

VIABILIDADE DAS SEMENTES DE BRAQUIÁRIA PELO TESTE DE TETRAZÓLIO¹

ANA DIONÍSIA DA LUZ COELHO NOVOBRE², HELENA MARIA CARMIGNANI PESCARIN CHAMMA³,
ROSANGELE BALONI ROMEIRO GOMES⁴

RESUMO - Objetivando estimar a viabilidade de sementes de braquiária (*Brachiaria brizantha*) pelo teste de tetrazólio, foram estudadas as condições para a hidratação e a coloração das sementes. Para tanto, utilizando oito lotes de sementes, foram variados os períodos e as temperaturas (2, 4, e 6 horas a 35°C e 40°C; 6 e 16 horas a 30°C) de hidratação e os períodos e as temperaturas (1, 2 e 4 horas a 35°C, 40°C e 45°C; 6 horas a 30°C) de coloração, em solução 0,075% de tetrazólio. As sementes foram classificadas em viáveis e não viáveis. Paralelamente, foram determinados o teor de água (estufa, 105±3°C/24h) e a germinação das sementes (SP, 20-35°C, avaliações aos 7, 14 e 21 dias). As imagens das sementes, viáveis e não viáveis, referentes ao teste de tetrazólio foram registradas por meio de fotografia digital. O delineamento experimental foi em blocos (três épocas) casualizado para cada lote de sementes, com quatro repetições, considerando nove tratamentos para a hidratação das sementes e 11 tratamentos para a coloração, com a comparação das médias pelo teste de Tukey (5%). É possível concluir que o teste de tetrazólio, eficiente para estimar a viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha*, pode ser conduzido com a hidratação das sementes por seis horas a 30°C (sementes com 25% de água) e a coloração por duas horas a 40°C.

Termos para indexação: *Brachiaria brizantha*, análise de semente, germinação.

VIABILITY EVALUATION OF BRACHIARIA SEEDS BY THE TETRAZOLIUM TEST

ABSTRACT - The objective of this research was to determine the conditions to evaluate the viability of *Brachiaria brizantha* seeds by the tetrazolium test. Using eight seed lots, preconditioning periods and temperatures (2, 4 and 6 hours at 35°C and 40°C; 6 and 16 hours at 30°C, between paper) and staining periods and temperatures (1, 2 and 4 hours at 35°C, 40°C and 45°C; 6 hours at 30°C, bisected seed through the embryo, immersed in an aqueous solution of 0.075% tetrazolium chloride) were tested. The tetrazolium test was performed classifying the seeds in two categories: viable and non-viable. Seed water content (oven method, 105±3°C/24h) and germination (TP, 20-35°C, count at 7, 14 and 21 days) were determined. The experimental design was a randomized block with four replications for each seed lot. The multiple mean comparison within treatments was performed using Tukey's test at a 0.05 error level. It was concluded that the tetrazolium test constitutes an efficient option for estimating the viability of *Brachiaria brizantha* seeds. The most adequate condition would be that resulting from a combination of six hours of preconditioning at 30°C (seed water content was 25%) followed by a two hours of staining at 40°C.

Index terms: *Brachiaria brizantha*, seed analysis, germination.

¹ Submetido em 06/04/2005. Aceito para a publicação em 18/11/2005;

² Eng. Agrônoma, Dra., Departamento de Produção Vegetal, USP/ESALQ, Caixa postal 09, CEP: 13418-900, Piracicaba-SP; adlcnoe@esalq.usp.br;

³ Eng. Agrônoma, MSc, Departamento de Produção Vegetal, USP/ESALQ,

Caixa postal 09, CEP: 13418-900, Piracicaba-SP; hmcpcam@esalq.usp.br;

⁴ Eng. Agrônoma, SFFV-DDR/DFA, Rua 13 de maio, 1558, CEP: 01327-2002, São Paulo-SP; classifi-sp@agricultura.gov.br.

INTRODUÇÃO

A produção de sementes de forrageiras tropicais no Brasil tem aumentado e, em decorrência, existe maior demanda pelo aprimoramento de tecnologias já estabelecidas para a produção de sementes.

Com relação à análise da viabilidade das sementes de *Brachiaria brizantha*, o período de tempo para a obtenção do resultado do teste de germinação, até 21 dias (Brasil, 1992), e a dormência em sementes recém colhidas contribuem para que o teste de tetrazólio seja, rotineiramente, utilizado para estimar a viabilidade dessas sementes.

