); fisiológicos (expresso principalmente pelo vigor e germinação, além de dormência em algumas espécies) e sanitários (além da infecção e infestações das sementes por organismos patogênicos que podem afetar a germinação e vigor, a semente infectada pode se tornar o principal veículo de introdução de patógenos em algumas áreas). Assim, a qualidade das sementes é influenciada pelos quatro atributos juntos, sendo afetada negativamente se um dos atributos não for atendido (MARCOS FILHO, 2015; PESKE et al., 2012). No entanto, a germinação e a pureza física são critérios de qualidade aceitos e determinados por análises de rotina em laboratórios para análise de sementes. Estes parâmetros são de grande importância para se avaliar a qualidade das sementes no mercado, todavia, nem sempre são eficientes. Os lotes de sementes aprovados pelas análises deveriam, além de apresentar elevada qualidade, manifestar alta capacidade de emergência em campo, o que, entretanto, pode não ocorrer (FRANCO et al., 2011).

O teste de germinação, utilizado para comercialização de sementes, tem sido empregado para medir a viabilidade e prever a emergência em campo, o que, via de regra, só ocorre quando a semeadura é realizada sob condições ideais. Tais condições raramente ocorrem e esse parâmetro de avaliação da viabilidade superestima a emergência das plântulas, em percentagem variável. Isto se deve ao fato de que o vigor das sementes integra fatores que vão além da simples viabilidade (FRANCO et al., 2011). Juntamente com a germinação, o fator que determina um rápido e uniforme estabelecimento da população de plântulas no campo é o vigor, sendo considerado o atributo de qualidade que melhor expressa o desempenho da semente. O teste de vigor tem por objetivo distinguir os níveis de qualidade fisiológica das sementes, que não são possíveis de detectar pelos testes de germinação (KRZYŻANOWSKY e FRANÇA NETO, 1999).

Para sementes de arroz, o teste de frio em rolo de papel com solo, teste de primeira contagem de germinação e envelhecimento acelerado, nesta ordem de importância são os testes de vigor mais comumente utilizados, para a verificação da qualidade fisiológica (FRANCO e PETRINI, 2002; MENEZES et al, 2009). O teste de tetrazólio, apesar de ser utilizado na cultura não tem a mesma importância que o observado na cultura da soja.

2.4 - Teste topográfico de tetrazólio (TZ)

Segundo a definição apresentada por ISTA (2003) e BRASIL (2009), o teste topográfico de tetrazólio é um método rápido que estima a viabilidade e vigor das sementes, baseando-se principalmente na distribuição dos tecidos vivos e mortos do embrião, na presença da solução de tetrazólio, possibilitando a determinação da viabilidade em um período inferior a 24 horas. Além disso, por proporcionar o exame detalhado das estruturas essenciais da semente, tem contribuído para identificar fatores que são responsáveis pela redução da qualidade fisiológica, perfazendo um nítido mapeamento topográfico do embrião (DELOUCHE, 1976; FRANÇA NETO et al., 1998; FRANÇA NETO, 1999).

Conforme Tunes et al. (2009), o teste de tetrazólio é importante no controle de qualidade de sementes, uma vez que permite estimativa rápida da capacidade de germinação das sementes, incluindo as dormentes.

Programas internos de controle de qualidade desenvolvidos pelas entidades produtoras de sementes têm privilegiado o uso de testes que apresentem rapidez na obtenção dos resultados. Entre estes testes pode-se destacar o de tetrazólio, pois, além de avaliar viabilidade e vigor, permite, em algumas espécies, como a soja por exemplo, a identificação dos fatores que influenciam a qualidade das sementes, como danos mecânicos, ocasionados por secagem, insetos e deterioração por umidade (FRANÇA NETO, 1999). Os dados obtidos através desse teste podem ser utilizados no estabelecimento de bases para a comercialização, semeadura, determinação do ponto de colheita e controle de qualidade durante o beneficiamento e armazenamento (MARCOS FILHO et al., 1987).

2.4.1 Histórico do teste

Um dos objetivos da tecnologia de semente é a determinação da qualidade fisiológica das sementes através de testes rápidos, principalmente a partir do final do século XIX, quando o sistema de produção de semente começou a ser organizado em diversos países da Europa (CARVALHO et al., 2013a).

Testes baseados na coloração, aspecto, peso volumétrico e velocidade de embebição das sementes foram inicialmente utilizados, visando a rápida avaliação da viabilidade das mesmas, porém sem nenhuma precisão (FRANÇA NETO et al., 1998).

As primeiras tentativas que apresentaram sucesso na avaliação da viabilidade das sementes com bio-corantes foram realizadas com a redução de sais de telúrio e de selênio nas células das sementes nos tecidos vivos. O método do selênio foi aperfeiçoado por Georg Lakon, chegando ao desenvolvimento do método topográfico para a determinação da viabilidade de sementes, mas ao tomar conhecimento dos efeitos tóxicos do selênio aos analistas de sementes, procurou por um sal similar, porém não tóxico, para ser utilizado com a mesma finalidade. Após realizar trabalhos com sais de tetrazólio, Lakon concluiu que o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio era o mais apropriado para o teste topográfico (FRANÇA NETO et al, 2015).

A utilização do teste foi aceita oficialmente pela AOSA (Association of Official Seed Analysts), após da publicação do Manual do Teste de Tetrazólio em 1970. Em

1983, esta mesma associação, publicou o Manual de Testes de Vigor (AOSA, 1983), que abordava a metodologia do teste para soja, algodão, milho e trigo.

No Brasil, o teste foi introduzido por diversos profissionais da área de sementes que receberam treinamentos na Universidade Estadual do Mississippi. Dois manuais sobre o teste: "O Teste de Tetrazólio para Viabilidade da Semente" (Delouche et al., 1976) e "Manual do Teste de Tetrazólio em Sementes" (Grabe, 1976) foram traduzidos pelo Prof. Flávio Rocha, da Universidade Federal de Pelotas (FRANÇA NETO et al., 1998).

Contribuições importantes foram dadas pela AOSA mediante a edição do seu Manual do Teste de Tetrazólio, que tem edição atualizada até os dias atuais, contempla mais de 650 espécies. A ISTA publicou em 2003 dois volumes da "ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing" (Fichas de Trabalho do Teste de Tetrazólio da ISTA): Vol. 1 para sementes de espécies agrícolas e olerícolas, e o Vol. 2 para sementes de espécies florestais e arbustivas.

O teste foi aprimorado para a soja pelos pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, da Embrapa, que publicaram, em 1981, o primeiro manual específico para a soja (França Neto, 1981), que foi a base para os manuais seguintes, "Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Soja" (FRANÇA NETO et al., 1985 e 1998).

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) contribuiu significativamente para disseminação e aperfeiçoamento das noções básicas e conceitos de que o teste de tetrazólio é um método confiável para a determinação do vigor de sementes de diversas espécies, publicado pela AOSA em 1983 (FRANÇA NETO et al., 2015).

Assim como ocorreu para a soja, a metodologia do teste de tetrazólio para a determinação do vigor foi também aperfeiçoada para outras culturas, como feijão, milho, algodão e amendoim, foram publicados em 1999 pela ABRATES (Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes). Segundo França Neto et al (2015), recentemente, a metodologia do teste de tetrazólio para determinação do vigor em sementes de soja foi validada pelo comitê de vigor da ISTA, onde foi proposta a inclusão da mesma nas regras internacionais para análise de sementes desta instituição.

2.4.2 Princípio do teste

O teste baseia-se na atividade de enzimas desidrogenase que catalisam reações respiratórias nas mitocôndrias, correlacionando-se a viabilidade das sementes com modificações na cor dos tecidos vivos (Figura 2). Quando a semente é imersa na solução incolor de 2,3,5-trifenil-tetrazólio, ocorre nas células vivas a reação de redução que resulta na formação de um composto vermelho, estável e não difusível, conhecido por trifenilformazan (FRANÇA-NETO, 1999; CARVALHO et al., 2013a).

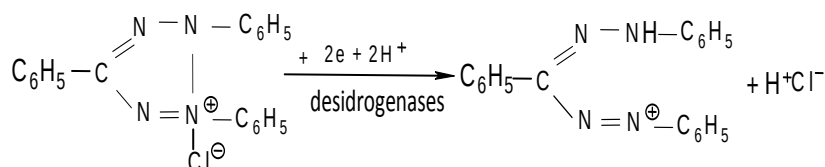


Figura 2- Reação química de redução do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a Trifenil formazan

A formação do trifenilformazan indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias e permite delimitar tecidos vivos a partir desses tecidos que permanecem não coradas ou apresentam coloração anormal (ELIAS et al, 2012, MARCOS FILHO, 2015).

2.4.3 Hidratação da semente: pré-condicionamento

Para que os resultados do teste sejam satisfatórios, é necessário que a solução de tetrazólio seja adequadamente absorvida pelas sementes. Em geral, as sementes devem ser pré-embebidas em água antes de serem submetidas à imersão na solução de tetrazólio, com o objetivo de ativar o metabolismo enzimático, uma etapa conhecida como pré-condicionamento (NOVEMBRE et al., 2006).

A hidratação da semente promove seu amolecimento, facilitando o preparo e a penetração da solução de tetrazólio, além de ativar o sistema enzimático, que resulta numa coloração mais nítida dos tecidos viáveis. Sementes pré-umedecidas são geralmente menos susceptíveis a danos, durante o seu preparo para o teste, do que sementes secas, e podem ser cortadas ou perfuradas mais facilmente para

expor o embrião à ação do tetrazólio. A coloração das sementes pré-umedecidas é mais uniforme, facilitando a avaliação (MOORE, 1977; CARVALHO et al., 2013).

De acordo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), a absorção de água pode ser lenta ou rápida. A absorção lenta é indicada para sementes com tendência ao rompimento se imersas diretamente em água e sementes velhas e secas, a fim de evitar trincas nas sementes ou a lixiviação de substâncias solúveis. Para tanto, a semente deve ser hidratada sobre ou entre folhas de papel, previamente umedecidas. E absorção rápida, onde as sementes são imersas diretamente na água até a sua hidratação completa. Se o período de imersão for superior a 24 horas a água deve ser trocada.

A temperatura utilizada para o pré-condicionamento é outro fator importante, que pode ter efeito significativo na duração do teste. Reduções significativos no tempo de execução do teste podem ser obtidas com o aumento da temperatura durante a etapa de pré-condicionamento, uma vez que temperaturas elevadas aumentam a velocidade de embebição de água pela semente (COSTA et al., 1998).

A hidratação das sementes de soja entre papel pode ter o período de tempo reduzido para seis horas a 41 °C (COSTA et al., 2007). Para sementes de braquiária, Novembre et al. (2006) indicaram seis horas a 30 °C, com redução de dez horas para a hidratação destas sementes e Santos et al. (2007), para as sementes de tomate, três horas a 45 °C, com redução de 15 h em relação às indicações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

A quantidade de água absorvida pelas sementes, para a hidratação dos tecidos, pode ser utilizada como um parâmetro de referência para a padronização das condições de execução do teste de tetrazólio. Costa e Marcos Filho (1994) consideraram adequado 27% de teor de água para as sementes de soja, Novembre et al. (2006), 25% para as de braquiária e Santos et al. (2007), 44% para as de tomate. Outras pesquisas indicaram a redução do tempo para a realização do teste de tetrazólio, sem especificar o teor de água das sementes (ANDRADE et al., 1996; DIAS et al., 2001).

2.4.4 Identificação das estruturas essenciais

O teste de tetrazólio baseia-se principalmente na distribuição dos tecidos vivos e mortos entre os vários órgãos do embrião. Por isso, para uma maior

confiabilidade nos resultados, o analista necessita ter conhecimento das estruturas essenciais das sementes e estar familiarizado com as áreas críticas do embrião. Se a importância e a função de cada órgão não forem conhecidas, as reações coloridas não terão sentido (FRANÇA NETO et al., 1998; ELIAS et al., 2012).

A Figura 3 apresenta uma semente de arroz cortada longitudinalmente, com destaque para o embrião, formado pelo eixo central (coleóptilo, plúmula, raízes seminais, radícula, coleorriza) e pelo escutelo.

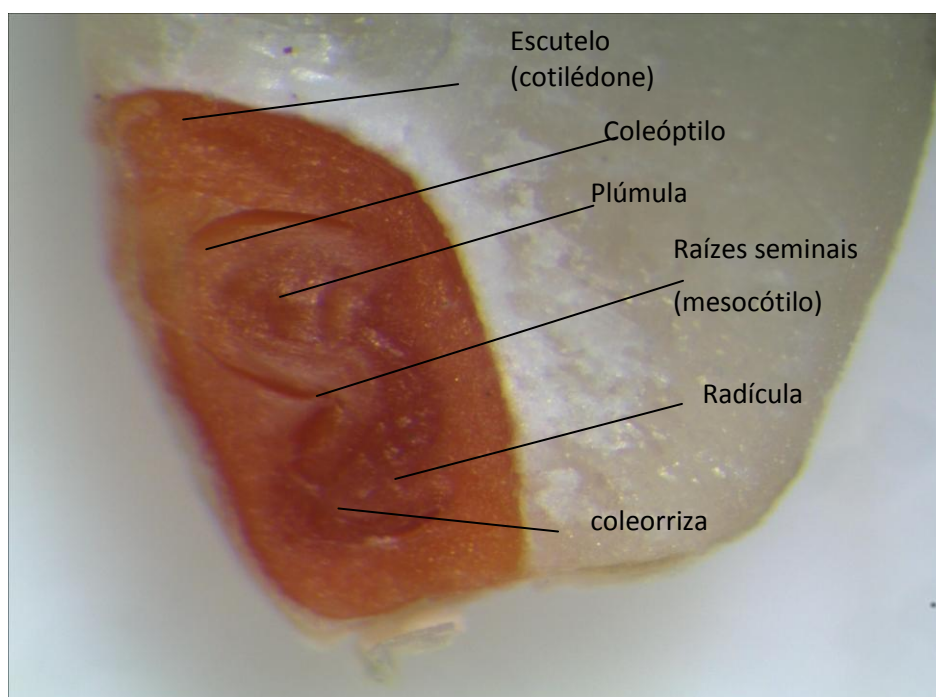


Figura 3- Corte longitudinal de semente de arroz, destacando o embrião

Para a interpretação da coloração do embrião, o analista deve ser capaz de visualizar o tipo de plântula que se desenvolveria a partir da estrutura do embrião a ser examinado (ELIAS et al., 2012).

2.4.5 Avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio

A identificação das sementes viáveis e não viáveis é diferente de espécie para espécie. Tecidos viáveis com boa viabilidade colorem de forma contínua e uniforme, começando pela superfície exposta e prosseguindo gradualmente para o interior da semente. Tecidos viáveis também tendem a ser firmes e resistentes (ISTA, 2003; BRASIL, 2009;).

Tecidos mortos, geralmente, não colorem, são moles e flácidos e apresentam coloração branco leitoso. A coloração dos tecidos viáveis varia de espécie para espécie, pois colorem em velocidades características para cada espécie em uma dada temperatura e concentração da solução de tetrazólio (FRANÇA NETO et al., 1998).

Embora haja similaridade entre as diferentes famílias, gênero e espécies, cada tipo de semente tem suas próprias características que influenciam a interpretação da coloração padrão, por isso, é extremamente importante a interpretação da coloração nas áreas críticas do embrião. Outro ponto importante é conhecer bem as diferenças a intensidade de coloração, uma vez que podem indicar tempo insuficiente de contato com o tetrazólio ou concentração inadequada (ELIAS et al, 2012).

Para otimização do teste, se faz necessária a exposição dos tecidos a solução de tetrazólio, a metodologia mais utilizada nos laboratórios de análise de sementes é o corte longitudinal na secção transversal através do meio do embrião. A avaliação é, então, realizada sobre as duas metades da semente, a fim de melhorar a interpretação do teste, uma vez que as sementes são pequenas, assim prejudicando a secção transversal exatamente no meio do eixo embrião (GRZYBOWSKY et al., 2012).

2.4.6 Aplicações do teste

O teste de tetrazólio pode ser aplicado em todas as etapas da produção de sementes. É muito utilizado na pré-colheita, quando se faz uma amostragem de um determinado campo de produção e através deste permitindo a viabilidade do lote antes da colheita (FRANÇA-NETO et al., 1998).

Em campo, as sementes estão sujeitas a danos por fatores ambientais, tais como temperaturas baixas, ataques de insetos e umidade alta, independentemente disto, a viabilidade pode ser determinada pelo teste de tetrazólio, decidindo-se se a lavoura ainda possui valor como semente ou se deverá ser colhida para outros fins. Em um programa de produção de sementes, é interessante que se avalie a qualidade antes da colheita, permitindo que lavouras, que apresentam sementes com possíveis problemas de potencial fisiológico sejam descartadas em tempo hábil para se evitar maiores prejuízos (AMARAL, 1999).

No processo de produção de sementes, estas são submetidas a uma série de etapas, para a obtenção de lotes de alta qualidade. Os impactos e os danos ocasionados em sementes são praticamente inevitáveis, pois podem ocorrer em várias etapas mecanizadas e ser agravados a cada dia, haja vista a demanda crescente por mecanização do setor agrícola, o que mantém o dano mecânico como um dos problemas mais sérios na área de tecnologia de sementes (PINTO et al., 2012). Além de danos mecânicos outros problemas podem ser facilmente observados no teste de tetrazólio, como por exemplo, imaturidade ou deformações do embrião (BRASIL, 2009).

Sementes de algumas espécies, tais como certas Poaceas e espécies nativas apresentam alta dormência, o que resulta em uma baixa estimativa de germinação mesmo após um longo período de armazenamento. O teste de tetrazólio é capaz de estimar a viabilidade das sementes dormentes e não dormentes, podendo assim determinar a viabilidade real do lote de sementes. O teste pode também verificar se as sementes remanescentes após o teste de germinação estão mortas ou apenas dormentes (CARVALHO et al., 2013a).

2.4.7 Avaliação do vigor de sementes pelo teste de tetrazólio

Para algumas espécies, o teste de tetrazólio pode ser utilizado para estimar o nível de vigor das sementes, com a utilização de critérios de interpretação apropriados o teste de tetrazólio também pode ser usado para fornecer uma avaliação rápida do vigor.

O conhecimento do vigor envolve as características da semente que determinam sua capacidade para a emergência e o crescimento rápido e uniforme de plântulas normais, sob amplas condições de ambiente (AOSA, 2010). Nesse sentido, os testes que avaliam o vigor têm ganhado destaque nos programas internos de controle de qualidade das sementes, como na cultura do milho (DIAS e BARROS, 1999) e da soja (FRANÇA NETO et al., 1999).

A avaliação do vigor é feita com base no desenvolvimento de coloração, local e extensão dos danos, e com o auxílio de lupa, preferencialmente aquelas que propiciam maior aumento para que seja criteriosamente examinadas e separadas em classes. Dentro da categoria das viáveis identificam-se os diferentes níveis de vigor.

Para a soja, feijão e algodão, por sugestão do França Neto et al. (1999); Bhering et al. (1999) e Vieira e Von Pinho (1999), as semente após o período de coloração são separadas em oito classes, onde 1 e 2 são classificadas como de vigor muito alto, a classe três é formada por sementes de vigor médio, as classes quatro e cinco correspondem às sementes viáveis com vigor baixo e muito baixo, respectivamente. As classes 6 a 8 correspondem às sementes não viáveis. A soma das percentagens incluídos nas classes 1 a 3 expressam o vigor das sementes.

