

PRÉ-CONDICIONAMENTO PARA TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DA CULTIVAR BRS ENERGIA

Maria do Socorro Rocha^{1,2}, Maria Isaura P. de Oliveira², Napoleão Esberard de M. Beltrão², Julita Maria F.C. Carvalho², Francisco de A.C. Almeida¹, Riselane de L.A. Bruno¹, Edilma P. Gonçalves¹

¹UFPB, marialirium@hotmail.com, ²Embrapa Algodão, napoleao@cnpa.embrapa.br

RESUMO - Objetivou-se com este trabalho estudar a metodologia do teste de tetrazólio para sementes da BRS Energia, determinando as melhores condições de temperatura, período de coloração e concentração de solução de tetrazólio. As sementes foram submetidas aos métodos de pré-condicionamento: embebição em papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco em germinador a 25 °C por 14 e 16 horas e escarificação manual. Após corte longitudinal na porção distal ao eixo embrionário, os tegumentos das sementes foram retirados manualmente e os embriões imersos em soluções de tetrazólio a 0,025; 0,050; 0,075 e 0,1% a 30 e 40 °C, por 1, 3 ou 6 horas, no escuro. Avaliou-se ainda a coloração de sementes com tegumento a 30 e 40 °C, previamente embebidas em água destilada por 12 horas a 30 °C. O método utilizando escarificação manual e posterior embebição em água por 12 horas a 40°C apresentou eficiência no pré-condicionamento de sementes de BRS Energia e a concentração 0,05% da solução de tetrazólio por 3 h, permite avaliar a qualidade de lotes de sementes dessa espécie. Utilizando-se o protocolo acima descrito, avaliou-se a adequação do teste de tetrazólio para estimar a viabilidade de sementes de mamoneira através da comparação com o teste de germinação. A comparação não resultou em diferenças significativa entre eles, o teste de tetrazólio utilizando solução a 0,05 % por 3 horas pode ser realizado na estimativa da viabilidade de sementes do cultivar BRS Energia.

Palavras-chave: Sementes de mamona, teste de tetrazólio, germinação, viabilidade.

INTRODUÇÃO

O teste de germinação é o principal método na determinação da viabilidade de sementes, por apresentar procedimentos padrões e por informar a porcentagem total de sementes viáveis (MARCOS FILHOS, 1987). Todavia, outros testes como de tetrazólio poderá ser usado para determinar a viabilidade de sementes com vantagem em relação ao teste de viabilidade de sementes, germinação vista que pode se obter, em laboratório (MENDONÇA et al. 2001).

A eficiência do teste em avaliar o vigor e a viabilidade das sementes está relacionada ao desenvolvimento de metodologias adequadas para cada espécie, de modo a definir as condições mais apropriadas para o preparo, pré-condicionamento e coloração das sementes. Nesta etapa do teste a temperatura e o período de pré-condicionamento são fatores essenciais.

Objetivou-se com este trabalho estudar metodologia do teste de tetrazólio para sementes da cultivar BRS Energia, determinando as melhores condições de temperatura, período de coloração e concentração da solução de tetrazólio.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Paraíba, utilizando-se sementes BRS Energia de diferentes lotes. As sementes foram obtidas no campo experimental da EMBRAPA em Barbalha, CE, safra, 2007.

As sementes foram submetidas aos seguintes métodos de pré-condicionamento para a remoção do tegumento: embebição em papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco em germinador a 25 °C por 14 e 16 horas, imersão direta em água em B.O.D. a 40°C por 30, 40 e 60 minutos. Após cada tratamento, o tegumento das sementes foi removido manualmente, fazendo-se um pequeno corte com estilete na extremidade oposta ao eixo embrionário. Em seguida, as sementes foram novamente imersas em água e mantidas em B.O.D. 30 a 40 °C por 12, 24, 36 e 60 minutos para a remoção da membrana fina remanescente (endosperma/perisperma), que envolve o embrião. Após a retirada desta membrana, realizando-se um pequeno corte com estilete de modo semelhante ao empregado para a retirada do tegumento, os embriões foram imersos para coloração em solução de 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 trifetil cloreto de tetrazólio, durante 30, 40 e 60 minutos, no escuro, a 40°C. Após cada período, foram, então, lavados em água corrente e avaliadas.