O método para a condução do teste de tetrazólio, para as sementes do gênero *Brachiaria*, está indicado nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). No entanto, pelas informações de Poletti et al. (1997) são utilizados procedimentos diferentes, em função do analista e, principalmente, do laboratório. Assim, as sementes são hidratadas por 16h, 20h ou 24h à temperatura ambiente ou por 14h a 30°C e mantidas em solução (0,2% ou 0,5%) de tetrazólio por uma hora a 45-50°C ou duas horas a 40°C. Os resultados da análise de uma amostra só são comparáveis quando o mesmo método é utilizado para a análise.

Na literatura, não há pesquisa relacionada à temperatura e aos períodos de hidratação e de coloração das sementes de *Brachiaria brizantha* para o teste de tetrazólio. Assim, a pesquisa objetivou estudar esses parâmetros, para avaliar a viabilidade das sementes de *Brachiaria brizantha* pelo teste de tetrazólio.

MATERIALE MÉTODOS

Inicialmente, foi determinada a pureza física de oito lotes comerciais de sementes de *Brachiaria brizantha*. Dessa forma, seguindo as indicações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), as sementes de cada lote foram peneiradas e ventiladas em assoprador para a separação dos componentes, sementes puras e material inerte. Posteriormente, o exame visual e a separação manual dos componentes complementaram a separação e a identificação dos demais materiais. A pureza física dos lotes variou entre 24% e 70%.

A partir desses resultados, as sementes puras de cada lote foram, então, submetidas à limpeza adicional (peneiração e ventilação das sementes, exame visual e separação manual dos componentes das amostras) para assegurar a obtenção de pureza física superior a 98%.

A seguir, as amostras foram homogêneas e divididas em quatro subamostras, que constituíram as repetições. Durante o período experimental, as sementes, embaladas em sacos de papel, permaneceram armazenadas em ambiente controlado (20°C e 50% umidade relativa do ar).

As condições estudadas para o teste de tetrazólio definiram os tratamentos aplicados às sementes, os quais avaliaram as combinações de tempo e de temperatura para a hidratação e para a coloração das sementes.

Para a hidratação, quatro repetições de dez sementes foram hidratadas entre papel toalha, previamente umedecido com água equivalente a 2,8 vezes o peso do papel seco. Para tanto, as sementes foram distribuídas sobre uma tira de papel toalha umedecido (comprimento de 18,5cm, largura de 10,5cm e peso do papel seco de 1,15g) e, em seguida, o papel foi sendo dobrado sobre as sementes formando invólucro semelhante a um rolo. A seguir, esse conjunto foi mantido em germinador por períodos de 2, 4 e 6 horas às temperaturas de 35°C e 40°C e por 6 e 16 horas a 30°C. À medida que foram completados os períodos de hidratação, sob microscópio estereoscópico, as sementes foram cortadas ao longo do embrião, retirando e descartando aproximadamente 1/3 da largura da semente, e colocadas em solução 0,075% de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio, por duas horas, no escuro e a 40°C (Delouche et al., 1976). Após a coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e mantidas imersas em água para a avaliação. O exame das estruturas da semente foi realizado com auxílio do microscópio estereoscópico. O critério de avaliação seguiu as recomendações de Grabe (1970, 1976), das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) para as sementes de braquiária e de Dias e Barros (1995), para as sementes de milho. As sementes foram classificadas em viáveis e não viáveis e os resultados expressos em porcentagem de sementes viáveis.

O teor de água das sementes, correspondente aos tratamentos para a hidratação das sementes dos oito lotes, foi determinado com quatro repetições de 1,0g de semente puras. As sementes, hidratadas conforme descrito anteriormente, foram pesadas no final do período de tempo estipulado para cada tratamento e o teor de água foi calculado pela fórmula indicada pela ISTA (1995). O teor de água inicial das sementes foi determinado em estufa a 105±3°C, durante 24h (Brasil, 1992) e o resultado expresso em porcentagem (Bu).

