

Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley - Bignoniaceae¹

Tetrazolium test in *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. and *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley seeds - Bignoniaceae

Luciana Magda de Oliveira² Maria Laene Moreira de Carvalho³ e
Marcela Carlota Nery⁴

RESUMO

A utilização do teste de tetrazólio é importante na avaliação da qualidade de lotes de sementes indicando seu vigor e viabilidade, suplementando resultados obtidos em testes de germinação e, na maioria dos casos, possibilitando o diagnóstico das causas de deterioração das sementes. O objetivo deste trabalho foi definir a metodologia mais adequada para a realização do teste de tetrazólio em sementes de *T. serratifolia* (ipê-amarelo) e *T. impetiginosa* (ipê-roxo). As sementes de ambas as espécies foram submetidas a embebição entre papéis umedecidos em água por 12 horas. Sementes de três lotes de ipê-amarelo foram pré-condicionadas com a retirada ou corte dos tegumentos e imersas em solução 0,5% de tetrazólio a 30°C por 12, 24 e 48 horas. Já as sementes de dois lotes de ipê-roxo tiveram seus tegumentos retirados e foram imersas em solução 0,07% e 0,1% de tetrazólio a 30°C por 12 horas. A embebição das sementes entre papel por 12 horas, seguida da retirada dos tegumentos e imersão em solução 0,5% de tetrazólio para o ipê-amarelo e 0,07% para o ipê-roxo, por 12 horas a 30°C foi eficiente na avaliação da viabilidade das sementes.

Termos para indexação: ipê-amarelo, ipê-roxo, viabilidade.

ABSTRACT

The use of the tetrazolium test is very important for the evaluation of seed lots quality and may indicate vigor and viability, while corroborating with results obtained in germination tests, and in many cases, enabling diagnosis of seed deterioration. The objective of this research was to verify the appropriate methodology of the tetrazolium test in seeds of *T. serratifolia* (yellow ipê) and *T. impetiginosa* (purple ipê). Seeds of either species were submitted to imbibitions in a paper moistened with water for 12 hours. Seeds of three lots of yellow ipê were pre-conditioned, the seed coat removed or cut of, and immersed in 0.5% tetrazolium solution at 30°C for 12, 24 and 48 hours. Upon removal of seed coats, seeds of two lots of purple ipê were soaked in 0.07% or 0.1% tetrazolium solution at 30°C for 12 hours. Imbibitions of seeds in paper for 12 hours followed by removal of the seed coat and by soaking in tetrazolium solution, 0.5% for yellow ipê and 0.07% for purple ipê, at 30°C for 12 hours, proved to be satisfactory for the evaluation of seed viability.

Index terms: yellow ipê, purple ipê, viability.

¹ Recebido para publicação em: 01/06/2004.

Aprovado em: 06/01/2005.

Parte da tese de doutorado apresentada pelo primeiro autor à UFLA, MG

² Eng. Florestal, D.Sc., UFLA, MG, lumagda@ufla.br

³ Eng. Agrônomo, D. Sc., Profa. do Dep. de Agricultura, UFLA, MG, mlaenemc@ufla.br

⁴ Eng. Agrônomo, Mestranda do Dep. de Agricultura, UFLA, MG, marcelacarlot@bol.com.br

Introdução

As espécies do gênero *Tabebuia* são propagadas sexualmente e a utilização de sementes de alta qualidade é fundamental para a obtenção de sucesso nos diversos programas florestais em que são requeridas e na restauração de áreas degradadas pelas atividades madeireiras e medicinais.

O teste de tetrazólio tem sido utilizado para avaliar a qualidade de sementes, permitindo a obtenção rápida de resultados de viabilidade e vigor, o que possibilita a tomada de decisões referentes aos lotes. Além disso, o teste de tetrazólio suplementa testes de germinação e diagnostica causas de deterioração das sementes (Bittencourt, 1995).

