



Comunicado breve

Preparo de sementes de corda-de-viola para o teste de tetrazólio utilizando micro-ondas

Raphael Branco Araujo¹, Fabrícia Cristina dos Reis², Ana Dionisia da Luz Coelho Novembre³

¹ Eng. Agr^o Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, SP, Brasil. *Autor para correspondência: rbaraujo.agro@yahoo.com.br

² Eng. Agr^o Msc. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, SP, Brasil. fabriciareis@msn.com

³ Eng. Agr^o Dra. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, adlcnove@esalq.usp.br

INFO ARTIGO

Histórico do artigo
Recebido: 23 junho 2015
Aceito: 14 outubro 2015

Palavras chaves:
Convolvulaceae
Dormência
Plantas daninhas

ABSTRACT

The aim of this work was to study morning glory (*Ipomoea hederifolia* L.) seeds preparation for the tetrazolium test. Initially the water absorption kinetics by the seeds was determined, to ascertain an appropriate hydration tissue level to the tetrazolium test. Thereafter, scarified and no-scarified seeds were hydrated until 20% water, between paper and by microwave radiation for 30, 45 and 60 seconds. After the hydration, seeds were sectioned longitudinally, width ways, and were maintained during 1 hour and 15 minutes in tetrazolium salt solution (0,075%) at 25°C for viability evaluation. The experimental design was a randomized block with two replications for each seed lot. The appropriate preparation for no-scarified seeds is using microwave radiation for 45 seconds and the coloring period is 1 hour and 15 minutes at 25°C. Therefore, the time of seeds preparation with microwave was decreased by 3 to 4 hours when compared with between paper method.

1. Introdução

A espécie *Ipomoea hederifolia* é conhecida popularmente como corda-de-viola e pertence à família Convolvulaceae. É considerada uma planta ornamental em função das flores coloridas, além de ser uma planta daninha economicamente importante, por competir com diversas plantas e causar prejuízos, principalmente para a colheita (Kissmann e Groth, 1999).

Além disso, Azania et al. (2009) afirmaram que sementes de *I. hederifolia* possuem um mecanismo de dormência que favorece a germinação ao longo do tempo, devido às diferenças dos momentos de emergência das plântulas. Dentre os tipos de dormência que foram relacionados por Baskin e Baskin (2001), a impermeabilidade do tegumento à água é atribuída às sementes de *Ipomoea*, sendo necessário o emprego de alguns tratamentos para que ocorra a embebição e, conseqüentemente, o início do processo germinativo (Popinigis 1985).

Para analisar a viabilidade dessas sementes existem métodos como o do teste de tetrazólio, que possibilita a inferência sobre a integridade dos tecidos e atividade metabólica das células. O teste consiste na utilização de

solução aquosa do sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio e na atividade das enzimas desidrogenases, na concentração de íons H⁺ e subsequente coloração avermelhada dos tecidos (Delouche et al., 1976).

Uma das prioridades em estudos de métodos para avaliar a qualidade das sementes é a agilidade para a obtenção dos resultados. Para determinar a viabilidade das sementes existem dois testes, o de germinação e o de tetrazólio (Brasil, 2009; ISTA, 2006).

No teste de germinação, o interesse é avaliar a formação da plântula, o que requer períodos variáveis de tempo em função das características da semente da espécie vegetal. No teste de tetrazólio os tecidos da semente é que são avaliados; assim ao estudar o método para esse teste o ideal é estabelecer condições que favoreçam a agilidade do preparo das sementes para a avaliação.

A utilização da radiação de micro-ondas pode auxiliar a reduzir o tempo dos procedimentos dos métodos de análise, como, por exemplo, as pesquisas desenvolvidas por Frandoloso et al. (1998) para determinar o grau de umidade de sementes de cebola, de cenoura e de tomate, ou de Tran

(1979) para superar a dormência da semente de *Acacia longifolia*.

