

Metodologia Alternativa para o Teste de Tetrazólio em Sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

Luciana Magda de Oliveira¹, Juliano Pereira Gomes¹, Gabriely Köerich Souza²,
Marcos Felipe Nicoletti¹, Taynara Oliveira de Liz¹, Tiago Georg Pikart¹

¹Departamento de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages/SC, Brasil

²Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa/MG, Brasil

RESUMO

Objetivou-se, com este trabalho, verificar a possibilidade do uso de metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia*. Sementes de três lotes foram submetidas à imersão em água por 18 horas e tiveram seus tegumentos e tecido nutritivo removidos ou não. Os embriões foram imersos em diferentes concentrações – 1,0%, 0,5% e 0,1% de solução – a 25°C, por uma hora, além de ser utilizada metodologia já descrita para a espécie. Para comparação dos resultados, foi realizado teste de germinação. É possível utilizar a metodologia alternativa, por meio da imersão das sementes em água por 18 horas, seguida da remoção do tegumento e do megagametófito, e da imersão em solução de tetrazólio 0,1% ou 0,5% a 25°C por uma hora, para a avaliação da qualidade das sementes de *A. angustifolia*.

Palavras-chave: pinheiro-do-paraná, qualidade de sementes, viabilidade.

Alternative Methodology for the Tetrazolium Test in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze Seeds

ABSTRACT

The objective of this research was to verify the possible use of an alternative methodology for the tetrazolium test in *A. angustifolia* seeds. Seeds of three lots were submitted to immersion in water for 18 hours. The seeds had their coats and nutritive tissue removed and the embryos were soaked in 1.0%, 0.5% and 0.1% tetrazolium solution at 25 °C for one hour, applying the standard methodology described for the species. Germination tests were performed to verify the reliability of results through the tetrazolium test. Immersion in water for 18 hours followed by the removal of seed coat and nutritive tissue and immersion in tetrazolium solution at 0.1% or 0.5% at 25 °C for 1 hour was an efficient methodology to evaluate the seed viability of *A. angustifolia*.

Keywords: “pinheiro-do-paraná”, seed quality, viability.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista, também conhecida por Mata de Pinhais ou Floresta com Araucária, integra o domínio do Bioma Mata Atlântica, constituindo um ecossistema que contempla expressiva diversidade, possuindo muitas espécies endêmicas. Atualmente, os remanescentes desse ecossistema estão altamente fragmentados, apresentando cerca de 12% de sua extensão original (Ribeiro et al., 2009) e apenas 7% em Santa Catarina (Vibrans et al., 2011).

Dentre as espécies presentes na Floresta Ombrófila Mista, está a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, conhecida popularmente como pinheiro-do-paraná, e que caracteriza esta região fitogeográfica (IBGE, 2012). Em meio a seus potenciais, destaca-se a importância econômica da madeira, assim como da semente (pinhão), que é rica em reservas energéticas (amido), e também apresenta quantidade expressiva de proteínas, lipídios e fibras (Cordenunsi et al., 2004). Em função, principalmente, da exploração indiscriminada do seu recurso madeireiro, está presente na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2008), sendo fundamentais, portanto, estudos para a conservação da espécie.

Devido ao fato de a espécie ser propagada principalmente via sexuada e possuir sementes sensíveis à dessecação (Tompsett, 1984), são necessários estudos relacionados a tecnologia e produção de sementes. O teste de germinação é uma das técnicas mais utilizadas na avaliação da qualidade fisiológica de sementes; entretanto, o tempo de finalização do teste para sementes de *A. angustifolia* pode chegar a 35 dias ou mais, o que, muitas vezes, inviabiliza sua utilização em razão da demora para obtenção dos resultados finais (Panza et al., 2002). Neste sentido, a utilização de métodos rápidos e eficientes, como o teste de tetrazólio, tem sido uma opção na análise da qualidade de sementes, principalmente para aquelas com germinação lenta e/ou recalcitrantes.

O teste de tetrazólio estima a viabilidade das sementes com base na alteração da coloração dos tecidos vivos, o que representa a atividade enzimática, quando imersos em uma solução de

cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Marcos Filho, 2005). A formação de um vermelho carmim claro indica que o tecido é viável; já um vermelho carmim intenso representa que o tecido está deteriorado (Roversi & Theisen, 2005). A metodologia do teste de tetrazólio deve ser padronizada para sementes de cada espécie, devido, principalmente, às diferenças na morfologia e na composição química das sementes. O teste tem sido utilizado com sucesso na análise da qualidade de sementes de espécies florestais, como *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs (Santos et al., 2006), *Ocotea porosa* Nees ex. Martius (Kalil Filho et al., 2008), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart. (Ribeiro et al., 2010), *Ceiba speciosa* (A. St. - Hil.) (Lazarotto et al., 2011), *Piptadenia moniliformis* Benth (Azeredo et al., 2011) e *Copaifera langsdorffii* Desf (Fogaça et al., 2011).