Outras espécies como amendoim (BITTENCOURT et al, 1999.), e milho (Dias e Barros,1999), por sugestão dos referidos autores, as semente são classificadas em três classes: a classe 1 corresponde as sementes vigorosas, a classe 2 é formada por sementes viáveis com baixo vigor e a classe 3, as sementes não viáveis.

Vários trabalhos tem sido publicados para determinação de níveis de vigor, como por exemplo, Fogaça et al.(2011), separaram em 4 classes sementes de sorgo. Sementes de melancia e abobrinha foram classificadas por Bhering et al., 2005 e Barros et al. (2005), em 5 classes e Gagliardi e Marcos Filho (2011), classificaram sementes de pimentão em 3 classes.

Nos últimos anos, a metodologia do teste de tetrazólio para determinação do vigor tem sido aprimorada, tornando o teste muito mais atrativo. No Brasil, a maioria dos laboratórios de análise de sementes que trabalham com soja, adotam o teste de tetrazólio como análise de rotina (FRANÇA NETO et al., 2015).

2.4.8 Metodologias alternativas para o teste do tetrazólio

As técnicas gerais para o uso do teste de tetrazólio para grande número de espécies já estão definidas nas Regras e Manuais para Análise de Sementes (ISTA, 2003, Brasil, 2009; AOSA, 2010). A eficiência do teste em avaliar a viabilidade das sementes depende do desenvolvimento de método adaptado para cada espécie de modo a definir as condições apropriadas para o preparo, a hidratação (pré-condicionamento), a coloração (concentração, tempo e temperatura de exposição) e a avaliação das sementes (ZORZAL et al., 2015). Nesse contexto pesquisas vem aprimorando técnicas de preparo e coloração das sementes.

Algumas sementes apresentam o tegumento duro e/ou impermeável, o que dificulta a penetração da solução do tetrazólio, sendo necessária sua retirada, como

observado por Barros et al., (2005) e Bhering et al.,(2005) em sementes de abobrinha e melancia, respectivamente. Esses autores verificaram que, para avaliar a viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio, deve-se remover o tegumento e a membrana interna, previamente à imersão em solução de tetrazólio. Em sementes de girassol, o procedimento mais adequado para o teste de tetrazólio segundo SILVA et al.(2013), foi a remoção do pericarpo e do tegumento aderidos ao embrião, previamente ao corte longitudinal entre os cotilédones e a coloração das sementes. De maneira similar, para avaliação da viabilidade de sementes de café pelo teste de TZ, Zonta et al. (2009) observaram que foi necessária extração do embrião antes da exposição à solução de tetrazólio.

Várias pesquisas foram desenvolvidas, buscando redução no tempo do pré-condicionamento de diversas espécies, tais como para soja (COSTA et al., 2007), milho (CHAMMA e NOVEMBRE, 2007), braquiária (NOVEMBRE et al., 2006) e cevada (GRZYBOWSKI et al (2012).

Outras pesquisas visaram a redução da concentração e tempo de coloração das sementes como em aveia preta (SOUSA et al., 2009), leucena (Costa e SANTOS, 2010), algodão (CERVI e MENDONÇA, 2009), sorgo (FOGAÇA et al., 2011), girassol (SILVA et al., 2013) e trigo (CARVALHO et al., 2013b).

O emprego de metodologia alternativa do teste de tetrazólio, em programas de controle de qualidade, principalmente, quando este for mais rápido que o recomendado pelas RAS, torna-se uma ferramenta importante para tomada de decisão quanto à avaliação do potencial fisiológico de um lote de semente, pois permite acelerar o processo para obtenção dos resultados.

No entanto, para sementes de arroz, ainda não há, na literatura, sugestões ou acréscimos ao proposto pelas RAS (BRASIL, 2009) ou ISTA (2003).

3 CAPÍTULO I – PREPARO DA SEMENTE DE ARROZ PARA EXECUÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO

3.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, especialmente na Ásia, onde se concentra 90% da produção e consumo mundial, Aproximadamente 158 milhões de hectares são semeados anualmente, com uma produção de cerca de 700 milhões de toneladas, sendo que, mais da metade dessa produção provinentes de lavouras com irrigação, as quais ocupam apenas 25% da área cultivada (FAO, 2013). O Brasil está entre os dez principais produtores de arroz, sendo o maior produtor fora da Ásia, colhendo na safra 2014/2015, 8.440,5 mil toneladas (SOSBAI, 2014; CONAB, 2015). O cultivo concentra-se principalmente na região Sul do Brasil, embora, também, seja cultivado em outras regiões com destaque para os estados de Tocantins, Maranhão e Mato Grosso do Sul (GUIMARÃES et al., 2006).

Sabe-se que o sucesso de uma lavoura é dependente da utilização de sementes de qualidade, cuja avaliação é realizada com diversos testes. Dentre os quais, o teste de germinação é o mais utilizado para determinar a viabilidade de sementes, Entretanto, apresenta limitações para algumas espécies, como o longo período para obtenção da porcentagem máxima de germinação, divergência dos resultados obtidos em laboratório e em campo, e a impossibilidade de avaliação de sementes dormentes (BRASIL, 2009; MARCOS FILHO, 2015).

Para o teste de germinação de sementes de arroz, é necessário um período de até 14 dias para obtenção dos resultados, porém, é necessário salientar que, como as sementes recém-colhidas normalmente apresentam dormência, este período pode se estender por 18 dias ou mais, em razão da necessidade de se utilizar tratamentos específicos para promoção da germinação (MENEZES et al., 2009; BRASIL, 2009), período considerado longo, para atender demandas do controle de qualidade das empresas produtoras de sementes. Segundo França Neto et al. (2015), a vantagem significativa do teste de tetrazólio é a possibilidade de aplicá-lo na pré-colheita a fim de direcionar o campo de produção de determinada espécie.

Dentro deste contexto, pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de desenvolver e calibrar testes capazes de avaliar de maneira rápida e eficiente a qualidade de um lote de sementes. Os testes que fornecem resultados de análise de sementes em período de tempo curto são fundamentais para agilizar as decisões nas diferentes etapas da produção de sementes. Dentre os testes de viabilidade de sementes considerados rápidos, o mais utilizado é o de tetrazólio, definido como um teste bioquímico, baseado na atividade das enzimas desidrogenases que catalisam as reações respiratórias, presentes nas mitocôndrias, localizadas no interior das células vegetais. Na respiração celular, há liberação de íons hidrogênio, que reagem com o sal de tetrazólio (incolor e difusível), formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada formazan, delimitando os tecidos vivos da semente e fornecendo resultados, de modo geral, em menos de 24 horas (FRANÇA-NETO, 1999; ISTA, 2003; MARCOS FILHO, 2005; BRASIL, 2009),

O procedimento metodológico para a condução do teste permite que uma série de ajustes sejam realizados, a fim adequá-lo para uma determinada espécie. O que difere uma metodologia da outra normalmente são o período e forma de hidratação das sementes, tempo de imersão das mesmas e concentração da solução de tetrazólio, retirada ou não do tegumento e/ou pericarpo e ainda podem ser definidas necessidade ou não de corte das sementes e extração do embrião (BRASIL, 2009). A eficácia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica das sementes depende de adequação da metodologia para cada espécie (PINTO et al., 2009).

Conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes- RAS (BRASIL, 2009), existem três procedimentos indicados para o pré-umedecimento e preparo de sementes de arroz para o teste de tetrazólio: embebição entre papel por 16-18 horas a 25-30 °C; embebição entre papel por 18 horas a 25 °C ou imersão diretamente em água por 18 horas a 20 °C, com posterior corte longitudinal através da metade do embrião e 3/4 do endosperma. Posteriormente, as sementes devem ser imersas em solução de tetrazólio com concentrações entre 0,1 e 1,0% por 2 a 4 horas a 30 ou 35 °C, não sendo recomendada a remoção da pálea e lema em sementes de arroz antes da embebição. Observa-se que a presença dessas estruturas poderá prejudicar a realização do corte, pois dificulta a embebição das mesmas, deixando-as com maior resistência ao corte, o que poderá acarretar erros na interpretação dos resultados.

Considerando o exposto, verifica-se que a metodologia para a condução do teste de tetrazólio em sementes de arroz ainda pode ser aprimorada. Em razão da importância da cultura, do longo período requerido para a condução do teste de germinação, da presença de dormência em sementes recém-colhidas, verifica-se a importância do teste de tetrazólio para a espécie. O presente trabalho teve como objetivo testar ajustes dos procedimentos de preparo das sementes de arroz para condução do teste de tetrazólio, avaliando a viabilidade de remoção da pálea e lema e definindo a necessidade de realização do corte da semente, além da localização mais eficiente deste.

3.2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas.

Utilizaram-se sementes de quatro cultivares de arroz irrigado e duas de sequeiro. Puitá Inta CL e BR IRGA 424 com cultivo predominante no Rio Grande do Sul (irrigado), SCS 116 Satoru e SCS 117 CL muito utilizadas em Santa Catarina (irrigado), além das cultivares BRS Serra Dourada e BRS Esmeralda cultivada na região do Cerrado (sequeiro), cada uma representada por dois lote. As mesmas foram obtidas de empresas produtoras de sementes localizadas nos municípios de Pedro Osório – RS, Tubarão – SC e Goiânia - GO.

As sementes foram inicialmente caracterizadas quanto ao teor de água, germinação e emergência de plântulas, como descrito a seguir:

Teor de água- foi realizada pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 h, com duas repetições de 4 a 5 g por lote, de acordo com as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes após a pesagem, foram acondicionadas em cápsulas de alumínio, colocadas em estufa em temperatura regulada para 105 °C, retiradas após 24 horas, deixadas em sílica até esfriar. Após pesadas em balança analítica, com precisão de quatro casas decimais, e teor de água calculado conforme indicado nas RAS. Os resultados foram expressos em porcentagem média de teor de água para cada lote, na base úmida.

Teste de germinação- foi conduzido segundo a RAS (2009), empregando 200 sementes divididas em quatro sub amostras de 50 sementes, dispostas em rolo de papel *germitest* umedecido com água destilada na proporção de 2,0 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram colocados em germinador a 25 °C. A primeira e segunda contagens foram realizadas aos cinco e quatorze dias após instalação do teste, contabilizando a porcentagem de plântulas normais e anormais e sementes mortas.

Emergência de plântulas- foi realizado com 100 sementes de cada lote, para cada unidade experimental, em bandejas plásticas, empregando solo como substrato, e cobertas por uma camada de solo. As caixas plásticas foram mantidas sob temperatura ambiente, em torno de 25 °C, e irrigadas diariamente. A avaliação

foi realizada aos 14 dias após a semeadura, computando-se a percentagem de plântulas emergidas.

O estudo foi dividido em duas etapas, sendo conduzido de forma sequencial, sendo o resultado da etapa I utilizado como base para prosseguir na etapa II.

Etapa 1: Preparo das sementes

O teste foi realizado utilizando-se como referência a metodologia tradicional, indicada pelas RAS (sem remoção da pálea e lema), confrontando com remoção prévia da pálea e lema (descascamento). Para tanto, cerca de 130 sementes de cada lote, para cada unidade experimental, foram colocadas em descascador para arroz, marca Suzuki, modelo MT-88. Nesse processo, a semente de arroz passa uma única vez através de um pequeno espaço existente entre rolos emborrachados com distância aproximada de 0,5 a 1 mm, sofrendo um movimento de fricção que possibilita a separação da casca da semente. O equipamento foi regulado de forma que aproximadamente 90% das sementes fossem descascadas e obtivesse baixa percentagem de quebra. Foram desconsideradas as sementes que apresentaram percentagem de sementes quebradas acima de 20%. Utilizou-se trinta por cento a mais de sementes como uma medida de segurança pela ocorrência de sementes que deixaram de ser descascadas, e aquelas que apresentavam alguma danificação na região do embrião, além da margem de segurança para eventuais erros na preparação (corte).

Para a realização das avaliações foram utilizadas sementes inteiras e quebradas (Figura 4), porém somente as que apresentavam tamanho superior a $\frac{1}{3}$ da semente e que continham o embrião intacto. O teste foi realizado utilizando-se 100 sementes, divididas em duas sub amostras com 50 sementes de cada lote.

As sementes dos doze lotes foram submetidas ao pré-umedecimento mediante imersão em 20 mL de água, utilizando para isso copos plásticos com capacidade de 50 mL, e mantidos à temperatura de 20 °C, durante 18 h (BRASIL, 2009). Decorrido esse período, as sementes foram separadas da água e em seguida foi realizado corte longitudinal no centro do embrião, com auxílio de lâmina de barbear, retirando e descartando $\frac{1}{2}$ da largura da semente. Após, foram submersas em solução 0,1% de cloreto 2, 3, 5 trifenil tetrazólio por duas horas, no escuro e a 35 °C, conforme recomendação das RAS (BRASIL, 2009).

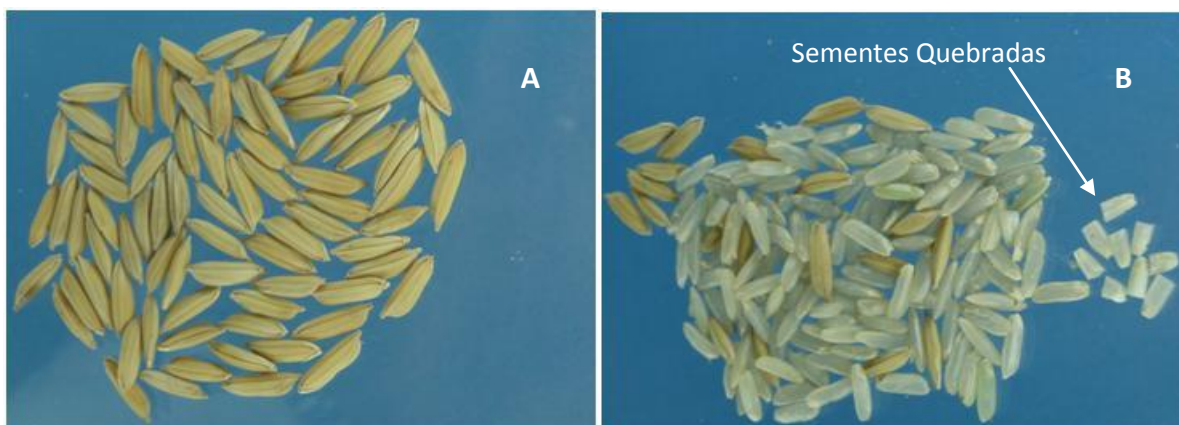


Figura 4: Preparação de sementes de arroz para o teste de tetrazólio. Sementes sem remoção da pálea e lema (A) e sementes após remoção de pálea e lema (B).

Após o período de coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas individualmente, observando-se a coloração do embrião. Foram consideradas viáveis as sementes que apresentaram coloração avermelhada nas partes vitais do embrião (Figura 3). A coloração dos embriões foram analisados com o auxílio de microscópio estereoscópico, marca Opton com aumento de 6x.

As sementes foram classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com a coloração apresentada no eixo embrionário, computando-se a porcentagem de sementes viáveis.

Para fins ilustrativos, as sementes foram fotografadas individualmente, sendo previamente visualizadas em microscópio estereoscópico trinocular, conectado a uma câmera fotográfica digital marca Tucsen, sendo as imagens captadas e transferidas para um computador pelo software Tsviiew.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Visando caracterizar a qualidade das sementes dos lotes utilizados os dados da germinação e emergência de plântulas foram submetidos à análise de variância, sendo os dados previamente transformados em $\arcsen.\sqrt{x/100}$, e posteriormente as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Realizou-se análise de correlação linear entre a germinação e os testes de tetrazólio. Para análise da eficiência dos procedimentos utilizados no teste de tetrazólio, foi utilizada a fórmula $\text{Eficiência TZ}_n = [1 - (|G - \text{TZ}_n|) / G] 100$, levando em consideração o resultado da germinação das sementes. Sendo G=% de plântulas

normais obtidas no teste de germinação; TZ_n = % de sementes viáveis obtidas nos testes de tetrazólio.

Realizou-se análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, para fins de comparação das eficiências entre as metodologias testadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas SASM-Agri (CANTERI et al., 2001) e Winstat (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003).

Etapla 2: Corte das sementes

Após a escolha do melhor procedimento na etapa 1 (Com descascamento), diferentes cortes foram testados. Para cada unidade experimental e cada tipo de corte, foram descascadas cerca de 130 sementes, conforme descrito na etapa 1, posteriormente, as mesmas foram imersas em água destilada por 18 horas a 20 °C. Decorrido esse período, com auxílio de lâmina de barbear, foram realizados os seguintes cortes: **corte longitudinal** através da metade distal do embrião, retirando e descartando 1/2 da largura da semente (Figura 5A); **corte transversal** realizado em área de tecido não essencial, acima do embrião, retirando e descartando a parte sem embrião (Figura 5B); e **semente inteira (sem corte)** descascada (Figura 5C). Após o corte, as sementes foram colocadas para colorir, conforme descrito na etapa I.

Para a avaliação da viabilidade, as sementes foram lavadas em água corrente, avaliadas individualmente, analisando-se e observando suas estruturas e coloração do embrião, utilizando-se para isso 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.

A obtenção das imagens foi realizada mediante pré visualização das sementes em microscópio estereoscópico trinocular, conectado a uma câmera fotográfica digital marca Tucsen, captadas e transferidas para um computador pelo software Tsviiew. Em cada processo, determinou-se o teor de água após o pré-condicionamento das sementes.

