

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE PINHÃO MANSO PELOS TESTES DE TETRAZÓLIO E DE RAIOS X¹

TAIS LEITE FERREIRA PINTO², JULIO MARCOS FILHO³, VICTOR AUGUSTO FORTI²,
CRISTIANE DE CARVALHO², FRANCISCO GUILHIEN GOMES JUNIOR²

RESUMO - O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) apresenta elevado potencial para produção de biocombustível; porém, existem poucos estudos relacionados à avaliação da qualidade de suas sementes. Assim, a pesquisa objetivou estudar os procedimentos para a condução do teste de tetrazólio e verificar a eficiência dos testes de tetrazólio e de raios X para a avaliação da viabilidade de sementes desta espécie. Para o teste de tetrazólio, foi comparado o pré-condicionamento entre papel e imersão em água, até que as sementes atingissem os teores de água de 30% e 40%. Após esta etapa, o tegumento das sementes foi retirado manualmente e os embriões foram imersos em solução de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio nas concentrações de 0,075% e 0,5%, por 120 minutos, a 40°C. Os resultados do teste de germinação foram confrontados com os resultados do teste de tetrazólio. A hidratação entre papel, até as sementes atingirem 30% de água e a coloração do embrião em solução 0,5% de tetrazólio, durante 120 minutos, no escuro, a 40°C, produzem informações consistentes. As sementes de pinhão manso foram submetidas ao teste de raios X, na intensidade de 25 Kv durante 60s; posteriormente, foi realizado o teste de germinação, relacionando-se os resultados obtidos nesses dois testes. Concluiu-se que é possível utilizar o teste de tetrazólio e de raios X para avaliar a viabilidade das sementes de pinhão manso.

Termos para indexação: análise de imagens, potencial fisiológico, oleaginosas.

EVALUATION OF THE *Jatropha curcas* L. SEED VIABILITY BY TETRAZOLIUM AND X-RAY TESTS

ABSTRACT– The *Jatropha curcas* L. presents a great potential for fuel, but there are few studies to assess seed quality of this species. Therefore, this research aimed to study the performance of the tetrazolium salt test procedures and to verify the efficiency of the X-ray test to evaluate the seed viability of this species. Seeds were hydrated between paper towel and immersed in water to reach 30 and 40% m.c.. Following, seed coat was removed manually and seeds were immersed in 0,075 and 0,5% tetrazolium solutions for 120 min., respectively, at 40°C. Best results of tetrazolium test comprised the hydration between paper, until the seeds reach 30% m.c. and coloration in contact with a solution of 0,5%. The *Jatropha curcas* L. seeds were also submitted to X-ray test, in intensity of the 25Kv for 60s. Results of tetrazolium and X-ray tests were compared to germination and it was shown that both are efficient to assess *Jatropha curcas* L. seeds viability.

Index terms: image analysis, physiological potential, oilseed.

¹Submetido em 29/09/2008. Aceito para publicação em 13/04/2009.

²Eng. Agr, Pós-graduando do Programa de Fitotecnia, USP/ESALQ, e-mail: tlferrei@esalq.usp.br

³Eng. Agr, Dr., Professor Titular, Departamento de Produção Vegetal, USP/ESALQ, Bolsista do CNPq, Caixa postal 09, CEP 13.418-900, Piracicaba. e-mail: jmarcos@esalq.usp.br

INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) pertence à família das euforbiáceas; caracteriza-se por sua rusticidade; é resistente à seca e pouco suscetível a pragas e doenças. As suas sementes são ricas em óleo e possuem características desejáveis para a produção de biodiesel (Melo et al. 2006). Principalmente, devido a essa última característica, está havendo interesse crescente pela implantação da cultura.

Recentemente (janeiro de 2008), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa m. 4, autorizou a inscrição da espécie *Jatropha Curcas* L. no Registro Nacional de Cultivares (RNC). A proibição de cultivo da espécie decorria, sobretudo, da ausência de pesquisas sobre o desempenho agrônomo da cultura e, entre elas, a ausência de estudos básicos sobre o desempenho das sementes.

