

TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AS SEMENTES DE MILHO: PERÍODOS DE HIDRATAÇÃO E DE COLORAÇÃO DAS SEMENTES¹

HELENAMARIA CARMIGNANI PESCARIN CHAMMA², ANADIONISIA DALUZ COELHO NOVEMBRE³

RESUMO - O objetivo da pesquisa foi estudar a redução do período de tempo para a condução do teste de tetrazólio, para avaliar a viabilidade de sementes de milho. A pesquisa foi conduzida em duas etapas, com sementes de três lotes, cultivar D657. Na primeira, as sementes foram hidratadas durante 4, 6, 12 e 16 horas a 25 e a 30°C e 4, 6 e 8 horas a 35 e a 40°C e mantidas em solução 0,075% de tetrazólio, por 3h a 35°C. Na segunda, as sementes hidratadas durante 4h a 25, 30, 35 e 40°C, foram mantidas em solução 0,075% de tetrazólio durante 1, 2 e 3 horas a 40°C. Paralelamente, foram determinados o teor de água (estufa 105±3°C por 24h) e a germinação das sementes (RP, 25°C, com avaliações aos 4 e aos 7 dias). Para cada etapa da pesquisa e para cada lote de semente, utilizou-se a análise conjunta para épocas (blocos) e tratamentos, com duas repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade de sementes de milho, com a hidratação das sementes durante 4h a 35 ou 40°C (sementes com 19,5 e 21,3% de água, respectivamente) e a coloração por 1, 2 ou 3 horas a 40°C.

Termos para indexação: *Zea mays*, análise de sementes, viabilidade, teor de água

TETRAZOLIUM TEST FOR CORN SEEDS: PRECONDITIONING AND STAINING PERIODS

ABSTRACT - The objective of this research was to determine the conditions to evaluate the viability of corn seeds by tetrazolium test. Using three seed lots, cultivar D657, preconditioning periods and temperatures (4, 6, 12 and 16 hours at 25 and 30°C and 4, 6 and 8 hours at 35 and 40°C) and staining periods and temperatures (seeds moistened during 4h at 25, 30, 35 and 40°C and staining during 1, 2 and 3 hours at 40°C in a solution of 0,075% tetrazolium chloride) were tested. Seed water content (oven method, 105±3°C/24h) and germination (TP, 25°C, count at 4 and 7 days) were determined. The tetrazolium test was performed classifying the seeds in two categories: viable and non-viable. The experimental design was a randomized block with two 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 tetrazolium test constitutes an efficient option for estimate the viability of corn seeds. The most adequate condition would be that resulting from a combination of four hours of preconditioning at 35 or 40°C (seed water contents reached values from 19,5 and 21,3%, respectively) followed by 1, 2 and 3 hours of staining at 40°C.

Index terms: *Zea mays*, seed analysis, viability, seed moisture

INTRODUÇÃO

As informações gerais para a realização do teste de tetrazólio estão indicadas em Delouche et al. (1976) e nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992; ISTA, 1999) e têm sido aprimoradas para diversas espécies.

O início do preparo da semente para o teste de tetrazólio

é a hidratação dos tecidos. A hidratação da semente facilita o preparo da semente e a absorção da solução de tetrazólio e ativa o sistema enzimático. A absorção de água deve ser lenta para evitar trincas nas sementes ou a lixiviação de substâncias solúveis, principalmente, em sementes deterioradas. Para tanto, a semente deve ser hidratada sobre ou entre folhas de papel, previamente umedecidas; as temperaturas indicadas para a

¹ Submetido em 14/12/2005. Aceito para publicação em 01/03/2007.

² Eng. Agrº MSc, Departamento de Produção Vegetal, USP/ESALQ, Caixa postal 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP. hmcpcam@esalq.usp.br

³ Eng. Agrº Dra., Departamento de Produção Vegetal, USP/ESALQ, Caixa postal 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP. adlcnove@esalq.usp.br

hidratação são entre 30 e 40°C (Moore, 1977).

