

# Teste de tetrazólio em sementes de crambe<sup>1</sup>

## Tetrazolium test in crambe seeds

Roberta Guimarães Rezende<sup>2</sup>; Lorena Leão de Jesus<sup>3</sup>; Marcela Carlota Nery<sup>4\*</sup>; Adriana de Souza Rocha<sup>5</sup>; Sara Michelly Cruz<sup>3</sup>; Paulo César de Resende Andrade<sup>6</sup>

### Resumo

O teste do tetrazólio é considerado uma alternativa promissora para a avaliação rápida da viabilidade e vigor das sementes. A adequação da metodologia do teste de tetrazólio para sementes de crambe, espécie que apresenta alto potencial para produção de biodiesel, pode acelerar a determinação da qualidade de diferentes lotes. Com o objetivo de verificar as condições ideais para realização do teste de tetrazólio em sementes de crambe cinco lotes da variedade FMS Brilhante foram submetidos à embebição entre papel em água a 30°C por 3 horas e após corte longitudinal as sementes foram imersas nas concentrações de 0,075%; 0,5% e 1% de solução de tetrazólio a 30°C por 18 h e 24 h. Observou-se que na concentração de 0,075% as sementes coloriram adequadamente e com 0,5% e 1,0% a coloração foi intensa. A embebição das sementes entre papel por 3 horas, seguida de corte longitudinal e utilização de 0,075% por 18 h ou 24 h é eficiente para avaliação da viabilidade das sementes de crambe.

**Palavras-chave:** *Crambe abyssinica*, viabilidade, pré-condicionamento

### Abstract

The tetrazolium test is considered a promising alternative for quick evaluation of viability and vigor of seeds. The adequation of tetrazolium test methodology for crambe seeds, specie that presents high potential for biodiesel production, may accelerate the determination of quality of different lots. With the aim to verify the ideal conditions for the tetrazolium test for crambe seeds, five lots of cultivar FMS Brilhante were submitted to the imbibition between paper in water at 30°C for three hours and after the longitudinal slicing, seeds were soaked in tetrazolium solution at concentrations of 0.075%; 0.5% and 1.0% at 30°C for 18 h and 24 h. It was observed that in the concentration of 0.75% seeds got an adequate coloration and with 0.5% and 1.0% the coloration was too intense. The imbibition of seeds between paper for 3 hours, followed by the longitudinal slicing and the utilization of 0.075% concentration for 18h or 24 hours was efficient to the evaluation of viability of crambe seeds.

**Key words:** *Crambe abyssinica*, viability, pre-conditioning

<sup>1</sup> Parte da monografia do primeiro autor.

<sup>2</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Graduada, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Diamantina, MG. E-mail: guimaraes\_roberta@hotmail.com

<sup>3</sup> Eng<sup>as</sup> Agr<sup>as</sup>, Mestres em Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias, UFVJM, Diamantina, MG. E-mail: lorenalj3@yahoo.com.br; saramichellycruz@gmail.com

<sup>4</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Prof<sup>ta</sup> PhD, Dept<sup>o</sup> de Agronomia, UFVJM, Diamantina, MG. E-mail: nery.marcela@gmail.com

<sup>5</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Discente do Curso de Mestrado em Produção Vegetal, Dept<sup>o</sup> de Agronomia, UFVJM, Diamantina, MG. E-mail: adrianaagro2010@hotmail.com

<sup>6</sup> Eng<sup>o</sup> Matemático e Estatístico, Prof. Dr., Instituto de Ciência e Tecnologia, UFVJM, Diamantina, MG. E-mail: paulo.andrade@ict.ufvjm.edu.br

\* Autor para correspondência

O crambe, *Crambe abyssinica* Hochst, é uma planta pertencente à família das crucíferas, de cultivo originário da região mediterrânea, tem ciclo curto, variando entre 90 a 100 dias (OPLINGER, 1991). De característica robusta é uma planta que se desenvolve em condições climáticas antagônicas, suportando desde geadas típicas do sul do país até climas quentes e secos como do centro-oeste do país (LAGHETTI; PIERGIOVANNI; PERRINO, 1995).