A metodologia estabelecida para a condução do teste de germinação das sementes de pinhão manso considera a avaliação final aos 10 dias (Pereira et al., 2007). Portanto, a busca por testes rápidos, que permitam avaliar de maneira eficiente o potencial fisiológico dos lotes, é importante para complementar e agilizar a tomada de decisões durante várias etapas de produção, principalmente, após a maturidade.

Neste contexto, o teste de tetrazólio tem se constituído em importante alternativa, pela eficiência e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor das sementes, permitindo obter resultados em menos de 24 horas (Barros, 1990). Consiste na observação da coloração desenvolvida em diferentes estruturas da semente, permitindo determinar a presença, a localização e a natureza das alterações nos tecidos das sementes (França Neto et al., 1999), além de, muitas vezes, possibilitar a identificação das causas da redução do potencial fisiológico.

A eficiência do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade das sementes depende do desenvolvimento de método adaptado para cada espécie, como a definição de condições apropriadas para o pré-condicionamento, o preparo, a coloração e a avaliação das sementes.

O teste de raios X é um método simples, rápido, não destrutivo e eficiente, especialmente para avaliação da morfologia de sementes. Através da imagem de raios X é possível visualizar as partes da semente, identificando seu grau de desenvolvimento e possíveis alterações. A viabilidade das sementes submetidas ao comprimento de onda dos raios X não é comprometida devido às baixas intensidades utilizadas, possibilitando a realização de testes adicionais com a mesma semente (Bino et al., 1993 e ISTA,

1995). Desta maneira, a interpretação da análise de raios X e sua comparação com os resultados de testes paralelos de germinação permitem associar a integridade de partes vitais da semente ao seu potencial fisiológico.

Assim, objetivo deste trabalho foi estudar os procedimentos para a condução do teste de tetrazólio e verificar a eficiência dos testes de tetrazólio e raios X para avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da USP, em Piracicaba. Foram utilizadas sementes de pinhão manso colhidas na safra de 2007, provenientes dos Estados do Mato Grosso do Sul (lote 1 e 2) e Minas Gerais (lote 3), com quatro repetições para cada lote.

Para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio, foram utilizadas 25 sementes por repetição. Foram realizados testes relacionados ao pré-condicionamento das sementes e à concentração da solução de tetrazólio. Os métodos de pré-condicionamento testados foram: embebição entre papel toalha (EP) umedecidos com quantidade de água equivalente a três vezes a massa seca do substrato, em germinador a 25°C, e imersão direta em água (IA), em estufa a 40°C, até que as sementes atingissem 30% e 40% de água (b.v.). A escolha desses teores de água ocorreu devido ao fato de que o grau de umidade superior 25% nas sementes é considerado fundamental para a integração dos sistemas de membranas (Marcos Filho, 2005).

A necessidade da retirada de todo o tegumento das sementes de pinhão manso para a penetração da solução de tetrazólio no embrião, após o tratamento de hidratação, foi constatada por Gris et al. (2007). A remoção foi realizada pressionando as sementes com os dedos de forma a causar ruptura ao tegumento, porém, sem que houvesse danificações no endosperma.

O nível de hidratação das sementes a ser obtido após o pré-condicionamento das mesmas foi definido com base em curvas de hidratação. Antes da obtenção das curvas, o teor de água inicial das sementes foi determinado pelo método de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas (Brasil, 1992). Para cada um dos métodos de pré-condicionamento testados foram obtidas curvas de hidratação através do monitoramento da massa úmida das sementes durante a hidratação, a cada oito horas, adotando-se como referência o teor de água inicial das sementes (7,4% para o lote 1 e 7,8% para os lotes 2 e

3), até que fosse observada a protrusão da raiz primária. Na hidratação entre papel, as sementes foram distribuídas entre duas folhas de papel-toalha umedecidas com a quantidade de água equivalente a 2,8 vezes a massa das folhas secas, sendo, em seguida, colocadas em caixas de plástico transparente (11cm x11cm x 3 cm), em germinador a 25°C. Na imersão direta, as sementes foram imersas em 500 mL de água e mantidas em germinador a 25°C. As condições utilizadas para a hidratação das sementes para o teste de tetrazólio foram às mesmas descritas para a obtenção das curvas de hidratação.