Quanto ao modo de ação em sementes, Anand et al. (2009) afirmaram que tratamentos com micro-ondas podem tornar o tegumento das sementes menos rígido, aumentando a taxa de embebição e consequentemente reduzindo a dormência de sementes de *Stylosanthes seabrana*. Ravi et al. (2012) atestaram o mesmo ao trabalhar com sementes de *Melia dubia*, e afirmaram ainda que tratamentos com ondas dessa frequência podem aumentar sua distribuição dentro das sementes durante a embebição, de modo a concluir o processo de germinação.

Apesar do teste de tetrazólio já ser utilizado para avaliar a viabilidade de sementes de plantas daninhas, estudos que avaliam o nível de hidratação para o preparo das sementes para esse teste são escassos. Assim, o objetivo deste trabalho foi adequar o método para o teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes de *I. hederifolia*.

2. Material e métodos

Foram utilizadas sementes de dois lotes de *Ipomoea hederifolia* adquiridas junto à empresa Agrocósmos. Todos os testes foram realizados com sementes escarificadas em ácido sulfúrico (1 M) durante 5 minutos (Azania, 2003) e com sementes intactas.

Etapa 1: Estudo da absorção de água pelas sementes.

Grau de umidade: método de estufa utilizando 105 °C ± 3 °C por 24 horas (Brasil, 2009), Resultado expresso em porcentagem de água, base úmida.

Cinética de absorção de água pelas sementes: quatro repetições de 25 sementes foram colocadas em papel, previamente umedecido com quantidade de água correspondente a 2,5 vezes o peso seco do papel, e mantidas em germinador a 25°C. A cada hora foi realizada a pesagem das sementes até que houvesse a germinação de 10% das sementes de cada repetição. Em seguida, o teor de água das sementes previamente determinado foi utilizado para calcular a quantidade de água absorvida pelas sementes a cada hora, conforme indicado:

$$U\% = \frac{P_u - P_s}{P_u}$$

Em que U% é o teor de água; P_u é o peso de sementes úmidas; P_s é o peso de sementes secas em estufa a 105 °C ± 3 °C por 24 horas.

Etapa 2: Estudo do preparo das sementes para o teste de tetrazólio.

Hidratação: em função das informações obtidas na etapa 1 foi estabelecido o nível de hidratação das sementes, assim, foi avaliada a hidratação entre papel e em micro-ondas. Para a hidratação entre papel 25 sementes por repetição foram distribuídas em papel, previamente umedecido com água equivalente a 2,5 o peso do papel seco. A seguir, esse conjunto foi mantido em germinador até as sementes atingirem 13% de teor de água em temperatura de 25°C. Essa temperatura foi determinada com base na recomendação de outras espécies do gênero *Ipomea* ser entre 20 e 30°C (Brasil, 2009) e o tempo foi determinado após testes preliminares. Para a hidratação em micro-ondas. 25 sementes por repetição foram imersas em 30 mL de água e colocadas no interior do micro-ondas, por períodos de 30, 45 e 60 segundos em potência alta (1.100 W). O aparelho de micro-ondas utilizado possui potência máxima de 1.600 W e frequência de 2,45 GHz.

Coloração: após a hidratação, a semente foi cortada longitudinalmente, através da face dorsal, evitando atingir o eixo embrionário (Figura 2). Após o corte, uma das partes de cada semente foi descartada. A seguir, a parte que tinha o eixo embrionário foi imersa em solução 0,075% de tetrazólio, por uma hora e 15 minutos. Esse período de tempo foi estabelecido após testes preliminares, em que foram avaliados períodos entre uma hora e duas horas. A coloração foi a 25°C, a mesma temperatura utilizada para a obtenção de cinética de absorção de água, e no escuro. Em seguida, as partes foram lavadas em água corrente e mantidas imersas em água até avaliação. A avaliação da viabilidade foi baseada nas características do embrião da semente e foram consideradas a localização dos tecidos, a intensidade de coloração, a turgescência e a presença de tecidos não coloridos e, ou, danificados, de acordo com o estabelecido por Grabe (1976) e as sementes foram classificadas individualmente como viáveis ou não viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis. Para complementar o estudo do método, para o preparo das sementes para o teste de tetrazólio, as sementes foram avaliadas também quanto à germinação.

