http://journal.unoeste.br/index.php/ca/index
DOI: 10.5747/ca.2019.v15.n1.a270
ISSN on-line 1809-8215

Colloquium Agrariae

Submetido: 17/04/2018 Revisado: 07/01/2019 Aceito: 13/03/2019

Preparo da semente de arroz para execução do teste de tetrazólio

Ireni Leitzke Carvalho[1], Géri Eduardo Meneghello[1], Lilian Madruga Tunes[1], Caroline Jácome Costa[2], Vanessa Nogueira Soares[1]

[1]Universidade Federal de Pelotas – UFPel. [2]EMBRAPA – Clima Temperado, Brasília, DF. E-mail: vnsoares@gmail.com

Resumo

A calibração de metodologias capazes de determinar de forma rápida e eficiente a qualidade de um lote de sementes de arroz, mediante testes de viabilidade como o de tetrazólio, ainda carece de ajustes. O objetivo deste estudo foi avaliar alternativas de preparo e corte das sementes para avaliação da viabilidade de sementes de arroz. O trabalho foi conduzido em duas etapas: a) necessidade de remoção da casca (pálea e lema) e b) corte das sementes, para avaliar a viabilidade de sementes de arroz. Foram utilizadas sementes de quatro cultivares de arroz irrigado (Puitá Inta CL, BR IRGA 424, SCS 116 Satoru e SCS 117 CL) e duas de sequeiro (BRS Serra Dourada e BRS Esmeralda), cada uma representada por dois lotes, totalizando doze lotes avaliados. Os lotes foram inicialmente caracterizados quanto ao teor de água, percentual de germinação o e de emergência de plântulas. Posteriormente, o estudo foi dividido em duas etapas, sendo conduzido de forma sequencial, sendo o resultado da etapa I utilizado como base para prosseguir na etapa II. Na primeira etapa, foi avaliada a necessidade da remoção ou não da pálea e da lema das sementes para a execução do teste de tetrazólio. Na segunda etapa, as sementes sem a pálea e a lema, foram avaliadas quanto ao tipo de corte longitudinal, transversal ou sem corte. Os resultados indicaram que para a avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio é recomendável a remoção da pálea e lema, sendo mais eficiente o corte longitudinal na metade distal do eixo embrionário. A remoção da pálea e a lema associada ao corte longitudinal na metade distal do embrião facilita a avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio.

Palavras-chave: corte das sementes; *Oryza sativa* L.; qualidade fisiológica; viabilidade de sementes

Rice seed preparation for the tetrazolium test

Abstract

The calibration of methodologies able to identifying the quality of a rice seed lot, quickly and efficiently through viability tests such as tetrazolium, still lacks adjustments. The aim of this study was to evaluate seed preparation and cutting alternatives to assess the viability of rice seeds. The study was conducted in two stages: a) need to remove the bark (palea and lemma) and b) cutting the seeds to evaluate the viability of rice seeds. Seeds of four cultivars of irrigated rice (Puitá Inta CL, BR IRGA 424, SCS 116 Satoru and SCS 117 CL) and two cultivars of dry rice (BRS Serra Dourada and BRS Esmeralda) were used, each represented by two lots, totaling twelve lots evaluated. The seed lots were initial characterized in terms of water content, germination test, and seedling's emergence. Subsequently, the study was divided in two stages, being conducted in a sequential manner, the result of stage I being used as a basis to proceed in stage II. In the first step, it was evaluated the need of the removal or not the palea and lemma for the execution of the tetrazolium test. In the second step, we evaluated the seeds without the palea and lemma for the longitudinal, transverse cut or uncut. The results indicated that for the evaluation of the viability of rice seeds by the tetrazolium test it is recommended the removal of the palea and lemma, being more efficient the longitudinal cut in the distal half of the embryonic axis. Removal of the palea and lemma associated with the longitudinal cut in the distal half of the embryo facilitate the evaluation of the viability of rice seeds by the tetrazolium test.

Keywords: *Oryza sativa* L.; physiological quality; seed cutting; seed viability

Introdução

O sucesso de uma lavoura é dependente da utilização de sementes de qualidade, cuja avaliação é realizada por diversos testes, dentre os quais, o teste de germinação é o mais utilizado para determinar a viabilidade de sementes. Entretanto, apresenta limitações para algumas espécies, como o longo período para obtenção da porcentagem máxima de germinação, divergência dos resultados obtidos entre laboratório e o campo, e a impossibilidade de avaliação de sementes dormentes (BRASIL, 2009; MARCOS FILHO, 2015).

Para o teste de germinação de sementes de arroz, é necessário um período de 14 dias para obtenção dos resultados, porém, é necessário salientar que, como as sementes recém-colhidas normalmente apresentam dormência, este período pode se estender por 18 dias ou mais, em razão da necessidade de se utilizar tratamentos específicos para promoção da germinação (MENEZES et al., 2009; BRASIL, 2009), período considerado longo para atender as demandas do controle de qualidade das empresas produtoras de sementes (CARVALHO et al., 2013). A vantagem significativa do teste de tetrazólio é a possibilidade de aplicá-lo na pré-colheita a fim de direcionar o campo de produção de determinada espécie (FRANÇA NETO et al., 2015).

Pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de desenvolver e calibrar testes capazes de avaliar de maneira rápida e eficiente a qualidade de um lote de sementes. Os testes que fornecem resultados de análise de sementes em período de tempo curto são fundamentais para agilizar as decisões nas diferentes etapas da produção de sementes. Dentre os testes de viabilidade de sementes, com a obtenção rápida de resultados, o mais utilizado é o de tetrazólio, um teste bioquímico, baseado na atividade das enzimas desidrogenases que catalisam as reações respiratórias, presentes nas mitocôndrias, localizadas no interior das células vegetais. Na 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 formazan, delimitando os tecidos vivos da semente e fornecendo resultados, de modo geral, em menos de 24 horas (ISTA, 2003; BRASIL, 2009; GIMENEZ et al., 2014; MARCOS FILHO, 2015).

