

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**TEREZA CRISTINA DE CARVALHO**

**VIABILIDADE E VIGOR DE SEMENTES DE TRIGO  
ESTIMADOS PELO TESTE DE TETRAZÓLIO**

**CURITIBA**

**2013**

**TEREZA CRISTINA DE CARVALHO**

**VIABILIDADE E VIGOR DE SEMENTES DE TRIGO  
ESTIMADOS PELO TESTE DE TETRAZÓLIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maristela Panobianco.  
Co-orientador: Dr. Francisco Carlos Krzyzanowski.

**CURITIBA**

**2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a argüição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **TEREZA CRISTINA DE CARVALHO**, sob o título "**VIABILIDADE E VIGOR DE SEMENTES DE TRIGO ESTIMADOS PELO TESTE DE TETRAZOLIO**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 07 de Junho de 2013.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio  
Coordenadora do Programa

Dra. Luciane Henneberg  
Primeira Examinadora

Dra. Elisa Serra Negra Vieira  
Segunda Examinadora

Dra. Gizelda Maia Rego  
Terceira Examinadora

Professor Dr. João Carlos Bessalho Filho  
Quarto Examinador

Professora Dra. Maristela Panobianco  
Presidente da Banca e Orientadora

## Dedico

### A Deus

*Pelo seu grandioso amor.*

### A minha família

Em especial a minha avó, Maria Madalena (*in memorian*), pelos seus ensinamentos e cuidados; aos meus pais, Cláudio de Carvalho (*in memorian*) e Theresa Möhring de Carvalho (*in memorian*); e ao meu querido irmão Luiz Claudio (*in memorian*)  
“*Existir não é estar vivo, é viver em alguém, eternamente lembrado*”; e  
aos meus irmãos Claudio, Guilherme e Deusa.

### Ao meu amado Esposo,

Ricardo Cachoba Filho,  
“*Pelo companheirismo, por ter aceitado se privar de minha companhia pelos estudos e pelo seu infinito amor*”.

### A herança de Deus para minha vida,

João Lucas Cachoba,  
“*É através dos seus olhares e sorrisos que eu ganho a cada dia mais amor e forças para viver*”.

*“Eu pedi Forças e Deus me deu dificuldades para me fazer forte;  
Eu pedi Sabedoria e Deus me deu problemas para resolver;  
Eu pedi Prosperidade e Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar;  
Eu pedi Coragem e Deus me deu perigo para superar;  
Eu pedi Amor e Deus me deu pessoas com problemas para ajudar;  
Eu pedi Favores e Deus me deu oportunidades;  
Eu não recebi nada que pedi, mas recebi tudo que precisava”.*

*Autor Desconhecido*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, pela complementação da minha formação profissional.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maristela Panobianco, por ter me recebido como aluna, pelos ensinamentos transmitidos, pela sua paciência, compreensão e amizade.

Ao Engenheiro Agrônomo MSc. Osvaldo de Castro Ohlson, um especial agradecimento pelos anos de convívio e ensinamentos transmitidos na área de Tecnologia de Sementes.

Ao Dr. Francisco Carlos Krzyzanowski, pesquisador da Embrapa Soja, pela co-orientação do trabalho e pelos indispensáveis conselhos na análise do teste de tetrazólio.

A Dr.<sup>a</sup> Luciane Henneberg, Dr.<sup>a</sup> Elisa Serra Negra Vieira e ao Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira pelas valiosas contribuições na pré-defesa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, em especial ao Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho, pelo exemplo profissional e pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Às Empresas: Cooperativa Castrolanda, Cooperativa Batavo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Sementes Joná (Ismênia Guimarães da Cunha Nascimento e Outros) pela doação das sementes.

As funcionárias Roseli do Rocio Biora e Lucimara Antunes, pelo atendimento, colaboração e amizade.

À amiga Inês Thomaz Guerios, pelos anos de amizade e companheirismo.

Ao Alex, Bruna, Camila, Grasiela, Luciane, Mariana, Nogueira, Renato, Rosemeire e Sibelle, pela amizade, companhia e colaboração.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta me ajudaram nessa jornada.

Muito obrigada!

## RESUMO

O teste de tetrazólio permite caracterizar a viabilidade e o vigor de sementes de várias espécies, em período relativamente curto, mesmo para aquelas que apresentam dormência quando recém-colhidas, como trigo. Na presente pesquisa, objetivou-se desenvolver uma metodologia para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio, bem como estabelecer classes de interpretação das sementes. O trabalho foi conduzido em duas etapas: a) estudo de procedimentos para determinação da viabilidade, utilizando-se cinco lotes de sementes (cultivar BRS 208) e testando-se diferentes formas de pré-umedecimento, preparo e coloração da semente, e concentrações da solução de tetrazólio; b) estimativa do vigor das sementes pelo teste de tetrazólio, empregando-se quatro lotes de sementes (cultivar BRS Tangará). Nesta etapa do trabalho, foram utilizadas as metodologias que apresentaram os melhores resultados na etapa anterior, visando estabelecer as classes de interpretação da qualidade de sementes de trigo. Pela análise dos resultados, a avaliação da viabilidade e do vigor das sementes de trigo pelo teste de tetrazólio pode ser pelo pré-umedecimento das sementes entre papel (18 h, a 20 °C), seguindo-se a seguinte condição: coloração de uma das metades da semente por imersão, em solução de tetrazólio a 0,075% (40 °C, por 2 h). A interpretação das sementes se baseou na definição de quatro classes de sementes (viáveis e vigorosas, viáveis e não vigorosas, não viáveis e mortas). Pode-se concluir que o teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade e o vigor de sementes de trigo.

**Palavras-chave:** *Triticum aestivum* (L.), qualidade fisiológica, germinação.

## VIABILITY AND VIGOR OF WHEAT SEEDS ESTIMATED BY TETRAZOLIUM TEST

### ABSTRACT

The tetrazolium test allows characterization of seed viability and vigor of various species in a relatively short period, even for those that show dormancy soon after harvest, as wheat. The purpose of the present study was to develop method for evaluation of seed viability and vigor in wheat by the tetrazolium test, as well as establish interpretive classifications seeds. The study was conducted in two stages: a) study of procedures for determination of viability using five seed lots (cultivar BRS 208) and testing different forms of pre-moistening, preparation and staining of the seed, and concentrations of the tetrazolium solution; b) estimate of seed vigor by the tetrazolium test, using four seed lots (cultivar BRS Tangará). At this stage of the study methodologies was used that showed the best results in the previous step, seeking to establish the interpretive classifications of wheat seed quality. Through analysis of the results, the evaluation of viability and vigor of wheat seeds by tetrazolium test may be the pre-moistening of the seeds between paper (18 h, at 20 °C), followed by the following condition: staining of one of the seed halves by immersion in tetrazolium solution at 0.075% (40 °C, for 2 h). The interpretation was based on the definition of four classifications of seeds (viable and with vigor, viable and without vigor, not viable, and dead). It can be concluded that the tetrazolium test is efficient for estimating wheat seed viability and vigor.

**Keywords:** *Triticum aestivum* (L.), physiological quality, germination.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>6</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>8</b>
2.1. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes.....	8
2.2. Teste de tetrazólio .....	10
<b>3. CAPÍTULO I – ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE TRIGO PELO TESTE DE TETRAZÓLIO .....</b>	<b>13</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	15
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
3.4. CONCLUSÕES .....	30
3.5. REFERÊNCIAS.....	31
<b>4. CAPÍTULO II – TESTE DE TETRAZÓLIO EM TRIGO: VIGOR E CLASSES DE SEMENTES.....</b>	<b>34</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	36
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.4. CONCLUSÕES .....	48
4.5. REFERÊNCIAS.....	49
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>54</b>
<b>8. ANEXOS (ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS).....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Teor de água e da germinação de sementes de cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208. .....	22
<b>TABELA 2</b> – Teor de água das sementes dos cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208, após hidratação das sementes entre papel e por imersão, a 20 °C, por 18 horas.....	22
<b>TABELA 3</b> – Resultados da viabilidade de sementes dos cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208, obtidos no teste de tetrazólio (TZ), conduzido com hidratação entre papel e por imersão, com coloração das duas metades da semente sobre papel, a 30 e 40 °C, com diferentes concentrações do sal de tetrazólio. ....	24
<b>TABELA 4</b> – Resultados da viabilidade de sementes dos cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208, obtidos no teste de tetrazólio (TZ), conduzido com hidratação entre papel e coloração por imersão, a 30 e 40 °C, utilizando-se concentrações do sal de tetrazólio a 0,1% e 0,075%, por 2 e 3 horas.....	27
<b>TABELA 5</b> – Dados do teor de água da semente, germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em campo de quatro lotes de trigo, cultivar BRS Tangará. ....	41
<b>TABELA 6</b> – Classes de sementes para avaliação do teste de tetrazólio em trigo. ....	43
<b>TABELA 7</b> – Resultados da viabilidade e vigor de sementes dos quatro lotes de trigo, cultivar BRS Tangará, obtidos no teste de tetrazólio (TZ), conduzido com diferentes procedimentos. ....	46

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Formas de hidratação e cortes de sementes de trigo: (A) à esquerda, hidratação das sementes entre papel umedecido (a.1) e por imersão em água (a.2); (B e C) detalhes do corte das sementes em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma. .... 18
- FIGURA 2** - Fruto seco de trigo (cariopse), destacando: a morfologia externa (A), representada por tricomas (a.1) e pericarpo + tegumento (a.2); e a morfologia interna (B), composta pelo endosperma (b.1), escutelo (b.2), coleóptilo (b.3), plúmula (b.4), mesocótilo (b.5), radícula (b.6) e coleorriza (b.7)..... 19
- FIGURA 3** - Hidratação entre papel, com coloração das duas metades da semente sobre papel, com solução de tetrazólio a 1,0%, por 2 horas, a 30 °C. Sementes viáveis: A, B, C, D, E e G; e não viáveis: F, H e I. .... 21
- FIGURA 4** - Hidratação entre papel (18 h / 20 °C), com coloração das duas metades da semente sobre papel (1,0% / 30 °C / 2 h): semente viável (A) e não viável (B); hidratação entre papel (18 h / 20 °C), com coloração de uma das metades da semente por imersão (0,1% / 30 °C / 3 h): semente viável (D) e não viável (E); e hidratação entre papel (18 h / 20 °C), com coloração de uma das metades da semente por imersão (0,075% / 40 °C / 2 h): semente viável (C) e não viável (F)..... 25
- FIGURA 5** - Sementes de trigo: classe 1 (A, B e C); classe 2 (D, E, F, G e H); classe 3 (I, J, L, M, N, O, P e S); e classe 4 (Q e R) ..... 44

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O trigo (*Triticum aestivum* L.) destaca-se como um dos mais importantes cereais produzidos no mundo, haja vista sua importância econômica e alimentar. No que se refere à rotação de culturas, é a principal espécie usada em razão de não ser hospedeira de algumas doenças, como a rizoctoniose e fusariose, as quais provocam redução expressiva no rendimento de muitas culturas.

A pesquisa e o controle de qualidade de sementes têm auxiliado no progresso da cultura no país, visto que, a eficiência do estabelecimento do campo de produção, está relacionada à adoção de sementes de qualidade fisiológica superior.

Para avaliação da viabilidade de sementes de trigo, os laboratórios dispõem do teste de germinação, o qual é amplamente utilizado, apresentando resultados de grande confiabilidade. A porcentagem de plântulas normais obtidas no teste representa o máximo de germinação da amostra em condições ótimas, artificiais e padronizadas, servindo como parâmetro para comercialização das sementes. Porém, o teste de germinação não apresenta muitas vezes dados que se relacionem com o desempenho das sementes em campo e, por esse motivo, surgiu o conceito de vigor.

Os testes de vigor são úteis para complementar as informações obtidas pelo teste de germinação, visto que seu conhecimento envolve características que determinam a capacidade das sementes para a emergência e o crescimento rápido e uniforme de plântulas normais sob ampla condição ambiental (AOSA, 1983).

O teste de tetrazólio destaca-se entre os métodos de avaliação da qualidade de sementes, pois permite a rápida determinação da viabilidade (menos de 24 horas), fornece o diagnóstico da causa da perda da viabilidade, permite a análise das condições físicas e fisiológicas de cada semente. Além disso, o teste não é afetado por diversas condições que geralmente interferem no teste de germinação, como a incidência de microrganismos e requer equipamentos simples e baratos (França Neto et al., 1998; Krzyzanowski et al., 2006; Costa et al., 2007).

A avaliação da viabilidade e do vigor por meio do teste de tetrazólio é utilizada em programas internos de controle de qualidade por empresas produtoras de sementes de milho (Dias e Barros, 1995) e de soja (França Neto et al., 1998). Quanto à aplicação do tetrazólio para análise da viabilidade de sementes de trigo, a literatura indica diferentes procedimentos quanto ao pré-umedecimento, distintas formas de preparo das sementes para serem coloridas,

ampla variação no tempo de coloração, além de diferentes concentrações da solução de tetrazólio. Em relação à análise do vigor, não há protocolos e nem o estabelecimento de classes de sementes pelo teste de tetrazólio (ISTA, 2008; Brasil, 2009).

Assim, a adequação de um método rápido e eficaz para a obtenção da viabilidade e do vigor de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio se faz necessário, visando à rápida tomada de decisão quanto ao destino dos lotes e o monitoramento do controle de qualidade das sementes produzidas.

Baseado no exposto o objetivo da pesquisa foi desenvolver uma metodologia eficiente para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de trigo, com o estabelecimento de classes de sementes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes

O Brasil encontra-se na 18ª posição no *ranking* dos países com a maior produção de trigo do mundo (FAO, 2013). Nos últimos anos, o consumo nacional do grão de trigo aumentou, sendo estimado para safra de 2013, 10,4 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Com isso, amplia-se a dependência da importação desse cereal, principalmente da Argentina, Paraguai e, às vezes, do Canadá e da Rússia (Ferreira, 2012).

O uso de sementes de alta qualidade fisiológica é requisito na implantação da cultura no campo, visando ganho na produção agrícola (Khah et al., 1989). Dados da Abrasem (2012) estimaram que a utilização de sementes foi de 72%, existindo ainda o cultivo de trigo sem conhecimento da procedência das sementes utilizadas na semeadura. O uso de sementes de baixa qualidade gera atraso na emergência de plântulas, resultando em menor crescimento da parte aérea e do sistema radicular (Khah et al., 1989; Merotto Júnior, 1999), baixo estande de plantas (TeKrony e Egli, 1991) e menor tolerância a seca (Sloane et al., 2004; Liao et al., 2006).

Nesse contexto, destaca-se a importância da avaliação da qualidade das sementes de trigo, motivada em função dos problemas que podem ocorrer com estas sementes nas diversas etapas da produção (Amaral e Peske, 2000), como injúrias mecânicas durante a colheita, beneficiamento (Baudet e Villela, 2007) e secagem (Baudet e Villela, 2007), ataque de patógenos no armazenamento (Plazas, 2002), pois as sementes são armazenadas no verão, quando a temperatura e umidade relativa do ar são altas (Harrington, 1972).

Assim, o controle de qualidade das sementes tem papel fundamental para garantir a qualidade dos lotes produzidos, uma vez que a semente é o insumo que dá origem a um novo cultivo (Menon et al., 1993).

O monitoramento da viabilidade das sementes vem sendo realizado mundialmente pelo teste de germinação (ASA, 2012), o qual fornece o valor máximo da porcentagem de viabilidade das sementes, sob condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar (Brasil, 2009). Por meio do teste de germinação, é possível analisar a qualidade fisiológica das sementes, definindo os lotes mais aptos para serem comercializados (Marcos Filho, 2005).

No entanto, a avaliação da viabilidade de trigo pelo teste de germinação pode levar até oito dias, caso as sementes não apresentarem dormência, ou até 15 dias para sementes recém-

colhidas (Brasil, 2009), normalmente dormentes (Andreoli et al., 2006). Adicionalmente, o teste de germinação pode superestimar o potencial germinativo das sementes, principalmente quando estas são expostas a condições desfavoráveis de ambiente durante a germinação em campo (Marcos Filho, 2005).

Outras limitações também foram atribuídas ao teste de germinação, como a não identificação dos fatores que afetam a qualidade das sementes e a incidência de patógenos que podem alterar o resultado da viabilidade das sementes (Arthur e Tonkin, 1991; Krzyzanowski et al., 1991; Piana et al., 1992).