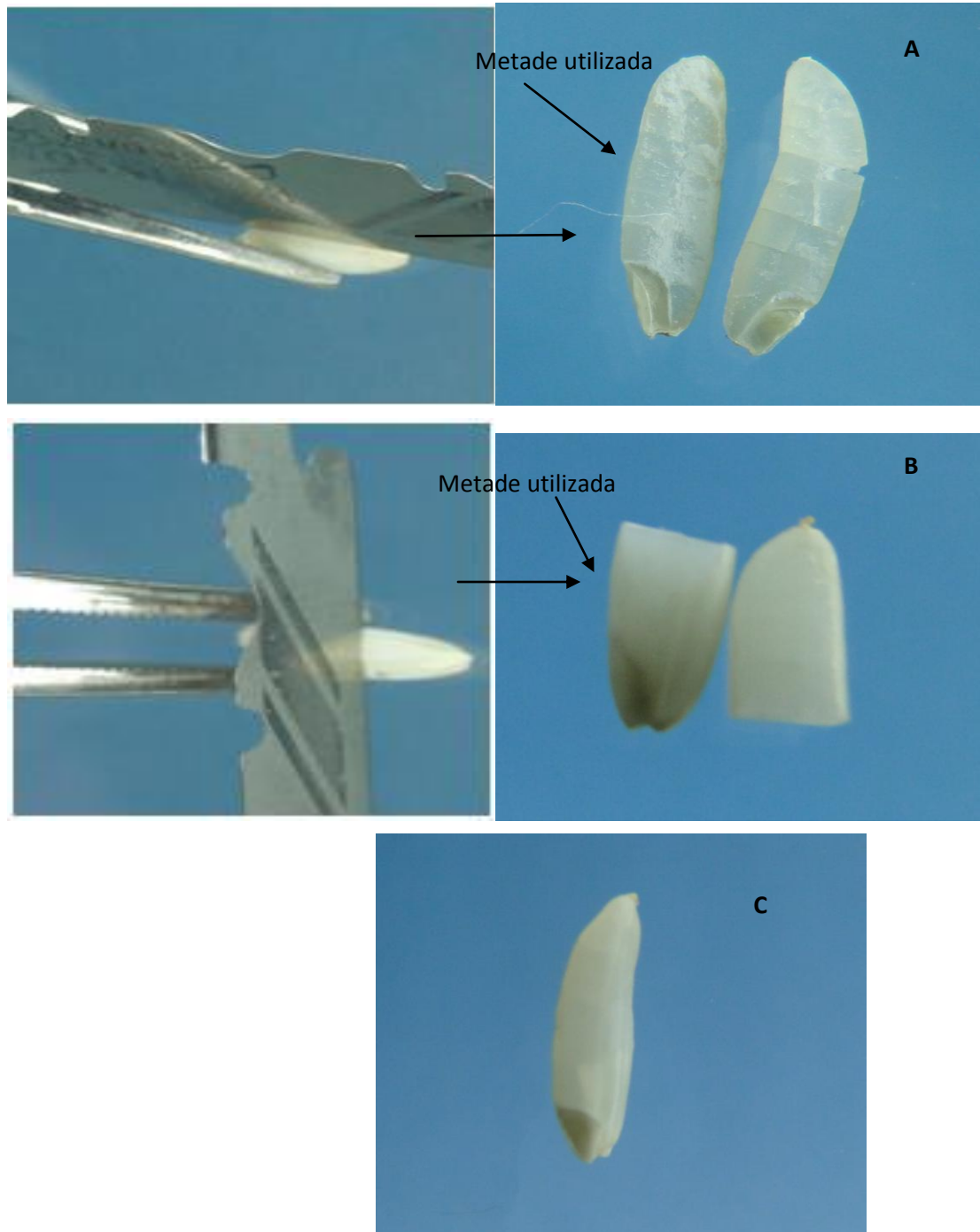


Figura 5: Cortes em sementes de arroz: corte longitudinal (A), corte transversal (B), semente sem corte (C),

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições.

Realizou-se análise de correlação linear entre a germinação e os testes de tetrazólio. Para análise da eficiência dos procedimentos utilizados no teste de tetrazólio, foi utilizado a fórmula **Eficiência** $TZ_n = [1 - (|G - TZ_n|) / G] 100$, levando em consideração o resultado da germinação das sementes. Sendo G=% de plântulas

normais obtidas no teste de germinação e $TZ_n =$ % de sementes viáveis obtidas nos testes de tetrazólio.

Os dados foram submetidos a similar procedimento estatístico descrito na etapa 1.

3.2 Resultados e discussão

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da caracterização inicial dos 12 lotes de sementes de arroz utilizadas no experimento. Os teores de água iniciais variaram de 10,6% a 13,4%, considerados adequados para a conservação das sementes de arroz.

Quanto à germinação, houve variação entre 97 e 78%, constatando-se que apenas o lote 10 estava com poder germinativo abaixo do padrão para comercialização no Brasil, o qual deve ser igual ou superior a 80%, estabelecidos pela Instrução Normativa nº 45 (BRASIL, 2013). Salienta-se, no entanto, que para os fins da pesquisa proposta, foi fundamental contar com lotes com níveis contrastantes de viabilidade, pois os procedimentos para preparo das sementes para o teste de tetrazólio devem ser suficientemente robustos e deve permitir identificar a real qualidade de um lote, independentemente de esta ser alta ou baixa.

Tabela 1 - Dados médios do teor de água de água (TA), emergência de plântulas (EP), plântula normais (PN), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) de 12 lotes de sementes de arroz.

Cultivar	Qualidade	Lote	TA	EP	PN	PA	SM
-----%-----							
BR Irga 424	Alta	1	13,2	87 a	95 b	2	3
	Média	2	11,7	76 b	87 c	10	3
Puitá Inta CL	Alta	3	13,4	86 a	97 a	2	1
	Média	4	11,4	80b	84 c	12	4
BRS	Alta	5	12,2	93 a	94 b	5	1
Esmeralda	Média	6	10,9	79b	89 c	8	3
BRS Serra	Alta	7	12,1	83b	94 b	2	4
Dourada	Média	8	10,6	81b	84 c	12	4
SCS 116	Alta	9	13,2	78b	93 b	4	3
Satoru	Média	10	12,5	72b	78 d	19	3
SCS 117 CL	Alta	11	13,0	87 a	97 a	1	2
	Média	12	11,4	73 b	89 c	8	3
Cv				3,15	7,65		

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Etapa 1: Preparo das Sementes

Quando foram seguidas as recomendações estabelecidas nas RAS (BRASIL, 2009) para o teste de tetrazólio em arroz, o qual estabelece corte longitudinal ao longo do eixo embrionário, sem remoção da pálea e lema, observou-se que a realização do corte é uma atividade difícil e morosa, provocando danos no embrião das sementes, podendo gerar dificuldade de interpretação e consequentemente mascarando os resultados (Figura 6a), por esta razão, quando foi avaliada a viabilidade, a utilização deste procedimento, gerou duvidas, uma vez que as maiorias das sementes apresentaram coloração esbranquiçada, provavelmente em razão do corte e coloração mais fraca. Segundo Vieira e Von Pinho (1999), a falta de coloração pode ser devida a lenta absorção da solução de tetrazólio, o que pode ter ocorrido neste caso.

Já quando a análise foi realizada com a remoção prévia da pálea e lema, observou-se que a execução do corte foi facilitada, pois a semente (cariopse) apresentou menor resistência mecânica ao corte, o que facilitou também a visualização das estruturas do embrião, tornado-as mais nítidas quanto à coloração (Figura 6b). Cervi e Mendonça (2009) relataram que quando foram adotadas as recomendações estabelecidas nas RAS (BRASIL, 2009) para o gênero *Gossypium*, a execução do teste foi morosa, além de ser difícil a remoção do tegumento, provocando inúmeros ferimentos e danos nos cotilédones das sementes, mascarando os resultados. Os autores relataram a dificuldade na diferenciação dos danos causados pela realização do corte, o que pode levar o analista a erros na interpretação. Carvalho et al. (2009) também relataram dificuldades na análise de sementes de amendoim, quando utilizaram a metodologia recomendada pelas RAS, concluindo que o teste de tetrazólio alternativo foi mais eficiente na avaliação da viabilidade das sementes. Por outro lado, Fonseca e Fagioli (2008) ao compararem o método alternativo com o convencional para sementes de soja, concluíram que não ocorreu perda de precisão nos resultados do TZ ao adotarem metodologia alternativa.

As sementes analisadas foram classificadas em viáveis e não viáveis, pela coloração dos tecidos. Na Figura 6 estão ilustradas sementes com casca (sem remoção da pálea e lema), e sementes com remoção prévia da pálea e lema.

Observa-se que as sementes onde não foi realizada a remoção prévia da pálea e lema (Figura 6a) a coloração não ficou nítida, gerando dúvidas na avaliação.

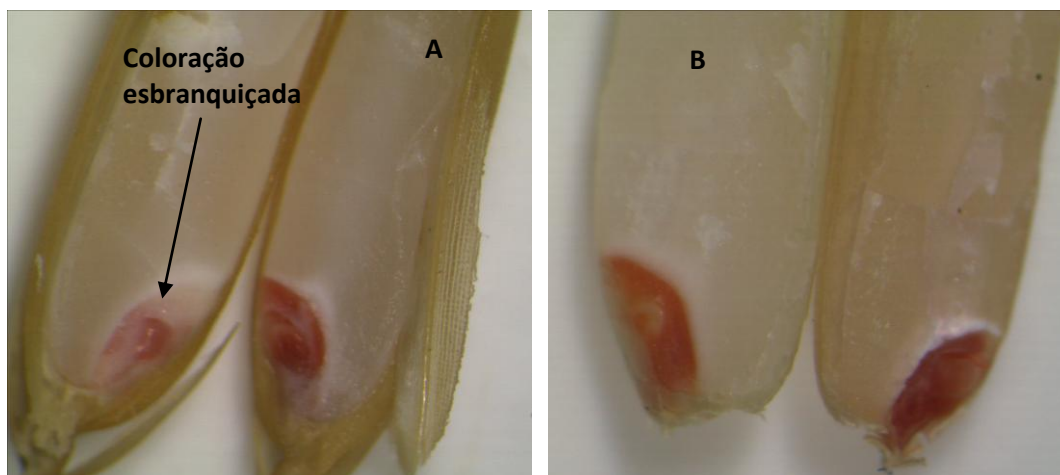


Figura 6- Coloração de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio. Teste sem remoção da pálea e lema (A) e com remoção da pálea e lema (B)

Na Tabela 2, são apresentados os resultados de germinação, viabilidade e eficiência dos processos utilizados no teste de tetrazólio, de 12 lotes de sementes de arroz. Na análise da correlação, observou-se que houve correlação positiva e significativa entre os testes de germinação e tetrazólio nos dois métodos, evidenciando que estas variáveis são associadas entre si.

Quando o TZ foi conduzido utilizando-se sementes sem a remoção da pálea e lema (TZ1), verificou-se que a eficiência foi baixa. Por exemplo, no lote 5, obteve-se um valor de viabilidade de 84% pelo teste de TZ sem a remoção da pálea e lema, ao passo que, no teste de germinação, este valor foi de 94%, o que equivale a dizer que a eficiência foi de apenas 89,4%, sendo este o maior valor observado. Em contrapartida, no lote 2, o resultado do teste de germinação indicou que 87% das sementes originavam plântulas normais, porém, o TZ, novamente realizado com sementes sem remoção de nenhuma estrutura, obteve viabilidade de 53%, representando eficiência de apenas 60%. Considerando a média dos 12 lotes utilizados, a diferença foi de 26 pontos percentuais (pp). Um erro dessa magnitude pode representar a necessidade de aumentar a quantidade de semente por hectare, ou de condenar indevidamente um lote em um processo de controle de qualidade, ou, em outra situação, aprovar de forma inadequada um lote de sementes para comercialização. Possivelmente, neste experimento, estas diferenças acentuadas entre os valores obtidos no teste de germinação e no teste de tetrazólio sem a remoção da pálea e lema (tradicional) devam-se ao fato de que a lema e pálea

dificultam a embebição, confirmado durante a realização do corte, pois a semente oferecia bastante resistência ao mesmo.

Tabela 2 – Germinação (%), viabilidade (%) e eficiência (%) do teste de tetrazólio adotando diferentes metodologias, em sementes de 12 lotes de sementes de arroz

Cultivar	Qualidade	Lotes	G	TZ1	TZ2	E TZ1	ETZ2
BR Irga 424	Alta	1	95	72	92	75,8	96,8
	Média	2	87	53	87	60,4	100,0
Puitá Inta	Alta	3	97	79	94	81,6	97,1
CL	Média	4	84	55	83	65,1	98,4
BRS	Alta	5	94	84	96	89,4	97,9
Esmeralda	Média	6	89	71	93	80,1	95,9
BRS Serra	Alta	7	94	81	96	85,8	97,9
Dourada	Média	8	84	51	87	61,4	95,6
SCS 116	Alta	9	93	73	97	78,2	95,7
Satoru	Média	10	78	49	93	63,5	80,7
SCS 117 CL	Alta	11	97	73	94	75,7	97,1
	Média	12	89	55	93	61,5	95,7
Média			90	66	92	73,2 B	95,7 A
Coeficiente de correlação linear, r (GxTZ1 e TZ2)				0,595*	0,487*		

G- Germinação

TZ1 – Teste de tetrazólio realizado de acordo com o indicado pelas RAS (tradicional), sementes de arroz sem remoção de pálea e lema, cortadas longitudinalmente.

TZ2 – Teste de tetrazólio realizado com utilização de sementes de arroz com remoção prévia da pálea e lema, cortadas longitudinalmente.

ETZ1 - Eficiência do TZ tradicional (sem remoção da pálea e lema).

ETZ2 - Eficiência do TZ com remoção da pálea e lema.

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

* Significativo a 5% pelo teste T

Comparando a média de resultados do teste de germinação com a média do TZ2 dos 12 lotes avaliados, verificou-se diferença de apenas dois pp (pontos percentuais), indicando que há similaridade entre os resultados, comprovando assim que o TZ2 foi eficiente, obtendo-se eficiência de 95,7%, o que torna o processo confiável, estando esta significativamente superior à da metodologia adotada no TZ1 (Tabela 2).

Constatou-se que a eficiência do processo TZ2 para o lote 10 foi de 80,7%, sendo que o resultado do teste de germinação foi de 78%, porém a estimativa da viabilidade do mesmo, realizado com remoção da pálea e lema (TZ2), foi de 93%, constituindo uma diferença de 15 pp. Esse resultado pode ser explicado pelo fato deste lote ter apresentado 19% de plântulas anormais no teste de germinação (Tabela 1), o que provavelmente não foi detectado pelo TZ, pois foram analisadas sementes quebradas, que no TZ coloriram os tecidos do embrião, mas no teste de germinação provavelmente originaram plântulas anormais. Para os demais lotes, a eficiência mínima do teste de tetrazólio com a remoção da pálea e lema foi de 95,6%, sendo que para o lote 2 a eficiência foi de 100%, apresentando resultados equivalentes ao teste de germinação. Segundo França Neto et al. (1998) os resultados dos testes de germinação e de tetrazólio devem ser semelhantes, com pequena margem de diferença entre eles, sendo tolerado 5 pp para soja. Nesse experimento, para a maioria dos lotes, as diferenças entre os resultados dos dois testes, empregando o procedimento da remoção da pálea e lema foi inferior a 5 pp, evidenciando novamente a eficiência do procedimento.

Em sementes de abobrinha (BARROS et al., 2005) e melancia (BHERING et al., 2005) verificou-se que, para avaliar a viabilidade das sementes pelo teste de TZ, deve-se remover o tegumento e a membrana interna previamente à imersão em solução de tetrazólio 0,075%, a 40 °C, por 60 minutos, pois, nessa condição verifica-se desenvolvimento de coloração adequada. Resultados semelhantes foram verificados por Silva et al.(2013) para sementes de girassol, ao concluírem que o procedimento mais adequado para o preparo das sementes para o teste de TZ foi a remoção do pericarpo e do tegumento aderidos ao embrião, previamente ao corte longitudinal entre os cotilédones e a coloração das sementes. De maneira similar, para avaliação da viabilidade de sementes de café pelo teste de TZ, Zonta et al, (2009) observaram que foi necessário extrair o embrião e sua expô-lo à solução de tetrazólio a 0,1%, durante 16 horas, a 35 °C.

Considerando os resultados obtidos nesta etapa, que demonstrou melhor eficiência do processo quando se removeu a pálea e lema, o segundo estudo levou em consideração este procedimento prévio à realização das demais etapas. Apesar das recomendações existentes para sementes de arroz (BRASIL, 2009) indicarem a utilização de sementes sem remoção da pálea e lema, essa metodologia foi ineficiente neste estudo.

Etapa 2: Corte das Sementes

A representação da estrutura interna das sementes de arroz após terem sido submetidos ao teste de tetrazólio empregando diferentes cortes, após coloração, pode ser visualizada na Figura 7, onde estão apresentadas sementes viáveis após cada procedimento de corte.

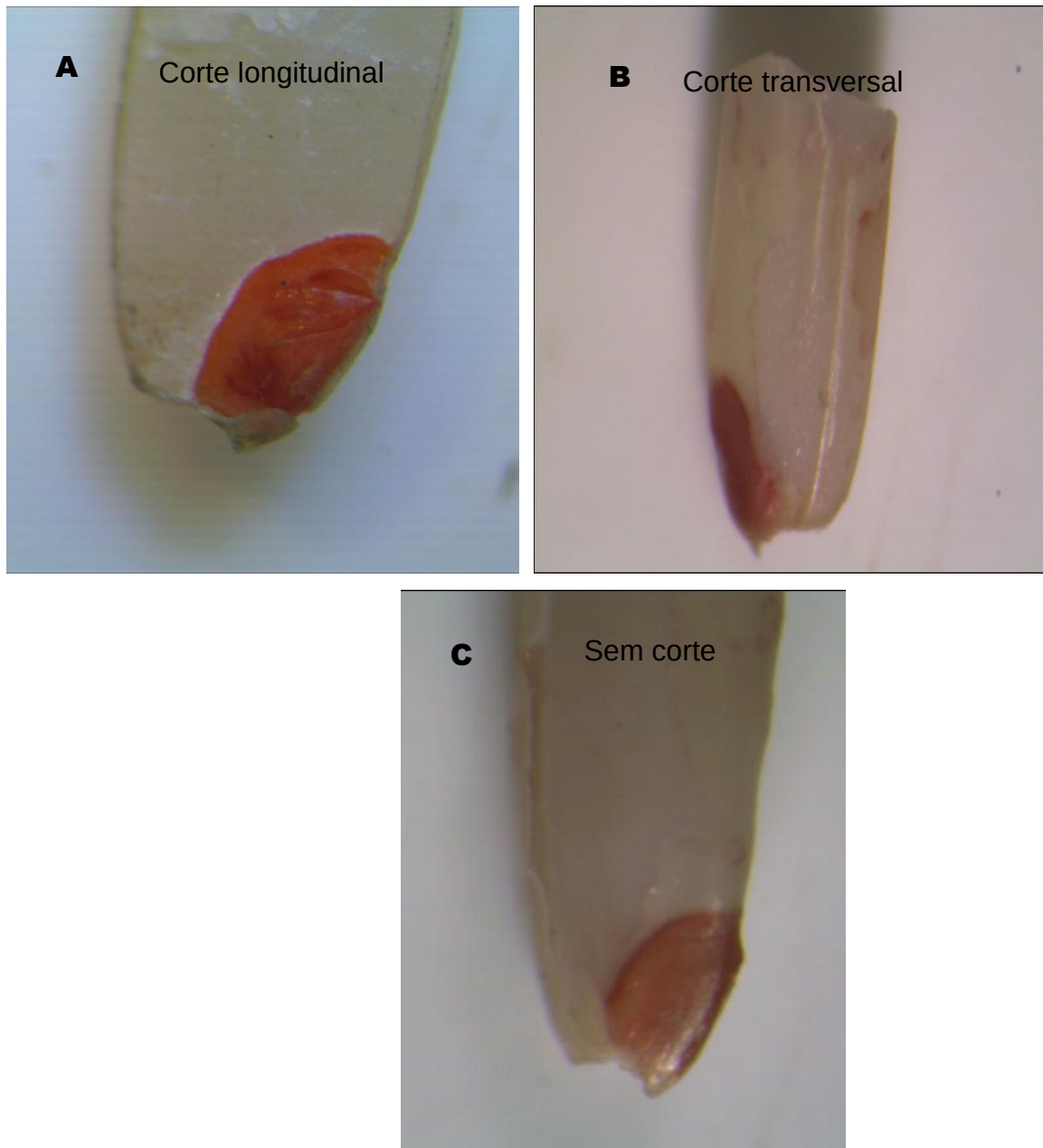


Figura 7 - Viabilidade de sementes de arroz submetidas ao teste de tetrazólio empregando diferentes cortes: corte longitudinal (A), corte transversal (B) e sem corte (C)

Nas sementes de gramíneas, como o arroz, as áreas vitais para avaliação da viabilidade das sementes são: plúmula, coleóptilo, região central do escutelo, radícula e a região das raízes seminais (Figura 3). Dessa forma, para o corte

realizado longitudinalmente na metade distal do embrião, foram consideradas viáveis as sementes que não apresentaram falhas na coloração em regiões vitais do embrião, e não viáveis àquelas cujos tecidos localizados em regiões vitais não apresentaram coloração, quando visualizadas em lupa com seis aumentos.