Conforme Rodrigues e Santos (1988), o teste de tetrazólio apresenta excelentes condições para ser utilizado rotineiramente em espécies perenes, como as florestais e frutíferas, uma vez que muitas dessas espécies necessitam de um longo período para germinarem. Pesquisas têm sido desenvolvidas, procurando abreviar o prazo requerido para a obtenção dos resultados de viabilidade e vigor, a partir da padronização do teste de tetrazólio para cada espécie (Nascimento e Carvalho, 1998), como nos trabalhos realizados para *Acacia nilotica* (Gera et al., 1998), *Albizia procera* (Purohit e Bisht, 1999) e *Delonix regia* (Backes et al., 2003).

A metodologia para a realização do teste de tetrazólio em sementes de *T. serratifolia* (ipê-amarelo) e *T. impetiginosa* (ipê-roxo) ainda não foi estabelecida. Desta forma, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de definir a metodologia mais adequada para a realização do teste de tetrazólio em sementes de ipê-amarelo e ipê-roxo.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram utilizados três lotes de sementes de ipê-amarelo, obtidos em Minas Gerais, sendo dois recém-colhidos: 2000Lavras - proveniente de Lavras, no ano de 2000 e 2000BH – colhido em Belo Horizonte; e um lote armazenado por dois anos: 1998 RV - proveniente de Ribeirão Vermelho, e colhido em 1998. Para o ipê-roxo foram utilizados dois lotes de sementes provenientes de Lavras, dos anos 2001 (lote recém-colhido) e 2000 (armazenado por um

ano). As sementes de todos os lotes foram colhidas em diversas matrizes, no início do processo de deiscência dos frutos, beneficiadas manualmente e mantidas em galpão para secagem natural por cinco dias, visto que a umidade das sementes estava em torno de 40% por ocasião da colheita. Os lotes foram armazenados em sacos de polietileno, em câmara com controle de temperatura e umidade (6-9°C; 70% UR). As sementes foram mantidas por 24 horas em condições ambientais antes da realização dos experimentos.

A umidade das sementes foi determinada pelo método de estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas (Brasil, 1992), com quatro repetições de um grama de sementes por lote.

Para efeito de comparação com os resultados do teste de tetrazólio, foram realizados testes de germinação em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de 20 sementes para cada lote. Inicialmente as sementes foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 2%, por dois minutos e, posteriormente, submetidas ao teste de germinação em substrato sobre areia, a 30°C , sob luz constante (Oliveira, 2004). Foram feitas avaliações aos 14 dias, primeira contagem e aos 28 dias após a semeadura, contagem final (Machado, 1999).

Para o teste de tetrazólio, inicialmente foram realizados pré-testes com o intuito de selecionar, por análise visual, as condições mais favoráveis para a coloração das sementes de ipê-amarelo e ipê-roxo. Foram testadas concentrações de 0,05%; 0,07%; 0,1%; 0,5% e 1% da solução de tetrazólio, tempos de 6; 12; 18; 24 e 48 horas e temperaturas de 25°C , 30°C e 35°C .

Nas sementes de ipê-amarelo, a concentração de 0,5% da solução de tetrazólio e temperatura de 30°C permitiram uma coloração mais nítida das suas estruturas, o que facilitou a avaliação do teste. Nas sementes de ipê-roxo, as concentrações 0,07% e 0,1% da solução de tetrazólio a 30°C possibilitaram a análise visual mais acurada das estruturas.

Ipê-amarelo

Para a realização dos experimentos referentes ao pré-condicionamento, as sementes de ipê-amarelo foram submetidas à embebição entre papéis umedecidos com água, por 12 horas, a 30°C . Após este período, foram realizados os seguintes tratamentos: retirada do tegumento (sem-tegumento), corte nas laterais do tegumento (corte-tegumento) e sementes com tegumento intacto (com-tegumento). Em

seguida, as sementes/embriões submetidas aos pré-condicionamentos foram colocadas em copos plásticos, sendo totalmente submersas em 0,5% da solução de tetrazólio (pH 6,5) e mantidas no escuro em incubadora BOD a 30°C, por 12, 24 e 48 horas, para os tratamentos sem-tegumento, corte-tegumento e com-tegumento, respectivamente. Foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento e lote, em delineamento inteiramente casualizado.