A planta tem despertado o interesse de produtores de soja como sendo mais uma alternativa para a safrinha e rotação de culturas, vindo após a colheita da soja, por ser uma cultura de inverno e por ter baixo custo e facilidade de produção, já que seu cultivo é mecanizado. Estudos preliminares mostram que possui em suas sementes teor de óleo de aproximadamente 35% a 46% em massa, sem casca (LAGHETTI; PIERGIOVANNI; PERRINO, 1995).

Jasper (2009) concluiu, após avaliar o potencial de produção do crambe e as características físico-químicas do óleo e do biodiesel obtidas desses grãos, que o biodiesel do *C. abyssinica* se encontra de acordo com normas estabelecidas na Resolução nº7 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). As pesquisas com o crambe, especialmente sobre o controle de qualidade de suas sementes, são essenciais para o estabelecimento da cultura e se justificam pela potencialidade da espécie e pela escassez de informações referentes à qualidade fisiológica e sanitária de suas sementes.

O uso de sementes com alta qualidade fisiológica, aliados aos demais atributos como os genéticos, os físicos e os sanitários, é a forma mais simplificada e econômica de se reduzir custos de produção e assegurar a sustentabilidade dos cultivos de interesse geral. Dessa maneira ressalta-se a importância da avaliação eficaz da viabilidade de lotes de sementes, que possibilita a seleção para comercialização e semeadura. Para o crambe ainda existem poucas informações sendo essa avaliação um desafio para a empresa produtora de sementes e as instituições de pesquisa.

O conhecimento da qualidade de um lote de sementes depende da disponibilidade de metodologias precisas, que levem a obtenção de resultados confiáveis (McDONALD, 1998). O teste de tetrazólio tem sido utilizado com sucesso nos programas de qualidade de sementes, por ser um método rápido que estima a viabilidade e vigor de lotes de sementes, além de poder diagnosticar causas da deterioração (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANCA NETO, 1999), e permitir a distinção entre sementes mortas e dormentes (GOSLING, 2003). Trata-se de um teste que, pela observação da coloração obtida nas diferentes partes da semente, permite determinar a presença, a localização e a natureza das alterações nos tecidos das sementes obtendo-se resultados, de modo geral, em menos de 24 horas (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANCA NETO, 1999). O teste baseia-se na atividade da enzima desidrogenase do ácido málico que reduz o sal de tetrazólio nos tecidos vivos das sementes, onde íons de H<sup>+</sup> são transferidos para o referido sal. Quando a semente é imersa na solução de tetrazólio ocorre a reação de redução nas células vivas resultando na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifenilformazan, indicando haver atividade respiratória nas mitocôndrias e, conseqüentemente, que o tecido é viável (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998).

A eficiência do teste de tetrazólio em avaliar a viabilidade das sementes depende do desenvolvimento de um método adequado para cada espécie, de modo a definir as condições apropriadas para a hidratação, o preparo, a coloração e a avaliação das sementes. Algumas pesquisas têm sido feitas tentando ajustar metodologias para o uso do teste de tetrazólio em espécies oleaginosas da família Brassicaceae como o nabo forrageiro. No entanto, o referido teste apresenta o procedimento padronizado e utilizado rotineiramente apenas para algumas espécies, como a soja (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998), o milho (DIAS; BARROS, 1995) e o feijão (SANTOS; NOVEMBRE; MARCOS FILHO, 2007).

Dessa forma, objetivou-se com esta pesquisa adequar metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de crambe.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, MG. Foram utilizados cinco lotes de sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) da variedade FMS Brilhante.

Para caracterização dos lotes foram realizados os seguintes testes e determinações:

**Teor de água** – foi adotado o método de estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24h (BRASIL, 2009), com duas repetições de 50 sementes.