O procedimento metodológico para a condução do teste permite que uma série de ajustes sejam realizados, a fim adequá-lo para uma determinada espécie. O que difere uma metodologia da outra normalmente são o período e forma de hidratação das sementes, tempo de imersão das mesmas e concentração da solução de tetrazólio, retirada ou não do tegumento e/ou pericarpo e ainda podem ser definidas necessidade ou não de corte das sementes e extração do embrião (Brasil, 2009). A eficácia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica das sementes depende de adequação da metodologia para cada espécie (CARVALHO et al., 2017).

Conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes- RAS (BRASIL, 2009), existem três procedimentos indicados para o pré-umedecimento e preparo de sementes de arroz para o teste de tetrazólio: embebição entre papel por 16-18 horas a 25-30 °C; embebição entre papel por 18 horas a 25 °C ou imersão diretamente em água por 18 horas a 20 °C, com posterior corte longitudinal através da metade do embrião e 3/4 do endosperma. Posteriormente, as sementes devem ser imersas em solução de tetrazólio com concentrações entre 0,1 e 1,0% por 2 a 4 horas a 30 ou 35 °C, não sendo recomendada a remoção da pálea e lema em sementes de arroz antes da embebição. Observa-se porém que a presença dessas estruturas pode prejudicar a realização do corte, pois dificulta a embebição das sementes, deixando-as com maior resistência ao corte, o que poderá acarretar erros na interpretação dos resultados.

Considerando o exposto, verifica-se que o método para a condução do teste de tetrazólio em sementes de arroz ainda pode ser ajustado. Em razão da importância da cultura, do longo do período requerido para a condução do teste de germinação, da presença de dormência em sementes recém-colhidas, verifica-se a importância do teste de tetrazólio para a espécie e do aprimoramento da metodologia. Esse estudo teve como objetivo buscar ajustes dos procedimentos de preparo das sementes de arroz para condução do teste de tetrazólio, avaliando a eficácia da remoção da pálea e lema e a necessidade e tipo de corte da semente.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas.

Utilizaram-se sementes de quatro cultivares de arroz irrigado e duas de sequeiro. Puitá Inta CL e BR IRGA 424 com cultivo predominante no Rio Grande do Sul (irrigado), SCS 116 Satoru e SCS 117 CL muito utilizadas em Santa Catarina (irrigado), além das cultivares BRS Serra Dourada e BRS Esmeralda cultivada na região do Cerrado (sequeiro), cada uma representada por dois lotes. As mesmas foram obtidas de empresas produtoras de sementes localizadas nos municípios de Pedro Osório – RS, Tubarão – SC e Goiânia - GO.

Caracterização inicial dos lotes de sementes de arroz

As sementes foram inicialmente caracterizadas quanto ao teor de água, germinação e emergência de plântulas, como descrito a seguir:

Teor de água- foi realizada pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 h, com duas repetições de 4,5 g por lote, de acordo com as recomendações das RAS (BRASIL, 2009). As sementes após a pesagem, foram acondicionadas em cápsulas de alumínio, colocadas em estufa em temperatura regulada para 105 °C, retiradas após 24 horas, deixadas em sílica até esfriar. Após, foi realizada nova pesagem em balança analítica, com precisão de quatro casas decimais, e teor de água calculado conforme indicado nas RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de teor de água para cada lote, na base úmida.

Teste de germinação - foi conduzido segundo a RAS (BRASIL, 2009), empregando 200 sementes divididas em quatro sub amostras de 50 sementes, para cada unidade experimental, dispostas em rolo de papel *germitest* umedecido com água destilada na proporção de 2,0 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram colocados em germinador a 25 °C. A primeira e segunda contagens foram realizadas aos cinco e quatorze dias após instalação do teste, respectivamente, contabilizando a percentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas.

Emergência de plântulas - foi realizada com 100 sementes de cada lote para cada unidade experimental, em bandejas plásticas, empregando solo como substrato, e cobertas por uma camada de solo de 2,5 cm. As caixas plásticas foram mantidas sob temperatura ambiente, em torno de 25 °C, e irrigadas diariamente. A avaliação foi realizada aos 14 dias após a semeadura, computando-se a percentagem de plântulas emergidas.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. Visando caracterizar a qualidade das sementes dos lotes utilizados, os dados da germinação e emergência de plântulas foram submetidos à análise de variância, sendo os dados previamente transformados em arcsen.√(x/100) para a análise e apresentados em porcentagem, e posteriormente as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Após a caracterização inicial dos lotes, o estudo foi divido em duas etapas, sendo conduzido de forma sequencial, sendo o resultado da etapa I utilizado como base para prosseguir na etapa II.