Teste de tetrazólio: quatro sub-amostras com 25 sementes escarificadas e intactas de cada lote foram hidratadas conforme o método citado anteriormente. A seguir, foi feito um corte transversal com auxílio de um bisturi na lateral do tegumento dorsal da semente (Figura 1). A parte contendo o eixo embrionário inteiro foi imersa em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio a 0,075% e mantidas no escuro em germinador a 25°C por 1 hora e 30 minutos para coloração. Em seguida, as partes foram lavadas em água corrente e analisadas individualmente externa e internamente após a retirada do tegumento, utilizando os critérios de interpretação definidos na primeira etapa. As imagens das sementes, viáveis e não viáveis, referentes ao teste de tetrazólio foram registradas por meio de fotografia digital.

Teste de germinação: quatro repetições de 50 sementes, de cada lote foram colocadas em caixas plásticas transparentes (0,11 x 0,11 x 0,03 m), contendo duas folhas de papel mata-borrão (0,105 x 0,105 m) umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel. Em seguida foram mantidas em germinador (20-30°C, com 8 horas de luz a cada 24 horas), com avaliações realizadas aos sete e aos 21 dias após a instalação do teste. Os resultados do teste de germinação foram expressos em porcentagem de plântulas normais e pela soma da quantidade de plântula normal (PN) e de sementes não germinadas (SNG), conforme indicação das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Delineamento experimental e análise estatística: o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (p<0,05).

3. Resultados e discussão

Previamente observou-se que o teor de água inicial médio das sementes de corda-de-violão de 7,00 %. Após nove horas de hidratação, foi observada a emissão da radícula das sementes escarificadas dos lotes 1 e 2, que atingiram 21,85 % de água e 34,90 % de água, respectivamente (Figura 1). Esses resultados, quando comparados com a emissão da radícula das sementes não escarificadas do lote 1, evidenciaram que sementes não escarificadas precisaram de mais tempo para emitir a radícula, uma vez que a emissão da radícula das sementes do lote 1 ocorreu após 16 horas, quando as sementes tinham 24,76 % de água, e as do lote 1 foi após 12 horas, quando as sementes tinham 35,00 % de água.

O estudo da cinética de hidratação das sementes de corda-de-violão mostrou que o teor de água médio de 13% é

adequado para o preparo das sementes para o teste de tetrazólio, pois com essa quantidade de água não há emissão da radícula.

Quando 10% das sementes emitiram radículas e se finalizou o estudo da hidratação, o teor de água das sementes do lote 1 foi menor que o das sementes do lote 2, possivelmente em função da diferença de qualidade entre essas sementes, pois há evidências de que a deterioração das sementes pode favorecer a absorção de água, devido à

desorganização das membranas celulares (Copeland e McDonald, 1995; Smith e Berjak, 1995).

Adicionalmente, pela Figura 1, foi determinado que as sementes escarificadas emitiram radícula em um menor período de tempo, em 9 horas, e os teores de água foram 21,85 % para as sementes do lote 1 e 34,90% para as do lote 2. Esses valores possibilitam afirmar que, apesar da escarificação química das sementes favorecer a velocidade de hidratação, não interferiu na quantidade de água absorvida pelas sementes.