**Teste de germinação** – a semeadura foi realizada em substrato rolo de papel, umedecido com uma quantidade de água equivalente 2,5 vezes a massa do papel e transferidos para germinadores à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes e os resultados expressos em porcentagens de plântulas normais. Foi realizada contagem a partir do 4º dia das plântulas normais e foi encerrado ao 7º dia.

**Teste de tetrazólio** – as sementes foram embebidas entre papéis umedecidos com 2,5 vezes a massa do papel por três horas, seguido do corte longitudinal. Logo em seguida, as sementes foram totalmente submersas em solução de tetrazólio (pH 6,5) nas concentrações de 0,075%, 0,5% e 1,0% por 18 horas e 24 horas em BOD à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , no escuro. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento.

Após o desenvolvimento da coloração, as metades das sementes foram lavadas em água corrente e deixadas submersas em água até o momento da avaliação. Posteriormente, foram analisadas individualmente com auxílio de uma lupa e, de acordo com a extensão, intensidade dos tons avermelhados, presença de áreas brancas leitosas, aspecto dos tecidos e localização destas

colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento, as sementes foram classificadas nas categorias de viáveis (com eixo embrionário e com área de translocação eixo-cotilédone intactos e mais de 50% de área colorida no cotilédone) e inviáveis.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (5 lotes e 2 períodos de embebição no tetrazólio) para as diferentes concentrações. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade e, quando necessário os dados foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  para aproximação da curva normal. Os resultados do teste de germinação e tetrazólio foram submetidos à análise de correlação simples de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Sisvar® (FERREIRA, 2010).

Os teores de água das sementes de crambe variaram de 10,5% a 15,5% (Tabela 1), por ocasião da realização dos testes. Masetto et al. (2009), observaram valores médios referentes ao teor de água das sementes de crambe após o beneficiamento entre 6,5% e 9,4%. Segundo Knights (2002) sementes de crambe devem ser colhidas com 14% a 12% de umidade e devem ser armazenadas e comercializadas com 10% ou menos de umidade.

Com relação aos testes de germinação (Tabela 1) estes possibilitaram classificar os lotes em cinco níveis sendo em ordem de maior qualidade fisiológica lote 4, 2, 3, 1 e 5. O teste de tetrazólio na concentração de 0,075% permitiu uma coloração mais nítida dos embriões quando comparada às demais concentrações, o que facilitou a análise visual da viabilidade. As concentrações de 1% e 0,5% de solução de tetrazólio não permitiram análise seguras por apresentarem coloração muito intensa nos dois períodos testados, dificultando a classificação visual, caracterizando todas as sementes como inviáveis.

**Tabela 1.** Resultados dos teores de água – U (%) e germinação – G (%) obtidos em cinco lotes de sementes de crambe.

Lotes	U	G
1	13,5 a	20 d
2	15,5 a	61 b
3	10,5 b	45 c
4	12,5 c	79 a
5	11,0 a	4 e
CV(%)	15,79	13,34
F	2,09	119,08
Pr>Fc	0,22	0,00

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

**Fonte:** Elaboração dos autores.

As menores concentrações são mais indicadas por possibilitarem melhor visualização dos distúrbios de coloração e identificação de diferentes tipos de injúrias, e pelo menor gasto de solução, sendo que as concentrações mais utilizadas são 0,075%; 0,1%; 0,2%; 0,5% e 1,0%. (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANCA NETO, 1999; FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998).

Na concentração da solução de 0,075%, tanto por 18h quanto por 24h foi possível distinguir o lote 4 como de qualidade superior aos demais e o lote 5 qualidade inferior (Tabela 2). Os lotes de qualidade intermediária, exceto o lote 2, foram classificados da mesma forma nos dois períodos testados. A concentração de 0,075% também é recomendada para outras sementes como o algodão por duas horas e trinta minutos (CERVI; MENDONÇA, 2009) e abóbora e abobrinha (BARROS et al., 2005) por uma hora.