Os embriões foram analisados individualmente, externa e internamente, após o seu seccionamento longitudinal, entre os cotilédones, tomando-se o cuidado para que o eixo embrionário fosse dividido longitudinalmente. Observou-se a ocorrência de danos nas faces interna e externa dos cotilédones e do eixo embrionário, dando atenção especial à profundidade e localização de cada dano e à sua distância em relação ao eixo. A interpretação foi feita com auxílio de lupa de seis aumentos (6x), com iluminação fluorescente.

Paralelamente, foram conduzidos testes de germinação, seguindo-se os procedimentos estabelecidos pelas RAS (BRASIL, 1992). Os tratamentos foram repetidos tantas vezes quantas necessárias, até que fosse possível elaborar um critério seguro para a interpretação do teste de tetrazólio, quanto à viabilidade e ao vigor da semente, cujos resultados apresentassem coerência com os valores obtidos para plântulas normais e anormais e sementes mortas nos testes de germinação. A germinação foi conduzida em rolo de papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, utilizando-se quatro subamostras de 50 sementes em germinador à temperatura de 25 °C. As avaliações foram realizadas aos sete e 14 dias após a semeadura,

computando-se as plântulas normais, anormais e sementes mortas, conforme as RAS (BRASIL, 1992), sendo os resultados expressos em porcentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes não submetidas a qualquer pré-condicionamento (embebição e remoção do tegumento), não absorveram a solução de tetrazólio, conservando a coloração original, independentemente das concentrações da solução de tetrazólio e do tempo de reação estabelecida, resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al (2006) em sementes de mamona das cultivares Guarani e IAC-80, que atribuíram a desuniformidade ou ausência de coloração à presença dos tegumentos.

Para o pré-condicionamento verificou-se que, dentre os procedimentos testados para a remoção do tegumento, a imersão das sementes em água a 30 °C e 40 °C por 12, 24, 36 e 48 horas, respectivamente, tornou difícil a remoção do tegumento (Tabela 1). A imersão direta em água por 12 e 24 horas a 40 °C ocasionou morte dos eixos embrionário e por 24 horas a 30 °C reduziu 30% sua viabilidade (Tabela 1 e Figura 1).

Na Tabela 2 constam as avaliações das combinações de temperatura, concentração e período de exposição das sementes a solução de tetrazólio. Observa-se que a 30 °C o tempo mínimo para as sementes adquirir coloração adequada foi 3 horas 1% e a 40 °C, em solução a 0,05%, sendo possível realizar as avaliações em curto período de tempo e com menor gasto do sal de tetrazólio.

Verificou-se ainda que as sementes da cultivar BRS Energia, após o condicionamento e preparo desenvolveram coloração rósea nos tecidos vigorosos em todas as concentrações (Figura 2A, B, C e D). O teste de tetrazólio reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Pela hidrogenação do 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio é produzida nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifenil formazan. Isto torna possível distinguir as partes vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor. Este teste tem sido aceito, segundo Deswal e Chand (1997), não somente como uma técnica para estimar a viabilidade, mas também o vigor das sementes.

Segundo Krzyzanowski et al. (1999), a escolha de metodologia adequada para o emprego do teste de tetrazólio deve se basear na facilidade para a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis e na capacidade de diferenciar lotes de qualidade fisiológica distintas. Desta maneira, o teste de tetrazólio utilizando a concentração de 0,05% pode ser usado como um complemento ao teste de germinação em sementes de BRS Energia.