Após o pré-condicionamento, as sementes foram imersas em solução de cloreto de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio nas concentrações de 0,5% e 0,075%, durante 120 minutos (o tempo foi determinado em testes preliminares), a 40°C,

no escuro.

Em seguida, as sementes foram seccionadas longitudinalmente no sentido do comprimento e as duas metades foram examinadas. De acordo com a extensão e a intensidade da coloração, a presença de áreas brancas leitosas e a localização dessas áreas em relação às áreas vitais das sementes, os embriões foram individualmente classificados em duas categorias: 1) viáveis e 2) não viáveis, de acordo com os critérios desenvolvidos por Moore, (1972) (Figuras 1 e 2). Os critérios para a escolha dos procedimentos mais adequados para a realização do teste foram baseados em função da facilidade de remoção do tegumento, eficiência de coloração dos embriões (baseados na intensidade e na uniformidade da coloração) e relações entre os valores obtidos no teste de tetrazólio com os do teste de germinação.

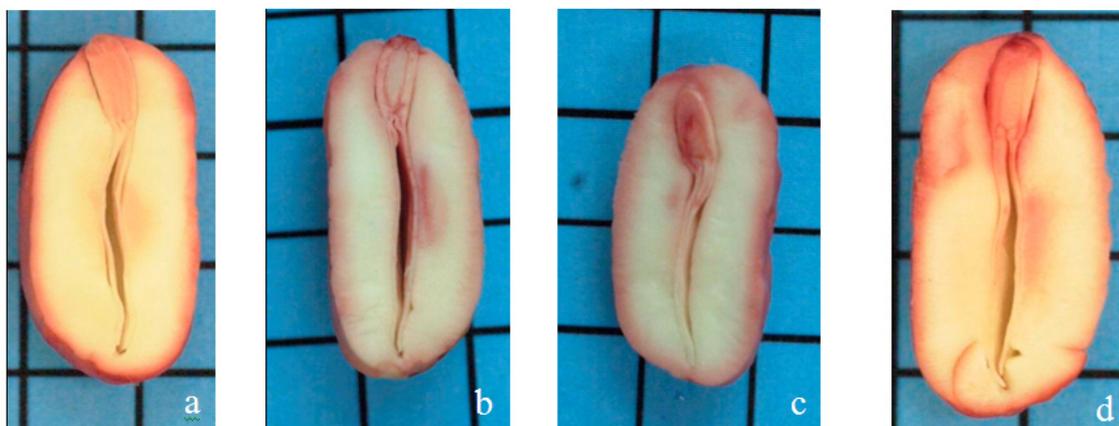


FIGURA 1. Semente viável: embrião com coloração rosa e, ou tecidos com aspecto normal e firme (a, b, c, d); menos de 50% do endosperma com regiões necrosadas (d); eixo embrionário com coloração vermelha intensa no córtex, porém, sem atingir o cilindro central (b, c).

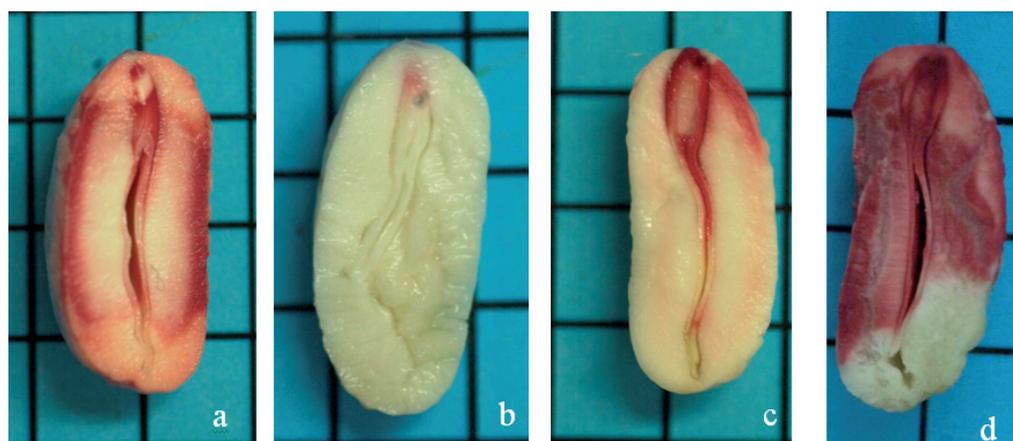


FIGURA 2. Semente não viável: mais de 50% do endosperma com regiões necrosadas (b, c) e, ou com coloração vermelha intensa (a, d); embrião com regiões descoloridas e, ou vermelha intensa atingindo o cilindro central (a, b, c, d).