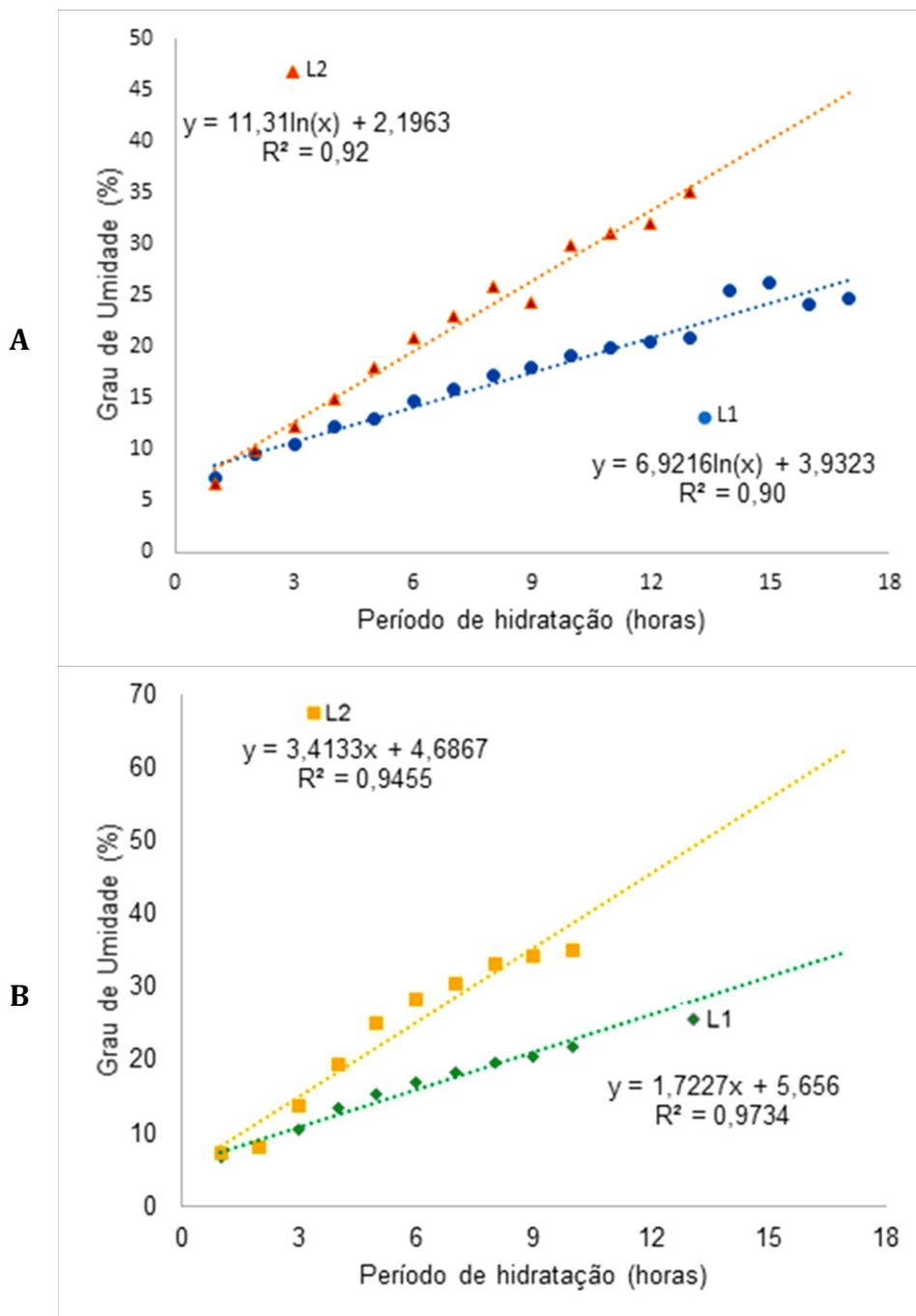


Figura 1. Teores de água (%) das sementes de *Ipomoea hederifolia*, lotes 1 e 2, em função do nível de hidratação; a - não escarificadas; b - escarificadas. Piracicaba, 2014.

Em função dos resultados do teste de tetrazólio (Tabela 2), as porcentagens de sementes viáveis foram superiores às obtidas no teste de germinação, quando foram consideradas somente a quantidade de plântulas normais (Tabela 1). Isto ocorreu provavelmente porque o tratamento utilizado para a superação de dormência indicado na pesquisa de Azania et al. (2003) não foi eficaz.

A eficiência de métodos para a superação da dormência de sementes foi questionada por Caloy (2013), que afirmou que os tratamentos indicados nem sempre são efetivos para a superação da dormência de todas as sementes. Além disso, Ogunwenmo e Ugborogho (1999) concluíram que a escarificação com ácido sulfúrico concentrado diminuiu o potencial de germinação de sementes de *I. hederifolia*.