Nas sementes em que foi realizado corte transversal e sem corte, foi analisado apenas a parte externa do embrião, sendo consideradas viáveis aquelas que apresentavam coloração vermelha em toda a extensão do embrião e não viáveis as que apresentavam falhas nas regiões vitais ou não coloriram, quando visualizada em lupa com aumento de seis vezes.

Na segunda etapa do experimento, em que foram realizados diferentes cortes para avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo TZ (Tabela 3), observaram-se diferenças médias de 2 pontos percentuais (pp) para TZ2, 4 pp para TZ3 e 6 pp para TZ4 em relação ao teste de germinação, e eficiência média de 95,7, 94,5 e 93,1%, respectivamente. A exemplo do observado na etapa 1, a análise da correlação linear demonstrou que há correlação positiva e significativa entre os testes de germinação e tetrazólio empregando os três métodos, confirmando a associação entre si.

Os resultados obtidos no TZ empregando os diferentes procedimentos de corte apresentaram coerência com os resultados do teste de germinação. No entanto, comparando os três procedimentos utilizados, observou-se que o TZ2 foi mais eficiente, apresentando, em média, 95,7% de eficiência, com a vantagem de possibilitar a análise mais detalhada de danos no embrião, uma vez que as partes vitais são visualizada, sem deixar dúvidas ao analista (Figura 7A).

Utilizando o corte longitudinal das sementes (TZ2), a diferença em relação aos resultados do teste de germinação, foram de no máximo de 15 pp no lote 10 (ou 4 pp nos lotes 6, 9, e 12) e resultando em 100% de acerto no lote 2, para os demais lotes essa diferença foi inferior a 4 pp. Com relação ao corte transversal (TZ3), observou-se que para os lotes 1, 3 e 7, obteve-se 100% de eficiência. Por outro lado, nos lotes 4, 8, 10 e 12 verificaram-se resultados com eficiência abaixo de 90%.

Em contrapartida, observando os resultados de eficiência do teste de tetrazólio sem corte da semente (TZ4), constatou-se que os resultados do teste de TZ apresentaram valores superiores aos resultados do teste de germinação para os 12 lotes avaliados, o que nos permite dizer que, se não há exposição da estrutura embrionária interna, o teste de TZ mostra-se menos eficiente para sementes de

arroz. O mesmo vale pra os resultados do TZ3, onde apenas o lote 11 apresentou resultado menor ao observado no teste de germinação. Já para o teste TZ2, os lotes 1, 3, 4 e 11 apresentaram resultados inferiores aos obtidos pelo teste de germinação.

Tabela 3 – Germinação (%), viabilidade (%) de diferentes cortes e eficiência dos processos (%) em relação à germinação, obtidas nos diferentes cortes em sementes de arroz pelo teste de tetrazólio

Cultivar	Qualidade	Lote	G	TZ2	TZ 3	TZ 4	ETZ 2	ETZ 3	ETZ 4
BR Irga	Alta	1	95	92	95	99	96,8	100,0	96,1
424	Média	2	87	87	93	99	100,0	92,9	86,0
Puitá Inta	Alta	3	97	94	97	99	97,1	100,0	98,1
CL	Média	4	84	83	94	90	98,4	88,1	92,9
BRS	Alta	5	94	96	97	100	97,9	97,2	93,6
Esmeralda	Média	6	89	93	93	92	95,9	95,9	96,6
BRS Serra	Alta	7	94	96	94	99	97,9	100,0	95,0
Dourada	Média	8	84	87	95	95	95,6	86,9	86,9
SCS 116	Alta	9	93	97	94	95	95,7	99,3	97,9
Satoru	Média	10	78	93	87	89	80,7	87,6	85,0
SCS 117	Alta	11	97	94	94	95	97,1	97,1	98,5
CL	Média	12	89	93	98	97	95,7	89,7	90,4
Média			90	92	94	96	95,7 A	94,5A	93,1 A
Coeficiente de correlação linear, r (GxTZ2, TZ3 e TZ4)			0,487**	0,397*	0,530**				

G- Germinação

TZ2 – Teste de tetrazólio realizado com sementes descascadas e cortadas longitudinalmente

TZ3 – Teste de tetrazólio realizado com sementes descascadas e cortadas transversalmente

TZ4 – Teste de tetrazólio realizado com sementes descascadas, sem corte

ETZ 2 - Eficiência do TZ2 (corte longitudinal)

ETZ3 - Eficiência do TZ3 (corte transversal)

ETZ 4 - Eficiência do TZ4 (sem corte)

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

* e ** Significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste T

Lima et al. (2007), analisando sementes de melão, submetidos ao teste de TZ, com ausência de corte, constataram que houve influência na coloração obtida, dificultando a difusão da solução de tetrazólio, comparativamente às sementes cortadas longitudinalmente.

Os resultados do teor de água (Tabela 4) após o pré-condicionamento das sementes estudadas foram similares, variando entre 24,6 e 29,7% nas sementes

sem remoção da pálea e lema e entre 25,7 e 27,9% com remoção dessas estruturas.

Tabela 4 - Teor de água inicial e após pré-condicionamento de sementes de arroz com e sem remoção da pálea e lema.

Lotes	Teor de água (%)			
	<u>Sem remoção da pálea e lema</u>		<u>Com remoção da pálea e lema</u>	
	Semente seca	Pós embebição	Semente seca	Pós embebição
1	13,2	27,0	11,4	26,1
2	11,7	25,1	11,9	27,8
3	13,4	27,3	11,4	27,3
4	11,4	25,6	11,8	26,8
5	12,2	28,9	10,6	26,8
6	10,9	27,4	10,8	27,3
7	12,1	29,7	11,4	25,8
8	10,6	27,8	11,7	26,0
9	13,2	27,3	11,4	27,9
10	12,5	24,6	12,2	26,3
11	13,0	26,0	11,6	25,7
12	11,4	25,3	11,6	25,9

Teores de água próximos ou superiores a 25% são suficientes para a reestruturação do sistema de membranas celulares em sementes de braquiária. A quantidade de água absorvida pelas sementes, para a hidratação dos tecidos, pode ser utilizada como parâmetro de referência para padronização das condições de execução do teste de tetrazólio (NOVEMBRE et al., 2006). Em sementes de milho, os teores de água de 19,5 e 21,5 foram suficientes para coloração dos tecidos e estimativa da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio (CHAMMA e NOVEMBRE, 2007).

Esses resultados de teor de água indicam que, independentemente dos procedimentos adotados, o pré-condicionamento das sementes permitiu a reativação do metabolismo enzimático das mesmas, necessário para a etapa da coloração do teste de tetrazólio.

3.3 Conclusões

A remoção da pálea e a lema associada ao corte longitudinal na metade distal do embrião facilita a avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio.

4 CAPITULO II - TESTE DE TETRAZÓLIO EM ARROZ: HIDRATAÇÃO E COLORAÇÃO DAS SEMENTES

4.1 Introdução

É possível alcançar altas produtividades quando são empregadas modernas técnicas de produção, onde está incluído o uso de sementes de alta qualidade. As empresas produtoras empenham esforços visando oferecer aos agricultores, sementes de qualidade na quantidade demandada. A avaliação da qualidade fisiológica das sementes é um aspecto importante a ser considerado em um programa de produção de sementes e, atualmente, testes que fornecem resultados em período de tempo relativamente curto são os mais demandados, pois agilizam as tomadas de decisões nas diferentes etapas do processo produtivo, especialmente na fase de pós-colheita (BHERING et al., 2005).

Nesse contexto, a utilização de testes rápidos para avaliar a qualidade das sementes é importante, principalmente, para agilizar decisões quanto ao manejo de campos em pré colheita, e de lotes durante as etapas de pós-colheita das sementes. Dentre os vários testes utilizados para este fim, está o teste de tetrazólio, cuja eficiência para avaliar a viabilidade das sementes depende de ajuste metodológico para cada espécie, envolvendo a definição de condições apropriadas para o pré-condicionamento, o preparo, a coloração e a avaliação das sementes (PINTO et al., 2009).

Embora seja um teste considerado rápido, ganhos significativos no tempo de execução podem ser obtidos com o aumento da temperatura durante a etapa de pré-condicionamento, uma vez que temperaturas elevadas aumentam a velocidade de embebição da semente (COSTA et al., 2007). A redução no tempo de execução do teste é importante para tomada de decisão, pois, o teste de tetrazólio tradicional, consome aproximadamente 24h. Dependendo da situação, esse período, embora relativamente curto quando comparado ao teste de germinação, pode ser excessivo e dificultar a tomada de decisões mais urgentes (MARCOS FILHO, 2005).

O pré-condicionamento é a etapa mais longa do teste, podendo ser consideravelmente reduzida aumentando-se a temperatura de embebição, conforme resultados obtidos por Costa et al. (2007), em sementes de soja, Barros et al., (2005), em sementes de abobrinha e Chamma e Novembre (2007) em sementes de milho, que elevaram para 40 °C a temperatura de embebição, reduziram para 6, 1 e

4h, respectivamente o tempo desta fase. Por outro lado, Grzybowski et al. (2012) reduziram o tempo de pré condicionamento para sementes de cevada, utilizando a metodologia de imersão direta em água por 4 h, a 20 °C, com corte longitudinal, sem aumentar a temperatura de embebição.

A etapa de hidratação da semente promove seu amolecimento, facilitando o preparo e a penetração da solução de tetrazólio, além de ativar o sistema enzimático, que resulta numa coloração mais nítida dos tecidos vivos. Sementes pré-umedecidas são geralmente menos susceptíveis a danos durante o preparo para o teste, do que sementes secas, além de poderem ser cortadas ou perfuradas mais facilmente para expor o embrião à ação do tetrazólio. A coloração das sementes pré-umedecidas é mais uniforme, o que facilita a avaliação (MOORE, 1977; CARVALHO et al., 2013a)

A velocidade de coloração, temperatura e concentração da solução de tetrazólio variam de acordo com a espécie estudada, podendo influenciar no resultado final do teste. Alguns autores trabalhando com diversas espécies, verificaram que há possibilidade de utilizar temperaturas superiores a 30 °C e períodos de tempo menores para a obtenção da coloração ideal (FRANÇA NETO et al., 1998; BHERING et al., 1999; BARROS et al., 2005; BHERING et al., 2005; NOVENBRE et al., 2006; CHAMMA e NOVENBRE, 2007). Além disso, é possível também reduzir a concentração da solução de tetrazólio. França Neto et al.(1998), Cervi e Mendonça (2009) e Carvalho et al. (2013) reduziram para 0,075% a concentração do sal de tetrazólio para avaliar sementes de soja, algodão e trigo, respectivamente, e Grzybowski et al. (2012) reduziram para 0,1%, em sementes de cevada.

Nesse contexto, ajustes metodológicos podem ser realizados para execução do teste de teste de tetrazólio, considerando as variáveis envolvidas, principalmente aquelas relacionados ao preparo e pré-condicionamento das sementes antes da coloração, concentração da solução de tetrazólio, período e temperatura de exposição à solução. Dessa forma, objetivou-se nesta pesquisa estudar opções de período de pré-condicionamento e de coloração e concentração do sal de tetrazólio para coloração visando reduzir o tempo de avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio.

4.2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas. O estudo foi dividido em três experimentos, conduzidos de forma independente.

4.2.1 Experimento I - Avaliação da concentração do sal de tetrazólio e período de coloração

Utilizaram-se sementes de seis cultivares de arroz Irrigado e de Sequeiro. Puitá Inta CL e BR IRGA 424, com cultivo predominante no Rio Grande do Sul, SCS 116 Saturu e SCS 117 CL, muito utilizadas em Santa Catarina, além das cultivares BRS Serra Dourada e BRS Esmeralda, cultivada na região do Cerrado. As sementes foram obtidas de empresas produtoras localizadas nos municípios de Pedro Osório – RS, Tubarão – SC e Goiânia - GO.

Inicialmente, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água, germinação e primeira contagem da germinação, conforme metodologia descrita a seguir.

Teor de água- a determinação do teor de água das sementes foi realizada pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 h, com duas repetições de 4 a 5 g por lote, de acordo com as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes foram acondicionadas em cápsulas de alumínio, colocadas em estufa em temperatura regulada para 105 °C, retiradas após 24 horas, deixadas em sílica para esfriar. Após, foram pesadas em balança analítica, com precisão de 0,0001 g, e umidade calculada conforme indicada nas RAS. Os resultados foram expressos em porcentagem média de teor de água para cada lote, na base úmida.

Teste de germinação- foi conduzido segundo a RAS (2009), 200 sementes foram divididas em quatro sub amostras de 50 sementes, dispostas em rolo de papel *germitest* umedecido com água destilada na proporção de 2,0 vezes a massa do papel. Os rolos foram colocados em germinador a 25 °C. A primeira e segunda contagens foram realizadas aos cinco e quatorze dias após instalação do teste, contabilizando a porcentagem de plântulas normais.

Primeira contagem de germinação (PCG) - a primeira contagem de germinação foi realizada em conjunto com o teste de germinação, no quinto dia,

quando foram retiradas do substrato as plântulas que já haviam germinado e classificadas como normais.

Teste de tetrazólio – Inicialmente, as sementes foram descascadas e imersas em água por 18 horas a 20 °C. Após, foram seccionadas longitudinalmente através do centro do eixo embrionário, e descartando aproximadamente 1/2 da largura da semente, seguindo os procedimentos metodológicos descritos no Capítulo I. Nesta etapa, realizou-se avaliação do teor de água das sementes descascadas, conforme metodologia anteriormente apresentada.

Em seguida, 100 sementes, divididas em duas sub amostras de 50 sementes, foram colocadas em copos plásticos com capacidade para 50 mL e imersas em solução de tetrazólio nas concentrações de 0,1%; 0,25%; 0,5% e 1%, e levadas à estufa regulada a 35 °C por 0,5; 1,0; e 2,0 horas, na ausência de luz. Ao término do período de coloração, as sementes foram lavadas em água corrente, e avaliadas individualmente, levando em consideração a intensidade e uniformidade de coloração apresentadas pelos tecidos, sendo classificadas seguindo recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) para a cultura do arroz, utilizando microscópio estereoscópio, com aumento de até 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.

Posteriormente, para fins ilustrativos, sementes representativas das diferentes colorações foram fotografadas individualmente. Para tanto as sementes foram previamente visualizadas em microscópio estereoscópico trinocular, conectado a uma câmera fotográfica digital marca Tucsen, foram captadas imagens e transferidas para um computador pelo software Tsviiew e utilizadas para ilustrar eventuais diferenças quanto à coloração das sementes no tempo e concentração do sal utilizado.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados da primeira contagem de germinação e germinação foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para avaliação da eficiência metodológicas do teste de tetrazólio, realizou-se comparação entre os resultados obtidos neste teste em cada concentração do sal e tempo de coloração com o resultado do teste de germinação, utilizando a fórmula **Eficiência TZ_n=[1-(|G-TZ_n|)/G]100**, sendo G=% de plântulas normais obtidas no

teste de germinação; TZ_n = % de sementes viáveis obtidas nas diferentes combinações de concentração de sal e tempo de coloração.

Para fins de análise estatística da eficiência, considerou-se um experimento fatorial 4x3 (concentrações de sal x tempos de coloração), sendo as repetições obtidas de cada cultivar. Os dados foram submetidos a análise de variância e posteriormente as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro, realizando-se os devidos desdobramentos em caso de interação significativa entre os fatores estudados. Foram utilizados os softwares SASM-Agri (CANTERI et al., 2001) e Winstat (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003).

4.2.2 Experimento II – Avaliação da Redução de Períodos de Hidratação

Para realização deste experimento utilizaram-se as mesmas cultivares do Experimento I. Considerando que os mesmos foram realizados com poucos dias de diferença, optou-se por não realizar nova aferição da germinação e umidade, sendo utilizados os mesmos dados para fins de cálculo da eficiência dos procedimentos ora testados.

Da mesma forma, o procedimento para descascar as sementes foi similar ao utilizado no Experimento I e descrito no Capítulo I. Após esta preparação, as sementes submetidas a diferentes condições de hidratação. Foram avaliados cinco períodos (0,5; 1; 2; 3 e 4 horas), combinados com duas temperaturas de hidratação (35 e 40 °C), que foram obtidas em BODs. Utilizou-se água a temperatura ambiente. Cerca de 130 sementes de arroz descascadas, para cada temperatura e período, foram submersas em aproximadamente 20 mL de água destilada para hidratação, nas condições a serem testadas.

Após cada período de hidratação nas respectivas temperaturas, as sementes foram cortadas longitudinalmente, conforme descrito no experimento I. Posteriormente foram submetidas à coloração com solução de tetrazólio 0,1% e mantidas em estufa regulada a 35 °C durante 2 h, no escuro, de acordo com dados obtidos no Experimento I. O procedimento de avaliação e obtenção de imagens foi similar ao do Experimento I.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para avaliação da eficiência metodológicas de condução do teste de tetrazólio, realizou-se comparação entre os resultados obtidos

neste teste em cada tempo e temperatura de hidratação com o resultado do teste de germinação obtido no experimento I, utilizando a fórmula **Eficiência** $TZ_n = [1 - (G - TZ_n) / G] 100$, sendo G=% de plântulas normais obtidas no teste de germinação; TZ_n = % de sementes viáveis obtidas nas diferentes combinações de tempo e temperatura de hidratação.

Para fins de análise estatística da eficiência, considerou-se um experimento fatorial 5 x 2 (tempo x temperatura de hidratação), sendo as repetições obtidas de cada cultivar. Os dados foram submetidos à análise de variância e posteriormente as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro, realizando-se os devidos desdobramentos em caso de interação significativa entre os fatores estudados, utilizando o programa Winstat.

4.2.2 Experimento III – Eficiência do teste de tetrazólio modificado na avaliação da viabilidade de sementes de arroz

Para a realização deste experimento foram utilizadas sementes de 8 lotes da cultivar BR Irga 424, obtidos em empresas produtoras de sementes do estado do Rio Grande do Sul. Os mesmos foram selecionados de forma a contemplar uma grande amplitude de viabilidade, uma vez que um teste para ser eficiente deve ter acurácia e robustez capaz de identificar potenciais diferenças de qualidade das sementes. Inicialmente, analisou-se o teor de água e germinação, seguindo procedimentos descritos no Experimento I.

Para a realização do teste de tetrazólio foram adotados os procedimentos que apresentaram melhor eficiência nos Experimentos I e II. Para as situações em que houve mais de uma condição com similar eficiência levou-se em consideração critérios técnicos, a saber: 1) menor tempo para realização, 2) menor quantidade de material e 3) melhor condição de coloração.