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 100 sementes por lote, sem aplicação do método para a superação da dormência. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel de filtro umedecidas com água,

equivalente a 2,2 vezes o peso do substrato seco, acondicionadas em caixas plásticas transparentes (11x11x3cm) e mantidas em germinador à temperatura alternada de 20-35°C (35°C/8 horas, em presença de luz, e a 20°C/16 horas, no escuro) conforme Brasil (1992). As avaliações foram realizadas aos sete, aos 14 e aos 21 dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais. O número de sementes dormentes, que não germinaram no final do teste de germinação, foi determinado conforme indicam as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e os dados somados aos do teste de germinação.

Para o estudo da temperatura e do tempo para a coloração dos tecidos da semente, foram analisadas quatro repetições de dez sementes para cada lote, hidratadas entre papel toalha por 6 horas a 30°C. Após a hidratação, sob microscópio estereoscópico, as sementes foram cortadas ao longo do embrião, retirando e descartando aproximadamente 1/3 da largura da semente, e colocadas em solução 0,075% de cloreto 2,3,5 trifênil tetrazólio por 1, 2 e 4 horas, no escuro, nas temperaturas de 35°C, 40°C e 45°C e por 6 horas a 30°C. A avaliação, a interpretação e a apresentação dos resultados seguiram o indicado para a hidratação.

O teste de germinação foi realizado como indicado na primeira etapa e o teor de água determinado pelo método da estufa ($105 \pm 3^\circ\text{C}/24\text{h}$).

Com a finalidade de verificar a estabilidade de resposta da população de sementes aos tratamentos, para cada etapa foram conduzidas três épocas de análises com intervalos de, aproximadamente, 20 dias.

As imagens das sementes, viáveis e não viáveis, de cada tratamento para a coloração das sementes, foram registradas por meio de fotografia digital com câmera Nikon, captadas e transferidas para o computador pelo programa Nikon Capture e processadas empregando o programa Adobe Photoshop, versão 6.0.

O delineamento experimental foi em blocos (três épocas) para cada lote de sementes, com quatro repetições, considerando nove tratamentos para a hidratação das sementes e 11 tratamentos para a coloração das sementes. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). Para execução da análise foi utilizado o Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores - SANEST (Zonta e Machado, 1984). Os dados do teor de água das sementes não foram analisados estatisticamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de água das sementes dos oito lotes, correspondentes aos tratamentos para a hidratação das sementes, foram 24,8% (6h a 30°C), 28,5% (16h a 30°C), 22,8% (2h a 35°C), 24,4% (4h a 35°C), 25,8% (6h a 35°C), 23,0% (2h a 40°C), 25,1% (4h a 40°C) e 25,9% (6h a 40°C). Com exceção das sementes hidratadas por 2h a 35°C ou a 40°C, as demais apresentaram teor de água próximo ou superior a 25%, suficiente para a reestruturação do sistema de membranas celulares (Bewley e Black, 1994). A quantidade de água absorvida pelas sementes, para a hidratação dos tecidos, pode ser utilizada como parâmetro de referência para a padronização das condições de execução do teste de tetrazólio.

Os teores de água iniciais variaram, durante o período experimental, de acordo com o lote de sementes, entre 10% e 12% (base úmida); esses valores são adequados para a conservação das sementes de braquiária.

Os resultados do teste de tetrazólio (Tabela 1) indicaram que a hidratação das sementes, dos oito lotes de braquiária, por seis horas à temperatura de 30°C (6h a 30°C/2h a 40°C) apresentou semelhança estatística com os resultados de germinação de todos os lotes. Esse período de hidratação das sementes está de acordo com uma das recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), embora as regras não especifiquem a temperatura a ser utilizada.

A hidratação das sementes por duas horas a 35°C (2h a 35°C/2h a 40°C) não foi suficiente para o corte das sementes, pois causou a dilaceração dos tecidos. No entanto, essa alteração no corte das sementes não interferiu na avaliação do teste, como pode ser constatado pelos resultados que, em termos estatísticos, mostraram a mesma eficiência que os do tratamento 6h a 30°C /2h a 40°C, para sete dos oito lotes avaliados (Tabela 1).

No tratamento correspondente ao período de 16h de hidratação a 30°C (16h a 30°C/2h a 40°C, Tabela 1) as sementes atingiram teor de água entre 27% e 29% e ocorreu a emissão da raiz primária em sementes de todos os lotes. Portanto, essa condição foi considerada inadequada para o preparo das sementes de braquiária.