Para agilizar os resultados quanto à viabilidade das sementes, existe o teste de tetrazólio, que elimina o período necessário para a superação da dormência, normalmente de duração de até sete dias (Costa et al., 2007; ISTA, 2008; Brasil, 2009). Tem-se buscado e aprimorado, também, testes que permitam o conhecimento rápido e eficiente do vigor da semente, estimando a capacidade de armazenamento e emergência das plântulas em campo (Mendes et al., 2010).

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, 1983). 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, 1995) e da soja (França Neto et al., 1998).

O controle de qualidade visa monitorar a produção das sementes em todas as suas fases (Costa et al., 2007), tornando possível analisar os procedimentos adotados durante as etapas de colheita, secagem, beneficiamento e durante o armazenamento, com o objetivo principal de identificar os pontos de origem com problemas, permitindo ações corretivas, para obter lotes de alta qualidade fisiológica (França Neto et al., 1998).

Para a avaliação do vigor de sementes de trigo, a literatura recomenda o uso dos testes de crescimento de plântulas (Nakagawa, 1999), primeira contagem de germinação (Brasil, 2009), envelhecimento acelerado (AOSA, 1983; Hampton e TeKrony, 1995; Modarresi et al., 2002; Lima et al., 2006; Ohlson et al., 2010), peso hectolítrico (Battisti et al., 2011), emergência de plântulas em campo (Amaral e Peske, 2000; Lima et al., 2006; Ohlson et al., 2010), acidez do exsudato (Amaral e Peske, 2000), condutividade elétrica de massa e individual (AOSA, 1983; Mertz et al., 2012).

Nesse contexto, destaca-se também o teste de tetrazólio, que além de ser indicado na análise da viabilidade (ISTA, 2008; Brasil, 2009), pode ainda ser utilizado para estimar o

vigor das sementes (Dias e Barros, 1995; França Neto et al., 1998; Bhering et al., 2005; Santos et al., 2007; Lima et al., 2010, Ribeiro et al., 2010).

## **2.2. Teste de tetrazólio**

O teste de tetrazólio é caracterizado por ser uma avaliação bioquímica, baseada na atividade das enzimas desidrogenases que catalisam as reações respiratórias, presente nas mitocôndrias, localizadas no interior das células vegetais (França Neto et al., 1998). Durante a 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 formazam, delimitando os tecidos vivos da semente (AOSA, 1983).

A coloração resultante da reação da solução de tetrazólio com os íons de hidrogênio é um indicativo da viabilidade dos tecidos, que ocorre por meio da detecção da respiração das células vegetais (AOSA, 1983; França Neto et al., 1998). Para sementes em processo de deterioração ou danificadas mecanicamente, o desenvolvimento da coloração é mais rápido, gerando tonalidade vermelha mais intensa e profunda, enquanto as sementes vigorosas têm aspecto brilhante com coloração rósea a vermelha (Delouche et al., 1976; França Neto et al., 1998). Nos tecidos mortos, onde não há atividade respiratória, as enzimas desidrogenases estão inativas, não ocorrendo à reação com a solução de tetrazólio e, conseqüentemente, as sementes permanecem descoloridas (Marcos Filho et al., 1987; França Neto et al., 1998).

O teste de tetrazólio permite a rápida avaliação da viabilidade das sementes (Costa et al., 2007), não é afetado pela incidência de microrganismos (Krzyzanowski et al., 2006), pode avaliar o vigor de sementes, fornecendo o diagnóstico das causas responsáveis pela redução de sua qualidade no caso da soja (danos mecânicos, por umidade e, danos por percevejo) (França Neto et al., 1998; Costa et al., 2007), permite a caracterização da presença, localização e natureza de distúrbios que podem ocorrer nos tecidos embrionários (Moore, 1973 citado por França Neto et al., 1998). O teste requer equipamentos simples para sua execução (Dias e Barros, 1995; França Neto et al., 1998), tendo alto rendimento do sal de tetrazólio no preparo de soluções de diferentes concentrações (Dias e Barros, 1995; França Neto et al., 1998).

Com relação às vantagens que o teste de tetrazólio apresenta para sementes de trigo, a que mais se destaca são para as sementes recém-colhidas, que não precisariam ser submetidas a tratamento para superação de dormência antes da avaliação da sua qualidade fisiológica (ISTA, 2008; Brasil, 2009).



Apesar das vantagens, o teste apresenta algumas limitações, tais como: necessidade de treinamento técnico sobre a estrutura embrionária da semente e sobre técnicas de interpretação (Krzyzanowski et al., 1991); é relativamente tedioso, uma vez que as sementes são avaliadas uma a uma (França Neto et al., 1998; Costa et al., 2007); embora rápido, no momento da avaliação, requer maior número de horas do analista que o teste padrão de germinação (Krzyzanowski et al., 1991; Costa et al., 2007); não mostra a eficiência de tratamentos químicos, nem as injúrias que estes podem causar (França Neto et al., 1998); e requer do analista capacidade de interpretação na identificação dos níveis de viabilidade das sementes (França Neto et al., 1998; Costa et al., 2007).

A avaliação da qualidade fisiológica por meio do teste de tetrazólio tem sido difundida para algumas espécies e usada em programas de controle de qualidade de sementes (Costa et al., 2007). Os critérios estabelecidos para a coloração dos tecidos podem ser utilizados na caracterização da viabilidade das sementes, sendo que dentro da classe das sementes viáveis, é possível distinguir as de alto e baixo vigor (Vieira e Von Pinho, 1999).

Assim, para as sementes de soja, ocorre a classificação conforme a viabilidade e o vigor, sendo estabelecidas oito classes de sementes com distinção dos níveis (França Neto et al., 1998), a saber: classes 1 a 3 (sementes viáveis e vigorosas), classes 4 a 5 (sementes viáveis e não vigorosas), classes 6 a 7 (sementes não viáveis) e classe 8 (sementes mortas). A mesma diferenciação é realizada em sementes de milho; no entanto, com o estabelecimento de três classes, sendo a classe 1 representada pelas sementes viáveis e vigorosas, a classe 2 pelas sementes viáveis e não vigorosas e, a classe 3, constituída pelas sementes não viáveis (Dias e Barros, 1995).

Para sementes como as de melancia (Bhering et al., 2005), tomate (Santos et al., 2007), pepino (Lima et al., 2010) e macaúba (Ribeiro et al., 2010), o teste de tetrazólio também é aplicado para avaliação da viabilidade e do vigor, porém com variações no número das classes de sementes.

Quanto à aplicação do tetrazólio para determinar a viabilidade de sementes de trigo, a literatura indica diferentes procedimentos (ISTA, 2008; Brasil, 2009). Nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) são apresentados dois protocolos quanto ao pré-umedecimento (umedecimento das sementes entre papel ou diretamente em água); dois diferentes preparos das sementes para serem coloridas (bisseção longitudinal ao longo do embrião e  $\frac{3}{4}$  do endosperma e incisão do embrião com o escutelo); diferentes concentrações da solução de tetrazólio (0,5 e 1,0%), além do tempo que as sementes devem permanecer na solução, o qual também se verifica variação de indicação de condução (de 2 a 24 horas).

Outra recomendação existente para o teste é descrita pela International Seed Testing Association (ISTA, 2008), a qual indica dois períodos de pré-umedecimento por imersão em água (4 h e 18 h), e dois tipos de preparo da semente (removendo o embrião com o escutelo ou fazendo um corte longitudinalmente ao longo do embrião e  $\frac{3}{4}$  do endosperma), com uso de solução de tetrazólio a 1,0%. Assim, verifica-se que os procedimentos indicados na literatura para análise da viabilidade de sementes de trigo diferem bastante quanto à forma de condução, necessitando em alguns deles de extrema habilidade do analista; como por exemplo para a remoção do embrião no fruto seco (cariopse) (ISTA, 2008; Brasil, 2009).

A existência de protocolos diferentes (ISTA, 2008; Brasil, 2009), com níveis distintos de dificuldade, associado ao fato do teste de tetrazólio não ser uma prática rotineira adotada pelos produtores de sementes de trigo, que na maioria das vezes baseiam-se na determinação do peso volumétrico, do teor de água e no aspecto visual para o recebimento das sementes, tem sido condicionado os resultados à avaliação do teste de germinação (CASEMG, 2012; COTRIEL, 2011; Tibola et al., 2009); o qual pode levar um período de até 15 dias para obtenção dos resultados (Brasil, 2009).

Quanto ao emprego do teste de tetrazólio para avaliação do vigor de sementes, o método tem sido difundido para algumas espécies, tais como milho (Dias e Barros, 1995), soja (França Neto et al., 1998), melancia (Bhering et al., 2005), tomate (Santos et al., 2007), pepino (Lima et al., 2010) e macaúba (Ribeiro et al., 2010). Para as sementes de trigo, existe a estimativa da viabilidade, porém não existem informações para determinação do vigor (ISTA, 2008; Brasil, 2009).

A adequação de um método rápido (menos de 24 horas) e eficaz para a obtenção da viabilidade e vigor de sementes se faz necessário, visando a tomada de decisão nos momentos de semeadura, colheita, beneficiamento e durante o armazenamento, oferecendo agilidade nos resultados da qualidade fisiológica de sementes (Costa et al., 2007; Lima et al., 2010). Conforme Deswal e Chand (1997), o teste de tetrazólio se destaca nesse contexto, por ser uma técnica que além de avaliar a viabilidade das sementes, também pode estimar o seu vigor.

### 3. CAPÍTULO I – ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE TRIGO PELO TESTE DE TETRAZÓLIO

**RESUMO** - A avaliação do teste de germinação em sementes de trigo varia de 4 a 15 dias, uma vez que a espécie normalmente apresenta dormência em sementes recém-colhidas. O teste de tetrazólio pode caracterizar a viabilidade das sementes em menos de 24 horas, inclusive para lotes com sementes dormentes. O trabalho objetivou adequar um procedimento prático e eficiente para avaliação da viabilidade de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio. Utilizaram-se cinco lotes de sementes da cultivar BRS 208, testando-se: a) hidratação entre papel toalha umedecido ou por imersão direta em água, por 18 h, a 20 °C; b) preparo da semente adotando corte em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma; c) coloração sobre papel das duas metades da semente e por imersão, por 2 e 3 h, a 30 e 40 °C; d) concentrações de solução de tetrazólio de 0,075%, 0,1%, 0,5% e 1,0%. Os procedimentos mais consistentes são por meio da hidratação das sementes entre papel (18 h, a 20 °C), com: coloração das duas metades da semente sobre papel (2 h, a 30 °C), em solução de tetrazólio a 1,0%; coloração de uma das metades da semente por imersão (3 h, a 30 °C), em solução a 0,1%; ou coloração de uma das metades da semente por imersão (2h, a 40 °C), em solução de tetrazólio a 0,075%.

**Termos para indexação:** *Triticum aestivum*, germinação, qualidade fisiológica.

## **ADAPTATION OF METHODOLOGY FOR EVALUATION OF THE WHEAT SEEDS VIABILITY THROUGH THE TETRAZOLIUM TEST**

**ABSTRACT-** The assessment of germination test in wheat seeds varies from 4 to 15 days, once the species normally presents dormancy in freshly harvested seeds. Tetrazolium test can characterize the viability of seeds in less than 24 hours including lots with dormancy seeds. The work objective was to adapt practical and efficient procedure for assessing the viability of wheat seeds by tetrazolium test. Five seed lots of 'BRS 208' were used to testing: a) hydration between wet paper towels and soaked in water for 18 h, at 20 °C; b) preparation of seed by adopting seeds were cut longitudinally through the embryo and endosperm; c) color on paper of the two halves of the seed and by immersion, for 2 or 3 h, at 30 or 40° C; d) tetrazolium solution of 0.075%, 0.1%, 0.5% and 1.0%. The procedures are more consistent through the hydration between wet paper towels (18 h, at 20° C), with: color on paper of the two halves of the seed (2 h, at 30° C), in a 1.0% tetrazolium solution; color of one half of the seed by immersion (3 h, at 30° C) at 0.1% solution; or color of one half of the seed by immersion (2 h, at 40° C), in a 0.075% tetrazolium solution.

**Index terms:** *Triticum aestivum*, germination, physiological quality.

### 3.1. INTRODUÇÃO

A produtividade de uma cultura depende diretamente do estabelecimento das plantas em campo, que por sua vez é reflexo das condições de produção e, principalmente, da qualidade das sementes adquiridas pelo agricultor.

Para avaliação da viabilidade de sementes de trigo, os laboratórios dispõem do teste de germinação, amplamente utilizado para comercialização de sementes, fornecendo resultados de grande confiabilidade. No entanto, a condução de um teste de germinação em sementes de trigo recém-colhidas pode levar um período de até 15 dias (Brasil, 2009), uma vez que podem apresentar dormência (Andreoli et al., 2006). Por outro lado a dormência é uma característica que evita a germinação das sementes no período de pré-colheita na espiga, o que acarreta prejuízos expressivos aos agricultores.

Para a rápida tomada de decisão quanto ao destino de lotes de sementes de trigo, é necessário dispor de um teste que possa estimar a viabilidade das sementes logo após terem sido colhidas. Neste sentido, destaca-se o teste de tetrazólio, que permite a avaliação da viabilidade em menos de 24 horas, além de não ser afetado por condições que geralmente interferem no teste de germinação, como a incidência de microrganismos (França Neto et al., 1998). Dentre as vantagens do teste para sementes de trigo, a que mais se destaca é a análise de sementes recém-colhidas, as quais não precisariam passar por tratamento de superação de dormência antes da análise inicial, como o pré-esfriamento, pré-aquecimento e hidratação do substrato com solução de giberelina (Brasil, 2009).

A avaliação da viabilidade da semente por meio do teste de tetrazólio é usada na análise de rotina de várias espécies, como soja (França Neto et al., 1998) e milho (Dias e Barros, 1995), e sugeridas para sementes de abobrinha (Barros et al., 2005), melancia (Bhering et al., 2005), café (Zonta et al., 2009), aveia preta (Souza et al., 2009), mamona (Gaspar-Oliveira et al., 2009), macaúba (Ribeiro et al., 2010), entre outras espécies de importância econômica.

Quanto à aplicação do teste de tetrazólio para determinar a viabilidade de sementes de trigo, a literatura indica diferentes procedimentos. Nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) são apresentados dois protocolos quanto ao pré-umedecimento (umedecimento das sementes entre papel ou diretamente em água); diferentes concentrações da solução de

tetrazólio (0,5 e 1,0%); além do tempo que estas sementes devem permanecer na solução, o qual varia de duas a 24 horas.

Outra recomendação existente para o teste é descrita pela International Seed Testing Association (ISTA, 2008), a qual indica dois períodos de embebição (4 h e 18 h) e dois tipos de preparo da semente, similares aos indicados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), por meio da remoção do embrião com o escutelo ou fazendo um corte longitudinalmente ao longo do embrião e  $\frac{3}{4}$  do endosperma.

Assim, verifica-se que os procedimentos indicados na literatura diferem quanto à forma de condução do teste. Alguns deles, necessitam de extrema habilidade do analista, como por exemplo a remoção do embrião no fruto seco (cariopse). Deste modo, a existência de mais de um protocolo, com níveis distintos de dificuldade para sua execução, tem sido condicionado a avaliação da qualidade das sementes de trigo pelo teste de germinação.

Adicionalmente, tem se observado perda expressiva na qualidade fisiológica das sementes de trigo produzidas (WAOB, 2010). As razões apontadas são principalmente chuvas no período de pré-colheita, atingindo diversas regiões como norte e oeste da Europa, noroeste dos Estados Unidos, norte da Austrália, oeste da Nova Zelândia, Canadá, África do Sul, Chile, Argentina e Brasil (Cunha et al., 2004); injúrias físicas nas etapas de colheita (Farrer et al., 2005) e secagem (Garcia et al., 2005) e danos no armazenamento (Rocha Júnior e Usberti, 2007), uma vez que as sementes são armazenadas durante o verão, sofrendo interferência de temperatura, umidade relativa do ar e pragas de armazenamento.

Diante do exposto, o trabalho objetivou adequar uma metodologia prática e eficiente para avaliação da viabilidade de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio.

### **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná, e no Laboratório de Análise de Sementes Oficial da Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (CLASPAR), em Curitiba, no período de junho de 2010 a abril de 2011. Inicialmente, foram obtidos 12 lotes de sementes de trigo da cultivar BRS 208, produzidas nas safras 2009/09 e 2010/10, nos municípios de Castro, Ponta Grossa e Tibagi, ambos pertencentes ao Estado do Paraná. Posteriormente foram selecionados cinco lotes de sementes de trigo com níveis distintos de qualidade fisiológica, por meio do teste de germinação (Brasil, 2009).