Por outro lado, Azania et al. (2003) observaram que a exposição das sementes de *I. hederifolia* por 5 minutos ao ácido sulfúrico (1 M) foi eficaz para a superação de dormência. Esses pesquisadores verificaram que cerca de 80% das sementes escarificadas germinaram e quando não escarificadas, a porcentagem de germinação foi próxima a 20%.

No final do teste de germinação as sementes não germinadas (SNG) foram avaliadas por meio do teste de tetrazólio, conforme indicação das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), e foram caracterizadas como viáveis 92% das sementes dos lotes 1 e 2.

Não foi observada diferença entre as porcentagens de sementes viáveis independentemente do lote de semente avaliado (Tabela 2), exceto para as sementes não escarificadas que foram expostas à radiação durante 30 segundos.

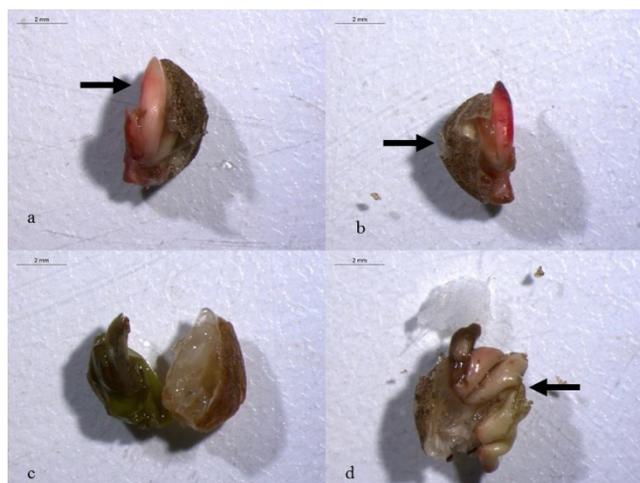


Figura 2. Sementes de *Ipomoea hederifolia*: teste de tetrazólio – sementes viáveis (a e b) e não viáveis (c e d). As setas destacam as partes das sementes: a – eixo embrionário; b – tegumento; d – um dos cotilédones.

Krzyzanowski et al. (1999) afirmaram que a escolha do método adequado para a realização do teste de tetrazólio deve basear-se na facilidade de diferenciação dos tecidos, em viáveis e não viáveis, e na possibilidade de diferenciar as sementes quanto à qualidade fisiológica. Assim os métodos utilizados nessa pesquisa para a hidratação das sementes de corda-de-violão, para posterior coloração das sementes, foram adequados, uma vez que houve possibilidade de diferenciar a qualidade das sementes dos lotes 1 e 2 e as características dos tecidos viáveis dos não viáveis (Figura 2).

Tabela 1. Resultados do teste de germinação (%) de sementes de *Ipomoea hederifolia*, lotes 1 e 2, sementes intactas e escarificadas (plântula normal (PN) e semente não germinada, SNG). Piracicaba, 2014.

Tratamentos	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	Germinação		SNG+PN	

Semente	43	49	91	89
escarificada				
Semente intacta	47	51	94	92
CV (%)	15,79		4,17	

Médias não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Viabilidade de sementes de *Ipomoea hederifolia*, lotes 1 e 2, avaliadas por meio do teste de tetrazólio - sementes intactas e escarificadas, hidratadas entre papel (EP) e por micro-ondas. Piracicaba, 2014.

Tratamentos	Viabilidade (%)	
	Lote 1	Lote 2
EP intacta	97,00 a	90,00 a
EP escarificada	93,00 a	85,00 ab
30 s micro-ondas intacta	81,00 ab	65,00 b
30 s micro-ondas escarificada	86,00 a	90,00 a
45 s micro-ondas intacta	83,00 ab	86,00 ab
45 s micro-ondas escarificada	84,00 ab	83,00 ab
60 s micro-ondas intacta	91,00 a	85,00 ab
60 s micro-ondas escarificada	80,00 b	88,00 a
CV (%)	13,03	7,25

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A utilização da radiação micro-ondas, para a hidratação das sementes de corda-de-violão para o teste de tetrazólio, foi adequada, pois possibilitou a avaliação da viabilidade das sementes e os resultados foram comparáveis aos das sementes hidratadas entre papel (Tabela 1), diferentemente do observado por Tran (1979) ao estudar esse tipo de radiação para as sementes de *Acacia*.