Simultaneamente, foi realizado o teste de germinação em areia utilizando água referente a 60% da capacidade de retenção do substrato (Brasil, 1992), a 30° C, conforme Pereira et al. (2007). Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada lote. As sementes e as plântulas foram avaliadas de acordo com Brasil (1992), considerando-se como plântula normal as que apresentavam as partes essenciais do embrião desenvolvidas (Figura 3b). A contagem final foi realizada após a estabilização da germinação, aos 10 dias após a semeadura.

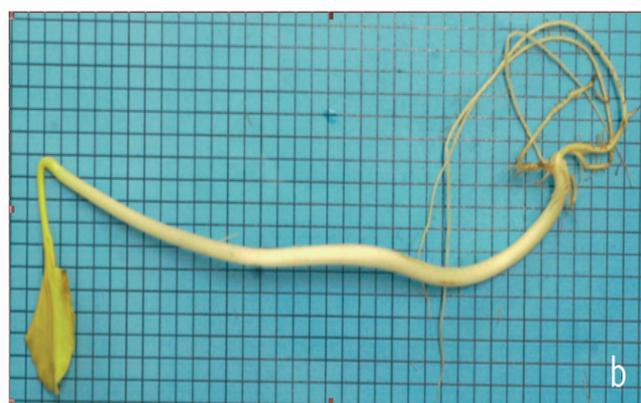


FIGURA 3. Imagem de semente obtida por meio do teste de raios X, sem apresentar danos (1.1)(a), originando em plântula normal (b).

Concomitantemente aos testes de tetrazólio e de germinação, foi conduzido o teste de raios X, com quatro repetições de 25 sementes para cada lote. Para a obtenção da radiografia, a placa de acrílico, com as sementes, foi

colocada diretamente sobre um filme radiográfico (Kodak MIN-R 2000, tamanho de 18 cm x 24 cm) a 40 cm da fonte de radiação. A intensidade de radiação utilizada foi de 25 Kv com tempo de exposição de 60s. O aparelho de raios X utilizado foi o Faxitron X-ray, modelo MX-20. Considerou-se que as imagens que apresentavam regiões sem manchas escuras e trincas no endosperma e embrião, foram consideradas como sementes sem danos; enquanto as imagens com presença de manchas escuras no endosperma, com área superior a 50% do total de sua superfície, e, ou presentes no embrião e, ou trincas no endosperma que pudessem interferir na translocação de reservas para o embrião e, ou trincas no embrião foram considerados como sendo danos severos. Os danos observados na análise radiográfica das sementes receberam notas de acordo aos critérios apresentados na Tabela 1 (Cicero et al., 1998).

TABELA 1. Notas atribuídas aos danos observados no endosperma e no embrião das sementes de pinhão manso através das imagens de raios X, modificado de Cicero et al. (1998).

Nível de dano	Endosperma	Embrião
Não observado	1	1
Severo	2	2

Em seguida, as sementes irradiadas foram submetidas ao teste de germinação com o objetivo de relacionar as características morfológicas das sementes com a porcentagem de germinação e o desenvolvimento das plântulas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes por tratamento. Os dados obtidos nos testes de tetrazólio e de germinação foram submetidos à análise da variância. A comparação das médias foi feita pelo teste de Dunnett (5%) utilizando o programa SANEST (Zonta e Machado, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de tetrazólio, entre os métodos de hidratação avaliados, observou-se que a embebição entre folhas de papel umedecidas garantiu maior uniformidade na coloração das sementes quando comparada com a imersão direta em água, resultando em valores de viabilidade mais elevados em comparação aos do procedimento de imersão em água, para os

dois teores de água testados (Tabela 2). A imersão direta em água, por proporcionar embebição muito rápida das sementes, pode ocasionar danos durante a embebição (Fogaça, 2000; Gris et al., 2007), caracterizados por desuniformidade

de coloração e presença de manchas nos cotilédones e endosperma (Figura 2d). Com relação à facilidade de retirada do tegumento, não foram verificadas diferenças entre ambos os métodos e teores de água testados.