Etapa 1: Preparo das sementes

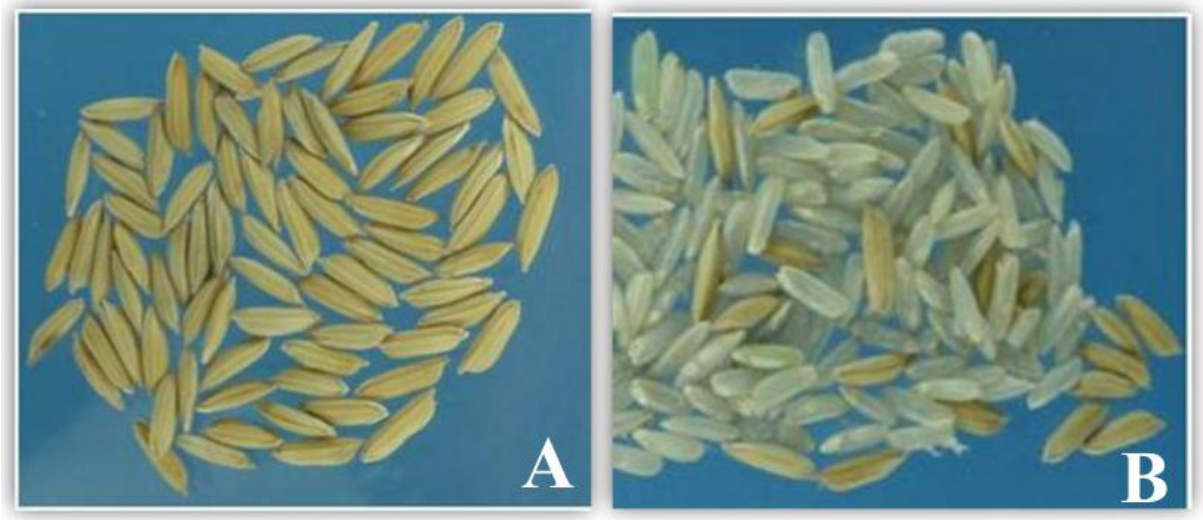
O teste de tetrazólio foi realizado utilizando-se como referência a metodologia tradicional, indicada por Brasil (2009) (sem remoção da pálea e lema), confrontando com remoção prévia da pálea e lema (descascamento). Cerca de 130 sementes de cada lote, para cada unidade experimental, foram colocadas em descascador de arroz, marca Suzuki, modelo MT-88. Nesse processo, a semente de arroz passa uma vez através entre rolos emborrachados com distância aproximada de 0,5 a 1 mm, sofrendo um movimento de fricção que possibilita a separação da casca da semente. O equipamento foi regulado de forma que aproximadamente 90% das sementes fossem descascadas e obtivesse baixa percentagem de quebra. Foram desconsideradas as sementes que apresentaram percentagem de sementes quebradas acima de 20%. Utilizou-se trinta por cento a mais de sementes como uma medida de segurança pela ocorrência de sementes que deixaram de ser descascadas, e aquelas que apresentavam alguma danificação na região do embrião, além da margem de segurança para eventuais erros na preparação (corte).

As avaliações foram realizadas com sementes inteiras e quebradas que apresentavam tamanho superior a 1/3 da semente e que continham o embrião intacto (Figura 1). Utilizou-se 100 sementes, por unidade experimental, divididas em duas sub amostras com 50 sementes de cada lote.

Após o preparo, as sementes descascadas e não descascadas foram submetidas ao pré-

umedecimento mediante imersão em 20 mL de água, utilizando-se para isso copos plásticos com capacidade de 50 mL, e mantidos à temperatura de 20 °C, durante 18 h (BRASIL, 2009). Decorrido esse período, as sementes foram separadas da água e em seguida foi realizado corte longitudinal no centro do embrião, com auxílio de lâmina e descartando metade da largura da semente. Após, foram submersas em solução 0,1% de cloreto 2, 3, 5 trifenil tetrazólio por duas horas, no escuro a 35 °C, conforme recomendação das RAS (BRASIL, 2009).

Figura 1. Preparação de sementes de arroz para o teste de tetrazólio. Sementes sem remoção da pálea e lema (A) e sementes após remoção de pálea e lema (B).



Após o período de coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas individualmente, observando-se a coloração do embrião. Foram consideradas viáveis as sementes que apresentaram coloração avermelhada nas partes vitais do embrião. A coloração dos embriões foi analisada com o auxílio de microscópio estereoscópico, marca Opton com aumento de 6x. As sementes foram classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com a coloração apresentada no eixo embrionário, computando-se a porcentagem de sementes viáveis.

Para fins ilustrativos, as sementes foram fotografadas individualmente, sendo previamente visualizadas em microscópio estereoscópico trinocular, conectado a uma câmera fotográfica digital marca Tucsen, sendo as imagens captadas e transferidas para um computador pelo software Tsview.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Para análise da eficiência dos procedimentos utilizados no teste de tetrazólio, foi utilizada a fórmula **Eficiência TZ_n=[1-(|G-TZ_n|)/G]100**, levando em consideração o resultado da germinação das sementes. Sendo G= % de plântulas normais obtidas no teste de germinação; TZ_n= % de sementes viáveis obtidas nos testes de tetrazólio.

Realizou-se análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, para fins de comparação das eficiências entre as metodologias testadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