Ipê-roxo

O pré condicionamento das sementes de ipê-roxo foi realizado pela embebição das sementes entre papéis umedecidos com água, por 12 horas. Em seguida, o tegumento foi retirado e os embriões foram colocados em copos plásticos, sendo totalmente submersos em 0,07% e 0,1% da solução de tetrazólio (pH 6,5) e mantidos no escuro, em incubadora BOD, a 30°C, por 12 horas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento e lote.

Em ambas as espécies, para facilitar a análise, as sementes/embriões submetidas ao teste de tetrazólio foram cortadas no sentido longitudinal. De acordo com a coloração dos tecidos, extensão dos danos, aspecto dos tecidos e, sobretudo, pela localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento, as sementes/embriões foram classificadas em viáveis ou inviáveis.

Os dados obtidos nos testes de germinação e tetrazólio foram transformados utilizando $\arcsin \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa SANEST (Zonta et al., 1985).

Resultados e Discussão

Na avaliação do teste de tetrazólio de sementes de ipê-amarelo e ipê-roxo foram encontradas três categorias de sementes viáveis e três de sementes inviáveis (Figura 1). Vale salientar que algumas sementes mantiveram seus cotilédones unidos durante a coloração, o que impediu a penetração da solução (Figura 1 - categoria C); sendo sua classificação, como viável ou inviável, obtida avaliando-se a turgência dos tecidos e a parte externa das sementes.

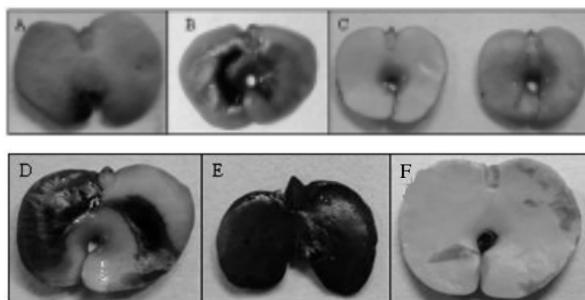


Figura 1- Categorias de sementes encontradas no teste de tetrazólio em lotes de sementes de ipê-amarelo (*T. serratifolia*) e ipê-roxo (*T. impetiginosa*). Viáveis: A - embrião com coloração rosa ou mais escura e tecidos com aspecto normal e firme; B - menos de 50% dos cotilédones descoloridos ou com coloração preta, não afetando a região de ligação com o eixo embrionário. Demais regiões com coloração rosa ou mais escura e tecidos firmes (eixo intacto); C - região externa do embrião com coloração rosa. Região interna com bordas de coloração rosa e centro descolorido, provavelmente devido à falta de penetração da solução de tetrazólio. Inviáveis: D - mais de 50% dos cotilédones descoloridos ou com coloração preta, afetando ou não a região de ligação com o eixo embrionário; E - embrião com coloração preta e F - embrião completamente descolorido.

No momento da interpretação do teste, observou-se que a região submetida ao corte estava descolorida ou com coloração vermelho-intenso; porém, estes danos afetaram pequena parte dos embriões de ipê-amarelo, não prejudicando a interpretação dos resultados. Danos causados no momento da realização do pré-condicionamento devem ser atentamente observados, pois, segundo Zucareli et al. (2001), a dificuldade na diferenciação dos danos originais da semente e os causados pela realização de cortes podem resultar em erros de interpretação pelo analista. Esse tipo de dano foi observado também em sementes de *Hevea brasiliensis* (seringueira) (Wetzel et al., 1992), *Peltophorum dubium* (canafístula) (Oliveira, 2000) e *Albizia hasslerii* (farinha-seca) (Zucareli et al., 2001).

Ipê-amarelo

As sementes dos lotes de ipê-amarelo 1998RV, 2000Lavras e 2000BH estavam com 9,3; 7,1 e 7,3% de umidade, respectivamente, por ocasião da realização dos testes. A baixa umidade observada nessas sementes, em equilíbrio com o meio ambiente, é característica de sementes oleaginosas, como do ipê-amarelo (Freitas et al., 1979).

