

A INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE MILHO COM O EMPREGO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DE IMAGENS

VIEIRA, P.A. ¹; FARIA, L.A.²; JORGE, L.A.C.³; MANTOVANI, E.⁴ e ANDREOLI, C.⁵

¹ e ² Embrapa SNT, C.P. 151, CEP 35.701-970, Sete Lagoas, MG, spsb@cnpmms.embrapa.br; ³ Embrapa CNPDIA, C.P. 133, CEP 69.301-970, São Carlos, SP, lucio@cnpdia.embrapa.br; ⁴ e ⁵ Embrapa CNPMS, C.P. 151, CEP 35.701-970, Sete Lagoas, MG, mantovani@cnpmms.embrapa.br, andreoli@cnpmms.embrapa.br

Palavras-chave: *Zea mays*, semente, análise de imagens, modelos, tetrazólio.

Apesar do setor de sementes movimentar, anualmente, valor superior a US\$ 1 bilhão em nosso país, com destaque para sementes de soja e milho, a falta de programas e instrumentos adequados para as condições de produção tropicais com que nos defrontamos é premente (Andreoli et al., 1995). A problemática atual reside na falta de metodologias rápidas, exatas e precisas para a determinação dos atributos das sementes, notadamente os fisiológicos, que permitam a tomada de decisões seguras, em período de tempo compatível com o processo produtivo. Vários testes para avaliação dos atributos fisiológicos de um lote de sementes são relatados e descritos por Krzyzanowski (1994), Marcos Filho (1995) e Vieira e Carvalho (1994), entre eles, os autores recomendam o teste de frio e envelhecimento acelerado como eficientes para avaliação do vigor de sementes de milho. Contudo, estes testes não são rápidos o suficiente para tomadas de decisão durante o processo produtivo. Em razão da necessidade de tomadas de decisão rápidas, desenvolveram-se alguns testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica das sementes como o teste do pH do exudato e o teste de condutividade elétrica, entretanto, estes testes além de exigirem condições e equipamentos especiais não possuem características de repetibilidade e exatidão para serem adotados como procedimentos padrões (Krzyzanowski, 1994; Marcos Filho, 1995 e Vieira e Carvalho, 1994). Krzyzanowski (1994) e Andreoli (1995) citam o teste de tetrazólio como eficiente e dos mais empregados pelas empresas produtoras de sementes durante a fase de recebimento das sementes na unidade de beneficiamento. O teste de tetrazólio é um método que em algumas horas estima a viabilidade das sementes com base na alteração da coloração dos tecidos vivos, em presença de uma solução de sal de tetrazólio. O sal de tetrazólio é um indicador oxidante e redutor. Este teste é baseado na atividade desses sistemas de enzimas desidrogenases, as quais tornam-se inativas com a perda de viabilidade dos tecidos das sementes. As enzimas desidrogenases estão envolvidas com processos respiratórios dos sistemas biológicos; íons de hidrogênio são transferidos para o tetrazólio, reduzindo-o e adquirindo coloração vermelha. Como esta reação ocorre no interior da célula e o pigmento não é difusível, há um delineamento nítido entre tecido vivo (coloração vermelha) e morto (não ocorre alteração de cor). A distribuição das áreas vivas e mortas pode ser visualizada e, em função de sua localização, permite avaliar a viabilidade das sementes (Dias & Barros, 1995). O teste de tetrazólio não requer equipamento complexo, entretanto, exige bom conhecimento de morfologia da semente por parte do analista e seu resultado é bastante subjetivo. A subjetividade do teste provoca variações de resultados entre analistas em função da dificuldade de visualização das estruturas da semente, notadamente em sementes de milho e, da interpretação das tonalidades da cor vermelha (Krzyzanowski, 1994 e Dias & Barros, 1995). Segundo Gonzalez & Wintz, (1987) a função principal do processo digital de imagens é de fornecer ferramentas para facilitar a identificação e extração de informações contidas nas