Inicialmente, as sementes foram descascadas (Condição obtida no capítulo I), utilizando o equipamento e seguindo o procedimento de execução e seleção das sementes já anteriormente descrito.

Para tanto, cerca de 130 sementes de cada lote foram descascadas em descascador para arroz marca Suzuki, modelo MT-88. O equipamento foi regulado de forma que aproximadamente 90% das sementes fossem descascadas e obtivesse menor percentagem de quebra, novamente foram desconsiderados os

lotes que apresentavam percentagem de sementes quebradas acima de 20%. Foram utilizadas sementes inteiras e quebradas maior que 1/3 do seu tamanho e que continham o embrião intacto. Trinta por cento a mais de sementes foram usadas como uma medida de segurança pela ocorrência de sementes que deixaram de ser descascadas, e aquelas que apresentavam alguma danificação na região do embrião e erros na preparação (corte).

Após, duas amostras de 50 sementes, por unidade experimental, foram hidratadas por 1h a 40 °C (condições obtidas no Experimento II) e submetidas ao melhor período de coloração foi obtido do Experimento I (1h a 35 °C). A concentração do sal de tetrazólio utilizada foi de 0,25%, condição que forneceu coloração mais adequada para avaliação, conforme testes preliminares.

Após o período de hidratação, determinou-se do teor de água, conforme metodologia descrita no Experimento I.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições.

Para avaliação da eficiência do teste de tetrazólio, realizou-se comparação entre os resultados obtidos neste teste com o resultado do teste de germinação, utilizando a fórmula **Eficiência TZ** = $[1 - (G - TZ) / G] 100$, sendo G = % de plântulas normais obtidas no teste de germinação; TZ = % de sementes viáveis obtidas no teste de tetrazólio.

Os dados obtidos nos testes foram submetidos à análise de variância e posteriormente as médias comparadas entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando o software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001)

4.3 Resultados e discussão

Na Tabela 5 são apresentados dados da caracterização inicial dos lotes de sementes de arroz utilizados nos Experimentos I e II. Verificou-se semelhança de qualidade entre os lotes, evidenciada pelos resultados dos testes de primeira contagem de germinação e germinação. Pela análise estatística do teste de primeira contagem de germinação, o lote 3 foi classificado como o de maior qualidade, enquanto que os demais lotes não apresentaram diferença significativa entre si.

Tabela 5 - Dados médios de teor de água, primeira contagem de germinação, (PCG) e germinação (G) de sementes de arroz.

Lotes	Teor de água	PCG	G
		-----%-----	
1	12,4	85 b	95 a
2	11,4	88 b	93 a
3	11,6	92 a	94 a
4	12,4	86 b	94 a
5	11,4	85 b	92 b
6	11,8	87 b	94 a
CV (%)		3,54	2,26

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Verificou-se que o teor inicial de água dos seis lotes avaliados apresentaram similaridade nos resultados, variaram entre 11,4 e 12,4 %, considerado importante para conservação e armazenamento das sementes. No teste de germinação os lotes variaram entre 92 e 95 %. Atendendo padrões de comercialização.

Experimento I

Na figura 8, estão apresentadas a coloração de sementes de arroz após terem sido expostas a diferentes períodos (0,5; 1 e 2 h) e concentrações do sal de tetrazólio (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0%).

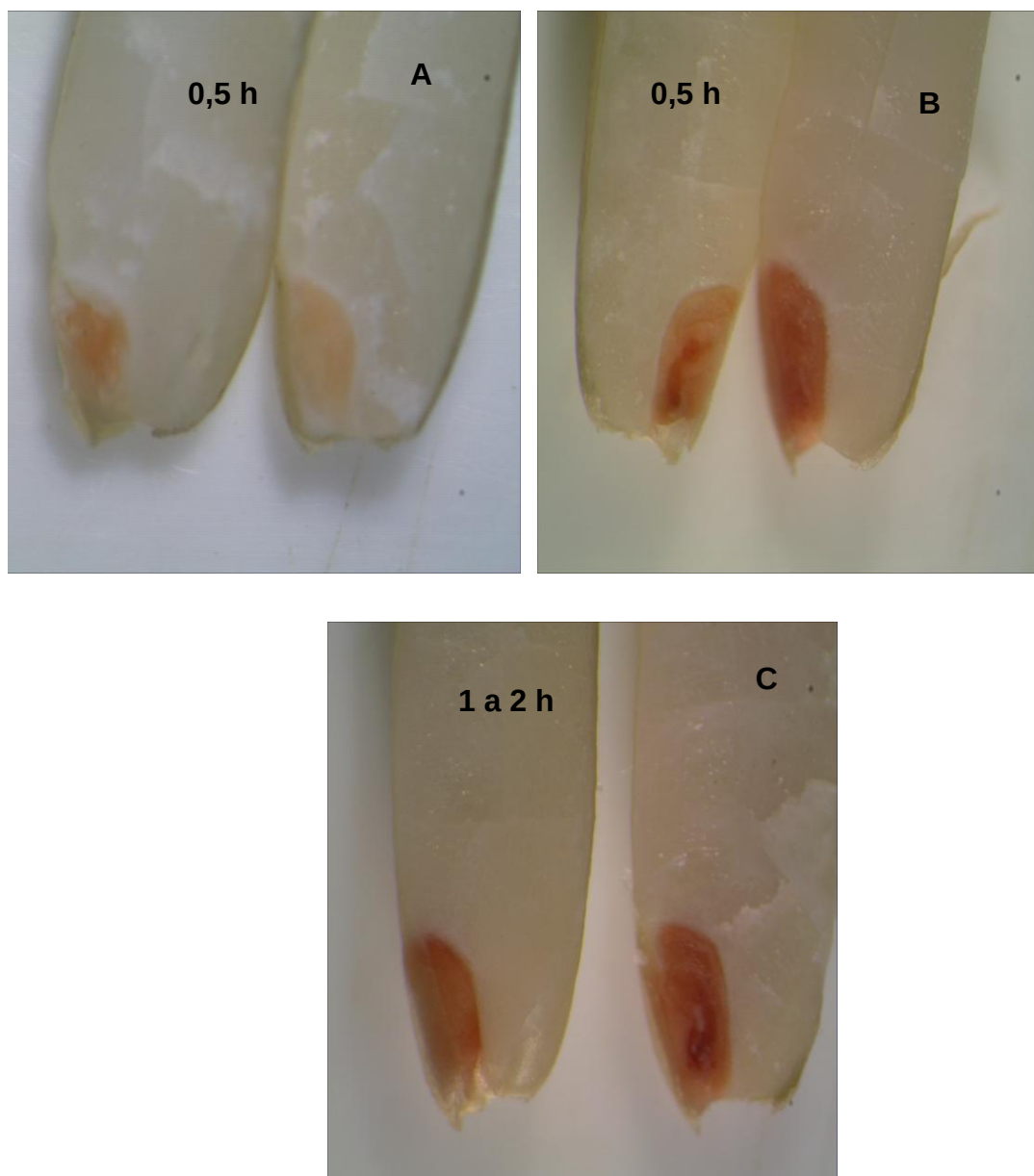


Figura 8 – Representação das sementes após coloração, nos períodos de 0,5 h (A) e (B) e 1 a 2 h de exposição ao sal de tetrazólio (C).

Observou-se que, à medida que se aumentou a concentração do sal, aumentou igualmente a intensidade de coloração dos tecidos embrionários das sementes.

Nota-se que com 0,5 h de exposição às concentrações do sal, as sementes apresentaram coloração fraca (Figura 8A) e algumas ainda não estavam completamente coloridas (Figura 8B). Já para as sementes que permaneceram nas concentrações por 1 ou 2h, obtiveram coloração adequada para a avaliação (Figura 8C). Segundo Marcos Filho (2005), a coloração se desenvolve com velocidade variável entre as sementes de diferentes espécies ou mesmo entre sementes da

mesma amostra, mas esse período geralmente se situa entre 60 e 240 minutos. A escolha da concentração de tetrazólio, assim como o tempo de incubação das sementes, deve ser feita considerando a facilidade de diferenciação das sementes viáveis e inviáveis (KRZYZANOWSKI et al., 1999), por proporcionar a possibilidade de melhor visualização dos distúrbios de coloração dos tecidos e a identificação de diferentes tipos de danos.

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.

Os resultados do experimento I, referente à concentração e tempos de coloração, estão apresentados na Tabela 6.

Verificou-se que de modo geral, os resultados indicaram que o tempo de 0,5 h não foi suficiente para colorir as sementes adequadamente, em todos os lotes analisados, independente da concentração do sal. Por outro lado, observou-se que a partir da concentração de 0,25%, os resultados indicaram tendência de acréscimo no percentual de viabilidade.

Tabela 6 - Viabilidade de seis lotes de sementes de arroz (%) pelo teste de tetrazólio em função de variações nas concentrações do sal (CS) e no tempo de coloração (TC).

CS (%)	TC (h)	Lotes						Média
		1	2	3	4	5	6	
0,1	0,5	42	36	37	66	30	65	46
	1,0	93	93	93	94	92	93	93
	2,0	93	95	93	94	92	94	94
0,25	0,5	79	82	56	77	65	69	73
	1,0	95	91	91	92	93	94	93
	2,0	95	91	92	92	94	93	93
0,5	0,5	44	83	84	80	68	68	71
	1,0	93	92	96	92	89	95	93
	2,0	93	91	93	92	90	92	92
1,0	0,5	82	73	91	89	70	70	77
	1,0	98	93	93	94	91	89	93
	2,0	97	93	92	94	92	91	93
G (%)		95	93	94	94	92	94	

Comparando a média dos resultados para o período de 0,5 h de coloração, verificou-se a viabilidade foi proporcional à concentração do sal, ou seja, aumentando-se a concentração ocorre acréscimo do número de sementes viáveis observadas nesse período de coloração.

Constatou-se também que neste período, na menor concentração (0,1 %) os valores obtidos foram menores em relação às demais concentrações, sendo verificada uma diferença de 31 pp comparada com a média dos lotes de maior concentração (1 %) da solução do sal de TZ. Silva et al. (2013) e Souza et al. (2010a) relataram dificuldades na avaliação de estruturas essenciais das sementes de girassol e triticale, respectivamente, quando utilizaram baixas concentrações e curtos períodos de tempo.

A redução da concentração da solução de tetrazólio utilizada na etapa de coloração do teste também foi sugerida para outras espécies, sendo obtidos resultados satisfatórios com concentrações da ordem de 0,075 % para soja (FRANÇA NETO et al, 1998), algodão (CERVI e MENDONÇA, 2009), trigo (CARVALHO et al., 2013b), e 0,1 % para cevada (GRZYBOWSKI et al., 2012).

Segundo Santos et al. (2006), dois fatores justificam o uso de menores concentrações do sal de tetrazólio: o alto custo do sal e a visualização satisfatória dos tecidos vivos das sementes, permitindo observar se há a presença ou não de danos, por meio da obtenção de uma coloração adequada.

A diferença máxima entre o teste de germinação e tetrazólio foi de 2 pp (Tabela 6) nos períodos de 1 e 2 h de coloração em todas as concentrações e lotes avaliados. Este resultado indica que o teste de tetrazólio é tão eficiente quanto o de germinação para avaliar a qualidade dos lotes de sementes de arroz. Considerando que as médias nos dois testes foram similares e, que o teste de tetrazólio é feito em menos de 24 h, enquanto o teste de germinação em sementes de arroz, segundo as RAS (Brasil, 2009), tem sua contagem final após 14 dias de instalação do teste. Os obtidos indicam que o teste de tetrazólio poderá ser utilizado para avaliar a qualidade das sementes por se obter resultados equivalente ao teste de germinação.

Estes resultados concordam com Silveira (2008) que obteve diferença média de 4 pp entre as determinações de germinação e tetrazólio em sementes de azevém, concluindo que o teste de tetrazólio em sementes de azevém pode ser

usado como método alternativo ao teste de germinação em laboratórios de análise de sementes.

Quanto à eficiência metodológica (Tabela 7), verificou-se que nos períodos de 1 e 2 h de coloração, obteve-se eficiência maior que 97,9 % em relação à germinação para todas as concentrações estudadas, o que significa dizer que houve acerto maior que 97 % nos resultados do teste de tetrazólio e que ocorreu erro menor que 3 pp.

Tabela 7 - Eficiência (%) do teste de tetrazólio em função de variações nas concentrações do sal e no período de coloração.

Período de coloração (h)	Concentração do sal de tetrazólio (%)			
	0,1	0,25	0,5	1
0,5	49,1 b B	77,4 b A	75,5 b A	82,5 b A
1,0	99,1 a A	98,3 a A	98,2 a A	98,2 a A
2,0	98,9 a A	98,2 a A	97,9 a A	98,4 a A
CV (%)	9,25			

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

França Neto et al. (1998) indicaram que os resultados de viabilidade em soja obtidos nos testes de germinação e de tetrazólio devem ser semelhantes, permitindo diferenças de até 5% entre si e que se ocorrerem diferenças maiores, estas devem ser explicadas. Dias e Barros (1999) também consideraram que a diferença máxima entre o teste de germinação e viabilidade pelo teste de tetrazólio em milho deve ser no máximo 5%, indicando que diferenças maiores apontam problemas na execução ou na avaliação de um dos testes.

Verificou-se eficiência menor quando foi utilizada a concentração de 0,1% da solução de TZ tempo de 0,5 h de coloração em relação às demais combinações. Por outro lado, quando se utilizou concentrações de TZ superiores a 0,1% nesse mesmo período, observou-se que não houve diferença estatística.

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 a partir de 1 h de coloração não houve diferença estatística entre as eficiências metodológicas, independentemente da concentração do sal. Neste caso, considera-se a mais eficiente àquela metodologia em que se obteve resultado no menor tempo e menor concentração, ou seja, 1 h de coloração utilizando concentração de 0,1% do sal de tetrazólio.

Os resultados obtidos neste experimento revelaram a possibilidade de utilização de solução com concentração mais baixa e menor tempo para obtenção dos resultados. Além de ser mais econômico, permite uma coloração adequada dos tecidos da semente em menor tempo, sem prejuízos na visualização da sua viabilidade. A temperatura e o tempo de coloração sugerido por espécie nas RAS, quadro 6.1, são considerados adequados para coloração, mas não devem ser considerados como absolutos porque podem variar com a condição da semente e com a pureza do sal e na medida em que se ganha experiência, é possível fazer a avaliação em um estágio ainda inicial de coloração (BRASIL, 2009). Neste sentido, com a experiência adquirida durante o período de realização do trabalho, pode-se dizer que o uso da concentração mais baixa (0,1%) permitiu identificar e avaliar da mesma forma detalhes de coloração do embrião do que as soluções de concentrações mais altas.

Quanto ao teor de água das sementes após período de hidratação, os resultados variaram entre 25,9 e 28,1%, quantidade considerada suficiente para coloração dos tecidos vivos.

De modo geral, a combinação mais eficiente para a realização do teste de tetrazólio visando avaliar a viabilidade de sementes de arroz foi a de 0,1 % de concentração do sal de TZ e 1 h de coloração.

Experimento II

Verificou-se que a partir de 2 h de hidratação na temperatura de 35 °C e 1 h a 40 °C (Figura 9) foi possível avaliar a viabilidade de sementes de arroz. Salienta-se que no período de hidratação de 0,5 h na temperatura de 35 °C não foi possível realizar o corte das sementes. Portanto essa condição foi considerada inadequada para o preparo das sementes de arroz.

O teor de água após hidratação das sementes por diferentes períodos (Figura 9) indicou que, independentemente do período de hidratação, as sementes absorveram mais água a 40 °C.

Observou-se que até o período de 2h, a diferença de absorção da água pelas sementes nas duas temperaturas apresentou-se maior; após esse período, as quantidades de água absorvidas em ambas as temperaturas foram similares.

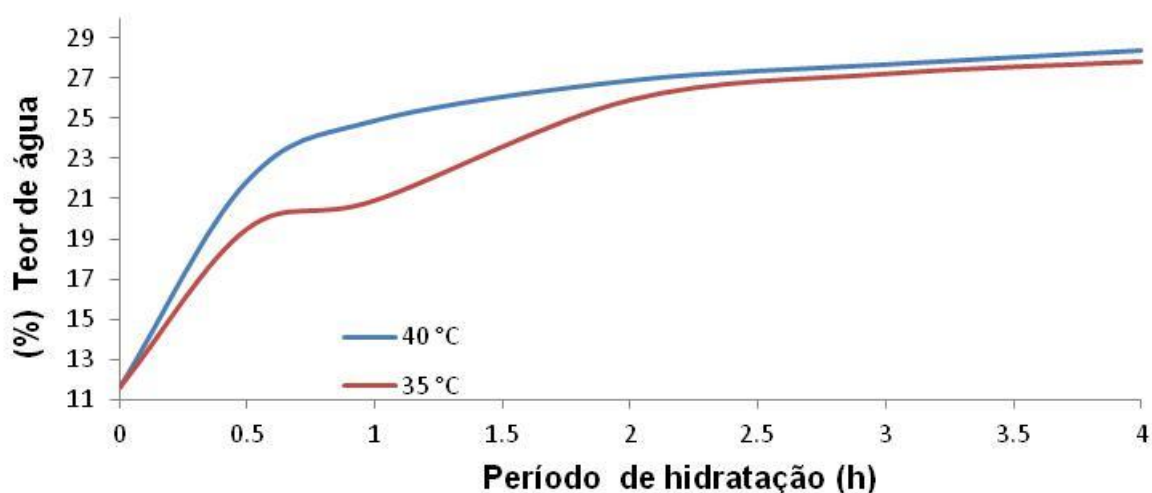


FIGURA 9. Teores de água de sementes de arroz hidratadas por 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 horas sob temperaturas de 35 e 40 °C.

De acordo com Moore (1977), temperaturas entre 30 e 40°C são as mais adequadas para a hidratação das sementes para o teste de tetrazólio. A hidratação das sementes de arroz em temperatura superior a 30°C reduz o tempo de preparo dessas sementes para o teste de tetrazólio.

De forma similar, Chamma e Novembre (2007) reduziram o tempo de hidratação para sementes de milho utilizando temperatura de 35 ou 40 °C e período de 4h, obtendo teores de água entre 19,5 e 21,3%, indicando que o teor de água das sementes como um dos parâmetros para a realização desse teste, podendo eliminar as interferências relacionadas às variações do substrato, como a quantidade de água disponível para a semente e à temperatura de hidratação. Além disso, as sementes são avaliadas em estágio metabólico similar. Da mesma forma, Novembre et al. (2006), indicaram que a quantidade de água absorvida pelas sementes de braquiária pode ser utilizada como parâmetro de referência para a padronização das condições de execução do teste de tetrazólio.

Observou-se que período de embebição de 1 h na temperatura de 35 °C e 0,5 h a 40 °C foi insuficiente para avaliar a viabilidade de sementes de arroz. O corte foi moroso, as sementes apresentaram resistência ao corte, provocando danos ao embrião e problemas referentes à coloração do embrião, dificultando assim a interpretação dos resultados. Por outro lado, verificou-se que à medida que as sementes ficaram mais tempo embebidas, apresentaram menor resistência mecânica ao corte, sendo adequados para avaliar a viabilidade pelo teste de tetrazólio (Figura 10).