Entretanto, Santana (2013) trabalhou com sementes de *Gossypium hirsutum* e obteve resultados que possibilitaram a utilização da radiação micro-ondas para preparo dessas sementes para o teste de tetrazólio, evidenciando que há a possibilidade de utilização desse método para sementes de outras espécies.

Conclui-se que as sementes de corda-de-violão devem ter ao menos 13 % de água para serem preparadas para o teste de tetrazólio, pois com essa quantidade de água não há emissão da radícula. O preparo adequado para as sementes não escarificadas é a utilização da radiação micro-ondas por 45 segundos e o período de coloração de sementes é de uma hora e quinze minutos a 25°C. Após a coloração, deve-se remover o tegumento das sementes para a visualização do eixo embrionário e avaliação da viabilidade. Assim, o tempo de preparo de sementes de *I. hederifolia* para o teste de tetrazólio com raios micro-ondas foi diminuído de 3 a 4 horas quando comparado com o método entre papel.

4. Referências

- ANAND, A. et al. Microwave seed treatment reduces hardseededness in *Stylosanthes seabrana* and promotes redistribution of cellular water as studied by NMR relaxation measurements. *Seed Science and Technology*, v. 37, n. 1, p. 88-97, 2009.
- AZANIA, A. A. P. M. et al. Métodos de superação de dormência em sementes de *Ipomoea* e *Merremia*. *Planta Daninha*, v. 21, n. 2, p. 203-209, 2003.

- AZANIA, C. A. M. et al. Superação da dormência de sementes de corda-de-violão (Ipomoea quamoclit e I. hederifolia). *Planta Daninha*, v. 27, n. 01, p. 23-27, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília, DF: 2009. p.365
- CALOY, L. H. M et al. Teste De Tetrázólio Para Sementes De Guanxuma. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 7, n. 1, 2013.
- COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. *Principles of seed science and technology*. 3.ed. New York : Chapman & Hall, 1995. 409p.
- FRANDOLOSO, V.; TILLMANN, M. A.; BAUDET, L. Determinação do grau de umidade de sementes de cebola, cenoura e tomate em forno de microondas. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 20, n. 2, p. 48-57, 1998.
- GRABE, D.F. *Manual do teste de tetrázólio em sementes*. Brasília, DF: AGIPLAN, 1976. 85p.
- ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. The germination test. In: *International rules for seed testing*. Bassersdorf, 2006. 5, p. 5.1-5.46.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Convolvulaceae Juss. In: KISSMANN, K. G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. 2.ed. São Paulo: BASF Brasileira, 1999. p. 673-693.
- KRZYŻANOWSKI, F.; VIEIRA, R. D.; FRANCA NETO, J.B. (Eds.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina:ABRATES, 1999.
- OGUNWENMO, K.; UGBOROGHO, R. E. Effects of chemical and mechanical scarification on seed germination of five species of Ipomoea (Convolvulaceae). *Boletim da Sociedade Broteriana*, v. 69, p. 147-162, 1999.
- POPINIGIS, F. *Fisiologia da semente*. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.
- RAVI, R.; KALAISELVI, T.; TILAK, M. Effect of combined treatment of Microbial Consortia and Microwave Energy on Germination of *Melia dubia* seeds. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, v. 3, n. 9, p. 1-5, 2012.
- SANTANA, B. A. Preparo de sementes de algodoeiro para o teste de tetrázólio. Piracicaba, 2013. 64 p. *Dissertação* (Mestrado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.
- SMITH, M.T; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.) *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 1995. cap.26, p.701-746.
- TRAN, V. N. Effects of microwave energy on the strophiole, seed coat and germination of Acacia seeds. *Functional Plant Biology*, v. 6, n. 3, p. 277-287, 1979