Etapa 2: Corte das sementes

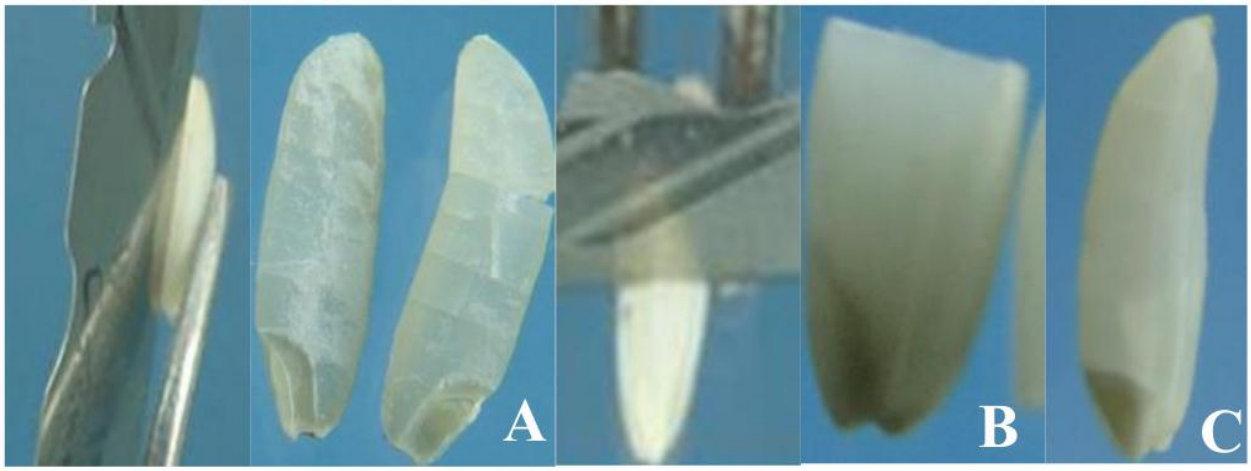
Após a escolha do melhor procedimento na etapa 1 (com descascamento), diferentes cortes foram testados. Para cada unidade experimental e cada tipo de corte, foram descascadas 130 sementes, conforme descrito na etapa 1, posteriormente, as mesmas foram imersas em água destilada por 18 h a 20 °C. Decorrido esse período, com auxílio de lâmina, foram realizados os seguintes cortes: **corte longitudinal** através da metade distal do embrião, descartando metade da largura da semente (Figura 2A); **corte transversal** realizado em área de tecido não essencial, acima do embrião, descartando a parte sem embrião (Figura 2B); e **semente inteira (sem corte)** descascada (Figura 2C). Após o corte, realizou-se

o procedimento de coloração das sementes, conforme descrito na etapa I.

Para a avaliação da viabilidade, as sementes foram lavadas em água corrente, avaliadas individualmente, analisando-se e observando suas estruturas e coloração do embrião, utilizando-se para isso uma lupa com aumento de seis vezes. As sementes foram classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com a coloração apresentada no embrião, computando-se a porcentagem de sementes viáveis.

A obtenção das imagens foi realizada mediante pré-visualização das sementes em microscópio estereoscópico trinocular, conectado a uma câmera fotográfica digital marca Tucsen, captadas e transferidas para um computador pelo software Tsview. Em cada processo, determinou-se o teor de água após o pré-condicionamento das sementes.

Figura 2. Cortes em sementes de arroz: corte longitudinal (A), corte transversal (B), semente sem corte (C).



O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Para análise da eficiência dos procedimentos utilizados no teste de tetrazólio, foi utilizado a fórmula **Eficiência TZ_n=[1-(|G-TZ_n|)/G]100**, levando em consideração o resultado da germinação das sementes. Sendo G = % de plântulas normais obtidas no teste de germinação e TZ_n = % de sementes viáveis obtidas nos testes de tetrazólio. Os dados foram submetidos a similar procedimento estatístico descrito na etapa 1.

Resultados e Discussão

Os resultados da caracterização inicial dos 12 lotes de sementes de arroz utilizadas no experimento encontram-se na Tabela 1. Os teores de água iniciais variaram de 10,6% a 13,4%, considerados adequados para a conservação das sementes de arroz.

Quanto à germinação, houve variação entre 97 e 78%, constatando-se que apenas o lote 10 estava com poder germinativo abaixo do padrão para comercialização no Brasil, o qual deve ser igual ou superior a 80%, estabelecidos pela Instrução Normativa n° 45 (BRASIL, 2013). Salienta-se, no entanto, que para os fins da pesquisa proposta, foi fundamental contar com lotes com níveis contrastantes de viabilidade, pois os procedimentos para preparo das sementes para o teste de tetrazólio devem ser suficientemente robustos e devem permitir identificar a real qualidade de um lote, independentemente de esta ser alta ou baixa.

Tabela 1. Teor de água (TA), emergência de plântulas (EP), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) de 12 lotes de sementes de arroz.

Cultivar	Qualidade	Lote	TA	EP	PN	PA	SM
			----------%----------				
BR Irga 424	Alta	1	13,2	87 a	95 b	2	3
	Média	2	11,7	76 b	87 c	10	3
Puitá Inta CL	Alta	3	13,4	86 a	97 a	2	1
	Média	4	11,4	80b	84 c	12	4
BRS Esmeralda	Alta	5	12,2	93 a	94 b	5	1
	Média	6	10,9	79b	89 c	8	3
BRS Serra Dourada	Alta	7	12,1	83b	94 b	2	4
	Média	8	10,6	81b	84 c	12	4
SCS 116 Satoru	Alta	9	13,2	78b	93 b	4	3
	Média	10	12,5	72b	78 d	19	3
SCS 117 CL	Alta	11	13,0	87 a	97 a	1	2
	Média	12	11,4	73 b	89 c	8	3
CV (%)				3,15	7,65		

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Etapa 1: Preparo das Sementes

Seguindo as recomendações estabelecidas nas RAS (BRASIL, 2009) para o teste de tetrazólio em arroz, o qual estabelece corte longitudinal ao longo do eixo embrionário, sem remoção da pálea e lema, observou-se que a realização do corte é uma atividade difícil e morosa, provocando danos no embrião das sementes, podendo gerar dificuldade de interpretação e consequentemente mascarando os resultados (Figura 3a). Por esta razão, quando foi avaliada a viabilidade, a utilização deste procedimento, gerou dúvidas, uma vez que a maioria das sementes apresentaram coloração esbranquiçada, provavelmente em razão do corte e coloração mais fraca. Segundo Vieira e Von Pinho (1999), a falta de coloração pode ser devida a lenta absorção da solução de tetrazólio, o que pode ter ocorrido neste caso.