Para sementes de *A. angustifolia*, as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) preconizam um período de 18 horas para o pré-condicionamento das sementes e de 18 a 25 horas de imersão na solução de tetrazólio, totalizando em torno de 40 horas para o início da avaliação do teste. Entretanto, devido à necessidade de análise rápida da qualidade das sementes, esse período pode ser considerado relativamente longo.

Metodologias alternativas para realização do teste de tetrazólio têm sido propostas para sementes de espécies, como amendoim (Carvalho et al., 2009) e algodão (Cervi & Mendonça, 2009), com o objetivo, principalmente, de redução do período de execução.

Objetivou-se, com este trabalho, verificar a possibilidade do uso de metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de *A. angustifolia*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As pinhas (ginostróbilo) de *Araucaria angustifolia* foram coletadas em 2009, nos municípios Urubici (lote 1), Urupema (lote 2) e Correia Pinto (lote 3), Santa Catarina, de oito árvores matrizes em cada procedência, perfazendo três lotes de sementes. O município de Correia Pinto está localizado a uma altitude de 852 m, possuindo clima do tipo "Cfb" (Mesotérmico úmido), de acordo com a classificação de Köppen, com verão fresco e temperatura média de 16°C. Já os municípios de Urubici e Urupema

localizam-se a uma altitude média de 922 m e 1332 m, respectivamente, com clima do tipo “Cfb” (Mesotérmico úmido), sendo considerados os locais que apresentam as menores temperaturas médias anuais no Estado (12 a 14°C), além de com ocorrência de neve, anualmente.

Após a colheita, foram realizados a extração manual e o beneficiamento das sementes, por meio da retirada de escamas não fertilizadas e escamas estéreis. Em seguida, as sementes foram submetidas aos testes de tetrazólio e germinação.

Além desses testes, foi determinado o teor de água das sementes, por meio do método de estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas (Brasil, 2009), com duas repetições de três sementes cortadas transversalmente, por lote.

O teste de germinação, realizado para efeito de comparação com os resultados do teste de tetrazólio, foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes para cada lote, totalizando 100 sementes por lote, em bandejas com substrato areia autoclavada, a 120°C por 20 minutos, e umedecida com água destilada a 60% da capacidade de campo, a 25°C sob luz constante, em germinadores tipo B.O.D. A avaliação da porcentagem de germinação, realizada segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), foi realizada aos 35 dias após a semeadura.

Em razão do fato de ter sido observada predação durante a realização dos testes de tetrazólio e germinação, foi avaliada a porcentagem de sementes predadas. Para isso, 100 sementes por lote foram analisadas, visualmente, após imersão em água por 24 horas.

Para o teste de tetrazólio, as sementes dos três lotes foram embebidas em água, durante 18 horas

(Brasil, 2009), para ativar o metabolismo; em seguida, tiveram seus tegumentos retirados e o tecido nutritivo (megagametófito) separado do embrião, com auxílio de estilete. Os embriões foram imersos em soluções de tetrazólio em concentrações de 1%, 0,5% e 0,1%, e mantidos no escuro, a 25°C , durante uma hora, de acordo com pré-testes. A metodologia do teste de tetrazólio prescrita pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009) também foi utilizada nas sementes dos três lotes, que consiste na embebição das sementes por 18 horas, remoção do tegumento e cortes nas partes lateral e terminal, seguida da imersão em solução de tetrazólio a 1,0%, por 18 horas, a 30°C (metodologia padrão). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes para cada lote/tratamento.

Para a análise do teste de tetrazólio, as sementes/embriões foram classificados em viáveis ou inviáveis, de acordo com a coloração e o aspecto dos tecidos, a extensão dos danos, e pela localização destas colorações em relação às áreas essenciais ao crescimento (Tabela 1), de acordo com Medeiros & Abreu (2007) e Brasil (2009).

Os dados obtidos nos testes de germinação e tetrazólio foram transformados ($\arcsin \sqrt{x/100}$), após realização de teste de normalidade Shapiro Wilk, e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água das sementes dos três lotes de *A. angustifolia* foi de, aproximadamente, 48%, o que é característico de sementes recalcitrantes. Segundo

Tabela 1. Categorias de sementes/embriões de *Araucaria angustifolia* obtidas por meio do teste de tetrazólio.