TABELA 2. Porcentagens de sementes viáveis de pinhão manso obtidas pelos testes de tetrazólio-sementes hidratadas entre papel e com 30%, 40% de água (EP 30% e EP 40%) e por imersão direta em água, com 30% e 40% de água (IA 30% e IA 40%) nas concentrações de sal de tetrazólio (Concentração solução) de 0,5% e 0,75%, em comparação aos resultados do teste de germinação.

Tratamentos		Lote 1	Lote 2	Lote 3
Hidratação	Concentração solução			
			%	
EP 30%	0,075%	44 ^{ns}	64 ^{ns}	80 ^{ns}
	0,5%	52 ^{ns}	57 ^{ns}	88 ^{ns}
EP 40%	0,075%	51 ^{ns}	60 ^{ns}	90 ^{ns}
	0,5%	47 ^{ns}	63 ^{ns}	91 ^{ns}
IA 30%	0,075%	43 ^{ns}	38**	85 ^{ns}
	0,5%	31**	55 ^{ns}	75 ^{ns}
IA 40%	0,075%	55 ^{ns}	61 ^{ns}	28**
	0,5%	53 ^{ns}	34**	55**
Germinação		54	43	89
CV (%)		19,2	12,80	10,70

** - Tratamentos que diferem da germinação a 5% pelo teste de Dunnett

NS – Tratamentos que não diferem da germinação a 5% pelo teste de Dunnett

Dentre os resultados de embebição entre papel, não foram verificadas diferenças entre os teores de água nas sementes de 30 e 40%, em relação a germinação das sementes de pinhão manso (Tabela 2). Portanto, devido ao menor tempo de execução do teste, o teor de água de 30% foi escolhido como mais adequado.

A concentração da solução de sal de tetrazólio de 0,5% foi a que proporcionou melhor visualização dos tecidos da semente de pinhão manso em comparação a concentração de 0,075%, originando resultados mais próximos aos da germinação, em ambos os métodos; também apresentou a vantagem de redução do período para obtenção dos resultados. Oliveira et al. (2006) também verificam que a utilização da concentração de 0,5% foi a que originou maior uniformidade na coloração dos tecidos das sementes de mamona.

As sementes do lote 2 apresentaram porcentagem de germinação inferior à maioria dos resultados de viabilidade obtidos pelo de tetrazólio (Tabela 2). Foi observada alta incidência de patógenos nas sementes desse lote, que pode

explicar essas diferenças. Pelo teste de raios X, também pode ser verificado esse fato, pois houve ocorrência acentuada de sementes mortas e plântulas anormais, porém, as imagens foram classificadas como sem danos (nota 1.1) (Tabela 3). Oliveira et al. (2005) também verificaram a interferência de patógenos na germinação de sementes de canafistula e diferenças em relação aos resultados do teste de tetrazólio.

Portanto, para o teste de tetrazólio foi considerado como método mais eficiente a hidratação das sementes entre papel até que as mesmas atingissem 30% de água, seguida pela remoção do tegumento e a coloração do embrião em solução 0,5% de tetrazólio, durante 120 minutos, no escuro, a 40°C.

Pelo teste de raios X foi possível identificar as estruturas essenciais da semente de pinhão manso (Figura 3a) e, também, observar os danos às sementes, inclusive os que devem ter interferido no potencial fisiológico, pois houve elevada relação entre sementes com danos considerados severos (Figuras 4a e 5a) e as porcentagens de plântulas anormais (Figura 4b) e de sementes mortas (Figura 5b).

TABELA 3. Porcentagem de total (T) de sementes em cada uma das notas atribuídas pela análise de imagens (Nota) e porcentagens das plântulas normais (PN), das plântulas anormais (PA) e de sementes mortas (SM) pelo teste de germinação das sementes submetidas aos raios X, para os três lotes estudados.