Com relação à coloração das sementes, os resultados indicaram (Tabela 2) que o período de uma hora a 45°C (6h a 30°C/1h a 45°C), independentemente do lote considerado, apresentou semelhança estatística com os resultados de germinação para os oito lotes. Apesar desse tratamento, em termos estatísticos, ter sido o mais eficiente houve dificuldade

TABELA 1. Germinação (%) e viabilidade (%) (obtida pelo teste de tetrazólio, com variações no tempo e na temperatura de hidratação e a coloração, em solução 0,075% de tetrazólio por 2h a 40°C), em oito lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* ⁽¹⁾.

Teste	Lotes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Germinação Tetrazólio (Hidratação)	82 b	86 b	86 b	87 a	83 b	85 b	82 b	88 b
6h a 30 C	96 ab	96 ab	98 ab	98 a	97 ab	97 ab	94 ab	96 ab
16h a 30 C	91 ab	98 a	96 ab	95 a	96 ab	98 a	93 ab	93 ab
2h a 35 C	96 ab	89 ab	97 ab	93 a	92 ab	99 a	96 ab	95 ab
4h a 35 C	98 a	92 ab	99 a	97 a	98 a	98 a	97 a	97 a
6h a 35 C	98 a	94 ab	99 a	97 a	95 ab	99 a	93 ab	98 a
2h a 40 C	96 ab	98 a	96 ab	93 a	94 ab	97 ab	94 ab	98 a
4h a 40 C	92 ab	96 ab	99 a	97 a	94 ab	97 ab	93 ab	97 a
6h a 40 C	91 ab	95 ab	97 ab	98 a	96 ab	97 ab	99 a	96 a
CV (%)	14,9	13,9	12,7	13,6	15,7	12,7	14,3	14,9

⁽¹⁾ Na coluna, médias, seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si (Tukey 5%).

TABELA 2. Germinação (%) e viabilidade (%) (obtida pelo teste de tetrazólio, sementes hidratadas por 6h a 30°C, com variações no tempo e na temperatura de coloração, em solução 0,075% de tetrazólio) em oito lotes de sementes de *Brachiaria brizantha* ⁽¹⁾.

Teste	Lotes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Germinação Tetrazólio (Coloração)	77 b	83 a	90 a	84 c	80 b	85 b	83 a	87 c
6h a 30 C	92 ab	94 a	98 a	98 ab	93 ab	97 ab	91 a	93 abc
1h a 35 C	92 a	91 a	95 a	98 ab	95 ab	100 a	93 a	97 abc
2h a 35 C	90 ab	93 a	97 a	100 a	92 ab	95 ab	95 a	97 abc
4h a 35 C	89 ab	88 a	98 a	93 abc	93 abc	98 a	91 a	98 abc
1h a 40 C	96 a	91 a	99 a	99 a	97 a	97 ab	96 a	91 bc
2h a 40 C	93 ab	84 a	98 a	95 abc	97 a	97 ab	94 a	97 abc
4h a 40 C	88 ab	93 a	99 a	97 abc	90 ab	98 a	96 a	98 abc
1h a 45 C	93 ab	93 a	97 a	97 abc	95 ab	97 ab	95 a	98 abc
2h a 45 C	97 a	89 a	96 a	94 abc	94 ab	96 ab	92 a	98 ab
4h a 45 C	91ab	91 a	95 a	89 bc	93 ab	95 ab	91 a	100 a
CV (%)	15,9	16,1	12,4	13,4	15,2	13,2	15,0	12,4

⁽¹⁾ Na coluna, médias, seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si (Tukey 5%).

para a avaliação das estruturas do embrião devido à coloração pouco intensa dos tecidos e, mesmo, em alguns casos, pela falta de coloração dos tecidos.

Quando as sementes foram mantidas em solução de tetrazólio por quatro horas sob as temperaturas de 35°C e de 40°C e por seis horas a 30°C (tratamentos 6h a 30°C/4h a 35°C, 6h a 30°C/4h a 40°C e 6h a 30°C/6h a 30°C, Tabela 2) ocorreu a emissão da raiz primária; assim, essas combinações

não devem ser utilizadas para o teste de tetrazólio em sementes de braquiária.

Dessa forma, considerando que, na primeira etapa da pesquisa (Tabela 1), o tratamento 6h a 30°C/2h a 40°C superou os demais e que, na segunda etapa (Tabela 2), o resultado desse tratamento foi estatisticamente comparável aos resultados de germinação das sementes de sete dos oito lotes analisados, é possível considerar esse tratamento como o mais

adequado para a realização do teste de tetrazólio. Além disso, esse período de hidratação é um dos recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e o período de duas horas de imersão na solução de tetrazólio a 40°C já havia sido indicado, por Delouche et al. (1976), como adequado para a coloração de sementes.