**Tabela 2.** Porcentagem de sementes viáveis de crambe obtidas pelo teste de tetrazólio após 18 horas e 24 horas de embebição na solução de 0,075% de tetrazólio.

Lotes	Tempo de embebição	
	18h	24h
1	55 Abc	55Abc
2	67Aab	62Ab
3	41Ac	42Ac
4	84Aa	87Aa
5	8Ad	3Ad
CV	17,57	
F (lotes * períodos)	0,337	
Pr>Fc (lotes * períodos)	0,8510	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

**Fonte:** Elaboração dos autores.

No período de 18h o coeficiente de correlação entre o teste de tetrazólio e o de teste de germinação foi moderado  $r = 0,61$ , e no período de 24h a correlação entre os dados foi altamente significativa  $r = 0,83$ , indicando que o teste de tetrazólio fornece uma indicação segura da viabilidade das sementes de crambe.

Segundo Krzyzanowski, Vieira e Franca Neto (1999), a escolha de metodologia adequada para o emprego do teste de tetrazólio deve se basear na facilidade para a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis e na capacidade de diferenciar lotes de qualidade fisiológica distintas. Outro fator que deve ser levado em consideração na avaliação da viabilidade de sementes é o tempo de execução do teste, pois, de acordo com França Neto, Krzyzanowski e Costa (1998), a rapidez na avaliação proporciona vantagens, como a possibilidade de descarte de lotes com qualidade inadequada e prevenir a comercialização de lotes de sementes de baixa qualidade fisiológica. O teste de tetrazólio pode ser, portanto, usado como complemento ao teste de germinação em sementes de crambe na concentração de 0,075% por 24h.

A utilização de solução de tetrazólio na concentração de 0,075% por 18h ou por 24h é eficiente para avaliação da viabilidade das sementes de crambe.

## 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*, Pelotas, v. 27, n. 2, p. 165-171, 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília: MAPA, 2009. 395 p.

CERVI, F.; MENDONÇA, E. A. F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 31, n. 1, p. 177-186, 2009.

DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. *Avaliação da qualidade de sementes de milho*. Londrina: IAPAR, 1995. 43 p. (Circular, 88).

FERREIRA, D. F. *SISVAR – Sistema de análise de variância*. Versão 5. 3. Lavras: UFLA, 2010.

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

GOSLING, P. G. Viability testing. In: SMITH, R. D.; DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; PRITCHARD, H. W.; PROBERT, R. J. (Ed.). *Seed conservation: turning science into practice*. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 2003. p. 445-481.

JASPER, S. P. *Cultura do crambe (Crambe abyssinica hochst): avaliação energética, de custo de produção e produtividade em sistema de plantio direto*. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

KNIGHTS, E. G. *Crambe: a North Dakota case study*. Kingston: A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No. W02/005, 2002. 25 p.

KRZYZANOWSKI, F.; VIEIRA, R. D.; FRANCA NETO, J. B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LAGHETTI, G.; PIERGIOVANNI, A. R.; PERRINO, P. Yield and oil quality in selected lines of Crambe abyssinica grow in Italy. *Industrial Crops and Products*, v. 4, n. 3, p. 203-212, 1995.

MASETTO, T. E.; QUADROS, J. B.; MOREIRA, F. H.; RIBEIRO, D. M.; BENITES JUNIOR, I.; REZENDE, R. K. S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de crambe produzidas no estado de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, Campina Grande, v. 13, n. 3, p. 107-113, 2009.

McDONALD, M. B. Improving our understanding of vegetable and flower seed quality. *Seed Technology*, Springfield, v. 20, n. 2, p. 121-124, 1998.

OPLINGER, E. S. *Crambe, alternative field crops manual*. St. Paul: University of Wisconsin and University of Minnesota, MN 55108, 1991.

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