Para a composição das repetições estatísticas, foram efetuados os seguintes procedimentos: a amostra de sementes de cada lote foi homogeneizada primeiramente em um divisor centrífugo, baseando-se nos critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Ao final da homogeneização, dividiu-se cada lote em quatro subamostras (que constituíram as repetições estatísticas) de peso semelhante.

Posteriormente, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel do tipo Kraft e armazenadas em ambiente controlado (14 °C e 63% de umidade relativa do ar) durante o período experimental, visando minimizar a intensidade de deterioração.

As seguintes avaliações foram realizadas:

1) Determinação do teor de água: realizada pelo método de estufa a  $105\pm 3$  °C, por 24 horas, utilizando-se duas subamostras de 5,0 g de sementes para cada repetição (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de teor de água para cada lote, na base úmida.

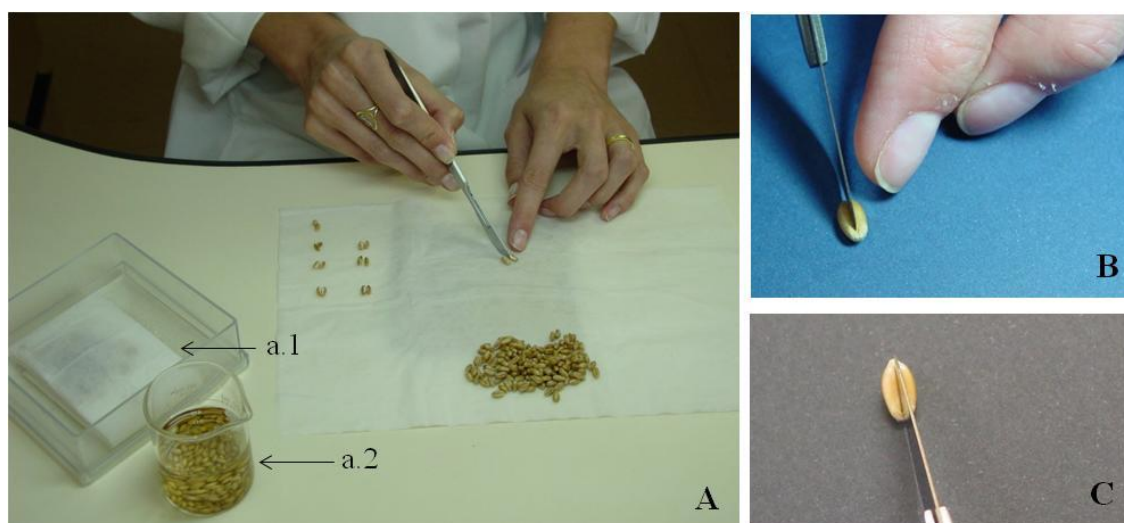
2) Teste de germinação: para cada repetição, foram tomadas quatro subamostras de 50 sementes cada (totalizando assim 16 repetições), distribuídas em rolo de papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato e mantidas em germinador, a 20 °C, sob regime de luz constante. A contagem de plântulas normais foi realizada no quinto dia após semeadura, baseando-se nos critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

3) Teste de tetrazólio (TZ): foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada lote, totalizando 200 sementes (Brasil, 2009). Empregaram-se 10% a mais de sementes como medida de segurança em caso de falha no preparo (corte), sendo que durante a avaliação foi computado somente 50 sementes por repetição. As seguintes metodologias foram testadas:

a) Pré-umedecimento:

a.1) sementes embaladas entre papel toalha umedecido (Figura 1A) com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel por 18 h, a 20 °C (Brasil, 2009);

a.2) sementes em imersão direta em 30 mL de água (Figura 1A), colocadas em copo de béquer, por 18 h, a 20 °C (ISTA, 2008).



**FIGURA 1** – Formas de hidratação e cortes de sementes de trigo: (A) à esquerda, hidratação das sementes entre papel umedecido (a.1) e por imersão em água (a.2); (B e C) detalhes do corte das sementes em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma.

Para cada procedimento de hidratação, foi determinado o teor de água das sementes, de acordo com item 1.

b) Preparo e coloração:

b.1) semente em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma (Figuras 1B e 1C), com colocação das duas metades sobre uma folha de papel filtro umedecido com solução de tetrazólio equivalente a 2,5 vezes a massa do papel (Souza et al., 2009), colocadas para colorir a 30 °C (Brasil, 2009; ISTA, 2008) nas concentrações 0,1% (Dias e Barros, 1995), 0,5% (Brasil, 2009) e 1,0% (ISTA, 2008), por duas horas, no escuro.

b.2) semente em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma, com colocação das duas metades sobre uma folha de papel filtro umedecido com solução de tetrazólio equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, colocadas para colorir a 40 °C (Souza et al., 2009) nas concentrações 0,1% (Dias e Barros, 1995), 0,5% (Brasil, 2009) e 1,0% (ISTA, 2008), por duas horas, no escuro.

b.3) semente em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma, com descarte de uma das metades e imersão da outra em 3 mL de solução de tetrazólio, em copo de plástico (capacidade de 50 mL), colocadas para colorir a 30 °C nas concentrações 0,075% (França Neto et al., 1998) e 0,1% (Dias e Barros, 1995), por duas e três horas, no escuro.

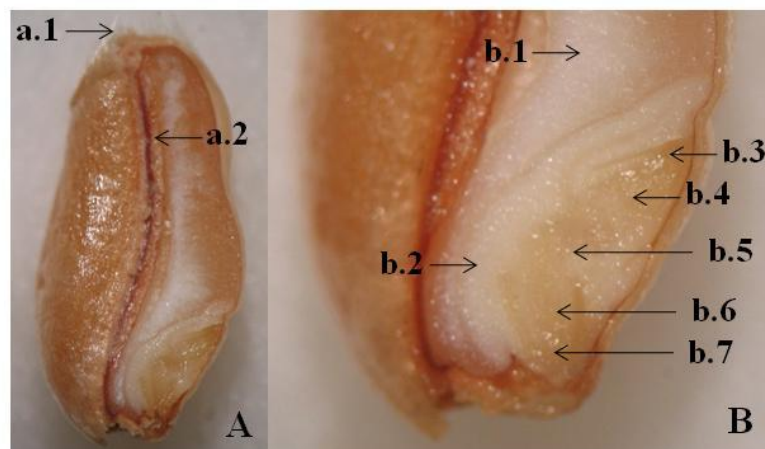
b.4) semente em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma, com descarte de uma das metades e imersão da outra em 3 mL de solução de tetrazólio, em copo



de plástico (capacidade de 50 mL), colocadas para colorir a 40 °C nas concentrações 0,075% (França Neto et al., 1998) e 0,1% (Dias e Barros, 1995), por duas e três horas, no escuro.

Após cada período de coloração, as sementes foram mantidas sobre o papel filtro (coloração sobre papel) ou imersas em água (coloração por imersão) em refrigeração (5 a 10 °C), até o momento da avaliação, realizada no mesmo dia da coloração, com auxílio do microscópio estereoscópico.

Os detalhes da morfologia externa e interna da semente de trigo, destacando as áreas vitais (coleóptilo, plúmula, mesocótilo, radícula, coleorriza e a região central do escutelo) estão apresentados na Figura 2.



**FIGURA 2** - Fruto seco de trigo (cariopse), destacando a morfologia externa (A), representada por tricomas (a.1) e pericarpo + tegumento (a.2); e a morfologia interna (B), composta pelo endosperma (b.1), escutelo (b.2), coleóptilo (b.3), plúmula (b.4), mesocótilo (b.5), radícula (b.6) e coleorriza (b.7).

A determinação da viabilidade das sementes de trigo baseou-se nas metodologias usadas para sementes de milho, descrita por Dias e Barros (1995) e no guia para avaliação de cereais descrito nas Regras para Análise de Sementes (2009). Ambos os procedimentos foram adaptados para sementes de trigo.

Utilizou-se como semente viável aquela que apresentou: coloração rosa brilhante, superficial, uniforme e sem lesões do embrião (Figura 3A); sementes com pequenos pontos deteriorados ou tecidos mortos em regiões não vitais (Figura 3B); sementes com embrião cor de rosa brilhante ou com coloração vermelha intensa e profunda, que apresentam pequenas áreas ou pontos com coloração mais intensa ou acinzentada nas extremidades do escutelo, sem atingir a região vital (Figuras 3B, 3C e 3D); sementes que têm danos atingindo a radícula,

mas com a região do mesocótilo (raízes seminais) intacta (Figura 3G); sementes que apresentam danos em áreas do escutelo desde que não atinjam as regiões vitais do embrião (Figura 3E). Para semente não viável, os seguintes critérios foram considerados: coloração intensa do embrião com áreas descoloridas sobre a plúmula e/ou coleótilo e/ou radícula mais a região do mesocótilo e/ou porção central do escutelo (Figuras 3F e 3I); sementes com todo o escutelo e parte ou todo o eixo central descolorido, ou ainda com o embrião totalmente acinzentado (Figura 3H).

Os dados obtidos em cada teste, exceto a determinação do teor de água, foram analisados de acordo com delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Determinou-se, também, o coeficiente de correlação de Pearson, para medir o grau da correlação entre as variáveis: teste de germinação e teste de tetrazólio. Este coeficiente é um método estatístico, que possibilita medir o grau de associação linear entre duas variáveis. A análise da variância foi realizada empregando o sistema computacional ASSISTAT, versão 7.6 beta (Silva, 2008), com transformação em arco seno  $\sqrt{x/100}$  e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**FIGURA 3** - Hidratação entre papel, com coloração das duas metades da semente sobre papel, com solução de tetrazólio a 1,0%, por 2 horas, a 30 °C. Sementes viáveis: A, B, C, D, E e G; e não viáveis: F, H e I.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos dados do teor de água inicial das sementes (Tabela 1), verificou-se que os cinco lotes apresentaram valores similares, fato importante para a execução dos testes (Marcos Filho, 2005).

**TABELA 1** – Teor de água e da germinação de sementes de cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208.

Lotes	Teor de água	Germinação
	..... % .....	
1	12,7	97 a
2	12,4	91 ab
3	12,6	90 ab
4	12,7	89 b
5	12,4	85 b
<b>C.V. (%)</b>	-	5,71

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores referentes ao teste de germinação (Tabela 1) permitiram classificar o lote 1 como de alta viabilidade e os lotes 4 e 5 como os de baixa viabilidade, ficando os lotes 2 e 3 em posição intermediária. Constatou-se que todos os lotes estavam com poder germinativo acima do padrão para comercialização no Brasil, o qual é igual ou acima de 80%, estabelecidos pela Instrução Normativa n.º 25 (MAPA, 2005).

O teor de água após a hidratação das sementes (Tabela 2) revelou diferenças de acordo com o procedimento testado. A hidratação entre papel proporcionou níveis mais baixos de água em comparação à hidratação por imersão, considerando o mesmo período de hidratação (18 h) e a mesma temperatura (20 °C). Este fato pode ter ocorrido, em função do maior potencial hídrico na hidratação das sementes por imersão, em comparação à hidratação entre papel.

**TABELA 2** – Teor de água das sementes dos cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208, após hidratação das sementes entre papel e por imersão, a 20 °C, por 18 horas.

Lotes	Teor de água após hidratação das sementes (18h / 20°C)	
	Entre papel	Por imersão
	..... % .....	
1	24,6	37,0
2	25,3	38,4
3	25,1	38,0
4	24,9	37,9
5	25,8	38,3

No momento da hidratação dos tecidos, o volume de água absorvido pelas sementes, atua como parâmetro na padronização das condições de execução do teste de tetrazólio (Novembre et al., 2006). Assim, determinar o procedimento mais adequado de hidratação das sementes é fundamental para ter um melhor resultado no processo de coloração das sementes com a solução de tetrazólio.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da viabilidade de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio. Verificou-se que quando as sementes foram hidratadas entre papel e coloridas a 30 °C, com solução de tetrazólio a 1,0% (Figuras 4A e 4B), obteve-se a mesma classificação de viabilidade dos lotes comparadas ao teste de germinação (Tabela 1), com coeficiente de correlação altamente significativo (0,97\*\*). Assim, o preparo das sementes antes da coloração (bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma), bem como o tempo de coloração (2 h), proporcionou maior agilidade em comparação aos métodos recomendados pela literatura, os quais indicam a incisão e a remoção do embrião, em período de tempo que varia de três a 24 h de coloração (ISTA, 2008; Brasil, 2009).

Em observação feita por Kruse (1996), ao comparar os métodos de preparo das sementes de trigo (corte longitudinal e incisão do embrião), a vantagem do método de incisão do embrião é a de avaliar a viabilidade do escutelo e da radícula. Por outro lado, o corte longitudinal ao longo do embrião e do escutelo permite visualizar todas as estruturas internas do embrião, sendo indicado para várias espécies, como braquiária (Novembre et al., 2006), aveia preta (Souza et al., 2009) e triticales (Souza et al., 2010).

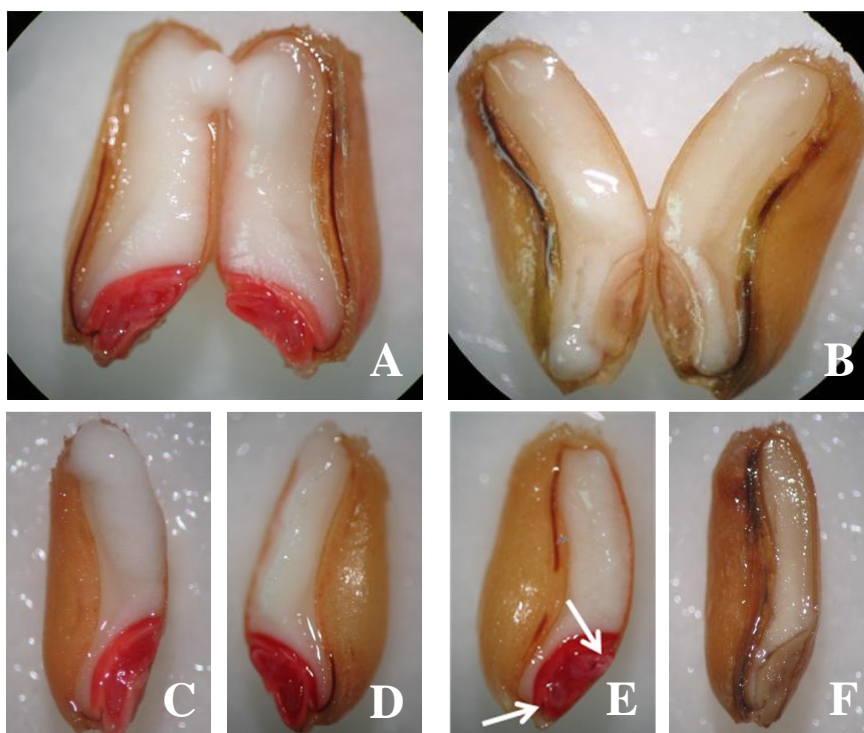
**TABELA 3** – Resultados da viabilidade de sementes dos cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208, obtidos no teste de tetrazólio (TZ), conduzido com hidratação entre papel e por imersão, com coloração das duas metades da semente sobre papel, a 30 e 40 °C, com diferentes concentrações do sal de tetrazólio.