A hidratação das sementes de soja entre papel pode ter o período de tempo reduzido para seis horas a 41°C (Costa, 1992). Para sementes de braquiária, Novembre et al. (2006) indicaram seis horas a 30°C, com redução de dez horas para a hidratação destas sementes e Santos (2003), para as sementes de tomate, três horas a 45°C, com redução de 15h em relação às indicações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

A quantidade de água absorvida pelas sementes, para a hidratação dos tecidos, pode ser utilizada como um parâmetro de referência para a padronização das condições de execução do teste de tetrazólio. Costa e Marcos Filho (1994) consideraram adequado 27% de água para as sementes de soja, Novembre et al. (2006) 25% para as de braquiária e Santos (2003) 44% para as de tomate. Outras pesquisas indicaram a redução do tempo para a realização do teste de tetrazólio, sem especificar o teor de água das sementes (Andrade et al., 1996; Dias et al., 2001).

A duração do período de coloração das sementes depende das características da semente, concentração e da temperatura da solução de tetrazólio (Grabe, 1970). Para as sementes de milho, as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) indicam solução 0,5 ou 1,0% de tetrazólio por duas a seis horas a 30°C e Dias e Barros (1995, 1999) indicaram solução 0,075 ou 0,1% de tetrazólio por duas a quatro horas, sob temperaturas entre 30 e 40°C, preferencialmente a 35°C.

Considerando as variáveis envolvidas no teste de tetrazólio, nesta pesquisa foram estudadas novas opções visando à redução do período de tempo para avaliar a viabilidade de sementes de milho.

MATERIALE MÉTODOS

As sementes de milho, representadas por três lotes do cultivar D657, foram homogeneizadas, em divisor tipo Boerner, e divididas em duas porções, que constituíram as repetições estatísticas. Durante o período experimental, as sementes, embaladas em sacos de papel, permaneceram em ambiente natural.

Inicialmente, para determinar a quantidade de água absorvida pelas sementes, foram avaliadas 100 sementes do lote 1 (duas repetições de 50, previamente pesadas) hidratadas entre uma folha de papel toalha, umedecida com 2,5 vezes o peso do papel seco, e mantidas por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas em germinador a 25, 30, 35 e 40°C. O teor de água inicial e a água absorvida pelas sementes em cada período e

temperatura foram determinados em estufa, a $105\pm 3^\circ\text{C}$ durante 24h, e o resultado expresso em porcentagem (Brasil, 1992).

Etapa 1 – Hidratação das sementes

Duas repetições de 75 sementes, dos três lotes, foram hidratadas em uma folha de papel toalha, previamente umedecida com água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e, em seguida, o papel foi dobrado sobre as sementes formando um invólucro semelhante a um rolo. Este conjunto foi mantido em germinador por períodos de 4, 6, 12 e 16 horas a 25 e a 30°C e por 4, 6, e 8 horas a 35 e a 40°C. Na medida em que foram completados os períodos de hidratação, 50 sementes por repetição foram cortadas ao longo do eixo do embrião, retirando e descartando 1/2 da largura da semente, e colocadas em solução 0,075% de cloreto 2, 3, 5 trifênil tetrazólio por três horas, no escuro e a 35°C (Dias e Barros, 1995, 1999). 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 da lupa (aumento de seis vezes). O critério de avaliação seguiu as recomendações de Grabe (1970, 1976), das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e de Dias e Barros (1995, 1999), 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 inicial e a água absorvida pelas sementes, em cada período e temperatura, foram determinados em estufa (duas subamostras de 15 sementes), a $105\pm 3^\circ\text{C}$ durante 24h, com o resultado expresso em porcentagem (Brasil, 1992).

O teste de germinação foi conduzido a 25°C, com 200 sementes por lote (quatro subamostras de 50), em rolos de papel toalha, os quais foram umedecidos com água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (Brasil, 1992).

Etapa 2 – Coloração dos tecidos das sementes

A partir das condições definidas na primeira etapa da pesquisa, foram avaliados os períodos para a coloração dos tecidos da semente. Assim, duas repetições de 75 sementes para cada lote foram hidratadas por quatro horas em uma folha de papel toalha, previamente umedecida com água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, a 25, 30, 35 e 40°C. Na medida em que foram completados os períodos de hidratação, 50 sementes por repetição foram cortadas ao longo do eixo do embrião, aproveitando-se apenas metade de cada semente, sendo estas mantidas por 1, 2 e 3 horas em solução 0,075% de tetrazólio a 40°C, no escuro. A avaliação, a

interpretação e a apresentação dos resultados seguiram o indicado na Etapa 1.