imagens para posterior interpretação. Neste sentido, sistemas de computação são utilizados para atividades interativas de análise e manipulação de imagens, notadamente, com relação à forma, cor e textura dos objetos que compõe a imagem. Com relação a cor, segundo Day (1997) e Pratt (1978), dentre os vários sistemas empregados, destaca-se o HSB, no qual, H varia entre 0 e 360° e representa as cores azul, amarelo, verde e vermelho, entre outras. O índice S, representa a saturação de luz da cor e varia entre 0 (preto) e 100%. Já o índice B, que representa a saturação de branco da cor, também variando entre 0 (preto) e 100% (branco). Durante o ano de 1999, no LAS da Embrapa SNT, em Sete Lagoas - MG, amostras (quatro repetições com 100 sementes) representativas de quatro lotes de sementes de milho classificadas em tamanhos semelhantes e com diferentes qualidades fisiológicas, avaliadas pelos testes de germinação e envelhecimento acelerado (Tabela 1) descritos por Vieira e Carvalho (1994), foram embebidas em solução "Fast Green" e, a seguir, submetidas ao teste de tetrazólio (solução do sal a 0,1%), conforme descrito por Dias & Barros (1995). Com o emprego de um "scanner" de mesa, e resolução de 200 ppi e 24 bits, foram digitalizadas imagens das sementes (Figura 1). A seguir, através do "software" SIAQS (Jorge & Crestana, 1996), foram eliminadas as áreas correspondentes ao endosperma, que apresentavam cor verde em função de sua reação com a solução "Fast Green". Através de análise visual e empregando-se o modelo HSB de cores, presente no "software" SIAQS (Jorge & Crestana, 1996) as áreas correspondentes a tecidos denominados bons (vermelho), médios (rosa claro) e ruins (cor do tecido original) foram substituídas pelas cores verde, amarelo e azul, respectivamente (Figura 2). Tecidos bons apresentaram $H > 330$, S variando entre 38 a 65% e $B > 90\%$. Tecidos médios, apresentaram $H > 320$, S variando entre 16 a 53% e $B > 96\%$, sendo que, para cores com $H > 330$, invariavelmente, S foi menor que 37%. Tecidos ruins, apresentaram H variando entre zero a 357, S variando entre 3 a 97% e B variando entre 4 a 100%, entretanto, para cores com $H > 320$, os valores de B correspondentes eram menores que 90%. Posteriormente, ainda com o emprego do "software" SIAQS, foram estimadas as áreas correspondentes às cores azul, verde e amarela, bem como, o somatório das áreas e o índice de cada área em relação à área total. Através dos índices de áreas boas, foi possível discriminar os lotes 1, 2 e 3, os quais diferiram significativamente a 5% pelo teste de Tukey (SAS, 1990). Através dos índices de áreas médias e ruins, foi possível discriminar os lotes 3 e 4, os quais diferiram significativamente a 5% pelo teste de Tukey (SAS, 1990). Ainda através dos índices de áreas boas, médias e ruins, foi possível elencar os lotes segundo suas qualidades fisiológicas.

TABELA 1: Resultados médios* dos testes de germinação e de envelhecimento acelerado em quatro lotes de sementes de milho. Sete Lagoas, Minas Gerais, 1999.

Lote	Germinação (%)	Envelhecimento acelerado (%)
1	99	94
2	90	79
3	83	72
4	75	62
C.V. (%)	2,8	3,4

* referentes a 4 repetições contendo 100 sementes.

Todos os lotes diferiram para germinação e envelhecimento acelerado a 5% pelo teste de Tukey.

TABELA 2: Resultados médios* das áreas totais, boas, médias e ruins, bem como os respectivos índices (%) em relação à área total, de embriões de sementes de milho submetidos ao teste de tetrazólio e estimados com o emprego da técnica de análise de imagens, em quatro lotes de sementes de milho. Sete Lagoas, Minas Gerais, 1999.

Lote	Área do embrião (mm)				Índice de área (%)		
	Total	Boa	Média	Ruim	Boa	Média	Ruim
1	1.035,11 ^A	760,22 ^A	12,38 ^A	1,64 ^A	73,44 ^A	16,85 ^A	9,70 ^A
2	849,72 ^{BC}	504,92 ^B	18,13 ^C	3,07 ^B	59,42 ^B	30,50 ^B	10,08 ^A
3	913,78 ^B	455,12 ^B	18,48 ^C	4,86 ^B	49,81 ^C	37,11 ^C	13,08 ^B
4	795,63 ^C	334,51 ^C	16,95 ^B	7,11 ^C	42,04 ^C	40,31 ^D	17,65 ^C
C.V. (%)	4,9	3,4	5,6	6,7			

* referentes a 4 repetições contendo 100 sementes
valores seguidos pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey

FIGURA 1: Imagem, digitalizada na resolução de 200 ppi e 24 bits, de sementes de milho do lote 2 embebidas em "Fast Green" e submetidas ao teste de tetrazólio. Sete Lagoas, Minas Gerais, 1999.