<b>Hidratação entre papel / coloração das duas metades da semente sobre papel (2 h)</b>						
<b>Lotes</b>	<b>30 °C</b>			<b>40 °C</b>		
	<b>Concentrações do sal TZ</b>			<b>Concentrações do sal TZ</b>		
	<b>0,1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1,0%</b>	<b>0,1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1,0%</b>
	..... % de sementes viáveis .....					
1	84 abc	86 a	93 a	64 ab	92 a	92 a
2	83 bc	76 b	89 ab	74 a	85 b	89 ab
3	86 ab	82 ab	88 ab	57 b	81 bc	89 ab
4	88 a	83 ab	85 b	57 b	82 bc	85 bc
5	80 c	81 ab	82 b	63 ab	76 c	82 c
<b>C.V. (%)</b>	3,2	4,3	4,5	7,9	3,8	3,7
<b>C.C. Pearson</b>	0,28 <sup>n.s.</sup>	0,42 <sup>n.s.</sup>	0,97**	0,20 <sup>n.s.</sup>	0,99**	0,93*
<b>Hidratação por imersão / coloração das duas metades da semente sobre papel (2 h)</b>						
<b>Lotes</b>	<b>30 °C</b>			<b>40 °C</b>		
	<b>Concentrações do sal TZ</b>			<b>Concentrações do sal TZ</b>		
	<b>0,1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1,0%</b>	<b>0,1%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1,0%</b>
	..... % de sementes viáveis .....					
1	76 ab	90 a	88 a	54 ab	90 ab	92 a
2	63 bc	89 a	84 ab	64 a	91 a	91 a
3	80 a	86 a	74 cd	50 bc	91 a	89 a
4	79 a	65 b	77 bc	53 ab	74 b	87 a
5	58 c	83 ab	64 d	38 c	85 b	83 a
<b>C.V. (%)</b>	7,9	8,9	4,8	7,9	8,2	5,4
<b>C.C. Pearson</b>	0,48 <sup>n.s.</sup>	0,42 <sup>n.s.</sup>	0,92*	0,59 <sup>n.s.</sup>	0,40 <sup>n.s.</sup>	0,91*

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

\*\* e \* significativo a 1% e a 5%, respectivamente, de probabilidade de erro, pelo teste “t”;

<sup>n.s.</sup> não significativo, pelo teste “t”.



**FIGURA 4** - Hidratação entre papel (18 h / 20 °C), com coloração das duas metades da semente sobre papel (1,0% / 30 °C / 2 h): semente viável (A) e não viável (B); hidratação entre papel (18 h / 20 °C), com coloração de uma das metades da semente por imersão (0,1% / 30 °C / 3 h): semente viável (D) e não viável (E); e hidratação entre papel (18 h / 20 °C), com coloração de uma das metades da semente por imersão (0,075% / 40 °C / 2 h): semente viável (C) e não viável (F).

Assim, com a coloração das duas metades da cariopse de trigo, há possibilidade de visualizar a semente inteira, além de caracterizar com maior segurança a sua viabilidade. Porém, o processo tem dispêndio de tempo no preparo das sementes para a coloração (posicionamento das duas metades sobre uma folha de papel umedecido).

Utilizando-se a mesma forma de preparo (hidratação entre papel / coloração das duas metades da semente sobre papel), porém com coloração a 40 °C (Tabela 3), não foi verificado a separação dos lotes em níveis de qualidade conforme o teste de germinação (Tabela 1). Esse fato pode estar relacionado ao aumento da temperatura (de 30 °C para 40 °C) no momento da coloração das sementes, uma vez que temperaturas acima de 35 °C podem influenciar a velocidade de absorção de água e as reações químicas (Taiz e Zeiger, 2004).

Quando as sementes foram hidratadas por imersão (Tabela 3), verificaram-se, dependendo da combinação testada, respostas distintas dos resultados obtidos em relação ao

teste de germinação (Tabela 1) ou mesmo nenhuma separação de viabilidade entre os lotes (40 °C/ 1,0%). Souza et al. (2010) também verificaram que o processo de umedecimento por imersão em sementes de triticales não foi eficiente para separar os lotes de maneira semelhante ao teste de germinação.

As sementes de trigo, quando foram hidratadas por imersão, obtiveram teores de água entre 37,0% e 38,4% (Tabela 2). Essa condição previamente a coloração com solução de tetrazólio não promoveu a classificação dos lotes de maneira semelhante à obtida no teste de germinação (Tabela 1), como observado nos resultados apresentados na Tabela 3. Tais resultados podem estar relacionados à rápida entrada de água, causando as sementes danos por embebição. Esse evento desencadeou alterações na conformação e estrutura celular, que dependendo da intensidade podem ser transitórias ou permanentes (Hoekstra et al., 1999), não possibilitando assim a adoção deste método para a hidratação das sementes (cariopses).

Após a semente ter atingido a maturidade fisiológica, a adequada captação de água durante a hidratação é imprescindível para o reinício da atividade metabólica (Marcos Filho, 2005). Durante a hidratação, a atividade respiratória da semente ocorre de maneira intensa e o volume de água disponível nessa etapa pode alterar a produção de substâncias como o hidrogênio. Sabe-se que, as alterações na disponibilidade de hidrogênio interferem na atividade respiratória das mitocôndrias, influenciando a reação do sal de tetrazólio com o hidrogênio produzido nos tecidos vivos da semente (França Neto et al., 1998).

Na Tabela 4 são apresentados os resultados do teste de tetrazólio, utilizando-se coloração por imersão de uma das metades da semente. Pelos dados obtidos foi possível a distinção dos lotes, em classes de viabilidade similares às obtidas no teste de germinação, quando se empregou a combinação 0,1% / 30 °C / 3 h (Tabela 4; Figuras 4D e 4E). Neste tipo de preparo (descarte de uma das metades da semente e imersão da outra em solução de tetrazólio), o tempo para análise é bastante reduzido e o método bem prático. Isso ocorre pelo fato de não ser necessário posicionar as duas metades da semente sobre papel.

Ainda analisando os resultados da Tabela 4, quando se empregou a combinação 0,1% de solução de tetrazólio, a 40 °C, independente de menor tempo (duas horas) ou maior tempo (três horas) de exposição da semente com a solução de tetrazólio, não foi possível separar os lotes em níveis de qualidade similares aos obtidos pelo teste de germinação (Tabela 1).

Na elaboração ou adequação de metodologia, com a análise conjunta da interferência de três fatores (concentração de solução, temperatura e tempo), é normal verificar que alguns procedimentos testados não sejam os mais apropriados para serem adotados. Essa observação



também foi constatada por outras pesquisas (Barros et al., 2005; Bhering et al., 2005; Gaspar-Oliveira et al., 2009; Souza et al., 2009; Zonta et al., 2009; Ribeiro et al., 2010).

**TABELA 4** – Resultados da viabilidade de sementes dos cinco lotes de trigo, cultivar BRS 208, obtidos no teste de tetrazólio (TZ), conduzido com hidratação entre papel e coloração por imersão, a 30 e 40 °C, utilizando-se concentrações do sal de tetrazólio a 0,1% e 0,075%, por 2 e 3 horas.

<b>Hidratação entre papel / coloração de uma das metades da semente por imersão</b>				
<b>Concentração do sal TZ a 0,1%</b>				
<b>Lotes</b>	<b>30 °C</b>		<b>40 °C</b>	
	<b>Tempo de coloração</b>		<b>Tempo de coloração</b>	
	<b>2 h</b>	<b>3 h</b>	<b>2 h</b>	<b>3 h</b>
	..... % de sementes viáveis .....			
1	82 a	90 a	90 a	92 a
2	72 b	85 ab	86 b	85 b
3	62 c	83 ab	86 b	89 ab
4	71 bc	82 b	82 c	84 b
5	69 bc	81 b	78 d	76 c
<b>C.V. (%)</b>	4,7	4,4	2,0	3,0
<b>C.C. Pearson</b>	0,70 <sup>n.s.</sup>	0,96**	0,95*	0,90*
<b>Concentração do sal TZ a 0,075%</b>				
<b>Lotes</b>	<b>30 °C</b>		<b>40 °C</b>	
	<b>Tempo de coloração</b>		<b>Tempo de coloração</b>	
	<b>2 h</b>	<b>3 h</b>	<b>2 h</b>	<b>3 h</b>
	..... % de sementes viáveis .....			
1	82 a	81 a	86 a	88 a
2	78 a	72 b	80 a	80 bc
3	65 b	70 b	82 a	84 ab
4	68 b	64 b	70 b	74 c
5	55 c	53 c	62 b	63 d
<b>C.V. (%)</b>	4,0	4,5	4,4	3,8
<b>C.C. Pearson</b>	0,91*	0,97**	0,88*	0,90*

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

\*\* e \* significativo a 1% e a 5%, respectivamente, de probabilidade de erro, pelo teste “t”.

Quando a coloração das sementes foi obtida por meio da solução de tetrazólio a 0,075%, a 40 °C, por 2 horas (Tabela 4), verificou-se separação adequada dos lotes de menor

qualidade, classificados pelo teste de germinação (Tabela 1, lotes 4 e 5), daqueles de qualidade superior (1, 2 e 3). Este procedimento possibilitou nítida coloração dos tecidos do embrião (Figuras 4C e 4F), além da possibilidade do uso de solução de tetrazólio mais reduzida representar maior rendimento do produto (sal de tetrazólio) e eficiência na avaliação do teste.

Nessa combinação testada (0,075% / 40 °C / 2 h; Tabela 4), verificou-se que o emprego da maior temperatura (de 40 °C) no momento da coloração das sementes foi eficiente na separação dos lotes. Provavelmente esse fato ocorreu em função da concentração da solução de tetrazólio utilizada ter sido a mais reduzida; permitindo uma adequada combinação de concentração de solução de tetrazólio e temperatura. Vale ressaltar que o acréscimo na temperatura provoca o aumento da energia cinética das moléculas e, conforme ressaltado por Taiz e Zeiger (2004), as sementes condicionadas a temperaturas elevadas (acima de 35 °C) têm aumento na velocidade de absorção de água e nas reações químicas, interferindo no processo de coloração das sementes.

França Neto et al. (1998) recomendaram a utilização da solução de tetrazólio a 0,075%, sob temperatura de 40 °C, para avaliação da viabilidade de sementes de soja; pois a concentração permite visualização adequada do embrião, caracterizando com precisão danos mecânicos, por umidade, por percevejo e por temperatura. A mesma solução foi estabelecida para sementes de milho (Dias e Barros, 1995), abobrinha (Barros et al., 2005) e melancia (Bhering et al., 2005).

Nos demais procedimentos (Tabela 4), quando se utilizou a temperatura de 30 °C (por 2 ou 3 horas), com solução de tetrazólio a 0,075% o ranqueamento dos lotes foi inconsistente, não sendo possível obter a mesma classificação do teste de germinação (Tabela 1). Para esses tratamentos, houve dificuldade na avaliação das estruturas do embrião em função da coloração dos tecidos terem sido superficiais e pouco intensas, provavelmente devido a baixa concentração da solução de tetrazólio, associada à temperatura de coloração e aos períodos de contato das sementes com a solução de tetrazólio.

Quando se empregou a combinação 0,075% de tetrazólio / 40 °C / 3h (Tabela 4), observou-se que a coloração dos tecidos foi mais intensa. Provavelmente o período de contato da solução de tetrazólio com as sementes (3 h), em conjunto com a temperatura de coloração adotada (de 40 °C) interferiu na coloração das sementes, dificultando a classificação dos lotes de maneira similar ao teste de germinação (Tabela 1). A dificuldade de análise das sementes nessa combinação ocorreu devido a forte coloração das sementes.

Baseado no exposto, a avaliação da viabilidade das sementes de trigo pelo teste de tetrazólio é possível por meio da hidratação das sementes entre papel, com coloração das duas metades da semente sobre papel a 1,0% de tetrazólio (2h, a 30 °C), permitindo neste método a análise das duas metades da cariopse. No entanto, este procedimento requer maior tempo de preparo das sementes para serem coloridas, devido ao posicionamento das duas metades da semente sobre uma folha de papel umedecido. O teste de tetrazólio, também foi eficiente por meio da coloração de uma das metades da semente por imersão em soluções de tetrazólio a 0,1% (3h, a 30 °C), e 0,075% (2h, a 40 °C).

Nesses dois métodos há maior praticidade no preparo das sementes devido a coloração ser por imersão. Merece destaque o uso de solução 0,075%, por ser mais diluída, ocasionando maior rendimento do produto e, conseqüentemente, menor custo, requerendo duas horas de coloração e gerando assim maior rapidez de execução do teste.

### 3.4. CONCLUSÕES

Os procedimentos para avaliação da viabilidade de sementes de trigo, pelo teste de tetrazólio, são por meio da hidratação das sementes entre papel (18 horas, a 20 °C), com:

a) coloração das duas metades da semente sobre papel (2h, a 30 °C), em solução de tetrazólio a 1,0%;

b) coloração de uma das metades da semente por imersão (3h, a 30 °C), em solução de tetrazólio a 0,1%; ou

c) coloração de uma das metades da semente por imersão (2h, a 40 °C), em solução de tetrazólio a 0,075%.

### 3.5. REFERÊNCIAS

- ANDREOLI, C.; BASSOI, M.C.; BRUNETTA, D. Genetic control of seed dormancy and preharvest sprouting in wheat. **Scientia Agricola**, v.63, n.6, p.564-566, 2006. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-90162006000600009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-90162006000600009&script=sci_arttext)
- 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**, v.27, n.2, p.165-171, 2005. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-31222005000200024](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222005000200024)
- BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.A. 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. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v27n1/25196.pdfwww>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- CUNHA, G.R.; PIRES, J.L.F.; PASINATO, A. Introdução ao problema da germinação na pré-colheita em trigo no Brasil. In: CUNHA, G.R.; PIRES, J.L.F. (Ed.). **Germinação pré-colheita em trigo**. Passo Fundo, p.11-20, 2004.
- DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.145-151, 2008. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n3/19.pdf>
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Avaliação da qualidade de sementes de milho. **Circular 88**, Londrina: IAPAR, 1995. 42p.
- FARRER, D.; WEISZ, R.; HEINIGER, R.; MURPHY, J.P., PATE, M.H. Delayed harvest effect on soft red winter wheat in the Southeastern USA. **Agronomy Journal**, v. 98, n.3, p.588-595, 2005. <http://openagricola.nal.usda.gov/Record/IND43865393>
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p.
- GARCIA, D.C.; BARROS, A.C.S.A.; PESKE, S.T.; MENEZES, N.L. Qualidade fisiológica de sementes de trigo submetidas à secagem estacionária com ar ambiente forçado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.158-166, 2005. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222005000100020&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222005000100020&script=sci_arttext)
- GASPAR-OLIVEIRA, C.M.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.160-167, 2009. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222009000300004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222009000300004&script=sci_arttext)

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; VAN AELST, A.C.; HEMMINGA, M.A. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. **Plant, Cell and Environment**, v.22, p.1121-1131, 1999. [http://ntmf.mf.wau.nl/hemminga/Online\\_articles/HemmingaGroup/HoekstraPlantCellEnvir\(1999\)22,1121-1131.pdf](http://ntmf.mf.wau.nl/hemminga/Online_articles/HemmingaGroup/HoekstraPlantCellEnvir(1999)22,1121-1131.pdf)

ISTA. International Seed Testing Association. Biochemical test for viability: the topographical tetrazolium test. In: **International rules for seed testing**. ed. 2008. Bassersdorf, 2008. cap.6, p.1-30.

KRUSE, M. Embryo excision versus longitudinal cut in tetrazolium viability determination of cereal seeds. **Seed Science and Technology**, v.24, p.171-183, 1996. <https://www.uni-hohenheim.de/publication/embryo-excision-versus-longitudinal-cut-in-tetrazolium-viability-determination-of-cereal-seeds-1>

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 25, de 16 de dezembro de 2005. Padrões de identidade e qualidade para produção e comercialização de sementes. Anexo XII - Padrões para produção e comercialização de sementes de trigo e de trigo duro. 2005. [http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/upload/1348856990\\_IN%2025%20de%2020%20de%20dezembro%20de%202005.pdf](http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/upload/1348856990_IN%2025%20de%2020%20de%20dezembro%20de%202005.pdf)

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p. (Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz).

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. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v28n2/a20v28n2.pdf>

RIBEIRO, L.M.; GARCIA, Q.S.; OLIVEIRA, D.M.T.; NEVES, S.C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.4, p.361-368, 2010. <http://webnotes.sct.embrapa.br/pdf/pab2010/04/45n04a03.pdf>

ROCHA JÚNIOR L.S.; USBERTI, R. Qualidade física e fisiológica de sementes de trigo expurgadas com fosfina durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.45-51, 2007. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222007000100007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222007000100007&script=sci_arttext)

SILVA, F. A. S. **Sistema de Assistência Estatística – ASSISTAT versão 7.6 beta**. Departamento de Engenharia Agrícola (DEAG) do CTRN da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – PB, 2008. <http://www.assistat.com/>

SOUZA, C.R.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia preta pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.3, p.57-62, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n3/a06v31n3.pdf>

SOUZA, C.R.; OHLSON, O.C.; GAVAZZA, M.I.A.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.3 p.163-169, 2010. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n3/v32n3a18.pdf>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

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. <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=scipdf&pid=S0718-34292009000200002> &lng=pt&nrm=i&tlng=pt

WAOB. World Agricultural Outlook Board. **World agricultural supply and demand estimates**. ed. 2010. Washington, 2010. 40p.