A determinação do teor de água das sementes e o teste de germinação foram realizados como indicado na primeira etapa da pesquisa.

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

Para cada etapa da pesquisa e para cada lote de semente foi realizada a análise conjunta para épocas (blocos), duas épocas de análise para cada etapa da pesquisa, e tratamentos (15 para a etapa da hidratação das sementes e 13 para a da coloração das sementes), com duas repetições. Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey (5% de probabilidade de erro). Os dados do teor de água das sementes não foram analisados estatisticamente. Para execução da análise foi utilizado o Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores - SANEST (Zonta e Machado, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da hidratação das sementes de milho

(Figura 1) indicou que, independentemente do período de hidratação, as sementes absorveram mais água a 40°C, quantidades similares a 30 e a 35°C e menos a 25°C. Além disso, no período de 24h, para uma mesma temperatura ocorreu o aumento da absorção de água com o aumento do período de hidratação. Conseqüentemente, a hidratação das sementes de milho em temperatura superior a 25°C reduz o tempo de preparo dessas sementes para o teste de tetrazólio. Esses resultados confirmam a indicação de Moore (1977), que considerou as temperaturas entre 30 e 40°C como as mais adequadas para a hidratação das sementes para o teste de tetrazólio.

A partir dos resultados da avaliação da absorção de água pelas sementes de milho e considerando os teores de água atingidos pelas sementes, foram estabelecidas as condições para a hidratação da semente para o teste de tetrazólio (Tabela 1). Conforme o esperado, para uma temperatura determinada, houve acréscimo do teor de água das sementes na medida em que o período da hidratação da semente aumentou (Tabela 1).

A comparação entre as temperaturas (Tabela 1) indicou que as quantidades médias de água absorvida pelas sementes a 40°C, nos períodos de 4h (21,0%) e de 6h (23,0%), foram superiores às das demais temperaturas. Para as temperaturas de 25 e de 30°C, os teores de água das sementes hidratadas por 12h foram semelhantes entre si e aos das hidratadas por

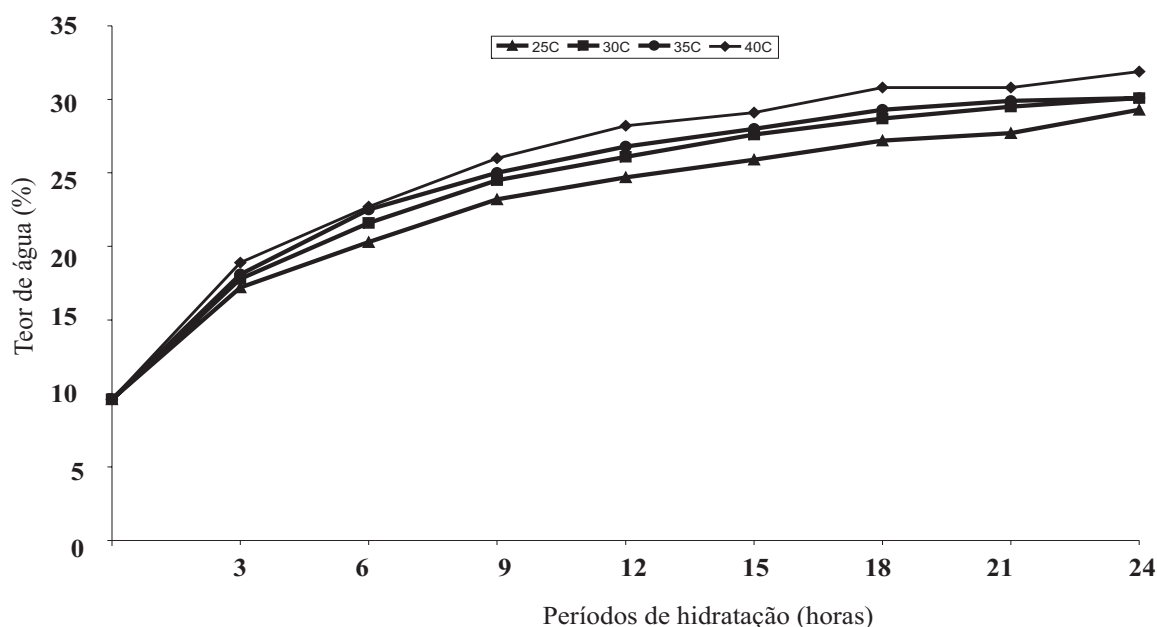


FIGURA 1. Teores de água de sementes de milho (%) hidratadas por 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, e 24 horas sob temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C.