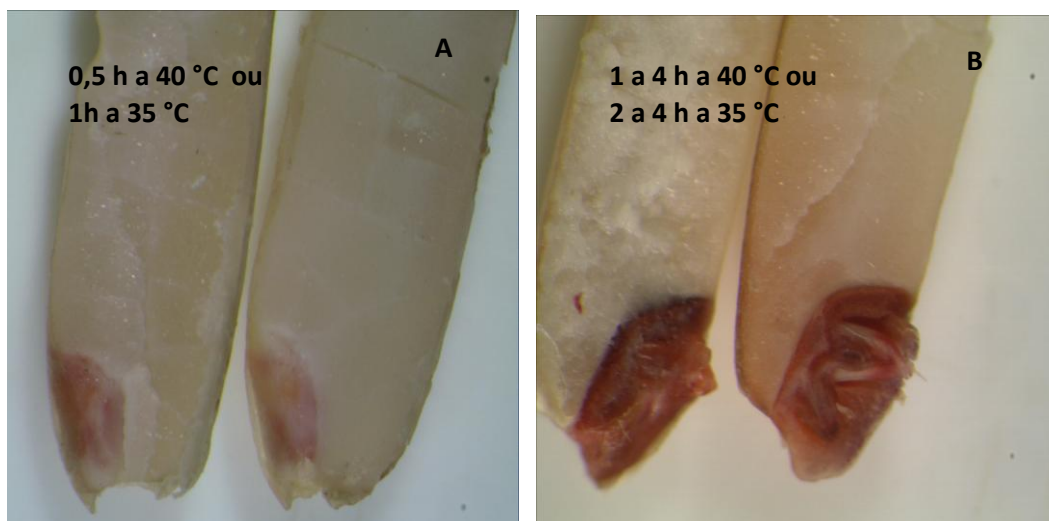


Figura 10- Cortes em sementes de arroz embebidas em diferentes temperaturas (35 e 40 °C) e períodos de hidratação: 0,5 e 1h de hidratação a 35 e 40 °C (A) e 1h a 40°C (B)

Observa-se na Figura 10 que as sementes quando ficaram embebidas no tempo de 0,5 a 40 °C e 1h a 35 °C (Figura 10A), o resultado da coloração ficou inadequada, pois a semente apresentou coloração esbranquiçada, ocorrendo dúvidas na avaliação. Para os demais períodos de embebição, não ocorreram diferenças na obtenção da coloração das sementes (Figura 10B).

Os resultados da viabilidade das sementes dos seis lotes de sementes de arroz, embebidas por períodos de tempo de 0,5 ; 1; 2; 3 e 4 h nas temperaturas de 35 e 40 °C, são apresentados na Tabela 8.

Observou-se que, independentemente da temperatura, o período de embebição de 0,5 h foi insuficiente para avaliar a viabilidade das sementes de arroz, pois apresentaram resultados inferiores aos obtidos no teste de germinação (Tabela 5). O mesmo vale para o período de embebição de 1 h na temperatura de 35 °C. Nesses períodos os valores da viabilidade não corresponderam aos encontrados no teste de germinação, provavelmente pelo fato de que as sementes não absorveram água suficiente para ativação do sistema enzimático, não havendo coloração ou ocorrendo desuniformidade na mesma.

Tabela 8 – Viabilidade de seis lotes de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio empregando diferentes períodos de embebição nas temperaturas de 35 e 40 °C.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Lotes						Média
		1	2	3	4	5	6	
35	0,5	0	0	0	0	0	0	0
	1,0	85	77	86	71	83	81	80
	2,0	95	93	93	94	97	94	94
	3,0	95	91	92	93	94	95	93
	4,0	95	93	94	95	95	95	95
40	0,5	68	84	82	78	69	65	74
	1,0	96	92	93	93	92	97	94
	2,0	97	93	97	97	92	91	95
	3,0	96	95	97	97	93	97	96
	4,0	99	96	99	97	95	94	97
G (%)		95	93	94	94	92	94	

Notou-se que quando as sementes foram avaliadas nos períodos de embebição de 2 a 4 h a 35 °C apresentou porcentagens de viabilidade pelo teste de tetrazólio obtiveram variação de apenas três pontos percentuais (pp), observada no lote 5. Este valor está dentro da tolerância permitida entre testes do mesmo laboratório, estabelecida nas RAS, para testes de TZ (BRASIL, 2009). O mesmo vale para os resultados obtidos nos lotes de sementes embebidas nos períodos de 1 a 4 h a 40 °C onde a diferença foi de seis pp nos lotes 3 e 6. Constatou-se que em média o teste de tetrazólio produziu resultados coerentes com os obtidos pelo teste de germinação, com valores próximos, obtendo-se diferença média de 3pp.

Diversos autores verificaram a associação entre os resultados de germinação e de viabilidade pelo teste de tetrazólio, destacando-se estudos com pepino (LIMA et al. 2010), milho (CHAMMA e NOVEMBRE, 2007), azevém (SILVEIRA, 2008), trigo (CARVALHO et al., 2013b), triticale (SOUZA et al. 2010a) e cevada (GRZYBOWSKI et al., 2012), salientando-se que nestes estudos, em média, as diferenças foram inferiores a 5 pp entre os resultados de germinação e viabilidade pelo teste de tetrazólio.

Quanto à eficiência metodológica (Tabela 9), quando foi utilizado temperatura de hidratação de 35 °C, combinado com hidratação por 1 hora, observou-se que a

eficiência foi de 85,6%, porém os demais períodos de hidratação nesta temperatura acima de 98%. Salienta-se, no entanto, que nestas condições, a coloração das sementes foi fraca e desuniforme. O mesmo ocorreu em relação à temperatura de 40 °C no período de 0,5 h de hidratação. Esta ocorrência pode ser explicado pelo fato de as sementes apresentarem teores de água inferiores a 24%, que é considerada condição ideal para coloração.

Para os demais períodos de hidratação, verificou-se que a eficiência do teste em ambas as temperaturas de embebição foi similar.

Tabela 9 – Eficiência do teste de tetrazólio (%) em função de diferentes períodos de embebição nas temperaturas de 35 e 40 °C.

Temperatura de hidratação (°C)	Tempo (h)				
	0,5	1	2	3	4
35	0,0 b C	85,6 b B	98,7 a A	98,4 a A	98,9 a A
40	79,2 a B	98,6 a A	98,2 a A	97,9 a A	97 a A
CV (%)	3,74				

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Para escolha do melhor método, considerou-se que a metodologia mais eficiente foi aquela que apresentou melhores resultados quanto à eficiência. Sendo assim, constatou-se que a partir de 2h de hidratação a 35 °C e 1 h a 40 °C, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Considerando que em um teste onde se obtém os mesmos resultados para mais de uma variável resposta, considera-se o mais eficiente àquele que fornece resultado em menor tempo.

Nesse contexto, os resultados indicam que é possível estimar a viabilidade de sementes de arroz, com redução significativa do tempo de preparo das sementes, 1 h a 40 °C e 2 h a 35 °C contrariando o estabelecido nas regras para análise de sementes, que recomenda período mínimo de 18 h nesta etapa. É possível obter resultado em 3 h, considerando 1h para realização do corte, 1 h para a hidratação e 1 h para coloração das sementes (metodologia Experimento I).

A redução do tempo de preparo das sementes para o teste de tetrazólio foi sugerida também para outras espécies como para soja (COSTA et al.,1998), braquiária (NOVEMBRE et al., 2006), tomate (SANTOS et al., 2007), milho (CHAMMA e NOVEMBRE, 2007) e algodão (CERVI e MENDONÇA, 2009).

Experimento III

Na Tabela 10 são apresentados dados do teor de água inicial, após remoção da pálea e lema e após período de hidratação.

Tabela 10- Dados médios do teor de água inicial, após remoção da pálea e lema e após pré-condicionamento (hidratação)

Lotes	Teores de água (%)		
	Inicial	Após remoção da pálea e lema	Após hidratação
01	12,8	13,7	25,9
02	12,9	13,6	26,7
03	13,0	13,4	26,6
04	13,0	13,8	25,7
05	13,2	13,4	26,0
06	12,8	13,9	26,9
07	11,4	12,2	25,3
08	11,3	11,6	25,1
Média	12,6	13,2	26,0

Verificou-se que a umidade inicial entre os lotes variou de 11,3 a 13,2 e o teor de água das sementes após período de hidratação foi em média 26%, considerado importante para ativação do sistema enzimático responsável pela coloração das sementes. Lembrando que, no experimento II, teores de água a partir de 24% foram suficientes para a obtenção de uma coloração adequada

Na Tabela 11 estão apresentados os dados de germinação, viabilidade pelo teste de tetrazólio (TZ) e eficiência do teste de TZ. Verificou-se distinção de qualidade entre os lotes, evidenciada pelos resultados de germinação que foi de 51 a 89%, condição importante para atender a proposta deste experimento que foi de verificar a confiabilidade do teste de tetrazólio.

Verificou-se que a análise de comparação de médias apontou o lote 6 como o de menor germinação (51%), e os lotes 1, 4 e 7 como os de alta qualidade, estando estes com germinação entre 87 e 89%.

Para a maioria dos lotes, observou-se proximidade numérica entre os resultados do teste de germinação e tetrazólio, exceto o lote 6 que apresentou menor germinação (51%).

Tabela 11 – Viabilidade pelo teste de germinação e tetrazólio e eficiência do teste de tetrazólio, em 8 lotes de sementes de arroz, cultivar BR Irga 424.

Lotes	Germinação	Teste de TZ	Eficiência TZ
	%		
1	89 a	93 a	96,2
2	75 c	72 c	96,0
3	78 c	75 c	96,6
4	87 a	89 b	96,9
5	83 b	85 b	96,7
6	51 d	62 d	78,6
7	89 a	88 b	97,0
8	74 c	73 c	96,2
Média	78	80	94,3
CV (%)	3,66	4,26	6,13

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Pelos resultados apresentados na Tabela 11, verificou-se que houve concordância entre a classificação obtida pelo teste de tetrazólio, utilizando a metodologia proposta no presente estudo, com o teste de germinação, exceto para os lotes 4 e 7. A equivalência entre os resultados foi confirmada quando se aplicou a fórmula da eficiência, que foi superior a 96% para a maioria dos lotes, exceto para o lote 6, onde obteve-se eficiência de 78,6%.

Vale ressaltar que os resultados obtidos nas diversas etapas deste estudo (Capítulo I, Experimento I e II do capítulo II) foram determinantes para redução do período total de avaliação da viabilidade de sementes de arroz. Os resultados empregando a metodologia tradicional são obtidos em 24 horas, porém, neste estudo, foi possível obter resultados equivalentes em até 3 horas, considerando 1 hora para cada etapa: pré-condicionamento, período para realização do corte e coloração.

Diante dos resultados obtidos, considerando-se que o fator período de hidratação, aliado ao uso de menor quantidade de reagentes e menor tempo de coloração para sementes de arroz previamente descascadas, são características desejáveis na realização do teste de viabilidade para obtenção de resultados de análises em laboratório, recomenda-se, para sementes dessa espécie, a

combinação de temperatura e período de hidratação/concentração do sal de tetrazólio/período de coloração de 40°C/1h/0,25/1h a 35 °C, na ausência de luz.

4.3 Conclusões

É possível realizar o teste de tetrazólio em sementes de arroz utilizando hidratação de sementes descascadas por 1h e 40 °C e coloração por 1h com concentração do sal a 0,25%.

5 CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DO VIGOR EM SEMENTES DE ARROZ PELO TESTE DE TETRAZÓLIO

5.1 Introdução

Os testes de vigor devem ser capazes de detectar diferenças no potencial fisiológico de lotes de sementes com germinação semelhante e compatível com as exigências mínimas para comercialização, sendo necessário distinguir com segurança lotes de vigor distintos entre si (MARCOS FILHO, 2011). O mesmo autor salienta que, até o momento, para se avaliar o vigor de sementes de uma determinada espécie ou de um conjunto de espécies, ainda não existe um teste universalmente aceito. No Brasil, dentre os testes disponíveis, podem ser destacados como os mais utilizados, os testes de frio para sementes de milho e os testes de envelhecimento acelerado e tetrazólio para soja.

Nas fases de produção e pós-colheita de sementes são necessários testes que forneçam resultados de análise da qualidade em período de curto tempo para monitorar satisfatoriamente o controle de qualidade das sementes produzidas (LIMA et al., 2010), vindo de encontro ao preconizado por Marcos Filho et al. (2009), ao alegar que os testes de vigor devem ser rápidos, de fácil execução, não exigir equipamentos complexos, reproduzíveis e ser suficientemente sensíveis para detectar com eficiência tanto pequenas como grandes diferenças de vigor.

Métodos rápidos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes tem sido alvo da pesquisa desde o final do século XIX, e fazem parte da atual demanda da indústria sementeira, principalmente por permitir a tomada de decisão rápida nos programas de controle de qualidade (FRANÇA NETO et al., 2015). Dentre esses testes, o teste de tetrazólio apresenta grande potencial por possibilitar a avaliação da qualidade fisiológica das sementes com rapidez e eficiência se executado criteriosamente, pois, além da viabilidade é possível também se determinar o vigor das sementes, com a mesma técnica empregada, diferindo na avaliação, que utiliza critérios mais rigorosos, de acordo com o grau de deterioração das sementes. Nesse contexto, o teste de tetrazólio também pode ser usado para fornecer uma avaliação rápida do vigor (CARVALHO et al, 2013a).

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, particularmente a desidrogenase do ácido málico, que reduz o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio nos tecidos vivos da semente, onde íons de hidrogênio são

transferidos para o referido sal (MARCOS FILHO et al.,1987, FRANÇA NETO et al., 1998). Quando a semente é imersa na solução de tetrazólio, esta se difunde através dos tecidos ocorrendo, nas células vivas, a reação de redução, resultando na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifênilformazan, indicando haver atividade respiratória nas mitocôndrias e, conseqüentemente, que o tecido é viável, ou seja, vivo (FRANÇA NETO, 1999). Salienta-se que o analista deve estar bem familiarizado com a morfologia interna da semente, especialmente quanto às partes vitais, a fim de evitar erros na avaliação.

Para utilizar o teste de tetrazólio na avaliação do vigor, as sementes são analisadas com base na coloração desenvolvida, local e extensão de eventuais danos, podendo ser classificados em diferentes níveis de vigor , mediante subdivisão da categoria das sementes viáveis. Vários trabalhos têm sido publicados com dados de pesquisas que utilizaram o teste de tetrazólio para determinação de vigor, como por exemplo, Fogaça et al.(2011), que propuseram realizar separação em quatro classes em sementes de sorgo. Sementes de melancia e abobrinha foram classificadas por Bhering et al., 2005 e Barros et al. (2005), em cinco classes e Gagliardi e Marcos Filho (2011), classificaram o pimentão em três classes. No entanto, para sementes de arroz ainda não há sugestões ou acréscimos ao proposto pelas RAS (BRASIL, 2009) ou ISTA (2003).

Para aquelas espécies em que é necessário realizar corte das sementes, é importante que este seja realizado de maneira adequada (sem formação de arestas), pois, para análise do vigor, as estruturas embrionárias devem ser perfeitamente visualizadas, não podendo apresentar injurias ou erros causadas pelo corte ou por coloração imperfeita (DIAS e BARROS 1999). Por esse motivo, provavelmente a metodologia tradicional, proposta por Brasil (2009), adaptada no presente trabalho na etapa inicial pelo descascamento, seja mais eficiente do que o teste de tetrazólio modificado, pois quando a hidratação é realizada por 18 horas, não é observado nenhum tipo de resistência ao corte e a umidade após pré-condicionamento proporciona coloração nítida e uniforme das estruturas.

O objetivo do presente trabalho foi estudar procedimento metodológico para utilizar o teste de tetrazólio para a avaliação do vigor de sementes de arroz.

5.2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas sementes de 10 lotes de sementes de arroz da cultivar BR Irga 424.

Inicialmente, para efeitos de comparação de resultados, foi realizada caracterização dos lotes das sementes, utilizando os seguintes testes:

Teor de água - foi realizado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas, utilizando-se duas subamostras por unidade experimental de 4 a 5 g de sementes para cada repetição (BRASIL, 2009). As sementes foram acondicionadas em cápsulas de alumínio, colocadas em estufa em temperatura regulada para 105 °C, retiradas após 24 horas, deixadas em sílica até esfriar, pesadas em balança com precisão de quatro casas decimais, e umidade calculada conforme as RAS. Os resultados foram expressos em porcentagem média de teor de água para cada lote, em base úmida. O teor de água foi determinado antes do descascamento das sementes, após o descascamento e após hidratação (pré-condicionamento).

Germinação – Foram conduzidos dois testes de germinação (25 e 30 °C), para tanto, para cada teste foram utilizadas 200 sementes, divididas em quatro sub amostras de 50 sementes, dispostas em rolo de papel *germitest* umedecido previamente com água destilada na proporção de 2,0 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram colocados em germinador regulado à temperatura de 25 °C e 30 °C, sendo as contagens para o teste conduzido a 25°C realizadas aos cinco e quatorze dias após a semeadura. Em paralelo foi realizado teste de germinação utilizando temperatura de 30 °C, realizando-se contagem única aos sete dias. Os resultados, para ambos os testes, foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Primeira contagem de germinação (PCG) - foi realizada em conjunto com o teste de germinação a 25 °C, no quinto dia, quando foram retiradas do substrato as plântulas normais.

Emergência de plântulas - foi realizado com 100 sementes de cada unidade experimental, semeadas em bandejas plásticas, empregando solo como substrato, e cobertas por uma camada de solo. As caixas plásticas foram mantidas em temperatura ambiente, em torno de 25 °C, e irrigadas diariamente. A avaliação foi

realizada aos 14 dias após a semeadura, computando-se a percentagem de plântulas emergidas.

Envelhecimento acelerado - foi conduzido de acordo com o método tradicional (MARCOS FILHO, 1999), utilizando-se água destilada. Cada amostra de sementes foi distribuída, formando camada única, sobre a superfície de tela metálica, suspensa no interior de caixa de plástico transparente (11 x 11 x 3 cm), contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram mantidas em câmara incubadora tipo B.O.D., regulada a 42 °C, por 120 horas. Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, como descrito anteriormente. As avaliações das plântulas normais foram realizadas no sétimo dia após a semeadura.

Teste de frio - foi conduzido, conforme proposto por Barros et al. (1999), utilizando-se quatro subamostras de 50 sementes para cada unidade experimental, distribuídas uniformemente em rolo de papel tipo *germitest* umedecido, previamente, com água destilada na proporção de 2,0 vezes a sua massa. Em seguida, os rolos de papel foram colocados em sacos plásticos, os quais foram vedados e mantidos em câmara de BOD, regulada à temperatura de 10 °C $\pm$ 1 °C, durante sete dias. Após esse período, os rolos foram transferidos para um germinador e mantidos nas mesmas condições do teste de germinação, sendo avaliada a porcentagem de plântulas normais após sete dias.