#### 4. CAPÍTULO II – TESTE DE TETRAZÓLIO EM TRIGO: VIGOR E CLASSES DE SEMENTES

**RESUMO** - O teste de tetrazólio é amplamente utilizado para avaliar o vigor de sementes de várias espécies. Porém, para o trigo, não há recomendação de metodologia específica. O objetivo deste estudo foi propor um procedimento para avaliar o vigor de sementes de trigo através deste teste, permitindo estabelecer classes de qualidade. Foram avaliados quatro diferentes lotes de sementes de trigo por meio da determinação do teor de água e dos testes de germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em campo. Foram testadas as seguintes metodologias: 1) bissecção longitudinal, com disposição das duas metades sobre papel embebido em solução de tetrazólio a 1,0%, a 30 °C, por 2 h; 2) bissecção longitudinal, com imersão de uma das metades em solução de tetrazólio a 0,1%, a 30 °C, por 3 h; e 3) bissecção longitudinal, com imersão de uma das metades em solução de tetrazólio a 0,075%, a 40 °C, por 2 h. Concluiu-se que o teste de tetrazólio é mais eficiente quando conduzido mediante imersão de uma das metades da semente em solução de tetrazólio a 0,075% (40 °C, por 2 h), permitindo a classificação das sementes em quatro classes de qualidade.

**Termos para indexação:** *Triticum aestivum*, qualidade fisiológica, viabilidade.

.....  
Capítulo escrito de acordo com as normas do periódico *Ciência e Agrotecnologia*.



## **TETRAZOLIUM TEST IN WHEAT: VIGOR AND CLASSIFICATIONS OF SEEDS**

**ABSTRACT** - The tetrazolium test is widely used for seed vigor assessment of various plant species. For wheat, however, there is no methodology specifically recommended. This study aimed at proposing a procedure to evaluate vigor of wheat seeds by this test; besides allowing the establishment of seed quality classes. Thus, four different wheat seed lots were assessed by determining the moisture content and through tests of germination, accelerated aging, and field seedling emergence. The following methodologies were assessed: 1) longitudinal bisection of seed, with subsequent placement of the two halves on filter paper moistened with a 1.0% tetrazolium solution, at 30 °C, for 2 h; 2) longitudinal bisection, with subsequent immersion of one seed half into a 1.0% tetrazolium solution, at 30 °C, for 3 h; and 3) longitudinal bisection, with subsequent immersion of one seed half into a 0.075% tetrazolium solution, at 40 °C, for 2 h. It was concluded that the tetrazolium test is more efficient in evaluating wheat seed vigor when performed with immersion of one half of the seed into a 0.075% tetrazolium solution (40 °C, for 2 h), allowing to sort seeds into four quality classes.

**Index terms:** *Triticum aestivum*, physiological quality, viability.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção do trigo está muito abaixo do consumo nacional do grão (CONAB, 2013), sendo que para aumentar a sua produção, faz-se necessário a adoção de medidas eficientes na instalação do campo, como o uso de sementes de alta qualidade fisiológica (Khah et al., 1989). O emprego de sementes de baixa qualidade gera atraso na emergência de plântulas em campo, resultando em menor crescimento da parte aérea e do sistema radicular (Khah et al., 1989; Merotto Júnior, 1999), baixo estande de plantas (TeKrony e Egli, 1991) e menor tolerância a seca (Sloane et al., 2004; Liao et al., 2006). Estes fatores podem resultar em produção abaixo do esperado.

Nas etapas de produção de sementes, os testes que fornecem resultados de análise da qualidade em período de tempo curto são fundamentais para monitorar o controle de qualidade das sementes produzidas (Lima et al., 2010). Nesse contexto, o teste de tetrazólio tem-se destacado, por ser um método rápido, que permite estimar a viabilidade e o vigor de lotes de sementes em menos de 24 horas (Costa et al., 2007). O teste também possibilita diagnosticar causas da deterioração das sementes. Para soja, por exemplo, é possível analisar danos por secagem, umidade, percevejo e injúrias físicas (França Neto et al., 1998).

Para o trigo, o teste de tetrazólio possibilita a avaliação da viabilidade, porém os métodos indicados na literatura diferem bastante quanto à forma de umedecimento, preparo e coloração das sementes, não havendo critérios para estimar o vigor e nem o estabelecimento de classes de sementes (ISTA, 2008; Brasil, 2009). Com relação às vantagens que o teste apresenta para análise da viabilidade das sementes de trigo, a que mais se destaca são para as sementes recém colhidas. Estas, não precisariam passar por tratamento para superação de dormência antes da avaliação, agilizando os resultados para a tomada de decisão quanto ao destino dos lotes.

O teste de tetrazólio para avaliação do vigor tem sido difundido para algumas espécies, tais como milho (Dias e Barros, 1995), soja (França Neto et al., 1998), melancia (Bhering et al., 2005), tomate (Santos et al., 2007) e pepino (Lima et al., 2010); porém, diferindo para cada espécie quanto aos critérios de condução e de avaliação.

Dessa forma, na avaliação da viabilidade e do vigor das sementes são estabelecidas classes de sementes com distintos níveis de categoria. O conjunto das categorias que compõe as classes de sementes possibilita distinguir as sementes viáveis e vigorosas (vigor) das viáveis e não vigorosas (viabilidade) (Dias e Barros, 1995; França Neto et al., 1998; Bhering

et al., 2005; Santos et al., 2007; Lima et al., 2010), apresentando no final da avaliação resultados que permitam estimar o vigor e a viabilidade das sementes. O conhecimento da viabilidade permite determinar o potencial de germinação das sementes quiescentes quando expostas a ambiente favorável (Marcos Filho, 2005); já o vigor da semente possibilita determinar a capacidade da mesma para a emergência e o crescimento uniforme de plântulas normais, sob amplas condições de ambiente (AOSA, 1983).

Assim, o teste de tetrazólio é aplicado para avaliação da viabilidade e do vigor de várias espécies, com variações no número das classes de sementes. Para as sementes de soja, são estabelecidas oito classes (França Neto et al., 1998); para as de milho, três classes (Dias e Barros, 1995); melancia, cinco classes (Bhering et al., 2005); e para as de tomate, pepino e macaúba, três classes (Santos et al., 2007; Lima et al., 2010; Ribeiro et al., 2010).

No caso do trigo, há carência de informações sobre o uso do teste de tetrazólio para se determinar o vigor, não havendo recomendação de metodologia para sua condução e nem o estabelecimento de classes para sua avaliação (ISTA, 2008; Brasil, 2009).

Nesse sentido, objetivou-se propor um procedimento para avaliação do vigor de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio, com o estabelecimento de classes de interpretação das sementes.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná, e no Laboratório de Análise de Sementes Oficial da Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (CLASPAR), em Curitiba, no período de março de 2011 a agosto de 2012.

Inicialmente, foram obtidos o total de 120 lotes de sementes de trigo pertencente às cultivares Mirante, Safira e BRS Tangará, produzidas nas safras 2010/10 e 2011/11 nos municípios de Castro, Ponta Grossa e Tibagi, ambos pertencentes ao Estado do Paraná. Posteriormente, foi determinado o teor de água (Brasil, 2009) dos lotes e as sementes foram analisadas quanto à sua qualidade fisiológica, por meio dos testes de germinação (Brasil, 2009) e envelhecimento acelerado (Ohlson et al., 2010), adotando-se para as análises estatísticas, de ambos os testes, quatro repetições de 50 sementes cada.

Para a realização da pesquisa foram selecionados quatro lotes de sementes de trigo pertencentes a cultivar BRS Tangará, com níveis distintos de qualidade fisiológica, uma vez

que os lotes de sementes das cultivares Mirante e Safira não apresentaram diferenças quanto a sua qualidade fisiológica, restringindo seu uso na pesquisa.

A amostra de sementes de cada lote da cultivar BRS Tangará foi homogeneizada primeiramente em um divisor centrífugo, baseando-se nos critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Ao final da homogeneização, dividiu-se cada lote de sementes em quatro subamostras (que constituíram as repetições estatísticas) de peso semelhante. Posteriormente, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel do tipo Kraft e armazenadas em ambiente controlado (14 °C e 60% de umidade relativa do ar), durante todo o período experimental, visando minimizar a intensidade de deterioração.

As seguintes avaliações foram realizadas:

1) Determinação do teor de água: realizada pelo método de estufa a  $105\pm 3$  °C, por 24 horas, utilizando-se duas subamostras de 5,0 g de sementes para cada repetição (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de teor de água para cada lote, na base úmida.

2) Teste de germinação: para cada repetição, foram tomadas duas subamostras de 50 sementes cada (totalizando assim 8 repetições por lote), distribuídas em rolo de papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato e mantidas em germinador, a 20 °C, sob regime de luz constante. A contagem de plântulas normais foi realizada no quinto dia após semeadura, baseando-se nos critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média para cada lote.

3) Envelhecimento acelerado: foi adotado procedimento recomendado por Ohlson et al. (2010), utilizando-se caixas de plástico (11,0x11,0x3,5 cm) como mini-câmaras, possuindo em seu interior uma lâmina de água equivalente a 40 mL e, acima dessa lâmina, uma bandeja de tela de alumínio, onde as sementes foram distribuídas formando uma camada única, a 43 °C e 100% de umidade relativa do ar, durante 48 h e mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. Em seguida, instalou-se o teste de germinação, conforme descrito no item 2. A determinação do teor de água das sementes foi realizada antes e após o período de envelhecimento, conforme descrito no item 1, visando à avaliação da uniformidade das condições do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais para cada lote.

4) Emergência de plântulas em campo: conduzido na área experimental do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná, em

Curitiba, no mês de setembro de 2011. Para cada lote, foram tomadas quatro repetições de 100 sementes cada, semeadas em canteiros de solo, sem correção, sendo distribuídas em cinco linhas de 40 cm de comprimento, espaçadas de 5 cm, com 2 cm entre sementes e 3,0 cm de profundidade, sob temperatura ambiente e com irrigação artificial a cada três dias (quando não ocorria precipitação natural). As avaliações foram realizadas no 14º dia após a semeadura, por meio da contagem de plântulas normais emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem média de plântulas normais para cada lote.

5) Teste de tetrazólio: realizado em duas etapas, sendo estudados na primeira etapa os critérios para obtenção das classes de sementes e, na segunda, a eficiência dos métodos para avaliação do vigor de sementes de trigo.

Na realização da primeira etapa, foram estabelecidos critérios para caracterizar sementes viáveis e vigorosas e sementes viáveis e não vigorosas. O procedimento foi elaborado com base nas estruturas vitais das sementes de trigo (coleóptilo, plúmula, mesocótilo, radícula, coleorriza e a região central do escutelo), nas classes de qualidade definidas para avaliação do tetrazólio em sementes de milho (Dias e Barros, 1995) e no guia para avaliação de cereais descrito nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Os critérios das características das sementes pertencentes à classe não viável foram previamente descritos no Capítulo I.

Para a condução do teste de tetrazólio, foram adotados os procedimentos indicados como os mais consistentes no Capítulo I da Tese, conforme descrito abaixo:

Para cada lote, foram tomadas quatro repetições de 55 sementes, sendo que durante a avaliação foram computados somente 50 sementes por repetição. O emprego de 10% a mais de sementes foi adotado como medida de segurança em caso de problemas durante a etapa de preparo. As sementes foram pré-umedecidas entre papel toalha com volume de água na quantidade equivalente a 2,5 vezes sua massa, por 18 horas, a 20 °C (Brasil, 2009), sendo estudadas as seguintes formas de preparo e coloração.

a) corte da semente em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma, com colocação das duas metades da semente sobre papel filtro umedecido (Souza et al., 2009), com solução 1,0% de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (ISTA, 2008), no volume de 2,5 vezes a massa do papel seco, a 30 °C no escuro (Brasil, 2009), por 2 horas;

b) corte da semente em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma, com imersão de uma das metades da semente em 3 mL de solução, a 0,075% de cloreto de

2,3,5 trifenil tetrazólio (Dias e Barros, 1995), em copos de plásticos (capacidade de 50 mL), a 40 °C, no escuro, por 2 horas;

c) corte da semente em bissecção longitudinal ao longo do embrião e do endosperma, com imersão de uma das metades da semente em 3 mL de solução, a 0,1% de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (Dias e Barros, 1995), em copos de plásticos (capacidade de 50 mL), a 30 °C, no escuro, por 3 horas.

Após cada período de coloração, as sementes foram mantidas sobre o papel filtro (coloração sobre papel) ou imersas em água (coloração por imersão) em refrigeração (5 a 10 °C), até o momento da avaliação, realizada no mesmo dia da coloração.

Para a descrição das classes de qualidade, as sementes foram avaliadas individualmente, usando-se como critério: suas estruturas vitais; a integridade dos tecidos; a localização e extensão dos danos e das áreas descoloridas; a intensidade de coloração e textura dos tecidos. Com base nas características observadas, foram elaborados desenhos manuais dos embriões do trigo, que serviram como padrão contendo as características que determinavam a distinção das classes de sementes. Posteriormente, as sementes foram fotografadas individualmente, visando ilustrar as distintas classes de qualidades obtidas na pesquisa.

Definidos os critérios para avaliação da viabilidade e do vigor das sementes de trigo pelo teste de tetrazólio, foi realizada a segunda etapa da pesquisa, sendo estudada a eficiência dos métodos de condução do teste de tetrazólio, comparados em relação aos testes de germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em campo, segundo procedimento descrito anteriormente.

Os dados obtidos nos testes, exceto para determinação do teor de água, foram analisados de acordo com delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições, separadamente para cada teste conduzido, sendo os valores obtidos pelos testes de tetrazólio e de emergência de plântulas em campo, analisados com quatro repetições. Determinou-se, também, o coeficiente de correlação de Spearman entre os dados dos testes de emergência de plântula em campo e os de vigor pelo teste de tetrazólio; e entre os dados do teste de germinação e os de viabilidade pelo teste de tetrazólio. Este coeficiente é um método de correlação não paramétrico, ou seja, ele avalia uma função monótona de similaridade de ranqueamento entre duas variáveis. A análise da variância foi realizada empregando o sistema computacional ASSISTAT, versão 7.6 beta (Silva, 2008), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água das sementes para os quatro lotes foram similares, apresentando variação de 0,6% (Tabela 5). Este fato se faz importante para a confiabilidade das avaliações e obtenção de resultados consistentes (Marcos Filho, 2005).

Pelo teste de germinação (Tabela 5) foi possível identificar os lotes 1, 2 e 3 como os de qualidade superior e o lote 4 como de qualidade inferior, estando porém todos acima do padrão de comercialização de sementes, o qual é acima de 80%, estabelecidos pela Instrução Normativa n.º 25 (MAPA, 2005). Vale ressaltar que o teste de germinação, por ser realizado sob condições adequadas de água, temperatura e luminosidade (ISTA, 2004; Brasil, 2009), tem o potencial de expressar a máxima germinação das sementes.

No teste de envelhecimento acelerado observou-se ranqueamento dos lotes de maneira similar ao obtido na germinação (Tabela 5). O teste de envelhecimento acelerado é um dos mais indicados para avaliação do vigor das sementes (TeKrony, 1995), pois possibilita estimar a qualidade fisiológica das sementes após períodos de estresse, condicionados por alta temperatura e umidade relativa.

**TABELA 5** – Dados do teor de água da semente, germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em campo de quatro lotes de trigo, cultivar BRS Tangará.