Entre os métodos de pré-condicionamento utilizados, somente os resultados do método sem tegumento não diferiram estatisticamente dos resultados obtidos no teste de germinação para os lotes 1998RV e 2000Lavras. Além disso, a utilização desse método possibilitou a diferenciação dos lotes conforme o teste de germinação, tendo o lote 2000Lavras demonstrado qualidade superior em relação aos demais (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados médios (em porcentagem) do teste de germinação e sementes viáveis no teste de tetrazólio em ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* Vahl Nich.), para os diferentes tratamentos e lotes estudados.

Tratamentos	Lotes		
	1998RV	2000LAVRAS	2000BH
Germinação	54 A b	90 A a	55 AB b
Sem tegumentos	48 A c	88 A a	66 A b
Corte tegumentos	22 B b	55 B a	44 B a
Com tegumentos	30 B b	52 B a	51 AB a

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

O pré-condicionamento visa principalmente a facilitar a penetração da solução de tetrazólio através dos tegumentos, sendo que, para algumas espécies, apenas cortes ou punções não são suficientes para essa penetração, necessitando da sua total retirada, o que pôde ser observado para sementes de ipê-amarelo. Resultados semelhantes foram obtidos por Zucareli et al. (1999) em sementes de sucará (*Gledistchia amorphoides*), que atribuíram a desuniformidade ou a ausência de coloração à presença dos tegumentos.

Tanto para sementes de ipê-amarelo como de ipê-roxo, a retirada dos tegumentos, além de facilitar a penetração da solução de tetrazólio nos tecidos, permitiu a total imersão dos embriões, possibilitando uma coloração mais uniforme, pois a presença das asas faz com que as sementes permaneçam na superfície da solução.

Ipê-roxo

Os lotes 2000 e 2001 de sementes de ipê-roxo estavam com 7,5% e 8% de umidade, respectivamente, por ocasião da realização dos testes de germinação e tetrazólio.

Para o lote 2001, os resultados (87 e 82%) das duas concentrações da solução de tetrazólio não diferiram estatisticamente daqueles obtidos no teste

de germinação (80%). Enquanto que, para o lote 2000, apenas os resultados obtidos na concentração de 0,07% da solução de tetrazólio (75%) foram estatisticamente iguais aos obtidos no teste de germinação (60%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados médios (em porcentagem) do teste de germinação e sementes viáveis no teste de tetrazólio em ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* Martius Ex. A. P. de Candolle Standley.), para as diferentes concentrações.

Tratamentos	Lotes	
	2000	2001
0,1%	84 A a	87 A a
0,07%	75 AB b	82 A a
Germinação	60 B b	80 A a

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si a 5% de probabilidade.

Os resultados dos testes de tetrazólio e germinação geralmente coincidem, porém, esses resultados podem apresentar discrepâncias consideráveis, isto porque, no teste de tetrazólio, somente o embrião é avaliado, não considerando a influência das estruturas externas das sementes nos resultados do teste de germinação, devido a possíveis infestações com patógenos no lote. Dessa forma, nem todas as anormalidades encontradas nas plântulas podem ser observadas nos embriões e, como consequência, o teste de tetrazólio pode apresentar resultados maiores (CATIE, 2000).

A concentração de 0,07% possibilitou ainda a diferenciação dos lotes de ipê-roxo, correspondendo aos resultados obtidos no teste de germinação (Tabela 2). A escolha da metodologia adequada para o emprego do teste de tetrazólio deve basear-se na facilidade para a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis e na capacidade de diferenciar lotes de qualidades fisiológicas distintas (Oliveira, 2000). Além disso, a concentração 0,07% permitiu uma coloração mais nítida dos embriões, facilitando a análise visual.

Marcos Filho et al. (1987) salientam que várias concentrações da solução de tetrazólio podem ser utilizadas na condução do teste, dependendo da espécie avaliada, do método de preparo das sementes e da permeabilidade do tegumento, sendo que, para sementes de espécies florestais, essas concentrações variam de 0,05% a 1%. Entretanto, as menores concentrações são mais indicadas por apresentarem menor custo com o sal e por possibilitarem melhor visualização dos distúrbios de coloração e

identificação de diferentes tipos de injúrias (França Neto et al., 1998).