Teste de tetrazólio - para condução do teste de tetrazólio, as sementes foram previamente descascadas, conforme metodologia estabelecida e descrita no capítulos I e II. Para fins deste estudo, foram selecionados lotes cuja percentagem de sementes inteiras após passarem pelo descascador fosse no mínimo 80%. Depois de descascadas, as sementes foram submersas em água por 18h a 20 °C. Após esse período as mesmas foram seccionadas longitudinalmente através do centro embrião, descartando aproximadamente metade da largura da semente. Antes do descarte as duas partes foram examinadas e selecionou-se aquela que apresentou as estruturas do embrião mais visíveis.

Em seguida, duas amostras de 50 sementes, as “melhores metades”, foram colocadas em copos plásticos e imediatamente submersas na solução de tetrazólio 0,1% e levadas à estufa, regulada a 35 °C e mantidas no escuro por 2 h. Atingida a coloração adequada dos embriões, a solução foi eliminada e as sementes lavadas em água corrente e conservadas em água até a avaliação. A visualização das

estruturas foi realizada com auxílio de uma lupa, marca Opton, com capacidade para aumento de até seis vezes.

Para a avaliação, considerou-se uma divisão em quatro classes de viabilidade, observando-se a presença e a localização do dano e das áreas não coloridas, além das condições físicas das estruturas embrionárias. A interpretação baseou-se na coloração das estruturas vitais das sementes de arroz (coleóptilo, plúmula, raízes seminais, radícula e escutelo), de acordo com recomendações da ISTA (2003). Estas estruturas são fundamentais para originar plântulas normais no teste de germinação.

Classe 1 - sementes viáveis de alto vigor: representada pelas sementes que não apresentaram danos ou apresentaram danos leves, com até 1/3 da radícula não coloridas.

Sementes que apresentaram embrião completamente colorido ou apresentando pequenas áreas não coloridas, nas extremidades da radícula ou escutelo, sem atingir a região vital.

Classe 2 - sementes viáveis de médio vigor: representada pelas sementes que apresentaram danos moderados, 1/3 das extremidades do escutelo descoloridas ou 2/3 da radícula não coloridas.

Classe 3 - sementes viáveis de baixo vigor: representada pelas sementes que apresentaram danos severos, raiz primária não colorida ou 1/3 do escutelo mais 2/3 da raiz primária não colorida, sem no entanto, comprometer as regiões vitais.

Classe 4 - sementes mortas e inviáveis, representada pelas sementes que apresentaram danos superiores a 1/3 do escutelo não colorido, raízes seminais e plúmula não coloridas.

Em termos práticos, o somatório das classes 1 a 3 representa as sementes viáveis. Para avaliação do vigor, foram consideradas a classe 1 (denominado TZ vigor1) e o somatório desta com a classe 2 (chamado de TZ vigor2). Visando fornecer subsídios para padronização e repetição desta metodologia foram obtidas imagens de sementes representativas das distintas classes obtidas neste experimento. Para tanto, foram fotografadas individualmente, apresentada em resultados e discussão, utilizando câmera fotográfica digital marca Tucsen, acoplada ao microscópio estereoscópio trinocular. As imagens foram captadas e transferidas para um computador utilizando software Tsvie e utilizadas para ilustrar diferenças quanto ao vigor, evidenciado pela localização dos danos.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott em nível de significância de 5% de probabilidade de erro. Em paralelo, realizou-se análise de correlação linear entre as variáveis respostas utilizadas neste estudo, utilizando o software Winstat (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003).

Para avaliação da eficiência metodológica de condução do teste de tetrazólio para viabilidade, realizou-se comparação entre os resultados obtidos neste teste em cada concentração do sal e tempo de coloração com o resultado do teste de germinação, utilizando a fórmula **Eficiência TZ** = $[1 - (|G - TZ|) / G] 100$, sendo G = % de plântulas normais obtidas no teste de germinação; TZ = % de sementes viáveis obtidas no teste viabilidade pelo TZ.

5.2 Resultados e discussão

Na Figura 11, são apresentadas imagens representativas de cada uma das classes de viabilidade considerados na padronização do teste de tetrazólio para sementes de arroz.

Em sementes de Poaceae, como o arroz, as áreas vitais para a avaliação de viabilidade são: plúmula; coleóptilo, região central do escutelo; radicular e seminal região raízes. Deste modo, as sementes viáveis mostraram coloração avermelhada em áreas vitais e sementes não viáveis apresentaram tecidos de cor branca nas áreas vitais onde a redução do sal de tetrazólio não ocorreu.

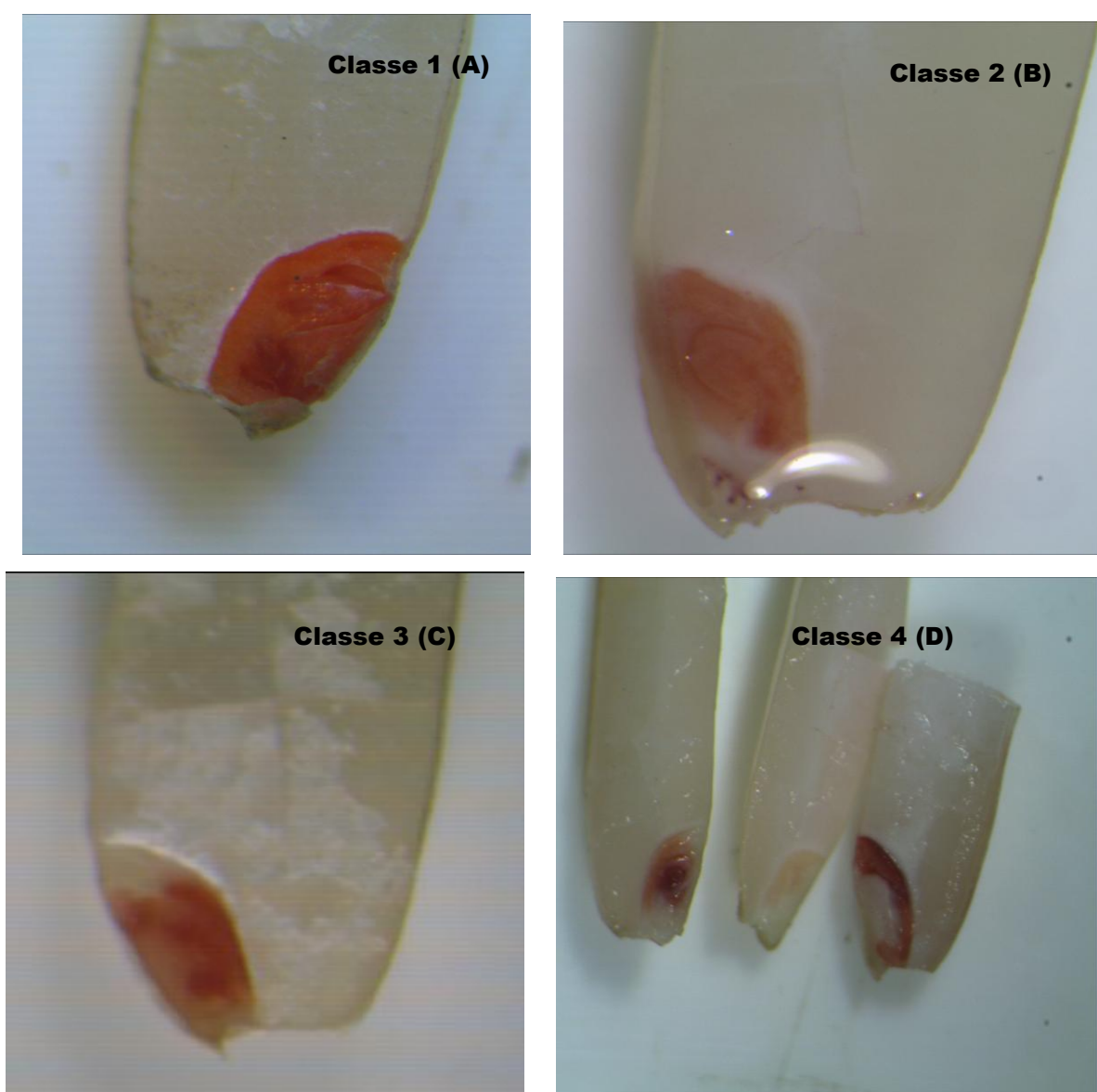


FIGURA 11 - Sementes de arroz submetidas ao teste de tetrazólio: classe 1 (A); classe 2 (B); classe 3 (C); e classe 4 (D).

Para determinar a viabilidade e o vigor das sementes, avaliou-se criteriosamente o embrião, observando principalmente a localização e o tamanho dos danos.

Na Figura 11A é apresentado uma semente de arroz da classe 1. Pode-se observar a coloração uniforme, com todas as estruturas do embrião bem visíveis. A Figura 11B, está representada pela classe 2, percebe-se que a radícula apresenta pelo menos 2/3 não colorida. A classe 3 está representada pela figura 11C, a semente apresenta parte do escutelo não colorido (mais de 1/3) e a classe quatro representada pela Figura 11D, onde observa-se a não coloração total ou parcial de estruturas vitais, indicando sementes não viáveis.

Sementes de soja, feijão e algodão, por sugestão do França Neto et al. (1999); Bhering et al. (1999) e Vieira e Von Pinho (1999), foram classificadas em oito níveis de viabilidade, onde as classes 1 e 2 foram classificadas como o de vigor muito alto, a classe 3 é formada por sementes de vigor médio, as classes 4 e 5 correspondem às sementes viáveis com vigor baixo e muito baixo, respectivamente. As classes 6 a 8 corresponderam às sementes não viáveis. A soma das percentagens das sementes incluídos nas classes 1 a 3 expressam o vigor das sementes. Por outro lado, em sementes de poaceas, geralmente, a classificação é realizada em um menor número de classes como, por exemplo, para milho, Dias e Barros (1999) sugeriram três níveis de vigor, classificando em classe 1 (sementes viáveis e vigorosas), classe 2 (viáveis e não vigorosas) e classe 3 (não viáveis), de acordo com esse autores, para sementes de milho, a classe 1 expressa o vigor. Carvalho et al. (2012) e Fogaça et al.(2011) determinaram quatro níveis de vigor para sementes de trigo e *Sorghum bicolor*, respectivamente, sendo dois níveis de sementes viáveis (viáveis vigorosas e viáveis não vigorosas), e dois níveis de inviáveis (não viáveis e mortas). Outras espécies como melancia e abobrinha foram classificadas por Bhering et al. (2005) e Barros et al. (2005) em cinco classes de viabilidade e Gagliardi e Marcos Filho (2011) classificaram o pimentão em três classes de vigor.

Salienta-se que o importante não é simplesmente realizar a divisão em maior ou menor número de classes, mas sim, conseguir fazê-lo de forma que esta subdivisão consiga estabelecer uma relação direta com o vigor do lote. A divisão em mais classes de vigor para sementes de espécies da família poaceae, como o arroz, é dificultada pelo fato de que a cariopse é ocupada em sua maior parte pelo

endosperma, composto de tecido de reserva, cuja visualização da reação com o sal de tetrazólio não contribui para identificação da viabilidade (danos) das sementes. O embrião, por sua vez, na maioria das espécies encontra-se protegido pelo tecido de reserva, dificultando a sua visualização, em comparação com espécies, como por exemplo, fabáceas, como a soja e o feijão, onde o embrião está totalmente exposto, protegido apenas pelo tegumento, podendo ser visualizado facilmente danos mecânicos ou por umidade e ataques por insetos.

O conteúdo inicial de água dos 10 lotes de sementes utilizados variou de 11,9 a 13,2 % (Tabela 12). Observou-se que as sementes após hidratação (pré-condicionamento) alcançaram teor de água em média de 28%. Os dados apresentados no Capítulo II, demonstraram que teores de água próximos ou superiores a 24%, foram suficientes para obtenção de uma coloração uniforme e adequada para visualização das estruturas do embrião no teste de tetrazólio. Em milho, teores de água a partir de 19,5 % foram suficientes para coloração dos tecidos pelo teste de tetrazólio (CHAMMA e NOVEMBRE, 2007). Para Novembre (2006), teores de água próximos ou superiores a 25% são suficientes para a reestruturação do sistema das membranas celulares em sementes de braquiária, ou seja, adequada para adquirirem coloração no teste de tetrazólio.

Tabela 12 - Teor de água inicial das sementes (sem remoção da pálea e lema), após remoção da pálea e lema (ARPL) e após hidratação (pré-condicionamento) das cariopses (AHC).

Lotes	Teores de água (%)		
	Inicial	ARPL	AHC
01	13,0	13,6	27,8
02	13,2	13,5	28,8
03	13,0	13,6	28,4
04	13,2	13,6	29,1
05	13,2	13,4	28,7
06	12,9	13,8	28,1
07	12,6	12,8	26,6
08	11,9	12,2	26,5
09	13,0	13,2	29,1
10	13,2	13,4	28,4
Média	12,9	13,3	28,1

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados dos testes de viabilidade obtidos pelo teste de germinação e tetrazólio e a eficiência do teste de tetrazólio.

A análise dos dados do teste de germinação permitiu separar os lotes em dois grupos. Observou-se que os valores médios variaram entre 95 e 89%. Sendo que o grupo de maior qualidade apresentou germinação de 94 e 95%, enquanto que o resultado dos demais lotes foi entre 89 e 92%, estando, porém todos acima do padrão de comercialização de sementes, o qual é superior a 80%, estabelecido pela Instrução Normativa n.º 45 (BRASIL, 2013). Apesar do teste de comparação de médias ter separado os lotes em dois grupos, verificou-se que os valores médios foram similares, apresentando diferença máxima de apenas seis pontos percentuais (pp) entre os lotes de maior (95%) e menor germinação (89%), o que justifica a utilização destes lotes para o estudo. A avaliação do vigor permite a detecção de possíveis diferenças na qualidade fisiológica entre lotes que apresentam poder germinativo semelhante e que podem exibir comportamentos distintos em condições de campo ou mesmo durante o armazenamento (FLÁVIO e DE PAULA, 2010).

Tabela 13 - Dados médios (%) da germinação (G), viabilidade pelo teste de tetrazólio e eficiência do teste de tetrazólio em dez lotes de sementes de arroz, cultivar BR Irga 424.

LOTES	G	TZ VIAB	EFICIÊNCIA
01	95 a	93 b	97,9
02	90 b	89 b	98,9
03	90 b	95 a	93,7
04	94 a	93 b	98,9
05	94 a	90 b	96,1
06	94 a	98 a	96,1
07	92 b	98 a	93,1
08	94 a	92 b	97,9
09	90 b	89 b	98,9
10	89 b	89 b	100
cv	4,16	2,73	

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Semelhantemente ao teste de germinação, a viabilidade obtida pelo teste de tetrazólio os lotes em dois grupos. Observou-se que houve semelhança numérica entre os resultados encontrados no teste de germinação, embora o teste de

comparação de médias aplicado tenha indicado que apenas os lotes 2, 6, 9 e 10 eram similares entre si e superiores aos demais. Resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2010) em sementes de pepino ao identificarem diferença na avaliação da viabilidade pelo teste de TZ e germinação, no entanto, observaram proximidade numérica entre os valores nestes testes e consideraram que essas diferenças foram irrelevantes.

Pela análise da eficiência do teste de TZ viabilidade observou-se que nos lotes 3 e 7 a eficiência foi menor em relação aos demais lotes. Nota-se que nestes lotes a viabilidade pelo teste de TZ foi superestimada, o que é normal no teste de tetrazólio, pois o mesmo não detecta, por exemplo, presença de sementes infectadas por fungos, que podem reduzir o resultado no teste de germinação.

O teste de primeira contagem de germinação, emergência de plântulas, teste de frio, envelhecimento acelerado, germinação a 30 °C e vigor pelo teste de tetrazólio dos dez lotes de sementes de arroz analisados, cultivar BR Irga 424, estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14 - Dados médios da primeira contagem de germinação (PCG), emergência de plântulas (EP) teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA), germinação a 30 °C e vigor pelo teste de tetrazólio (TZ vigor 1 e TZ vigor 2), em dez lotes de sementes de arroz, cultivar BR Irga 424.

LOTES	PCG	EP	TF	EA	G 30°C	TZ VIGOR 2	TZ VIGOR 1
-----%-----							
01	87 a	91 b	75 b	90 a	92 a	91 b	85 b
02	78 b	85 c	80 b	88 a	86 b	89 b	83 b
03	81 b	85 c	77 b	86 a	87 a	88 b	85 b
04	88 a	93 b	81 a	62 d	84 b	91 b	90 a
05	82 a	91 b	82 a	83 b	86 b	86 b	81 b
06	92 a	95 a	84 a	86 a	82 b	97 a	94 a
07	85 a	91 b	79 b	82 b	90 a	98 a	91 a
08	87 a	97 a	80 b	83 b	91 a	89 b	79 b
09	84 b	91 b	83 a	73 c	80 b	87 b	80 b
10	84 b	91 b	82 a	56 e	80 b	84 b	83 b
CV	4,24	2,42	3,25	3,87	3,68	3,22	5,00

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

TZ VIGOR 1 – Percentagem de sementes Classe 1

TZ VIGOR 2 - Percentagem de sementes Classe 1 e 2

O teste de primeira contagem da germinação separou os lotes em dois grupos apresentando resultados que variaram de 78 a 92% (Tabela 14). Confrontando os resultados com os do TZ vigor 2 e TZ vigor 1, observou-se que os lotes 2, 3, 6, 7, 9 e 10 foram ranqueados da mesma forma, indicando similaridade. Nakagawa (1999) afirma que o teste de primeira contagem de germinação pode ser usado como um teste de vigor, pois, à medida que a deterioração da semente avança, a velocidade da germinação é reduzida. Dessa forma, os lotes mais vigorosos são os que apresentam maior percentagem da sua primeira contagem do teste de germinação.

Quanto ao teste de emergência de plântulas, observou-se que este foi sensível para ranquear os lotes, separando-os em três níveis de vigor, sendo os lotes 6 e 8, os de alto vigor (valores entre 95 e 97%), 1, 4, 5, 9 e 10 de vigor intermediário (valores entre 91 e 93%) e os lotes 2 e 3 de vigor inferior (85%). Os valores observados no teste de emergência podem ser considerados altos, provavelmente em função de que as condições durante a realização do teste terem sido favoráveis, possivelmente em condições adversas poderia ter sido observado uma maior estratificação entre os lotes testados. Os lotes 1, 4, 5, 6, 9 e 10 apresentaram a mesma classificação pelo teste de TZ vigor 1, o que significa dizer que 60% dos lotes apresentaram classificação semelhante à obtida pelo teste de emergência de plântulas. Para o teste TZvigor 2, este percentual foi de 50%.

No teste de frio, os lotes também foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo com qualidade superior apresentou valores entre 81 e 84%, enquanto que no grupo de menor qualidade observaram-se resultados entre 75 e 80%. Apesar do teste de frio ser recomendado para avaliação do vigor em sementes de arroz e ter classificado os lotes em dois níveis de vigor, como no teste de TZ vigor1 e TZ vigor2, somente 50% dos lotes obtiveram o mesmo ranqueamento.