Table 1. Categories of *Araucaria angustifolia* seeds/embryos obtained by the tetrazolium test.

VIÁVEIS
<ul style="list-style-type: none"> embrião com coloração rosa e tecidos com aspecto normal e firme; menos de 50% dos cotilédones descoloridos ou com coloração vermelho intensa, não afetando a região de ligação com o eixo embrionário. Demais regiões com coloração rosa e tecidos firmes.
INVIÁVEIS
<ul style="list-style-type: none"> mais de 50% dos cotilédones descoloridos ou com coloração vermelho intensa, afetando ou não a região de ligação com o eixo embrionário; embrião completamente descolorido ou com coloração vermelho intensa.

Fonte: Adaptado de Medeiros & Abreu (2007) e Brasil (2009).

Eira et al. (1994), o nível crítico de umidade das sementes dessa espécie – abaixo do qual há perda total de viabilidade – é próximo de 38%.

Durante a análise dos embriões submetidos ao teste de tetrazólio, foi observado que a maioria (mais de 40%) daqueles que foram imersos na solução sem a separação do megagametófito (metodologia padrão) estava com regiões descoloridas, o que acarretou em dúvidas se essas regiões eram áreas inviáveis ou se a presença do tecido nutritivo dificultou a difusão da solução de tetrazólio. Entretanto, foi verificado, após análise estatística dos dados, que a presença do tecido nutritivo subestimou os resultados da qualidade dos lotes, em comparação com os obtidos no teste de germinação (Tabela 2).

O preparo das sementes, antes da imersão na solução de tetrazólio, é fundamental na obtenção de colorações adequadas, visando, principalmente, a facilitar a penetração da solução de tetrazólio. Para algumas espécies, apenas cortes ou punções não são suficientes para essa penetração, necessitando da total retirada das estruturas que circundam o embrião (Oliveira et al., 2005). A dificuldade de análise em razão da presença de estruturas circundantes ao embrião foi observada também em algumas espécies de angiospermas, como em sementes de *Handroanthus serratifolius* e *H. impetiginosus* (Oliveira et al., 2005), e *Amburana cearensis* (Guedes et al., 2010).

Ressalta-se que a retirada do tecido nutritivo deve ser realizada de maneira cuidadosa, para se evitarem danos ao embrião. Injúrias causadas no momento da realização do preparo devem ser atentamente

observadas, pois, segundo Zucareli et al. (2001), a dificuldade na diferenciação entre os danos originais do embrião e os causados pela realização de cortes podem resultar em erros de interpretação pelo analista.

Em relação às concentrações da solução de tetrazólio, para os embriões sem o tecido nutritivo, foi observado que, a 1%, houve uma coloração intensa (Figura 1B), o que dificultou a classificação em viável ou inviável, acarretando em resultados estatisticamente diferentes em relação aos de germinação. Enquanto que, para as concentrações 0,5% e 0,1%, não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados de viabilidade obtidas nos testes de tetrazólio e germinação, o que demonstra que a metodologia alternativa, com o uso dessas concentrações, pode ser utilizada na análise da qualidade das sementes dessa espécie (Tabela 2).

Metodologia alternativa do teste de tetrazólio também foi utilizada por Medeiros & Abreu (2007) para sementes de *A. angustifolia*; entretanto, com concentração da solução de 0,2%, sendo as sementes incubadas à temperatura de 40°C durante 4 horas, sem pré-condicionamento. 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 1,0%. Todavia, as menores concentrações são mais indicadas, por apresentarem menor custo com o sal e por possibilitarem melhor visualização dos

Tabela 2. Resultados do teste de germinação e de viabilidade determinada pelo teste de tetrazólio (TZ) em sementes de *Araucaria angustifolia*.

Table 2. Results of germination and viability determined by the tetrazolium test (TZ) in *Araucaria angustifolia* seeds.

TESTES (%)	LOTES		
	Correia Pinto	Urubici	Urupema
	----- % -----		
Germinação	79 a	69 a	59 a
Viabilidade TZ 1,0% (com tecido nutritivo)	42 b	35 b	27 b
Viabilidade TZ 1,0% (sem tecido nutritivo)	34 b	28 b	32 b
Viabilidade TZ 0,1%	64 a	82 a	69 a
Viabilidade TZ 0,5%	67 a	76 a	64 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