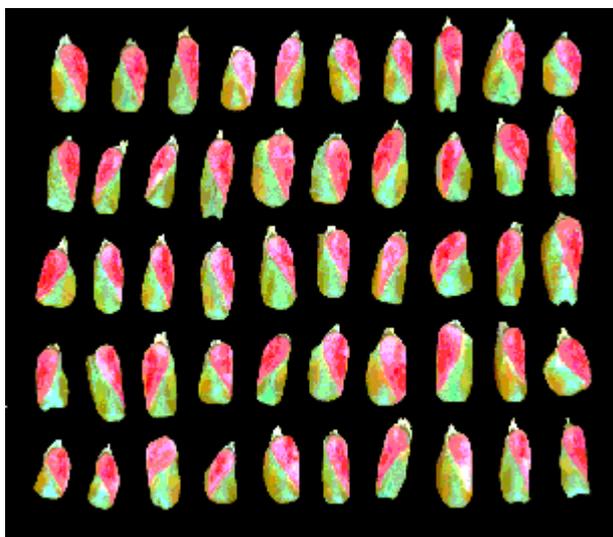
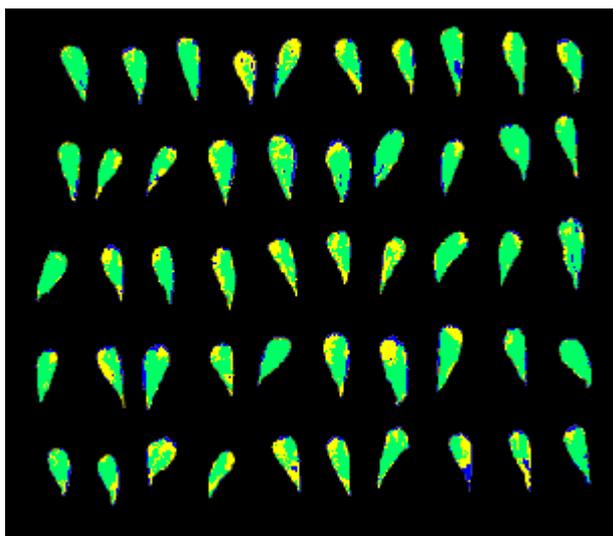


FIGURA 2: Imagem digital (200 ppi e 24 bits) de sementes de milho do lote 2 destacando as áreas boas (verde) médias (amarelo) e ruins (azul) dos embriões, identificadas com emprego do teste de tetrazólio. Sete Lagoas, Minas Gerais, 1999.



BIBLIOGRAFIA

- ANDREOLI, C.; ANDRADE, R.V.; AZEVEDO, J.T.; BORBA, C.S. Teste de tetrazólio no recebimento de sementes de soja. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.5, n.1, p.59-61. 1995.
- DAY, J.B. **Color scanning handbook**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1997.267p.
- DIAS, M.C.L. L. ; BARROS, S.A.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 43p. (IAPAR.Circular Técnica, 88).
- GONZALEZ, R.C.; WINTZ, P.A. **Digital image processing**. Reading: Addison-Wesley, 1987. 431p.
- JORGE, L.A.C. ; CRESTANA, S. SIARCS 3.0: novo aplicativo para análise de imagens digitais aplicado a ciência do solo. In: CONGRESSO LATINO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., 1996, Águas de Lindóia,SP. **Solo Suelo 96**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1996. p.5.
- KRZYZANOWSKI, C.F. Relato de testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n.2, p.59-61, 1994.
- MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.4, n.2, p.59-61. 1995.
- PRATT, W.K. **Digital image processing**. New York: John Wiley, 1978. 750p.
- SAS INSTITUTE (Cary, NC) **SAS/STAT User's guide**, version 6. 4º ed. Cary, 1990. 1848p.
- VIEIRA, D.R.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP,. 1994. 164p.