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 Piana et al. (1992), a rapidez na avaliação proporciona vantagens, como a possibilidade de descarte de lotes com qualidade inadequada. Para sementes de ipê-roxo e ipê-amarelo, o teste de germinação teve duração de 28 dias, enquanto que os resultados do teste de tetrazólio foram obtidos em apenas um dia.

Dessa maneira, o teste de tetrazólio utilizando a concentração de 0,07% pode ser usado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de ipê-roxo.

Conclusão

A embebição das sementes entre papel por 12 horas, seguida da retirada dos tegumentos e imersão em solução 0,5% de tetrazólio para o ipê-amarelo e 0,07% para o ipê-roxo, por mais 12 horas, a 30°C são metodologias eficientes na avaliação da viabilidade das sementes.

Referências Bibliográficas

- BACKES, C.; KROHN, N. G.; MISSIO, V. C.; CASTILHO, R. M. M.; SÁ, M. E. Desenvolvimento do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de *Delonix regia*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 13., 2003, Gramado. **Anais...** Gramado, 2003. v. 13, n. 3, p. 75.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD, DNDV, CLAV, 1992. 365 p.
- BITTENCOURT, S. R. M. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de amendoim através do teste de tetrazólio**. 1995. 111 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP.
- CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA – CATIE. **Proyecto de Semillas Forestales. Laboratorio para analizar de 2000 a 5000 muestras de semillas**. Turrialba – Costa Rica: CATIE, Danida Forest Seed Centre, 2000. 99 p. (Serie Técnica, Manual Técnico, 37).
- FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72 p.
- FREITAS, S. C.; CANDIDO, J. F.; CONDE, A. R.; HARA, T. Determinação de equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols armazenadas em diferentes umidades relativas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 3, n. 2, p. 135-144, 1979.
- GERA, N.; GERA, M.; PUROHIT, M. Tetrazolium test for the seeds of *Acacia nilotica* Willd. Ex Del. **Indian Forester**, Dehra Dun, v. 124, n. 12, p. 1039-1042, 1998.
- MACHADO, C. F. **Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson – Bignoniaceae)**. 1999. 19 f. Monografia. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. da. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230 p.
- NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, N. M. Determinação da viabilidade de sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.) através do teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 470-474, 1998.
- OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) pelos testes de germinação, tetrazólio e raios-X**. 2000. 111 f. Dissertação (Mestrado em Produção Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente**. 2004. 160 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia – Sementes). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- PIANA, Z.; TILLMANN, M. A. A.; SILVA, W. R. da. Avaliação da qualidade de sementes através de testes rápidos. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 37-46, 1992.
- PUROHIT, M.; BISHT, S. Use of TTC for interpretation of viability of seeds of *Albizia procera* (Roxb.) Benth. **Indian Forester**, Dehra Dun, v. 125, n. 8, p. 828-834, 1999.

RODRIGUES, F. C. M. P.; SANTOS, N. R. F. Teste de tetrazólio. In: RODRIGUES, F. C. M. P. **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 100 p.

WETZEL, M. M. S.; CÍCERO, S. M.; FERREIRA, B. C. S. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de seringueira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 83-88, 1992.

ZONTA, E. F.; MACHADO, A. A.; SILVEIRA JUNIOR, P. Sistema de análise estatística (SANEST) para microcomputador (versão 1.0). In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 1985, Piracicaba. p. 74-90.

ZUCARELI, C.; MALAVASI, M. M.; FOGAÇA, C. A.; CONTIERO, R. L. Preparação e coloração de sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. – Leguminosae (Caesalpinaceae) para avaliação da viabilidade através do teste de tetrazólio. **Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq**, Cascavel, v. 3, p. 63-64, 1999.

ZUCARELI, C.; MALAVASI, M. M.; FOGAÇA, C. A.; MALAVASI, U. C. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 186-191, 2001.