Nota*	Lote 1				Lote 2				Lote 3			
	T	PN	PA	SM	T	PN	PA	SM	T	PN	PA	SM
1.1.	64	39	4	5	82	52	15	15	90	90	0	0
2.1.	5	0	6	15	1	0	1	0	4	1	1	2
1.2.	9	1	5	3	8	1	3	4	1	0	1	0
2.2.	23	1	3	19	10	1	0	9	5	3	1	1
Total	100	41	18	41	100	54	19	28	100	94	4	3

* 1. Dano não observado, 2. dano severo. O primeiro número da nota refere-se ao endosperma e o segundo refere-se ao embrião.

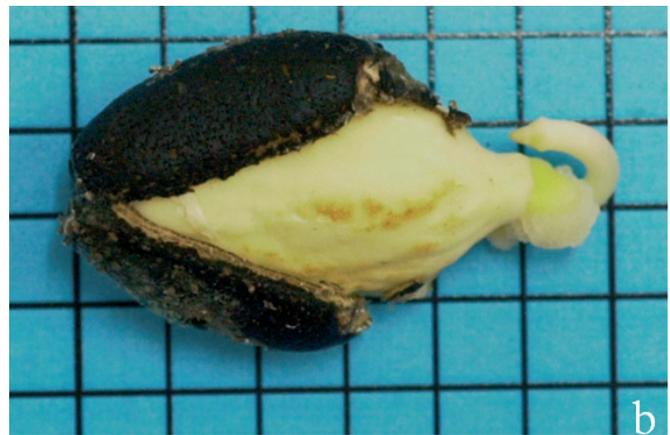


FIGURA 4. Imagem de semente obtida por meio do teste de raios X, apresentando danos no endosperma e embrião (nota 2.2) (a), originando em plântula anormal (b).



FIGURA 5. Imagem de semente obtida por meio do teste de raios X, apresentando danos no endosperma e embrião (nota 2.2) (a), originando em semente morta (b).

CONCLUSÃO

Os testes de tetrazólio e de raios X são eficientes para avaliar a viabilidade das sementes de pinhão manso.

Para a utilização do teste de tetrazólio em sementes de pinhão manso, recomenda-se a hidratação das sementes entre papel até que as mesmas atinjam 30% de água, seguida pela remoção do tegumento e a coloração do embrião em solução 0,5% de tetrazólio, durante 120 minutos, no escuro, a 40°C.

REFERÊNCIAS

- BARROS, A.S.R.; MARCOS FILHO, J. Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.10, p.1447-1459, 1990.
- BINO, R.J.; AARTSE, J.W.; VAN DER BURG, W.J. Non destructive X-ray of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, v.3, p.167-170, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SMDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CICERO, S. M.; VAN DER HEIJDEN, G.W.A.M., VAN DER BURG W.J., BINO, R.J. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 603-612, 1998.
- FOGAÇA, C.A. **Padronização e adequação de metodologias para avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Caesalpinaceae**. 2000. 95f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Universidade do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.8.5-1 - 8.5-28.
- GRIS, C. F.; CARVALHO, M. L. M. de; OLIVEIRA, A.dos S. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica em sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/caracterizacao/2.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2008.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION-ISTA. International rules for testing seed. **Seed Science and Technology**, v.13, n.2, p.300-520, 1995.
- MARCOS FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MOORE, R.P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, v. 44, n. 3, p. 22-24, 1972.
- OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; CALDEIRA, C.M.; SILVA, C.D.; SILVA, D.G. Teste de tetrazólio em sementes de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. Disponível em: < http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/trabalhos_cbm2/153.pdf>. Acesso em: 10 maio 2008.
- OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert *Leguminosae Caesalpinioideae*. **Cerne**, v. 11, n. 2, p. 159-166, 2005.
- PEREIRA, M. D.; DIAS, D. C. F. dos S.; DIAS, L. A. S. Germinação de sementes de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em diferentes temperaturas e substratos. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. Disponível em: < <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/47.pdf>>. Acesso em: 25 de maio de 2008.