Com a remoção prévia da pálea e lema, observou-se que a execução do corte foi facilitada, pois a semente (cariopse) apresentou menor resistência mecânica ao corte, o que facilitou também a visualização das estruturas do embrião, tornando-as mais nítidas quanto à coloração (Figura 3b). As recomendações estabelecidas nas RAS (BRASIL, 2009) para o gênero *Gossypium,* tornam a execução do teste morosa, além de ser difícil a remoção do tegumento, provocando inúmeros ferimentos e danos nos cotilédones das sementes, mascarando os resultados (CERVI; MENDONÇA, 2009). Os mesmos autores relataram a dificuldade na diferenciação dos danos causados pela realização do corte, o que pode levar o analista a erros na interpretação. Existem relatos de dificuldades na análise de sementes de amendoim, quando utilizada a metodologia recomendada pelas RAS (BRASIL, 2009), concluindo que o teste de tetrazólio alternativo foi mais eficiente na avaliação da viabilidade das sementes (CARVALHO et al., 2009). Em sementes de soja, ao se comparar o método alternativo com o convencional, não ocorreu perda de precisão nos resultados do TZ ao adotarem metodologia alternativa (FONSECA; FAGIOLI, 2008). Em sementes de trigo, utilizando-se metodologia alternativa as propostas pelas RAS (BRASIL, 2009) também não ocorreu perda na precisão dos resultados (CARVALHO et al., 2013), bem como em sementes de sorgo (CARVALHO et al., 2014).

As sementes analisadas foram classificadas em viáveis e não viáveis, pela coloração dos tecidos. Na Figura 3 estão ilustradas sementes com casca (sem remoção da pálea e lema), e sementes com remoção prévia da pálea e lema.

Figura 3. Coloração de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio. Teste sem remoção da pálea e lema (A) e com remoção da pálea e lema (B).



Os resultados de germinação, viabilidade e eficiência dos processos utilizados no teste de tetrazólio, dos lotes de sementes de arroz avaliados estão apresentados na Tabela 2.

De acordo com a fórmula para o cálculo da eficiência utilizada nessa pesquisa, quanto menor a diferença entre os resultados obtidos no teste de germinação e TZ, maior será a eficiência da metodologia de TZ avaliada. Quando o TZ foi conduzido utilizando-se sementes sem a remoção da pálea e lema (TZ1), verificou-se que a eficiência foi baixa. No lote 5, obteve-se um valor de viabilidade de 84% pelo teste de TZ sem a remoção da pálea e lema, ao passo que, no teste de germinação, este valor foi de 94%, o que equivale a dizer que a eficiência foi de apenas 89,4%, sendo este o maior valor observado. Em contrapartida, no lote 2, o resultado do teste de germinação indicou que 87% das sementes originavam plântulas normais, porém, o TZ, novamente realizado com sementes sem remoção de nenhuma estrutura, obteve viabilidade de 53%, representando eficiência de apenas 60%. Considerando a média dos 12 lotes utilizados, a diferença foi de 26 pontos percentuais (pp). Um erro dessa magnitude pode representar a necessidade de aumentar a quantidade de sementes por hectare, ou de condenar indevidamente um lote em um processo de controle de qualidade, ou, em outra situação, aprovar de forma inadequada um lote de sementes para comercialização. Possivelmente, neste experimento, estas diferenças acentuadas entre os valores obtidos no teste de germinação e no teste de tetrazólio sem a remoção da pálea e lema (tradicional) devam-se ao fato de que a lema e pálea dificultam a embebição pelas sementes, confirmado durante a realização do corte, pois a semente oferecia bastante resistência ao mesmo.

Tabela 2. Germinação (%), viabilidade (%) e eficiência (%) do teste de tetrazólio adotando diferentes metodologias, em sementes de 12 lotes de sementes de arroz.

Cultivar	Qualidade	Lotes	G	TZ1	TZ2	ETZ1	ETZ2
BR Irga 424	Alta	1	95	72	92	75,8	96,8
	Média	2	87	53	87	60,4	100,0
Puitá Inta CL	Alta	3	97	79	94	81,6	97,1
	Média	4	84	55	83	65,1	98,4
BRS Esmeralda	Alta	5	94	84	96	89,4	97,9
	Média	6	89	71	93	80,1	95,9
BRS Serra Dourada	Alta	7	94	81	96	85,8	97,9
	Média	8	84	51	87	61,4	95,6
SCS 116 Satoru	Alta	9	93	73	97	78,2	95,7
	Média	10	78	49	93	63,5	80,7
SCS 117 CL	Alta	11	97	73	94	75,7	97,1
	Média	12	89	55	93	61,5	95,7
Média			90	66	92	73,2 B	95,7 A

1. G- Germinação
2. TZ1 – Teste de tetrazólio realizado de acordo com o indicado pelas RAS (BRASIL, 2009) (tradicional), sementes de arroz sem remoção de pálea e lema, cortadas longitudinalmente.
3. TZ2 – Teste de tetrazólio realizado com utilização de sementes de arroz com remoção prévia da pálea e lema, cortadas longitudinalmente.
4. ETZ1 - Eficiencia do TZ tradicional (sem remoção da pálea e lema).
5. ETZ2 - Eficiencia do TZ com remoção da pálea e lema.
6. Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- Significativo a 5% pelo teste T

Comparando a média de resultados do teste de germinação com a média do TZ2 dos 12 lotes avaliados, verificou-se diferença de apenas dois pp (pontos porcentuais), indicando que há similaridade entre os resultados, comprovando assim que o TZ2 foi eficiente, obtendo-se eficiência de 95,7%, o que torna o processo confiável, estando esta significativamente superior à da metodologia adotada no TZ1 (Tabela 2).