Lotes	Teor de água	Germinação	Envelhecimento acelerado	Emergência de plântula
	----- % -----			
1	12,9	96 a	90 a	83 a
2	12,5	93 a	89 a	76 ab
3	12,3	93 a	86 a	69 bc
4	12,6	80 b	62 b	65 c
<b>C.V. (%)</b>	-	3,8	5,3	5,9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

Para os resultados obtidos pelo teste de emergência de plântulas em campo (Tabela 5), verificaram-se diferentes níveis de vigor entre os lotes estudados: o lote 1 exibiu qualidade

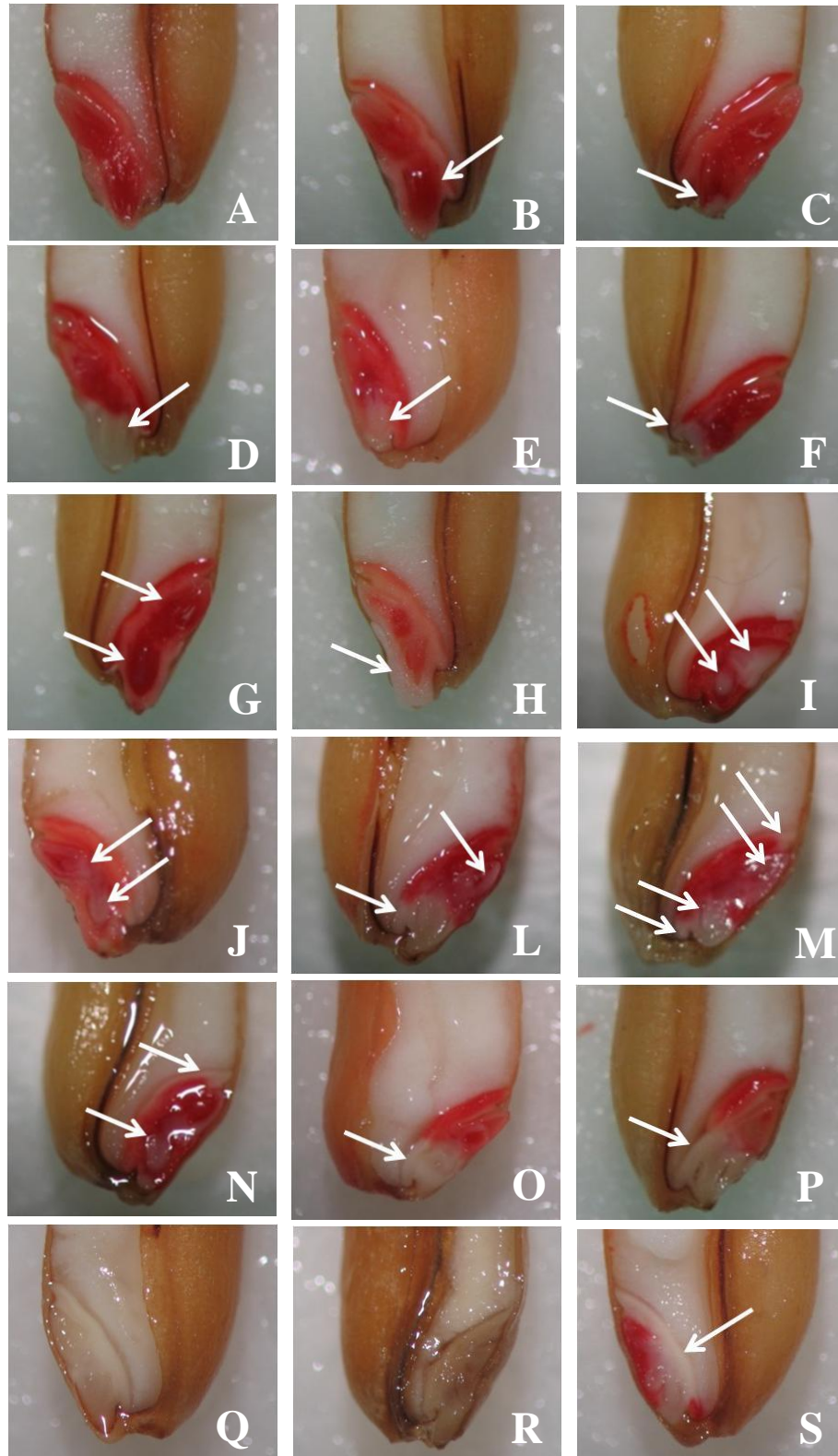
superior, os lotes 2 e 3 tiveram comportamento intermediário, enquanto o lote 4 revelou qualidade inferior. O teste de emergência de plântulas em campo estima o comportamento das sementes em campo, principalmente sob condições não favoráveis para a germinação das sementes (Byrum e Copeland, 1995). Em função disso, seu uso na comparação de métodos que analisem o vigor das sementes, tem sido adotado como padrão para aferição de novos protocolos.

Para obtenção dos resultados da viabilidade e do vigor de sementes de trigo pelo teste de tetrazólio, as sementes foram analisadas uma a uma, segundo critérios estabelecidos na Tabela 6, computando-se como número de sementes viáveis (viabilidade) as incluídas nas classes de sementes de 1 e 2; e como potencialmente vigorosas (vigor) as incluídas somente na classe 1. Na Figura 5 estão ilustradas as classes estabelecidas no estudo.



**TABELA 6** – Classes de sementes para avaliação do teste de tetrazólio em trigo.

<b>Classe de sementes</b>	<b>Descrição</b>
<b>1 - viáveis e vigorosas</b>	Sementes perfeitas, apresentando coloração rosa brilhante, uniforme e sem lesões do embrião (Figura 5A); ou com embrião cor de rosa brilhante, com pequenas áreas ou pontos com coloração mais intensa (Figura 5B); ou com pequenos pontos deteriorados ou tecidos mortos nas extremidades do escutelo, sem atingir a região vital (Figura 5C).
<b>2 - viáveis e não vigorosas</b>	Sementes que têm danos atingindo a radícula, mas com a região do mesocótilo (raízes seminais) intacta (Figuras 5D, 5E e 5F); sementes com coloração vermelha intensa na região do embrião, indicando maior deterioração do tecido lesionado (Figura 5G); sementes que apresentam danos ou regiões descoloridas em áreas maiores do escutelo, desde que não atinjam as regiões vitais do embrião (Figura 5H).
<b>3 - não viáveis</b>	Sementes com intensa coloração do embrião com áreas descoloridas sobre a plúmula, mais a região do coleóptilo e radícula (Figura 5I); com áreas descoloridas sobre a plúmula, mais a região da radícula (Figura 5J); e com áreas descoloridas sobre o coleóptilo mais a região da radícula e parte do escutelo (Figuras 5L e 5M); sementes com danos ou regiões descoloridas no mesocótilo e parte do escutelo (Figuras 5N e 5O), mais a região da radícula e coleorriza (Figura 5S); sementes que apresentam danos ou regiões descoloridas na porção central do escutelo (Figura 5P).
<b>4 - mortas</b>	Embrião totalmente acinzentado (Figuras 5Q e 5R).



**FIGURA 5** - Sementes de trigo: classe 1 (A, B e C); classe 2 (D, E, F, G e H); classe 3 (I, J, L, M, N, O, P e S); e classe 4 (Q e R).

A viabilidade das sementes de trigo, pelo teste de tetrazólio, é apresentada na Tabela 7. Observou-se que o uso da solução a 0,075% permitiu separar os lotes em três níveis de qualidade: alta (lote 1), intermediária (lotes 2 e 3) e baixa (lote 4). Comparando esses resultados com aqueles obtidos pelo teste de germinação das sementes (Tabela 5), observou-se maior sensibilidade desse método (TZ-viabilidade), na distinção de nível intermediário de viabilidade entre os lotes de sementes (lotes 2 e 3). O uso de solução de tetrazólio a 0,075% tem sido empregado na análise da viabilidade em sementes de várias espécies, como a soja (França Neto et al., 1998), o milho (Dias e Barros, 1995), a abobrinha (Barros et al., 2005) e a melancia (Bhering et al., 2005), possibilitando além da análise da viabilidade das sementes dessas espécies, o maior rendimento de solução de tetrazólio durante as avaliações.

Para os resultados da viabilidade das sementes de trigo, obtidos com solução de tetrazólio a 0,1% e 1,0% (Tabela 7), os lotes 1, 2 e 3 foram classificados como de maior viabilidade e o lote 4 como de menor viabilidade, resultados semelhantes aos obtidos no teste de germinação (Tabela 5). Apesar do uso de 0,1% para análise da viabilidade apresentar também rendimento no preparo de solução, o tempo necessário para as sementes permanecerem em contato com a solução de tetrazólio durante o procedimento de coloração foi de três horas, enquanto que no procedimento adotando-se solução de tetrazólio a 0,075% o tempo de coloração foi de duas horas, conferindo a este menor período de condução do teste.

Na análise da viabilidade das sementes adotando-se concentração de 1,0% (Tabela 7), embora o método tenha se destacado como eficiente, o procedimento requer uso de solução de tetrazólio mais concentrada, conferindo menor rendimento do sal de tetrazólio, além do maior período de tempo no preparo das sementes para a coloração (posicionamento das duas metades sobre uma folha de papel umedecido).

**TABELA 7** – Resultados da viabilidade e vigor de sementes dos quatro lotes de trigo, cultivar BRS Tangará, obtidos no teste de tetrazólio (TZ), conduzido com diferentes procedimentos.

Lotes	TZ-Viabilidade		
	Concentração da solução de tetrazólio		
	0,075%	0,1%	1,0%
	----- % -----		
1	93 a	96 a	96 a
2	89 ab	95 a	94 a
3	90 ab	92 a	92 a
4	81 b	81 b	78 b
CV (%)	5,6	2,4	2,9
C.C. Spearman <sup>(1)</sup>	0,80 <sup>n.s.</sup>	1,00**	1,00**

Lotes	TZ-Vigor		
	Concentração da solução de tetrazólio		
	0,075%	0,1%	1,0%
	----- % -----		
1	51 a	40 a	57 a
2	46 ab	36 b	46 b
3	42 bc	32 c	47 b
4	35 c	19 d	9 c
CV (%)	7,9	5,1	5,4
C.C. Spearman <sup>(2)</sup>	1,00**	1,00**	0,80 <sup>n.s.</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ );

\*\* significativo a 1% de probabilidade de erro, pelo teste “t”.

<sup>n.s.</sup> não significativo.

<sup>(1)</sup> Correlação entre os dados dos testes de germinação e de tetrazólio.

<sup>(2)</sup> Correlação entre os dados do teste de emergência de plântulas em campo e de tetrazólio.

Para os dados de vigor, analisado pelo teste de tetrazólio (Tabela 7), houve separação dos lotes de maneira semelhante ao da emergência de plântulas em campo (Tabela 5), quando se empregaram soluções de tetrazólio a 0,075% e 0,1%, exibindo valores altamente significativos (1,00\*\*). Nestes procedimentos, houve nítida coloração dos tecidos da semente (Figura 5A), possibilitando visualizar os tecidos do embrião coloridos de róseo claro brilhante. Outros exemplos de sementes nesta classe estão ilustrados nas Figuras 5B e 5C.

Vale ressaltar que se comprovada sua eficiência, o uso de soluções de tetrazólio mais diluídas tornam-se opções mais adequadas por permitirem o maior rendimento do sal de tetrazólio durante as análises. Para os dois procedimentos de condução da análise do vigor

pelo teste de tetrazólio (0,075%/40 °C/2 h; 0,1%/30 °C/3 h), com alto coeficiente de correlação (1,00\*\*, Tabela 7), verificou-se que ambos apresentaram rendimento quanto à solução de tetrazólio usada; entretanto, o maior destaque é para o procedimento com uso de 0,075%, que também confere um menor período de coloração das sementes (duas horas).

Quando se empregou a solução de 1,0% (Tabela 7), os resultados não apresentaram correlação significativa com a emergência de plântulas em campo (Tabela 5). Provavelmente isto ocorreu pelo fato da concentração 1,0% ter influenciado o processo de coloração das sementes, uma vez que os tecidos do embrião ao invés de coloridos de róseo brilhante apresentaram tonalidade vermelha intensa (similar à cor dos tecidos lesionados). Uma vez que a análise do teste é baseada na coloração dos tecidos do embrião, tornou-se difícil a distinção das sementes pertencentes a classe 1 (sementes viáveis e vigorosas) das pertencentes a classe 2 (viáveis e não vigorosas). Assim, pelos resultados obtidos, verificou-se que as concentrações de 0,075% e 0,1% foram mais eficientes para a determinação do vigor.

#### 4.4. CONCLUSÕES

O teste de tetrazólio para avaliação do vigor de sementes de trigo deve ser conduzido mediante o pré-condicionamento das sementes entre papel (18 horas, a 20 °C), com coloração de uma das metades da semente por imersão, em solução de tetrazólio a 0,075% (40 °C, por 2 horas).

A análise do vigor de sementes de trigo é baseada em quatro classes de sementes (viáveis e vigorosas, viáveis e não vigorosas, não viáveis e mortas).

#### 4.5. REFERÊNCIAS

- AOSA. Association of Official Seed Analysts. **Seed vigor testing handbook**. Wageningen: AOSA. 1983, 88p. (Contribution, 32).
- 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**, v.27, n.2, p.165-171, 2005. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-31222005000200024](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222005000200024)
- BHERING, M.C.; 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. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v27n1/25196.pdfwww>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Mapa/ACS, Brasília, 2009. 399p.
- BYRUM, J.R.; COPELAND, L.O. Variability in vigour testing of maize (*Zea mays* L.) seed. **Seed Science and Technology**, v.23, n.2, p.543-549, 1995.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/2013 – Segundo Levantamento – Novembro/2012**. 2013. 33 p. [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_11\\_08\\_09\\_10\\_48\\_boletim\\_portugues\\_novembro\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_11_08_09_10_48_boletim_portugues_novembro_2012.pdf)
- 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. **Circular técnica 39**, Londrina, Paraná, 2007. 8p.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Avaliação da qualidade de sementes de milho. **Circular 88**, Londrina: IAPAR, 1995. 42p.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: Embrapa CNPSo, 1998. 72p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 116).
- ISTA. International Seed Testing Association. Germination. In: **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2004. cap.5, p.1-5.
- ISTA. International Seed Testing Association. Biochemical test for viability: the topographical tetrazolium test. In: **International Rules for Seed Testing**. ed. 2008. Bassersdorf: ISTA, 2008. cap.6, p.1-30.
- KHAH, E. M.; ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. Effects of seed ageing on growth and yield of spring wheat at different plant-population densities. **Field Crops Research**, v.20, p.175-190,

1989. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000072&pid=S0101-3122200900010001600006&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000072&pid=S0101-3122200900010001600006&lng=en)

LIAO, M., PALTA, J.A., FILLERY, I.R.P. Root characteristics of vigorous wheat improve early nitrogen uptake. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.57, p.1097–1107, 2006. <http://www.publish.csiro.au/paper/AR05439.htm>

LIMA, L.B.; PINTO, T.F.L.; 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.60-68, 2010. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n1/v32n1a07.pdf>

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 25, de 16 de dezembro de 2005. Padrões de identidade e qualidade para produção e comercialização de sementes. Anexo XII - Padrões para produção e comercialização de sementes de trigo e de trigo duro. 2005. [http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/upload/1348856990\\_IN%2025%20de%2020%20de%20dezembro%20de%202005.pdf](http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/upload/1348856990_IN%2025%20de%2020%20de%20dezembro%20de%202005.pdf)

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p. (Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz).

MEROTTO JÚNIOR, A.; SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A.F.; HAVERROTH, H.S. A desuniformidade de emergência reduz o rendimento de grãos de milho. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p.595-601, 1999. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781999000400004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781999000400004&script=sci_arttext)

OHLSON, O.C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CAIEIRO, J.T.; PANOBIANCO, M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.118-124, 2010. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-3122201000400013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-3122201000400013&script=sci_arttext)

RIBEIRO, L.M.; GARCIA, Q.S.; OLIVEIRA, D.M.T.; NEVES, S.C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.4, p.361-368, 2010.

SANTOS, M.A.O.; NOVENBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, v.35, n.1, p.213-223, 2007. <http://www.ingentaconnect.com/content/ista/sst/2007/00000035/00000001/art00019>

SILVA, F. A. S. **Sistema de Assistência Estatística – ASSISTAT versão 7.6 beta**. Departamento de Engenharia Agrícola (DEAG) do CTRN da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – PB, 2008. <http://www.assistat.com/>

SLOANE, D.H.G., GILL, G.S., MCDONALD, G.K. The impact of agronomic manipulation of early vigour in wheat on growth and yield in South Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.55, p.645–654, 2004. <http://www.publish.csiro.au/paper/AR03170.htm>



TEKRONY, D.M.; EGLI, D. B. Relationship of seed vigor to crop yield: a review. **Crop Science**, v.31, p.816-822, 1991.  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000109&pid=S0101-3122200900010001600026&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000109&pid=S0101-3122200900010001600026&lng=en)

TEKRONY, D.M. Accelerated aging test. In: HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. (Ed.) **Handbook of vigour test methods**. 3.ed. Zurich: ISTA, p.35-50, 1995.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos na pesquisa, constatou-se que é possível analisar a viabilidade e vigor das sementes de trigo por meio de um método prático e eficiente, sendo possível o estabelecimento de quatro classes de sementes. No entanto, na análise visual das sementes, observou-se que vários fatores podem afetar a qualidade das sementes de trigo. Nesse sentido, constatou-se a possibilidade de continuidade do estudo através da obtenção do diagnóstico das causas da deterioração das sementes, como os danos por temperatura, geada, secagem, mecânicos e umidade. Na literatura, existem informações do diagnóstico de danos por secagem, identificados por meio da presença de áreas descoloridas na região central do escutelo (ISTA, 2008; Brasil, 2009). Entretanto, estudos que abordem a análise dos demais danos são escassos.