TABELA 1. Teores de água de sementes de milho, cultivar D657, lotes 1, 2 e 3, inicial e após hidratação entre papel toalha por 4, 6, 12 e 16 horas a 25 e a 30°C, e por 4, 6 e 8 horas a 35 e a 40°C.

Períodos e temperaturas (hidratação)	Lotes		
	1	2	3
%.....		
Inicial	9,0	9,1	9,1
4h a 25°C	17,9	18,0	18,0
6h a 25°C	19,6	19,1	18,9
12h a 25°C	23,0	25,3	25,5
16h a 25°C	26,3	26,3	27,0
4h a 30°C	18,4	19,2	18,6
6h a 30°C	22,1	20,6	21,0
12h a 30°C	26,6	24,3	24,7
16h a 30°C	27,4	27,4	29,3
4h a 35°C	19,2	20,1	19,4
6h a 35°C	22,0	22,4	22,0
8h a 35°C	25,3	24,8	24,8
4h a 40°C	20,9	21,1	21,0
6h a 40°C	22,1	24,2	24,2
8h a 40°C	25,0	27,0	25,4

8h, a 35 e a 40°C (próximos a 25,0%). As sementes atingiram o maior teor de água com a hidratação a 30°C por 16h (28,0%).

Os resultados da viabilidade das sementes (Tabela 2), dos três lotes, não apresentaram diferenças estatísticas, indicando que, para o teste de tetrazólio, as sementes de milho podem ser hidratadas em temperaturas distintas, no intervalo entre 25 e 40°C, e em períodos inferiores aos especificados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e por Dias e Barros (1995, 1999). No entanto, as sementes hidratadas por quatro horas a 25°C apresentaram a maior resistência ao corte com a ruptura dos tecidos das sementes. Assim, muitas vezes, foi necessária a reposição das sementes.

Para o teste de tetrazólio em sementes de milho, os métodos indicam a hidratação das sementes com base no número de horas em que essas permanecem em contato com o substrato úmido (Brasil, 1992; Dias e Barros, 1995, 1999). A indicação do teor de água da semente, como um dos parâmetros para a realização desse teste, poderá eliminar as interferências relacionadas às variações do substrato, como a quantidade de água disponível para a semente e à temperatura de hidratação, além disso, as sementes serão avaliadas em estágio metabólico similar.

Considerando a ausência de diferenças significativas entre

TABELA 2. Viabilidade de sementes de milho, cultivar D657, lotes 1, 2 e 3, resultados dos testes de germinação e de tetrazólio. Etapa 1.

Tratamentos	Lotes		
	1	2	3
%.....		
Germinação	95a	94a	95a
Tetrazólio (hidratação)			
4h a 25°C	91a	94a	91a
6h a 25°C	92a	93a	92a
12h a 25°C	95a	94a	94a
16h a 25°C	94a	94a	94a
4h a 30°C	92a	93a	95a
6h a 30°C	92a	94a	96a
12h a 30°C	95a	92a	94a
16h a 30°C	92a	93a	95a
4h a 35°C	89a	92a	93a
6h a 35°C	94a	94a	93a
8h a 35°C	95a	97a	93a
4h a 40°C	92a	92a	94a
6h a 40°C	95a	92a	95a
8h a 40°C	92a	97a	94a
CV (%)	4,2	4,8	5,6

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% .

os resultados da primeira etapa da pesquisa (Tabela 2) e a possibilidade de redução do período de hidratação das sementes de milho, foi estudado o período de coloração das sementes, com sementes hidratadas por 4 horas a 25, 30, 35 e 40°C e mantidas em solução 0,075% de tetrazólio por 1, 2 ou 3 horas a 40°C.

A avaliação do teor de água das sementes após a hidratação indicou similaridade de resultados, quando comparados aos observados na Figura 1 e na Tabela 1: o menor grau de hidratação (17,3%) a 25°C, o intermediário (18,6 e 19,5%) a 30 e a 35°C e o maior, próximo a 21,0%, quando hidratadas a 40°C.