Constatou-se que a eficiência do processo TZ2 para o lote 10 foi de 80,7%, sendo que o resultado do teste de germinação foi de 78%, porém a estimativa da viabilidade do mesmo, realizado com remoção da pálea e lema (TZ2), foi de 93%, constituindo uma diferença de 15 pp. Esse resultado pode ser explicado pelo fato deste lote ter apresentado 19% de plântulas anormais no teste de germinação (Tabela 1), o que provavelmente não foi detectado pelo TZ, pois foram analisadas sementes quebradas, que no TZ coloriram os tecidos do embrião, mas no teste de germinação provavelmente originariam plântulas anormais (VIEIRA et al., 1999). Para os demais lotes, a eficiência mínima do teste de tetrazólio com a remoção da pálea e lema foi de 95,6%, sendo que para o lote 2 a eficiência foi de 100%, apresentando resultados equivalentes ao teste de germinação. Os resultados dos testes de germinação e de tetrazólio devem ser semelhantes, com pequena margem de diferença entre eles, sendo tolerado 5 pp para soja (FRANÇA NETO et al., 1998). Nesse experimento, para a maioria dos lotes, as diferenças entre os resultados dos dois testes, empregando o procedimento da remoção da pálea e lema foi inferior a 5 pp, evidenciando a eficiência do procedimento.

Em sementes de abobrinha (BARROS et al., 2005) e melancia (BHERING et al., 2005) verificou-se que, para avaliar a viabilidade das sementes pelo teste de TZ, deve-se remover o tegumento e a membrana interna previamente à imersão em solução de tetrazólio 0,075%, a 40 °C, por 60 minutos, pois, nessa condição verifica-se desenvolvimento de coloração adequada. Resultados semelhantes foram verificados por Silva et al. (2013) para sementes de girassol, ao concluírem que o procedimento mais adequado para o preparo das sementes para o teste de TZ foi a remoção do pericarpo e do tegumento aderidos ao embrião, previamente ao corte longitudinal entre os cotilédones e a coloração das sementes. De maneira similar, para avaliação

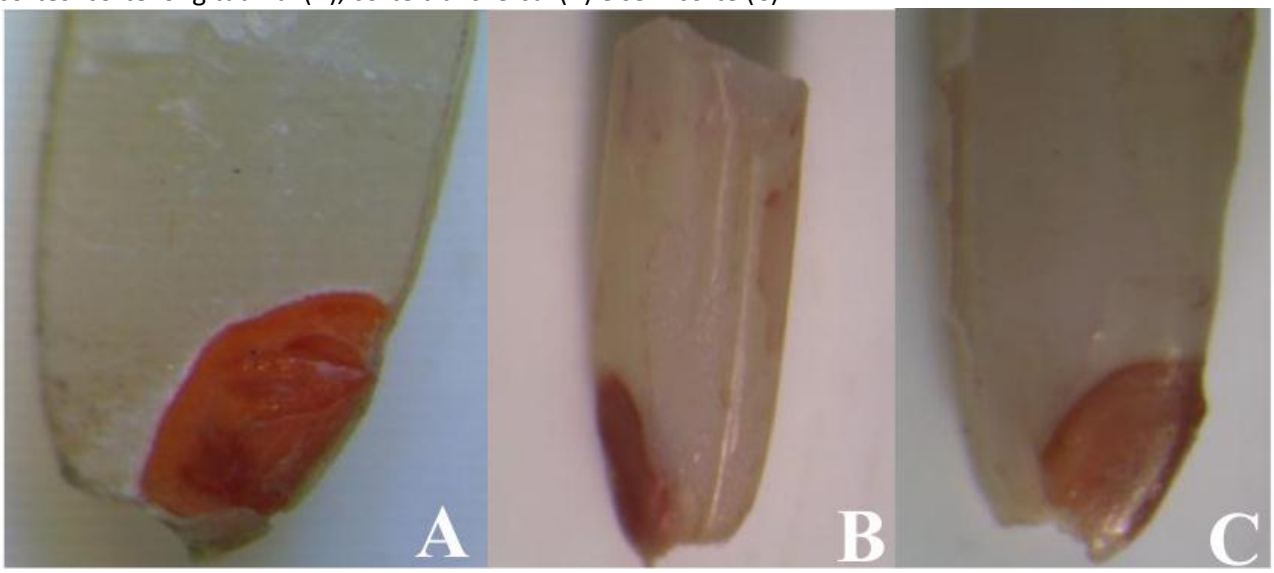
da viabilidade de sementes de café pelo teste de TZ, Zonta et al. (2009) observaram que foi necessário extrair o embrião e expô-lo à solução de tetrazólio a 0,1%, durante 16 h, a 35 °C.

Considerando os resultados obtidos nesta etapa, que demonstrou melhor eficiência do processo quando se removeu a pálea e lema. Quando o TZ foi conduzido utilizando-se sementes sem a remoção da pálea e lema (TZ1), verificou-se que a eficiência foi baixa. Por exemplo, no lote 5, obteve-se um valor de viabilidade de 84% pelo teste de TZ sem a remoção da pálea e lema, ao passo que, no teste de germinação, este valor foi de 94%, o que equivale a dizer que a eficiência foi de apenas 89,4%, sendo este o maior valor observado. Em contrapartida, no lote 2, o resultado do teste de germinação indicou que 87% das sementes originaram plântulas normais, porém, o TZ, novamente realizado com sementes sem remoção de nenhuma estrutura, obteve viabilidade de 53%, representando eficiência de apenas 60%. Considerando a média dos 12 lotes utilizados, a diferença foi de 26 pp. Um erro dessa magnitude pode representar a necessidade de aumentar a quantidade de semente por hectare, ou de condenar indevidamente um lote em um processo de controle de qualidade, ou, em outra situação, aprovar de forma inadequada um lote de sementes para comercialização. Possivelmente, neste experimento, estas diferenças acentuadas entre os valores obtidos no teste de germinação e no teste de tetrazólio sem a remoção da pálea e lema (tradicional) devam-se ao fato de que a lema e pálea dificultam a embebição, confirmado durante a realização do corte, pois a semente oferecia bastante resistência ao mesmo. Apesar das recomendações existentes para sementes de arroz (BRASIL, 2009) indicarem a utilização de sementes sem remoção da pálea e lema, nesse estudo os melhores resultados foram obtidos com a remoção prévia da pálea e da lema. O segundo estudo levou em consideração este procedimento prévio à realização das demais etapas

Etapa 2: Corte das Sementes

A representação da estrutura interna das sementes de arroz após terem sido submetidos ao teste de tetrazólio empregando diferentes cortes, após coloração, pode ser visualizada na Figura 4, onde estão apresentadas sementes viáveis após cada procedimento de corte.