CONCLUSÃO

Para determinar a viabilidade de sementes da cultivar BRS Energia recomenda-se o pré-condicionamento diretamente em água destilada por 12 horas a 30 °C, com posterior retirada do tegumento e embebido em solução de tetrazólio na concentração de 0,05% em estufa a 40 °C por 3 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: CLAV/DNDV; SNAD/MA, 1992. 365 p.

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

KRZYZANOWSKI, F.; VIEIRA, R. D.; FRANCA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

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

MENDONÇA, E. A. F.; RAMOS, N. P.; PAULA, R. C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2001.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; CALDEIRA, C. M.; SILVA, C. D.; SILVA, D. G. Teste de Tetrazólio em Sementes de Mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão. 2006. 1 CD-ROM.



Figura 1. Sementes da BRS Energia, com os eixos embrionários mortos, quando imersos diretamente em água por 12 e 24 horas a 40 °C e por 24 horas a 30 °C.

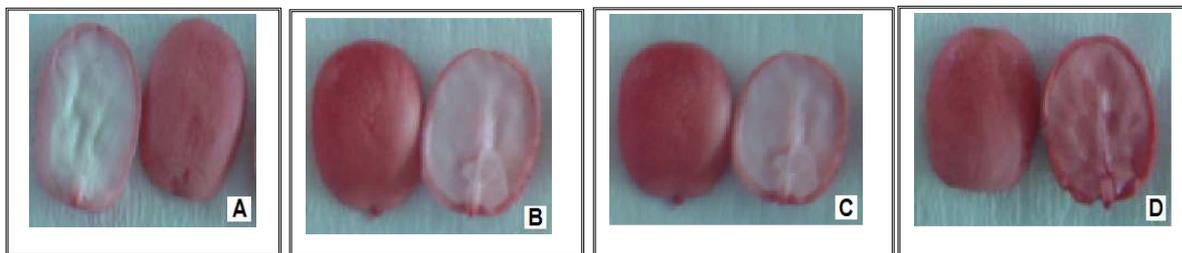


Figura 2. Coloração de sementes da Cultivar BRS Energia submetidas a diferentes concentrações de tetrazólio. **A:** Coloração fraca (0,025%); **B:** Coloração adequada (0,05 %); **C:** Coloração adequada (0,075 %); **D:** Coloração excessiva (0,1 %).

Tabela 1. Viabilidade (%) de sementes da BRS Energia, em função de temperaturas e períodos de condicionamento.

Período (h)	30 °C		40 °C	
	Rolo de papel	Água	Rolo de Papel	Água
12	-	97	-	0
24	-	32	-	0
36	34	-	70	-
48	36	-	78	-

Tabela 2. Avaliação da coloração das sementes da cultivar BRS Energia em função da temperatura, da concentração da solução e do período de exposição em solução de tetrazólio.

Temp. (°C)	Conc. (%)	Período de avaliação (h)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
30	0,025	SC ¹	SC ¹	CF ²	CA ³				
	0,050	SC ¹	CF ²	CF ²	CF ²	CF ²	CA ³	CA ³	CA ³
	0,075	SC ¹	CF ²	CF ²	CF ²	CA ³	CA ³	CA ³	CE ⁴
	0,100	CF ²	CF ²	CA ³	AD ³	AD ³	CE ⁴	CE ⁴	CE ⁴
40	0,025	SC ¹	CF ²	CF ²	CF ²	CF ²	CA ³	CA ³	CA ³
	0,050	CF ²	CF ²	CA ³	CA ³	AD ³	CA ³	CE ⁴	CE ⁴
	0,075	CF ²	CF ²	CA ³	CA ³	CE ⁴	CE ⁴	CE ⁴	CE ⁴
	0,100	AD ³	CE ⁴						

¹SC: Sem Coloração (ausência total de coloração); ²CF: Fraca (leve coloração rósea em toda a superfície da sementes); ³CAD: Adequada (boa tonalidade de rósea); ⁴CEX: Coloração Excessiva.