As estruturas das sementes, submetidas ao teste de tetrazólio (hidratação por seis horas a 30°C e coloração por duas horas a 40°C), podem ser visualizadas e identificadas pelas fotografias (Figura 1). Há, ainda, a possibilidade de classificar as estruturas do embrião (eixo do embrião e cotilédone), em viável ou não, pela coloração dos tecidos. As

fotografias constituem recurso adicional para a avaliação da viabilidade das estruturas da semente.

CONCLUSÃO

O teste de tetrazólio, eficiente para estimar a viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha*, pode ser conduzido com a hidratação das sementes por seis horas a 30°C (sementes com 25% de água) e com a coloração por duas horas a 40°C.

AGRADECIMENTOS

À JCMASCHIETTO pela cessão das sementes.

REFERÊNCIAS

- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2^o ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARO, M. **O teste de tetrazólio para a viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR. 1995. 43p. (Circular Técnica, 88).
- GRABE, D.F. **Tetrazolium testing handbook**. 1970. 62p. (Contribution, 29).
- GRABE, D.F. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Brasília, DF: AGIPLAN, 1976. 85p.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Controlled deterioration test. **Handbook of vigour test methods**. Zürich, 1995. p.70-78.
- POLETTI, A.D.; ZANCANELLA, E.F.; GERALDI JUNIOR, G.; MARCHI, L.O.S.; BARROS, L.C.S.; LUIZ NETO, M.; GOMES, R.B.R.G. **Teste de tetrazólio em sementes de gramíneas forrageiras tropicais**. Campinas, SAA/CATI/DSMM, 1997. 47p.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores - SANEST**. Pelotas, 1984.

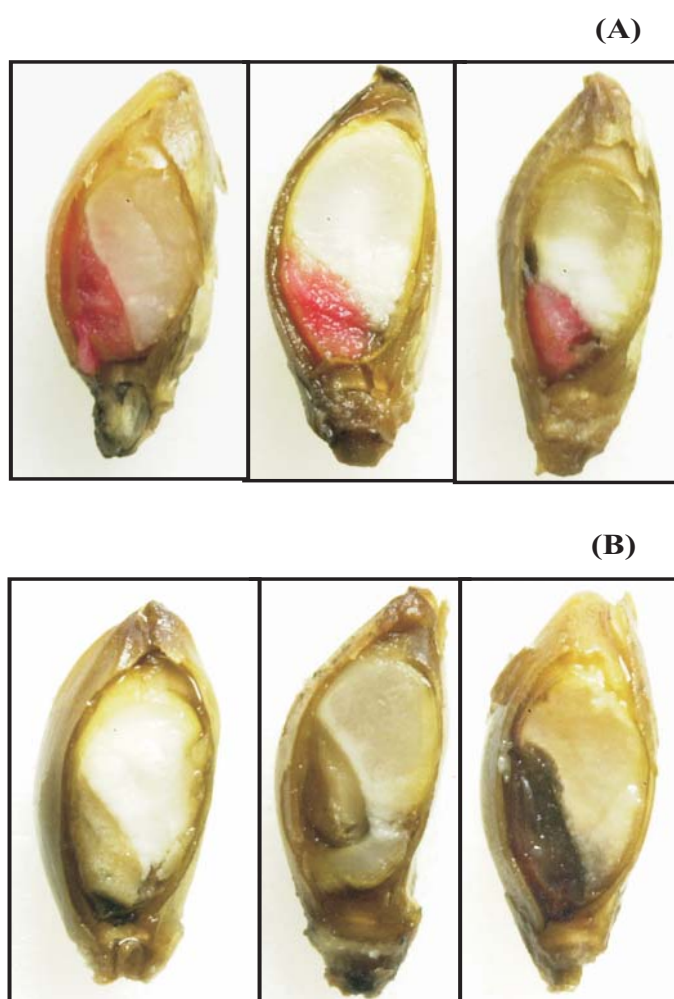


FIGURA 1. Teste de tetrazólio: sementes viáveis (A) e não viáveis (B) de braquiária.