Figura 4. Viabilidade de sementes de arroz submetidas ao teste de tetrazólio empregando diferentes cortes: corte longitudinal (A), corte transversal (B) e sem corte (C).



Para o corte realizado longitudinalmente na metade distal do embrião, foram consideradas viáveis as sementes que não apresentaram falhas na coloração em regiões vitais do embrião, e não viáveis àquelas cujo tecidos localizados em regiões vitais não apresentaram coloração, quando visualizadas em lupa com seis aumentos.

Nas sementes em que foi realizado corte transversal e sem corte, foi analisado apenas a parte externa do embrião, sendo consideradas viáveis aquelas que apresentavam coloração

vermelha em toda a extensão do embrião e não viáveis as que apresentavam falhas nas regiões vitais ou não coloriram, quando visualizada em lupa com aumento de seis vezes.

Na segunda etapa do experimento, em que foram realizados diferentes cortes para avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo TZ (Tabela 3), observaram-se diferenças médias de 2 pp para TZ2, 4 pp para TZ3 e 6 pp para TZ4 em relação ao teste de germinação, e eficiência média de 95,7; 94,5 e 93,1%, respectivamente.

Os resultados obtidos no TZ empregando os diferentes procedimentos de corte apresentaram coerência com os resultados do teste de germinação. No entanto, comparando os três procedimentos utilizados, observou-se que o TZ2 (corte longitudinal) foi mais eficiente, apresentando, em média, 95,7% de eficiência, com a vantagem de possibilitar a análise mais detalhada de danos no embrião, uma vez que as partes vitais são visualizadas, sem deixar dúvidas ao analista (Figura 4A).

Utilizando o corte longitudinal das sementes (TZ2), a diferença em relação aos resultados do teste de germinação, foram de no máximo de 15 pp no lote 10 (ou 4 pp nos lotes 6, 9, e 12) e resultando em 100% de acerto no lote 2, para os demais lotes essa diferença foi inferior a 4 pp. Com relação ao corte transversal (TZ3), observou-se que para os lotes 1, 3 e 7, obteve-se 100% de eficiência. Por outro lado, nos lotes 4, 8, 10 e 12 verificaram-se resultados com eficiência abaixo de 90%.

Em contrapartida, observando os resultados de eficiência do teste de tetrazólio sem corte da semente (TZ4), constatou-se que os resultados do teste de TZ apresentaram valores superiores aos resultados do teste de germinação para os 12 lotes avaliados, o que nos permite dizer que, se não há exposição da estrutura embrionária interna, o resultado do teste de TZ pode não ser tão preciso, pois não há a visualização das estruturas vitais do embrião de sementes de arroz. O mesmo vale para os resultados do TZ3 (corte transversal), onde apenas o lote 11 apresentou resultado menor ao observado no teste de germinação. Já para o teste TZ2, os lotes 1, 3, 4 e 11 apresentaram resultados inferiores aos obtidos pelo teste de germinação. A ausência de corte em sementes de melão submetidas ao teste de TZ, influenciou a coloração obtida, dificultando a difusão da solução de tetrazólio, comparativamente às sementes cortadas longitudinalmente (LIMA et al., 2007). Nas sementes sem corte e com corte transversal não houve exposição da estrutura embrionária interna, o que dificulta a identificação de danos em partes vitais do embrião, sendo analisado apenas a parte externa do embrião, sendo consideradas viáveis aquelas que apresentavam coloração vermelha em toda a extensão do embrião e não viáveis as que apresentavam falhas nas regiões vitais ou não coloriram. Todavia, para sementes com o corte realizado longitudinalmente na metade distal do embrião, foram consideradas viáveis as sementes que não apresentaram falhas na coloração em regiões vitais do embrião, e não viáveis àquelas cujos tecidos localizados em regiões vitais (plúmula, coleóptilo, região central do escutelo, radícula e a região das raízes seminais) não apresentaram coloração.

Tabela 3. Germinação (%), viabilidade (%) de diferentes cortes e eficiência dos processos (%) em relação à germinação, obtidas nos diferentes cortes em sementes de arroz pelo teste de tetrazólio

Cultivar	Qualidade	Lote	G	TZ2	TZ3	TZ4	ETZ2	ETZ3	ETZ4
BR Irga 424	Alta	1	95	92	95	99	96,8	100,0	96,1
	Média	2	87	87	93	99	100,0	92,9	86,0
Puitá Inta CL	Alta	3	97	94	97	99	97,1	100,0	98,1
	Média	4	84	83	94	90	98,4	88,1	92,9
BRS Esmeralda	Alta	5	94	96	97	100	97,9	97,2	93,6
	Média	6	89	93	93	92	95,9	95,9	96,6
BRS Serra Dourada	Alta	7	94	96	94	99	97,9	100,0	95,0
	Média	8	84	87	95	95	95,6	86,9	86,9
SCS 116 Satoru	Alta	9	93	97	94	95	95,7	99,3	97,9
	Média	10	78	93	87	89	80,7	87,6	85,0
SCS 117 CL	Alta	11	97	94	94	95	97,1	97,1	98,5
	Média	12	89	93	98	97	95,7	89,7	90,4
Média			90	92	94	96	95,7A	94,5A	93,1A