Quanto ao teste de envelhecimento acelerado, verificou-se que o mesmo separou os lotes em cinco níveis de vigor. Os resultados mostraram diferenças importantes na qualidade dos lotes, principalmente porque estas pareciam ser muito pequenas e de difícil distinção pelos demais testes. Observou-se semelhança estatística com o teste de vigor pelo TZ apenas nos lotes 5, 6 e 8. Os resultados deste teste foram numericamente inferiores aos valores encontrados nos demais testes. Segundo Torres e Marcos Filho (2005) o alto grau de umidade das sementes propicia a deterioração das sementes, originando plântulas anormais e sementes mortas.

Semelhantemente ao teste de emergência de plântulas, no teste de germinação a 30 °C, observou-se conformidade na análise estatística em seis lotes (2, 4, 5, 7, 9 e 10), comparativamente ao TZvigor 2, o que significa que 60% dos lotes tiveram o mesmo ranqueamento e 50% para TZvigor 1. Apesar da germinação a 30 °C ser recomendado pelas RAS para sementes de arroz, a avaliação foi realizada mediante contagem única, verificando com isso que o teste reduziu o desempenho das sementes sendo portanto considerado como teste de vigor nesse experimento.

Os dados referentes a análise de correlação estão apresentados na Tabela 15. Não foi possível observar correlação linear significativa entre os testes de emergência de plantas e o TZvigor1 representado pela classe 1, sendo um indício de que esta classe não se mostrou suficientemente robusta para ranquear lotes quanto ao vigor.

Tabela 15 - Coeficientes de correlação de Pearson entre os resultados dos testes de emergência de plântulas (EP), primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), tetrazólio viabilidade (TZ viab.), tetrazólio vigor 1 (TZ vg 1), tetrazólio vigor 2 (TZ vg 2), teste de frio (TF), envelhecimento acelerado (EA) e germinação a 30 °C (G 30 °C) aplicados em 10 lotes de sementes de arroz, cultivar BR Irga 424.

	PCG	G	TZ viab.	TZ vg 1	TZ vg 2	TF	EA	G 30 °C
EP	0,79**	0,677**	0,300 ^{ns}	0,243 ^{ns}	0,356 ^{ns}	0,352 ^{ns}	-0,067 ^{ns}	0,209 ^{ns}
PCG	1	0,678**	0,624**	0,594**	0,552**	0,354 ^{ns}	0,031 ^{ns}	0,231 ^{ns}
G		1	0,369*	0,441*	0,446*	0,189 ^{ns}	0,291 ^{ns}	0,523**
TZ viab.			1	0,821**	0,831**	0,147 ^{ns}	0,308 ^{ns}	0,371*
TZ vg1				1	0,811**	0,292 ^{ns}	0,101 ^{ns}	0,229 ^{ns}
TZ vg 2					1	0,117 ^{ns}	0,362*	0,406*
TF						1	0,232 ^{ns}	-0,273 ^{ns}
EA							1	0,595**

* e ** Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de T.

ns – Não significativo

Por outro lado o TZ vigor 2 representado pelo somatório das classes 1 e 2 apresentou correlação linear significativa com as variáveis PCG, G, TZ viab, EA e G 30 °C, porém não verificou-se correlação significativa em relação ao teste de frio e emergência de plântulas, evidenciando que o teste não é suficientemente sensível para detectar diferenças no vigor em lotes de sementes de arroz. As baixas correlações observadas não podem ser consideradas como falta de associação entre alguns testes de vigor e as metodologias utilizadas do TZ vigor, mas sim que estas apresentam subjetividade na avaliação e enquadramento nas distintas

classes, indicando necessidade de ser encontrado uma metodologia capaz de tornar o processo padronizado e reproduzível. Para que a correlação possa ser efetivamente usada para decidir a melhor metodologia, os lotes devem preferencialmente apresentar correlação linear significativa com o teste de emergência de plântulas, pois, segundo McDonald (1980) um teste de vigor deve entre outros correlacionar-se com o desempenho em campo.

Na literatura são encontrados relatos da eficiência de TZ para avaliação do vigor de sementes, dentre os quais podem ser elencados pesquisas com soja (FRANÇA NETO et al., 1998) sorgo (FOGAÇA et al., 2011), trigo (CARVALHO et al., 2012) melancia (BHERING et al., 2005), abobrinha (BARROS et al., 2005) e pimentão (GAGLIARDI e MARCOS FILHO, 2011), evidenciando que há potencialidade do mesmo para esta finalidade, sendo necessário ajuste de procedimento.

A calibração de um teste de vigor é uma atividade que requer, em muitos casos, acentuada repetição metodológica, pois pequenas variações na metodologia estudada podem representar significativas diferenças no resultado final. Saliencia-se que neste trabalho, conforme mencionado, o teste de emergência de plântulas foi realizado em condições favoráveis. Possivelmente o baixo nível de estresse a que as sementes foram expostas durante este teste, não foi efetivo para a estratificação dos lotes. Esta é apenas uma das possíveis causas de não terem sido encontrados resultados plenamente satisfatórios, somado a aspectos como a subjetividade no enquadramento em uma ou outra classe proposta, além da própria subdivisão de classes, aspectos que remetem sobremaneira a subjetividade na avaliação, os quais não são buscados quando objetiva-se padronização de procedimentos e reprodutibilidade de resultados.

5.3 Conclusões

O teste de tetrazólio para determinação do vigor em sementes de arroz é promissor, no entanto, nesta pesquisa, os critérios utilizados para a determinação do vigor não foram eficientes para diferenciar satisfatoriamente os lotes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do arroz destaca-se pela importância que possui no cenário mundial e nacional. Especificamente, no Brasil, a produção concentra-se nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Destaca-se que o potencial produtivo da espécie facilmente ultrapassa 10 toneladas por hectare, apesar da taxa de utilidade de sementes ser considerado baixa (42%). Por outro lado, sabe-se que há uma relação direta, para a maioria das culturas, entre qualidade da semente utilizada e a produtividade.

Para tanto, universidades e instituições de pesquisas públicas e privadas têm desenvolvido pesquisas no intuito de desenvolver e aprimorar métodos e procedimentos para aferir a qualidade das sementes. A indústria sementeira, por sua vez, tem demanda por métodos que sejam eficientes e rápidos, se possível, capazes de fornecer resultados em poucas horas.

Neste contexto, enquadra-se o teste de tetrazólio, largamente utilizado na cultura da soja, tanto para avaliação de viabilidade quanto para vigor. No caso do arroz, a utilização deste teste é menos frequente, e restrito à viabilidade. Soma-se a isso, o fato de que a metodologia tradicionalmente utilizada demanda praticamente 24 horas para sua conclusão.

Considerando os dados obtidos neste estudo, foi possível verificar que é possível reduzir significativamente o tempo para condução deste teste, realizando alguns ajustes no procedimento metodológico tradicional. Primeiramente é necessário realizar o descascamento das sementes (remoção de pálea e lema), podendo ser utilizado descascador mecânico para agilizar o processo. A forma de realizar o corte das sementes também influencia o processo, sendo recomendado que seja realizado longitudinalmente na metade distal do eixo embrionário.

Assim, o período de execução do teste de tetrazólio para sementes de arroz pode ser reduzido para Três horas, utilizando hidratação por 1h das sementes previamente descascadas por 1h a 40°C, quando as sementes atingem teores de água de aproximadamente 24%, realizar corte e avaliação por 1h e coloração por 1 h com solução de sal de tetrazólio com concentrações de 0,25 a 1,0%, inferindo-se com isso que teste de tetrazólio modificado é eficiente para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de arroz. Neste estudo foi constatada a possibilidade da

redução na execução do teste de tetrazólio de sementes de arroz de 21 para três horas, obtendo-se um ganho de 18h em relação às indicações das Regras para Análise de Sementes.

O simples conhecimento da germinação (ou viabilidade) de um lote de sementes embora importante, em muitos casos, não é suficiente, principalmente quando é adotado um rigoroso controle interno de qualidade pelas empresas sementeiras. Outra situação semelhante é quando os agricultores são tecnificados, portanto conhecedores da importância de se utilizar sementes de qualidade, sendo necessário conhecer parâmetros indicativos do vigor do lote.

Vários testes são utilizados com esta finalidade, inclusive o próprio teste de tetrazólio em diversas culturas. Porém, no caso do arroz, são necessárias mais pesquisas para visando aprimoramento da metodologia utilizada para determinação do vigor pelo teste de tetrazólio.

REFERÊNCIAS

AMARAL, A. S. Testes rápidos para estimar a germinação de sementes. **Lavoura Arroeira**, v. 44, n. 397, p. 10 – 14. 1999.

ANDRADE, R. N. B.; SANTOS, D. S. B.; SANTOS FILHO, B.G.; MELLO, V.D.C. Testes de germinação e de tetrazólio em sementes de cenoura armazenadas por diferentes períodos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.18, n.1, p.108-116, 1996.

AOSA - Association of Official Analysts. **Tetrazolium Testing Handbook**. Assoc.Offic. Seed Analyst, Ithaca, 2003.

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Tetrazolium Testing Handbook**. Assoc.Offic. Seed Analyst, Ithaca, 2010.

BARROS, D. I.; DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. S. & ARAÚJO, E. F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**. 27: 165-171, 2005.

BHERING, M. C.; SILVA, R.F.; ALVARENGA, E.M.; DIAS, D.C.F.S. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.8.3, p.1-10.

BHERING, M. M.; DIAS, D. C. F. S.; BARROS, D.I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.176-182, 2005.

BITTENCOURT, S. R. M ; VIEIRA, R. D. Metodologia do teste de tetrazólio em amendoim. In : KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 8.2, p. 1-8.

BRASIL. **Glossário ilustrado de Morfologia**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuaria. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 406 p.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 45 de 17 de setembro de 2013. **Padrões para a produção e a comercialização de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.)**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 183, 20 set. 2013.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V.; SASMAgri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24, 2001.

CARVALHO, I. L.; ALVES, C. X.; MENEZES, N. L. Teste de tetrazólio em sementes. In: SCHUCH, L. O.B.; VIEIRA, J. F.; RUFINO, C. A; ABREU JUNIOR, J. S. **Sementes: produção, qualidade e inovações tecnológicas**. Pelotas, 2013a, P. 171-200.

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

CARVALHO, T. C. ; KRZYZANOWSKI, F. C.; OHLSON, O. C.; PANOBIANCO, M. Improved assessment of wheat seeds vigor. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 6, p. 608-614, 2012.

CARVALHO, N. M. ; DA SILVA, J. B.; SILVEIRA, C. M. DA, HORVAT, R.A. Método alternativo para submeter sementes de amendoim à solução de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n.1,18-22, 2009.

CERVI, F.; MENDONÇA, E.A.F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.177-186, 2009.

CHAMMA, H. M. C. P.; NOVENBRE, A. D. L. C. Teste de tetrazólio para as sementes de milho: período de hidratação e de coloração das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 125-129, 2007.

CICERO, S. M.; Aplicação de imagens radiográficas no controle de qualidade de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.3, p.48-51, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: Sexto levantamento grãos safra 204/22015 - março 2013**. Disponível

em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>> Acesso em: agosto de 2015.

COSTA, C. J.; SANTOS, C. P. DOS. Teste de tetrazólio em sementes de leucena. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 66-72, 2010.

COSTA, N. P. da; 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, 1998.

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A. A. **Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em semente de soja- série sementes**. Londrina: Embrapa, 2007 (circular técnica, 39).

COSTA, N. P. ; MARCOS-FILHO, J. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seeds. **Seed Science and Technology**, v. 22, p.9–17, 1994.

DELOUCHE, J. C. Qualidade e desempenho da semente. **Revista Seed News**, Pelotas, v.9, n.5, 2005.

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. 103 p.

DIAS, D. C. F. S.; BARROS, D.I.; BHÉRING, M. C.; ARAÚJO, E.F.; DIAS, L.A.S. Teste de tetrazólio em sementes de abóbora. **Informativo ABRATES**, v.11, n.2, p.124, 2001.

DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste e tetrazolio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.152-158, 2008a.

DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazolio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.145-151, 2008b.

DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A.S.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 8.4, p.1-10.

ELIAS, S.G; COPELAND, L.O; McDONALD, M.B; BAALBAKI, R.Z. **Seed testing: principles and practices**, Michigan, 2012.

EMBRAPA Clima Temperado: **Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil, 2005: Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>. Acesso em: agosto de 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Rice Market Monitor**. V.16, n.2, 2013.

FLÁVIO J.J.P, PAULA R.R DE. Testes de envelhecimento acelerado e de condutividade elétrica em sementes de *Dictyoloma vandellianum* A. Juss. **Scientia Forestalis** , v.38, n. 87, p.391- 399,2010.

FOGAÇA, C. A.; COSTA, R.S.; SIMONI, F.; GEROLINETO E. Teste de tetrazólio em sementes de *Sorghum bicolor* L. – Poaceae. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, V. 11 – N. 1, p. 1519-5228, 2011.

FONSECA, N. R.; FAGIOLI, M. Comparação da precisão dos resultados do teste de tetrazólio usando a metodologia alternativa e a tradicional em sementes de soja. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, p. 47-55, 2008.

FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

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

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

FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. Cap 8.5, p.1-27, 1999.

FRANCO, D. F.; PETRINI, J. A. **Testes de vigor em sementes de arroz**. Brasília. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2002. (Comunicado Técnico, 68).

FRANCO, D.F.; ELIAS, M.C.; MAGALHAES JUNIOR, A.M de. **Produção e avaliação da qualidade de sementes de arroz Irrigado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011.

GAGLIARDI, B.; MARCOS FILHO, J. Assessment of the physiological potential of bell pepper seeds and relationship with seedling emergence. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1 p. 162 - 170, 2011.

GRABE, D.F. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Brasília, DF: AGIPLAN. 1976. 86p

GRZYBOWSKI, C. R. S.; OHLSON, O. C.; SILVA, R. C.; PANOBIANCO, M. Viability of barley seeds by the tetrazolium test. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1 p. 47 - 54, 2012.

GUIMARÃES, C. M.; SANTOS, A. B.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; STONE, L. F. Sistemas de cultivo. In: Santos, A.B. dos; Stone, L.F.; Vieira, N. R. de A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. revista e ampliada . Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 53-96, 2006.

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

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. **International Rules for Seed Testing**. In: Chapter 6: Biochemical Test for Viability, The Topographical Tetrazolium Test. Bassersdorf: ISTA, 2007.46p.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. **The rice grain and its gross composition**. In: JULIANO, B.O. (Ed.). Rice: chemistry and technology. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985. Cap.2, p.17-57.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANCA NETO, J. B. Vigor de Sementes. Seed News, Pelotas, n. 11, p. 20-21, 1999.

LIMA, C. B.; BELLETTINI, N. M. T.; JANANI, J. K.; SILVA, A. S.; AMADOR, T. S.; VIEIRA, M. A. V.; CHEIRUBIM, A. P. Metodologias do Teste de Tetrazólio para

sementes de Melão (*Cucumis melo* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 744-746, 2007.

LIMA, L.B.; PINTO T. L. F.; NOVENBRE A. D. L. C.. Avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de pepino pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.1, p. 060-068, 2010.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows. WinStat. Versão 2.0.** UFPel, 2003.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina-PR: 2. ed., 2015. 660p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARCOS FILHO, J. Testes de VIGOR: dimensão e perspectivas. **Revista Seed News**, janeiro/fevereiro, 2011.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: ESALQ, 1987. 230 p.

MARCOS FILHO, j.; KIKUTI, A. L. P.; LIMA, L. B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo análise computadorizada de imagens. **Revista brasileira de sementes**, v. 31, n. 1, 102-112, 2009.

McDONALD, M.B. Assessment of seed quality. **Horticultural Science**, v.15, p.784-788, 1980.

MENEZES, N. L.; FRANZIN, S.M; BORTOLOTTO, R. P. Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de superação. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.7, n.1, p.35- 44, 2009.

MIELEZRSKI, F. SCHUCH, L.O.B.; PESKE, S.T.; PANOZZO, L.E.; CARVALHO, R.R.; ZUCHI, J. Desempenho em campo de plantas isoladas de arroz híbrido em função da qualidade fisiológica das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n.3, p.87-95, 2009.

MOORE, R. P. **Tetrazolium testing handbook**. Raleigh: North Carolina State University, 1977.

NAKAGAWA, J. **Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas**. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999.

NEDEL, J.L.; SCHUCH, L.O.B.; ASSIS, F.N.; CARMONA, P.S. A planta de arroz: morfologia e fisiologia. In: PESKE, S.T.; SCHUCH, L.O.B.; BARROS, A.C.S.A. Ed. **Produção de arroz irrigado**. 3ed. Pelotas: Universitária/UFPel, 2004.

NOVEMBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P.; GOMES, R.B.R. Viabilidade das sementes de braquiária pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.2, p.147-151, 2006.

NUNES, C.D.M. **Importância do uso de sementes de boa qualidade de arroz irrigado para safra 2011/2012**. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/noticias/?q=24022#24022>>. Acesso em: agosto de 2015.

PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G. E. (Orgs.) **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**. 3. ed. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 2012. p. 13-104.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. ; VALENTINI, S. R. T. Teste de tetrazólio. In: SILVA, A.; PIÑA-RODRIGES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.). **Manual de análise de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p. 61 - 73. (Série Registros, 14).

PINTO, T. L. F.; MONDO, V. H. V. GOMES JÚNIOR, F. G. CICERO, S. M. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 3, p. 310-316, 2012.

PINTO, T. L. F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; GOMES JÚNIOR, 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.

SANTOS, M.A.O; NOVEMBRE, A.D.L.C AND MARCOS-FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, v.35, p.213-223, 2007.

SANTOS, S. R. G. ; DE PAULA, R. C.; FOGAÇA, C. A.; MÔRO, F. V.; COSTA, R. S. Viabilidade de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – Euphorbiaceae – pelo teste de Tetrazólio. **Científica**, v.34, n.1, p.39-45, 2006.

SILVA, R. C.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; FRANCA-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.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. In: XXX Reunião técnica da cultura do arroz irrigado, Bento Gonçalves, RS, 2014. **Anais...** Porto Alegre: SOSBAI, 2014.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. de 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, 2010a.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. de C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia branca pelo teste de tetrazolio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4,p.174-180, 2010b.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. DE C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia preta pelo teste de tetrazolio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.3,p.57-62, 2009.

TORRES, S.B; MARCOS FILHO, J. Physiological potencial evalution in melon seeds (*Cucumis melo* L.). **Seed science and Tecnology**, v. 33, n. 2, p.341-350, 2005.

TUNES, L. M; BADINELLI, P. G; OLIVO, F.; BARROS, A. C. S. A. Tratamentos para superação da dormência em sementes de cevada. **Scientia Agraria**, v.10, n.1, p.15-21, 2009.

VIEIRA, M. G. G. C.; VON PINHO, E. V. R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

VIEIRA, N.R. de A.; RABELO, R.R. Qualidade tecnológica. In: SANTOS, A.B. dos; STONE, L.F.; VIEIRA, N.R. de A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2.ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p.869-900

ZONTA, J. B.; SOUZA, L. T.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. **Idesia**, v.27, n.2, p.17-23, 2009.

ZORZAL, T. A.; FANTINATO, D. E.; CAMPOS, L. M.; LUZ, A. C. C. da; CORTE, V. B. Teste do tetrazólio para estimativa da viabilidade de sementes. **Natureza online**, v.13, n.3, p.144-149, 2015.