A análise dos resultados, referentes à coloração dos tecidos (Tabela 3) no teste de tetrazólio, indicou que a viabilidade das sementes, dos três lotes, não apresentou variações significativas em relação aos resultados do teste de germinação, à exceção das sementes do lote 2 hidratadas por 4h a 30°C e coloridas por 1h a 40°C.

Os tecidos das sementes, mantidas em solução de tetrazólio por 1h (Tabela 3), tinham a cor clara, dificultando a avaliação. No entanto, os resultados não apresentaram variação significativa em relação à germinação para os lotes 1 e 3. Essa característica não foi observada para os demais períodos de coloração.

TABELA 3. Viabilidade de sementes de milho, cultivar D657, lotes 1, 2 e 3, resultados dos testes de germinação e de tetrazólio. Etapa 2.

Tratamentos	Lotes		
	1	2	3
	%.....		
Germinação	94 ab	96a	95a
Tetrazólio (hidratação/coloração)			
4h a 25°C/1h a 40°C	93 ab	89 ab	92 a
4h a 30°C/1h a 40°C	94 ab	88 b	93 a
4h a 35°C/1h a 40°C	94 ab	96 a	97 a
4h a 40°C/1h a 40°C	93 ab	94 ab	92 a
4h a 25°C/2h a 40°C	91 ab	96 a	97 a
4h a 30°C/2h a 40°C	94 ab	96 a	97 a
4h a 35°C/2h a 40°C	90 b	93 ab	95 a
4h a 40°C/2h a 40°C	96 ab	95 ab	92 a
4h a 25°C/3h a 40°C	96 ab	94 ab	92 a
4h a 30°C/3h a 40°C	96 ab	96 a	97 a
4h a 35°C/3h a 40°C	98 a	96 a	96 a
4h a 40°C/3h a 40°C	94 ab	95 ab	97 a
CV (%)	5,0	4,4	7,2

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% .

Os resultados dessa pesquisa indicaram que cinco horas são suficientes para a hidratação e a coloração das sementes de milho para o teste de tetrazólio. Dessa forma, há a redução de, no mínimo, 15 horas em relação ao indicado pelas Regras para Análise de Sementes. A redução do tempo de preparo das sementes para o teste de tetrazólio foi sugerida também para outras espécies como para soja (Costa e Marcos Filho, 1994), cenoura (Andrade et al.,1996), abóbora (Dias et al., 2001), tomate (Santos, 2003) e braquiária (Novembre et al., 2006).

CONCLUSÕES

O teste de tetrazólio é eficiente para estimar a viabilidade de sementes de milho, com a hidratação das sementes durante 4h a 35 ou 40°C (sementes com 19,5 e 21,3% de água, respectivamente) e a coloração por 1, 2 ou 3 horas a 40°C.

AGRADECIMENTOS

À Dow AgroSciences pela concessão das sementes.



REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R.N.B.; SANTOS, D.S.B.; SANTOS FILHO, B.G.; MELLO, V.D.C. Testes de germinação e de tetrazólio em sementes de cenoura armazenadas por diferentes períodos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, n.1, p.108-116, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- COSTA, N.P. **Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja**. 1992. 132f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
- COSTA, N.P.; MARCOS FILHO, J. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.22, n.1, p.9-17, 1994.
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARO, M. **O teste de tetrazólio para a viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.
- DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.I.; BHÉRING, M.C.; ARAÚJO, E.F.; DIAS, L.A.S. Teste de tetrazólio em sementes de abóbora. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.11, n.2, p.124, 2001.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 1995. 43 p. (Circular Técnica, 88).
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B.(Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.8.4.1-8.4.10.
- GRABE, D. F. **Manual do teste de tetrazólio em sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 85p.
- GRABE, D. F. **Tetrazolium testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1970. 62p. (Contribution, 29).
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International Rules for Seed Testing, Rules 1999. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.27, p.201-215, 1999.
- MOORE, R.P. **Tetrazolium testing handbook**. Raleigh: North Carolina State University, 1977. Paginação irregular.
- 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**, Brasília, v. 28, n.2, p. 147-151, 2006.
- SANTOS, M.A.O. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de tomate através do teste de tetrazólio**. 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores - SANEST**. Pelotas: UFPel, Instituto de Física e Matemática, 1984. 150p.