G- Germinação TZ2 – Teste de tetrazólio realizado com sementes descascadas e cortadas longitudinalmente TZ3 – Teste de tetrazólio realizado com sementes descascadas e cortadas transversalmente TZ4 – Teste de tetrazólio realizado com sementes descascadas, sem corte ETZ2 - Eficiência do TZ2 (corte longitudinal) ETZ3 - Eficiência do TZ3 (corte transversal) ETZ4 - Eficiência do TZ4 (sem corte). Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * e ** Significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste T

Os resultados do teor de água após o pré-condicionamento das sementes estudadas foram similares, variando entre 24,6 e 29,7% nas sementes sem remoção da pálea e lema e entre 25,7 e 27,9% com remoção dessas estruturas (Tabela 4).

Tabela 4. Teor de água inicial e após pré-condicionamento de sementes de arroz com e sem remoção da pálea e lema.

Lotes	Teor de água (%)			
	Sem remoção da pálea e lema		Com remoção da pálea e lema	
	Semente seca	Pós embebição	Semente seca	Pós embebição
1	13,2	27,0	11,4	26,1
2	11,7	25,1	11,9	27,8
3	13,4	27,3	11,4	27,3
4	11,4	25,6	11,8	26,8
5	12,2	28,9	10,6	26,8
6	10,9	27,4	10,8	27,3
7	12,1	29,7	11,4	25,8
8	10,6	27,8	11,7	26,0
9	13,2	27,3	11,4	27,9
10	12,5	24,6	12,2	26,3
11	13,0	26,0	11,6	25,7
12	11,4	25,3	11,6	25,9

Teores de água próximos ou superiores a 25% são suficientes para a reestruturação do sistema de membranas celulares em sementes de braquiária. A quantidade de água absorvida pelas sementes, para a hidratação dos tecidos, pode ser utilizada como parâmetro de referência para padronização das condições de execução do teste de tetrazólio (NOVEMBRE et al., 2006). Em sementes de milho, os teores de água de 19,5 e 21,5 foram suficientes para coloração dos tecidos e estimativa da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio (CHAMMA; NOVEMBRE, 2007).

Esses resultados de teor de água indicam que, independentemente dos procedimentos adotados, o pré-condicionamento das sementes permitiu a reativação do metabolismo enzimático das mesmas, necessário para a etapa da coloração do teste de tetrazólio.

4. CONCLUSÃO

A remoção da pálea e a lema associada ao corte longitudinal na metade distal do embrião facilita a avaliação da viabilidade de sementes de arroz pelo teste de tetrazólio.

REFERÊNCIAS

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. https://doi.org/10.1590/S0101-31222005000200024

BHERING, M. M.; 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. https://doi.org/10.1590/S0101-31222005000100022

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa n° 45 de 17 de setembro de 2013.** Padrões para a produção e a comercialização de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 183, 20 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasilia: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V.. SASMAgri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CARVALHO, I.L.; MENEGHELLO, G.E.; TUNES, L. M.; JÁCOME, C.C.; SOARES, VN. Methodological adjustments to the tetrazolium test in rice seeds. **Journal of Seed Science**, v.39, n.1, p.041-049, 2017. http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n1169643

CARVALHO, N. M.; DA SILVA, J, B.; SILVEIRA, C. M. DA, HORVAT, R.A. Método alternativo para submeter sementes de amendoim à solução de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n.1,18-22, 2009. https://doi.org/10.1590/S0101-31222009000100002

CARVALHO, T.C.; GRZYBOWSKI, C.R.S.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M. Adaptation of the tetrazolium test method for estimating the viability of sorghum seeds. **Journal of Seed Science**, v.36, n.1, p.246-252, 2014. http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v32n2713

CARVALHO, T. C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. **Journal of Seed Science**, v.35, n.3, p.361-367, 2013. http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372013000300013

CERVI, F.; MENDONÇA, E. A. F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.177-186, 2009. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000100020

CHAMMA, H. M. C. P.; NOVEMBRE, A. D. L. C. Teste de tetrazólio para as sementes de milho: período de hidratação e de coloração das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.125-129, 2007. https://doi.org/10.1590/S0101-31222007000200017

FONSECA, N. R.; FAGIOLI, M. Comparação da precisão dos resultados do teste de tetrazólio usando a metodologia alternativa e a tradicional em sementes de soja. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, p. 47-55, 2008.

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

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A. A. Diacom: 35 anos de capacitação nos testes de tetrazólio e Patologia de sementes de soja. **Revista Seed News**, v.19, n.5, 2015.

GIMENEZ, J.I.; FERREIRA, G.; CAVARIANI, C. Tetrazolium test for assessment of seed viability of atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Journal of Seed Science**, v.36, n.3, p.357-361, 2014. http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v36n31004

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. In: **ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing**. Bassersdorf: ISTA, v.1, 2003.

LIMA, C. B.; BELLETTINI, N. M. T.; JANANI, J. K.; SILVA, A. S.; AMADOR,T. S.; VIEIRA, M. A. V.; CHEIRUBIM, A. P. Metodologias do Teste de Tetrazólio para sementes de Melão (*Cucumis melo* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n.2, p. 744-746, 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina-PR: 2015.

MENEZES, N. L.; FRANZIN, S.M; BORTOLOTTO, R. P. Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de superação**. Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.7, n.1, p.35- 44, 2009.

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.

SILVA, R. C.; GRZYBOWSKI, C. R. S.; FRANCA-NETO, J. B.; PANOBIANCO, M. Adaptação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de girassol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.1, p.105-113, 2013. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000100014

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. p. 8.1-1 - 8.1-13

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://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292009000200002