Constatou-se, também, no teste de tetrazólio que durante o pré-umedecimento algumas sementes iniciam o processo de germinação (emissão da raiz primária). Recomenda-se que durante o preparo das sementes, não se deve colorir aquelas que já iniciaram a germinação. Isso se dá pela dificuldade de distinção das estruturas do embrião, como a radícula, coleorriza e a parte inferior do escutelo, impedindo assim a correta caracterização do vigor da semente. Essa observação também foi constatada por Novembre et al. (2006) para sementes de braquiária, onde no período de hidratação de 16 horas, a 30 °C, as sementes que atingiram o teor de água entre 27,0% e 29,0% iniciaram a emissão da raiz primária.

Diante do exposto na pesquisa, constatou-se que o teste de tetrazólio permite avaliar a qualidade fisiológica das sementes de trigo, especialmente aquelas dormentes, agilizando a tomada de decisão quanto ao destino dos lotes de sementes.

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

O teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade e vigor de sementes de trigo, sendo possível identificar quatro classes de sementes (viáveis e vigorosas, viáveis e não vigorosas, não viáveis e mortas).

## 7. REFERÊNCIAS GERAIS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/>>. Acessado em: 18 jun. 2012.

AMARAL, A.S.; PESKE, S.T. Testes para avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6 n.12, p.12-15, 2000.

ANDREOLI, C.; BASSOI, M.C.; BRUNETTA, D. Genetic control of seed dormancy and preharvest sprouting in wheat. **Scientia Agricola**, v.63, n.6, p.564-566, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Seed vigor testing handbook**. Wageningen: AOSA. 1983, 88p. (Contribution, 32).

ARTHUR, T.J.; TONKIN, J.H.B. Testando o vigor de sementes. **Informativo ABRATES**, v.1, n.3, p.38-41, 1991.

AUSTRALIAN SEEDS AUTHORITY - ASA. **Introduction to seed testing**. Disponível em: <<http://aseeds.net.au/testing-articles/102-introduction-to-seed-testing>>. Acessado em: 18 jun. 2012.

BATTISTI, R.; SOMAVILLA, L.; BUSANELLO, C.; SCHWERZ, L. Eficiência do uso da massa hectolitro como teste rápido de vigor de semente de trigo (*Triticum aestivum*). **Revista da FZVA**, v.18, n.1, p.125-135. 2011.

BAUDET, L.; VILLELA, F.A. Unidades de beneficiamento de sementes. **Seed News**, v.11, n.2, p.22-26, 2007.

BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.A. 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 399p.

COMPANHIA DE ARMAZÉNS E SILOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS - CASEMG. **Amostragem de produtos**. Disponível em: <<http://www.casemg.com.br/empresa/index.htm>>. Acessado em: 8 ago. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/2013 – Segundo Levantamento – Novembro/2012**. 2013. 33 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_11\\_08\\_09\\_10\\_48\\_boletim\\_portugues\\_novembro\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_11_08_09_10_48_boletim_portugues_novembro_2012.pdf)>. Acessado em: 18 mar. 2013.

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. **Circular técnica 39**, Londrina: EMBRAPA CNPSo, 2007. 8p.

COOPERATIVA TRITÍCOLA DE ESPUMOSO Ltda - COTRIEL. **Segregação de trigo**. 2011. Disponível em: <<http://www.cotriel.com.br/institucional.aspx>>. Acessado em: 8 ago. 2012.

DELOUCHE, J.C. Standardization of vigor tests. **Journal of Seed Technology**, v.1, n.2, p.75-85, 1976.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, v.1, n.2, p.427-452, 1973.

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**, v.25, p.409-417, 1997.

DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Avaliação da qualidade de sementes de milho. **Circular 88**, Londrina: IAPAR, 1995. 42p.

FOOD AND AGRICULTURE PRODUCTION - FAO. **Production - Country rank in the world, by commodity**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 9 de abr. de 2013.

FERREIRA, G. **O desafio do trigo**. Gazeta do Povo on line. Disponível em: <<http://www.gazetadopovo.com.br/colunistas/conteudo.phtml?tl=1&id=1251893&tit=O-desafio-do-trigo>>. Acessado em: 4 jun. 2012.

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

HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. **Handbook of vigor test methods**. Zürich: ISTA, 1995. 117p.

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T., ed. – **Seed biology**. New York: Academic Press, v.3, p.145-245, 1972.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **Biochemical test for viability: the topographical tetrazolium test**. In: International rules for seed testing. ed. 2008. Bassersdorf: ISTA, 2008. cap.6, p.1-30.

KHAH, E. M.; ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. Effects of seed ageing on growth and yield of spring wheat at different plant-population densities. **Field Crops Research**, v.20, p.175-190, 1989.

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo Abrates**, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P. Tecnologias que valorizam a semente de soja. **Seed News**, n.6, 2006.

LIAO, M., PALTA, J.A., FILLERY, I.R.P. Root characteristics of vigorous wheat improve early nitrogen uptake. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.57, p.1097-1107, 2006.

LIMA, L.B.; PINTO, T.F.L.; 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.60-68, 2010.

LIMA, T.C.; MEDINA, P.F.; FANAN, S. Avaliação do vigor de sementes de trigo pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.106-113, 2006.

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

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

MENDES, R.C.; DIAS, D.C.F.S.; PEREIRA, M.D.; DIAS, L.A.S. Testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.1, p.114-120, 2010.

MENON, J.C.M.; BARROS, A.C.S.A.; MELLO, V.D.C; ZONTA, E.P. Avaliação da qualidade física e fisiológica da semente de soja produzida no estado do Paraná na safra 1989/90. **Revista Brasileira de Sementes**, v.15, n.2, p.203-208, 1993.

MEROTTO JÚNIOR, A.; SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A.F.; HAVERROTH, H.S. A desuniformidade de emergência reduz o rendimento de grãos de milho. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p.595-601, 1999.

MERTZ, L.M.; SEGALIN, S.R.; HUTH, C.; D'AVILA ROSA, T. Condutividade elétrica individual para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de trigo. **Informativo Abrates**, v.22, n.1, p.35-39, 2012.

MODARRESI, R.; RUCKER, M.; TEKRONY, D.M. Accelerated ageing test for comparing wheat seed vigour. **Seed Science and Technology**, v.30, n.3, p.683-687, 2002.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: Conceitos e Testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2, p.1-24.

NOVENBRE, 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.

OHLSON, O.C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CAIEIRO, J.T.; PANOBIANCO, M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.118-124, 2010.

PIANA, Z.; TILLMANN, A.A.; SILVA, W.R. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes através de testes rápidos. **Informativo ABRATES**, v.3, n.1, p.37-46, 1992.

PLAZAS, I.H.A.Z. **Associação entre fungos e insetos no armazenamento de sementes de trigo (*Triticum aestivum*)**. 2002. 96p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico de Campinas, IAC.

RIBEIRO, L.M.; GARCIA, Q.S.; OLIVEIRA, D.M.T.; NEVES, S.C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.4, p.361-368, 2010.

SANTOS, M.A.O.; NOVENBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, v.35, n.1, p.213-223, 2007.

SLOANE, D.H.G., GILL, G.S., MCDONALD, G.K. The impact of agronomic manipulation of early vigour in wheat on growth and yield in South Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.55, p.645-654, 2004.

TEKRONY, D.M.; EGLI, D. B. Relationship of seed vigor to crop yield: a review. **Crop Science**, v.31, p.816-822, 1991.

TIBOLA, C. S.; LORINI, I.; MIRANDA, M. Z. **Boas práticas e sistema APPCC na pós-colheita de trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2009. 20p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 105).

VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: Conceitos e Testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 8, p.1-13.

## 8. ANEXOS (ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS)

CARVALHO, T.C.; KRZYZANOWSLI, F.C.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M.  
Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. **Journal of Seed Science** (no prelo).

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



Londrina, 23 de maio de 2013.

Ilmo(a) Sr(a) Tereza Cristina de Carvalho,

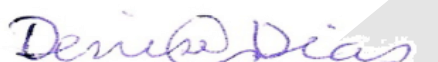
Prezado(a) Senhor(a),

Comunicamos que o trabalho "Tetrazolium test adjustment for wheat seeds", de autoria de Tereza Cristina de Carvalho, Francisco Carlos Krzyzanowski, Osvaldo de Castro Ohlson e Maristela Panobianco, foi aprovado para publicação no Journal of Seed Science, estando em fase de editoração final pelo Comitê Editorial.

Informamos que o mesmo será publicado com a maior brevidade possível, respeitando a ordem de aprovação para publicação.

Renovando protesto de consideração e apreço, subscrevemo-nos.

Cordialmente,

  
Denise C. Fernandes Santos Dias  
Editora RBS

  
Gilda Pizzolante de Pádua  
Editora RBS

# IMPROVED ASSESSMENT OF WHEAT SEEDS VIGOR

## Melhor avaliação do vigor de sementes de trigo

Tereza Cristina de Carvalho<sup>1</sup>, Francisco Carlos Krzyzanowski<sup>2</sup>, Osvaldo de Castro Ohlson<sup>3</sup>, Maristela Panobianco<sup>4</sup>

### ABSTRACT

The tetrazolium test is widely used for seed vigor assessment of various plant species. For wheat, however, there is no methodology specifically recommended. This study aimed at determining an efficient procedure to evaluate vigor of wheat seeds by this test; besides allowing the establishment of seed quality classes. Thus, four different wheat seed lots were assessed by determining the moisture content and through tests of germination, accelerated aging, and field seedling emergence. The following methodologies were assessed: 1) longitudinal bisection of seed, with subsequent placement of the two halves on filter paper moistened with a 1.0% tetrazolium solution, at 30° C, for 2 h; 2) longitudinal bisection, with subsequent immersion of one seed half into a 1.0% tetrazolium solution, at 30° C, for 3 h; and 3) longitudinal bisection, with subsequent immersion of one seed half into a 0.075% tetrazolium solution, at 40° C, for 2 h. It was concluded that the tetrazolium test is more efficient in evaluating wheat seed vigor when performed with immersion of one half of the seed into a 0.075% tetrazolium solution (40° C, for 2 h) or a 0.1% tetrazolium solution (30° C, during 3 h); allowing to sort seeds into four quality classes.

**Index terms:** *Triticum aestivum*, physiological quality, viability.

### RESUMO

O teste de tetrazólio é amplamente utilizado para avaliar o vigor de sementes de várias espécies. Porém, para o trigo, não há recomendação de metodologia específica. O objetivo, neste estudo, foi determinar um procedimento eficiente para avaliar o vigor de sementes de trigo, por meio deste teste, permitindo estabelecer classes de qualidade. Foram avaliados quatro diferentes lotes de sementes de trigo, por meio da determinação do grau de umidade e dos testes de germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas em campo. Foram testadas as seguintes metodologias: 1) bissecção longitudinal, com disposição das duas metades sobre papel embebido em solução de tetrazólio a 1,0%, a 30° C, por 2 h; 2) bissecção longitudinal, com imersão de uma das metades em solução de tetrazólio a 0,1%, a 30° C, por 3 h; e 3) bissecção longitudinal, com imersão de uma das metades em solução de tetrazólio a 0,075%, a 40° C, por 2 h. Concluiu-se que o teste de tetrazólio é mais eficiente quando conduzido mediante imersão de uma das metades da semente em soluções de tetrazólio a 0,075% (40° C, por 2 h) ou a 0,1% (30° C, por 3 h), permitindo a classificação das sementes em quatro classes de qualidade.

**Termos para indexação:** *Triticum aestivum*, qualidade fisiológica, viabilidade.

(Received in august 17, 2012 and approved in october 10, 2012)

### INTRODUCTION

The wheat occupies the sixth place in the rank of the most cultivated food crops worldwide (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION-FAOSTAT, 2011) and constitutes the main source of calories for more than 1.5 million people (MANSKE et al., 2001). In Brazil, the annual production of this cereal reaches only 5.9 million metric tons; notwithstanding the national consumption of the grain requires 10.4 million metric tons annually, being thus enormously insufficient to supply the internal market demand (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2011).

To increase wheat production, the adoption of efficient cultural practices in the establishment of the

crop in the field such as: the use of high physiological quality seeds (KHAH; ROBERTS; ELLIS, 1989) becomes necessary, once the use of low quality seeds leads to delay of emergence of seedlings in the field, which results in smaller growth of the aerial plant parts as well as smaller growth of the root system (KHAH; ROBERTS; ELLIS, 1989; MEROTTO-JÚNIOR, 1999); low and irregular plant stand in the field (TEKRONY; EGLI, 1991); and lower tolerance to drought (SLOANE; GILL; MCDONALD, 2004; LIAO; PALTA; FILLERY, 2006). These factors may result in grain yield far behind the expected.

The tetrazolium test plays an extremely important role in seed quality control programs, since it is a fast

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná/UFPR – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo – Rua dos Funcionários – 1540 – 80035-050 – Curitiba – PR – Brasil – tcdcarva@gmail.com

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja – Londrina – PR – Brasil

<sup>3</sup>Empresa Paranaense de Classificação de Produtos – Laboratório de Análise de Sementes de Curitiba – Curitiba – PR – Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal do Paraná/UFPR – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo – Curitiba – PR – Brasil

method and allows the assessment of viability and vigor of seed lots in less than 24 hours. The test also allows diagnosing the cause of seed deterioration. For soybean seeds, for example, it is possible to detect the damages caused by the drying process, by weathering, by attack of stink bugs, and/or those caused by mechanical damages (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998). In relation to the advantages of such test for seeds of wheat deserves emphasis the possibility of its use to assess freshly harvested seeds that would not need to undergo specific treatment to overcome dormancy before physiological quality evaluation; therefore speeding results for the decision taking about the destination of the seed lot.

The tetrazolium test has been successfully used on evaluating vigor of seeds of several plant species, such as: corn (DIAS; BARROS, 1995); soybean (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998); watermelon (BHERING; DIAS; BARROS, 2005); tomato (SANTOS; NOVENBRE; MARCOS FILHO, 2007); and cucumber (LIMA; PINTO; NOVENBRE, 2010). In the case of wheat seeds, however, the information available on its use for determination of vigor is scarce; and there is no specific methodology recommendation either for its conduction or the establishment of quality classes during assessment.

In this sense, the objective with this study was to determine an efficient methodology for the assessment of vigor of wheat seeds by using the tetrazolium test; with the establishment of quality classes.

## MATERIAL AND METHODS

The research work was carried out in the Seed Analysis Laboratory of the Department of Phytotechnology and Phytosanitary Sciences, Federal University of Paraná, municipality of Curitiba, State of Paraná, Brazil, using four different wheat seed lots of cv. BRS Tangará.

The seed sample of each seed lot was first homogenized into a centrifugal separator, according to criteria established by the Rules for Seed Analysis (RSA) (BRASIL, 2009). After homogenization, the sample was subdivided into four subsamples (replications), of similar weight for each lot, using the same device. Afterwards, the seed were packaged into Kraft paper bags and stored into a controlled environmental chamber (14°C; 60% RH) during all the experimental period, aiming at minimizing deterioration intensity.

The following assessments were afterwards performed:

**Moisture content determination:** this test was performed by the oven method at  $105\pm 3^\circ\text{C}$ , for 24 h, using two subsamples of 5.0 g each, for each replication (BRASIL, 2009). Results were expressed in percentage mean for each seed lot, in wet basis.

**Germination test:** for each replication, two subsamples of 50 seeds each were taken, thus totaling eight replications per seed lot. The seeds of each replication were then evenly distributed on top of two sheets of paper towels, covered with another sheet of the same paper, all previously moistened with distilled  $\text{H}_2\text{O}$  in a proportion equivalent to 2.5 times the mass of the dry substrate, and made into rolls. Immediately after, these rolls were placed into a seed germinator, at  $20^\circ\text{C}$ , under constant light. The counting of seedling was performed at the fifth day after sowing, according to RSA (BRASIL, 2009). Results were expressed as the mean percentage of normal seedlings for each seed lot.

**Accelerated aging:** for this test, the procedure recommended by por Ohlson et al. (2010) was used. For this, the test was conducted using 11 cm x 11 cm x 3.5 cm transparent plastic germination boxes (gerbox) containing 40 ml of distilled  $\text{H}_2\text{O}$  at the bottom. An aluminum screen was then fixed at the upper edge of each gerbox where seed of each subsample were uniformly distributed on a single layer. The sets (gerbox + seeds) were subsequently placed into a controlled environmental chamber (at  $43^\circ\text{C}$  and 100% RH) during 48 h. After that period, the seeds of each gerbox were subjected to germination test as previously described in the item 2. Determination of moisture content was performed, as already described in the item 1, before and after the accelerated aging procedure aiming at assessing the uniformity of the test conditions. Results were expressed as the mean percentage of normal seedlings for each seed lot.

**Emergence of seedlings in the field:** this test was carried out within an experimental area of the Department of Phytotechnology and Phytosanitary Sciences, Federal University of Paraná, in September, 2011. For each seed lot, four replications of 100 seeds each were taken. These seeds were sowed in small plots, with soil without fertility correction, into five rows with 3.0 cm deep and 40 cm long, with 5.0 cm interspaces and 2.0 cm between seeds within the row, with artificial irrigation at each three days (when natural precipitation had not occurred). The evaluations were performed at the fourteenth day after sowing by counting the number of normal seedlings emerged; and the results were

expressed as the mean percentage of normal seedling for each seed lot.

**Tetrazolium test:** for this test, four replications of 55 seeds each were withdrawn from each seed lot. During the assessment, however, only 50 seeds per replication were computed. The procedure of using an additional 10% of seeds was adopted as safety; in case of problems occurrence in the hydration of seeds during the preconditioning step. The seeds were previously moisturized between one sheet of paper towels, moistened with distilled water in a volume equivalent to 2.5 times the mass of dry substrate, at 20° C, during 18 h (BRASIL, 2009). The following treatments were then performed:

a) longitudinal cut, bisecting the seed along the embryo and endosperm with the aid of a razor blade; and then placing the two halves of the seed on top of filter paper moistened with a 1.0% solution of 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION-ISTA, 2008) in a volume equivalent to 2.5 times the mass of the dry substrate, in the dark, during 2 h (BRASIL, 2009);

b) longitudinal cut, bisecting the seed along the embryo and endosperm with the aid of a razor blade; and then immersing one half of the seed into a 3 ml of a 0.075% or 0.1% of 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride solutions (Dias; Barros, 1995), into 50 ml capacity plastic cups, at 30° C (for 3 h) or at 40° C (for 2 h), respectively, in the dark.

After each staining period, the seeds were maintained on top of the filter paper (staining on paper) or immersed into water (staining by immersion), under refrigeration (varying from 5° C to 10° C) until assessment, which was performed at the same day of staining,

Based on the vital structures of wheat seeds (coleoptile, plumule, mesocotyl, radicle, coleorhiza, and the central region of the scutellum) and on the classes defined

for the assessment of corn seeds by the tetrazolium test (DIAS; BARROS, 1995), classes of vigor for wheat seeds by the tetrazolium test were proposed.

Data obtained in the tests, except for moisture content determination, were analyzed using a completely randomized experimental design, with eight replications, and the ANOVA performed separately for each test performed. Data obtained by the tetrazolium test were analyzed with four replications. It was also determined the Spearman correlation coefficient between data obtained on seedling emergence in the field and on the tetrazolium test data. Means were compared by the Tukey test at 1% probability ( $p \leq 0,01$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

The moisture content of seeds for the four seed lots were similar and did not present statistically significant differences between each other, showing a variation of only 0.6% (Table 1). Such fact is important, since demonstrates the reliability of the evaluations and the feasibility in the achievement of consistent results. By the germination test (Table 1) it was possible to sort the seed lots 1, 2, and 3 as of the highest quality; and the seed lot 4 was the one with the lowest performance. Nevertheless all the four seed lots have presented germination above the standards established for seed commercialization. In the accelerated aging test it was possible to detect statistically significant difference only for the seed lot 4, in a similar way to what was obtained in the test of germination (Table 1).

Differently, for emergence of seedlings in the field (Table 1) statistically significant differences on the levels of vigor were detected among the four seed lots studied: the seed lot 1 has presented the highest quality; the seed lots 2 and 3 had an intermediary behavior; while the seed lot 4 presented the lowest quality.

Table 1 – Moisture content of seeds and percentage of wheat seedlings assessed by tests of germination, accelerated aging and seedling emergence in the field, obtained from four different wheat seed lots, cv. BRS Tangará.

Seed lots	Moisture content	Germination	Accelerated aging	Seedling emergence in the field
		----- % -----		
1	12.9	96 a*	90 a*	83 a*
2	12.5	93 a	89 a	76 ab
3	12.3	93 a	86 a	69 bc
4	12.6	80 b	62 b	65 c
CV (%)	-	3.8	5.3	5.9

\*Means followed by the same letter in the column are not statistically different between each other by the Tukey test at 1% probability ( $p \leq 0.01$ ).

To obtain the results of the tetrazolium test, the seeds were individually assessed according to the established criteria, which are shown on table 2. As viable seeds (viability) were computed those seeds included in the classes 1 and 2; and as potentially vigorous (vigor) only those seeds included in the class 1. In addition to these classes, some seeds were sorted as non-viable (class 3) or as dead seeds (class 4). On the figure 1, the classes established within this study of vigor for wheat seeds by the tetrazolium test are shown.

The viability of the wheat seeds, assessed by the tetrazolium test, is presented on table 3 (upper section). By analyzing data computed, it can be observed that the use of the tetrazolium solution at 0.075% has allowed sorting the seed lots into three quality levels: high quality (lot 1); intermediary quality (lots 2 and 3); and low quality (lot 4). For results obtained with the tetrazolium solution at 0.1% and 1.0%, the seed lots 1, 2, and 3 were sorted in the category of high viability; and the seed lot 4 in the category of low viability, i.e., results similar to those obtained by the germination test (Table 1).

Table 2 – Classes of vigor and viability of wheat seeds obtained through assessment by the tetrazolium test.

Class of seeds	Description
1 – viable and vigorous	Perfect seeds, displaying a shiny pinkish color, superficial, uniform and without lesions in the embryo (Figure 1A); or with the embryo with shiny pink color, with small areas or dots with more intense hue (Figure 1B); or with small deteriorated dots or dead tissues on the extremities of the scutellum, but without reaching the vital region (Figure 1C).
2 – viable and non-vigorous	Seeds with damages reaching the radicle, but with the region of the mesocotyl (seminal roots) intact (Figures 1D, 1E and 1F); seeds with intense and profound red coloration in the embryo region, indicating higher deterioration of the damaged tissue (Figure 1G); seeds presenting damages or discolored regions on larger areas of the scutellum, since these areas do not reach the vital regions of the embryo (Figure 1H).
3 – non-viable	Seeds with intense red coloration of the embryo with discolored areas in the plumule, in addition to the regions of the coleoptile and radicle (Figure 1I); with discolored areas on the plumule and the radicle region (Figure 1J); and with discolored areas in the coleoptile plus the radicle region and part of the scutellum (Figures 1L and 1M); seeds with damages, or discolored regions, in the mesocotyl and part of the scutellum (Figures 1N and 1O); seeds that present damages, or discolored regions, in the central portion of the scutellum (Figure 1P).
4 – dead	Embryo totally grayish (Figures 1Q and 1R).

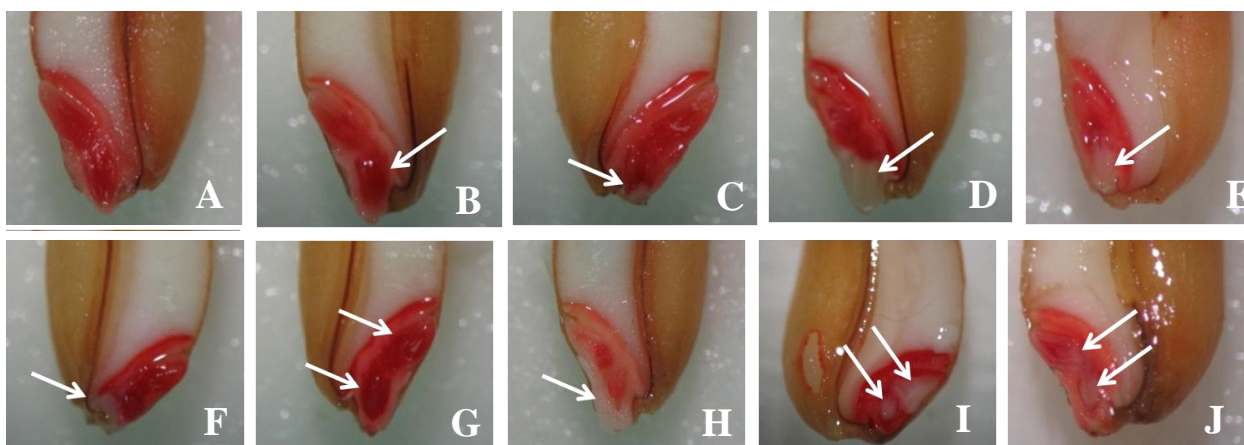


Figure 1 – Classification of quality of wheat seeds established by the tetrazolium test: class 1 (A, B, and C); class 2 (D, E, F, G, and H); class 3 (I, J, L, M, N, O, and P); class 4 (Q and R); and seeds that are beginning to germinate during the hydration procedure (S).

Continue...

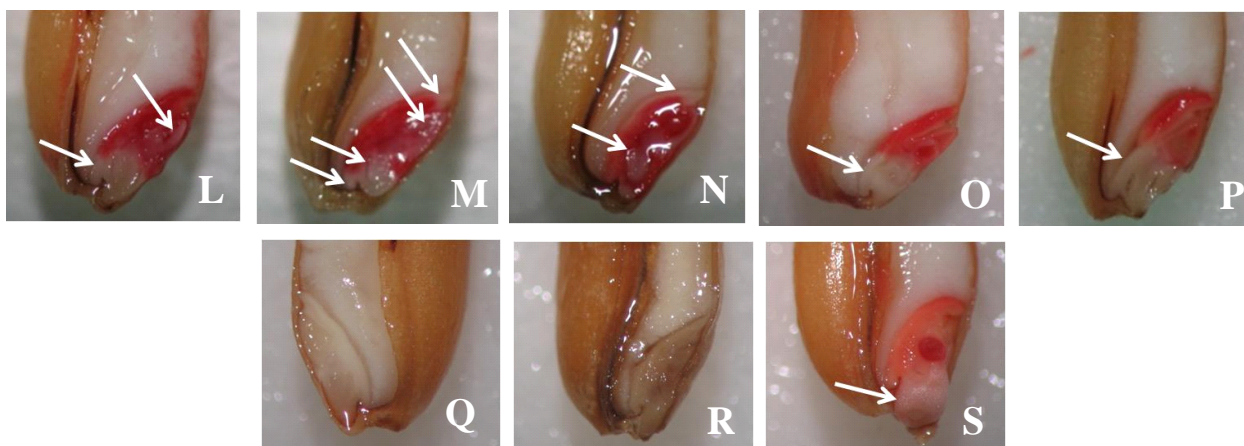


Figure 1 – Continued...

Table 3 – Viability (upper part) and vigor (lower part) of seeds of four wheat seed lots, cv. BRS Tangará, obtained by the tetrazolium test carried out with different procedures.

Seed lots	Viability		
	Concentration of tetrazolium solution		
	0.075%	0.1%	1.0%
	----- % -----		
1	93 a*	96 a*	96 a*
2	89 ab	95 a	94 a
3	90 ab	92 a	92 a
4	81 b	81 b	78 b
CV (%)	5.6	2.4	2.9
Seed lots	Vigor		
	Concentration of tetrazolium solution		
	0.075%	0.1%	1.0%
	----- % -----		
1	51 a*	40 a*	57 a*
2	46 ab	36 b	46 b
3	42 bc	32 c	47 b
4	35 c	19 d	9 c
CV (%)	7.9	5.1	5.4
C.C. Spearman	1.00**	1.00**	0.80 <sup>n.s.</sup>

\*Means followed by the same letter in the column are not statistically different between each other by the Tukey test ( $p \leq 0.01$ ). C.C.Spearman: \*\* significant at 1% probability, by the "t" test; <sup>n.s.</sup> non-significant.

For data on vigor, also assessed by the tetrazolium test (Table 3, lower section) there was a separation of the seed lots similar to that obtained for seedling emergence in the field, when tetrazolium solutions at 0.075% and 0.1%

were used; showing highly significant values (1.00\*\*). With this procedure occurred a very distinct staining of the seed tissues (Figure 1A), thus allowing visualizing the tissues of the embryo, which have acquired a shiny pinkish color.

When the tetrazolium solution at 1.0% concentration was used (Table 3, lower sector) the results did not present significant correlation with seedling emergence in the field (Table 1). This probably occurred because the 1.0% tetrazolium concentration influenced the staining process of the seeds, once the embryo tissues, instead of acquiring the shiny pinkish color, presented an intense red color hue (similar to color of damaged tissues). Since the assessment is based on the color of embryo tissues, the distinction of seed belonging to class 1 (viable and vigorous seeds) from those belonging to class 2 (viable and non-vigorous) became difficult. Therefore, by the results obtained it was verified that the tetrazolium concentrations of 0.075% and 0.1% were the most efficient in determining wheat seed vigor.

It is recommended that during the process of preconditioning of wheat seeds for the tetrazolium test, the seeds whose germination process have already started (with emission of the primary root), as illustrated on Figure 1S, should not be used. This is due to the fact that the distinction of the structures of the embryo such as the radicle, the coleorhiza, and the lower part of the scutellum becomes difficult, thus preventing the correct characterization of vigor of the seed.

### CONCLUSIONS

The most effective methodologies to evaluate seed vigor are preconditioning of the seeds between moistened paper towels for 18 h, at 20° C and then perform the staining of one half of seed by immersion into a 0.075% tetrazolium solution, at 40° C, during two hours or into a 0.1% tetrazolium solution, at 30° C, during three hours.

The tetrazolium test, when applied to assess wheat seed vigor, allows the sorting of these seeds into four quality classes.

### REFERENCES

- BHERING, M.C.; 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**, Pelotas, v.27, n.1, p.176-182, jun. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ACS, Brasília, DF, Brasil. 2009. 399p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2010/2011 – Quarto Levantamento – Janeiro/2011**. Brasília. 2011. 40p.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. IAPAR, Circular 88, Londrina, PR, Brasil, p.42, 1995.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAOSTAT. **Top production – Wheat**. 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 23 nov. 2011.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. EMBRAPA-CNPSO Documentos 116, Londrina, PR, Brasil, 72 p. 1998.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION-ISTA. Biochemical test for viability: the topographical tetrazolium test. In: **International rules for seed testing**. eds. Bassersdorf, Switzerland. p.1-30, 2008.
- KHAH, E. M.; ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. Effects of seed ageing on growth and yield of spring wheat at different plant-population densities. **Field Crops Research**, Bucks, v.20, p.175-190, 1989.
- LIAO, M.; PALTA, J.A.; FILLERY, I.R.P. Root characteristics of vigorous wheat improve early nitrogen uptake. **Australian Journal of Agricultural Research**, Canberra, v.57, p.1097-1107, set. 2006.
- LIMA, L.B.; PINTO, T.F.L.; NOVENBRE, A.D.L.C. Avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de pepino pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, n.1, p.60-68, 2010.
- MANSKE, G.G.B. et al. Importance of P uptake efficiency versus P utilization for wheat yield in acid and calcareous soils in Mexico. **European Journal of Agronomy**, Bonn, v.14, p.261-274, jul. 2001.
- MEROTTO JÚNIOR, A. et al. A desuniformidade de emergência reduz o rendimento de grãos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.4, p.595-601, 1999.

OHLSON, O.C. et al. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, n.4, p.118-124, 2010.

SANTOS, M.A.O.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.35, n.1, p.213-223, abr. 2007.

SLOANE, D.H.G.; GILL, G.S.; MCDONALD, G.K. The impact of agronomic manipulation of early vigour in wheat on growth and yield in South Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, Canberra, v.55, p.645-654, jul. 2004.

TEKRONY, D.M.; EGLI, D. B. Relationship of seed vigor to crop yield: a review. **Crop Science**, Madison, v.31, p.816-822, mai. 1991.