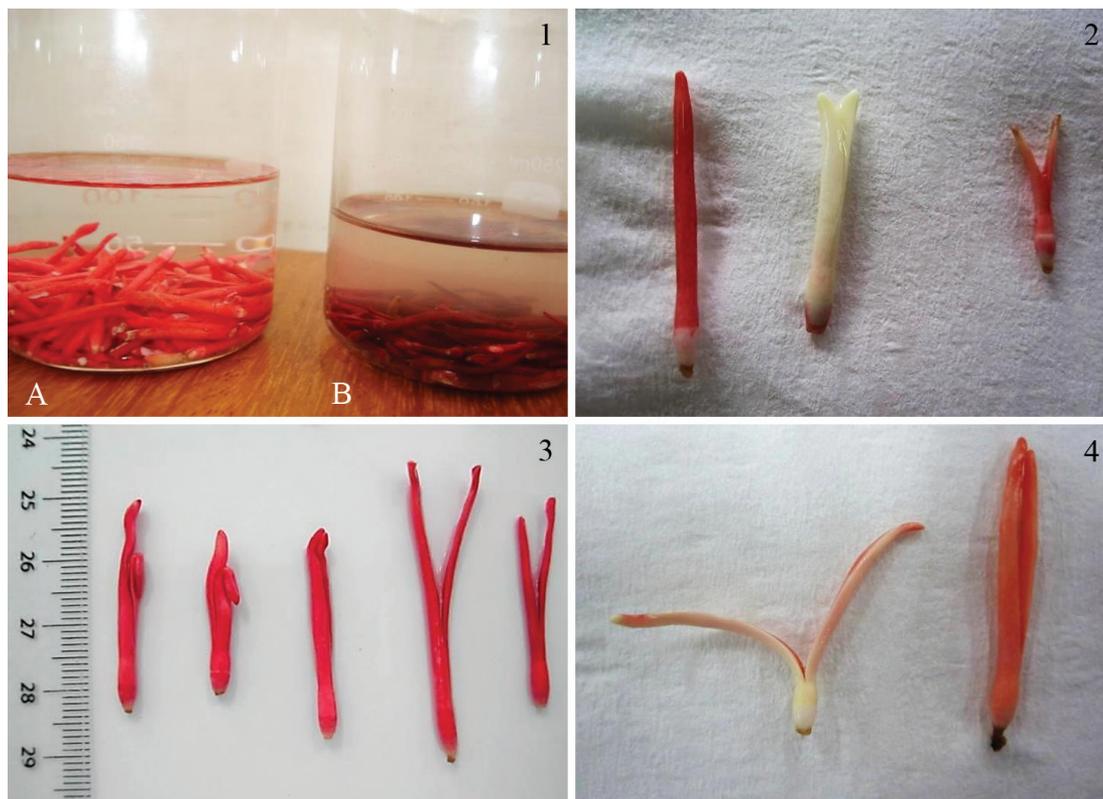


Figura 1. 1 - Embriões de *Araucaria angustifolia* coloridos com solução de 0,1% (A) e 1% (B) de tetrazólio; 2 - Diferenças de coloração dos embriões submetidos ao teste de tetrazólio; 3 - Embriões viáveis coloridos com solução de 0,1% de tetrazólio; 4 - Embriões inviáveis submetidos à solução de 0,1% de tetrazólio.

Figure 1. 1 - Embryos of *Araucaria angustifolia* stained with tetrazolium solution 0.1% (A) and 1% (B); 2- Differences in staining of embryos submitted with tetrazolium test; 3- Viable embryos stained with tetrazolium solution of 0.1%; 4 - Unviable embryos subjected to tetrazolium solution of 0.1%.

distúrbios de coloração e identificação de diferentes tipos de injúrias (França Neto et al., 1999). Nesse sentido, para sementes de *A. angustifolia*, a utilização da concentração de 0,1% da solução de tetrazólio, além de facilitar a análise dos tecidos viáveis e inviáveis, possibilita a redução de custos com o sal de tetrazólio, em comparação com a concentração de 0,5%.

Durante a condução dos experimentos, foi observada a presença de larvas de *Cydia araucariae* Pastrana (Lepidoptera: Tortricidae), conhecida popularmente como broca-do-pinhão. Considerada como a principal predadora de sementes de *Araucaria angustifolia* (Gallo et al., 2002), na forma jovem, se alimenta do tecido nutritivo do pinhão, danificando e inviabilizando o embrião, antes mesmo do processo de dispersão dos propágulos (Mecke, 2002).

Foram constatados 25% de predação no lote 1 e 22% no lote 2; enquanto que, no lote 3, não foram identificadas sementes predadas. O nível de dano parece estar relacionado ao local de coleta das sementes; além disso, segundo Crawley (2000), esse nível depende do ciclo de desenvolvimento do inseto, podendo variar entre anos e entre épocas de coleta.

4. CONCLUSÃO

A metodologia alternativa na avaliação da qualidade das sementes de *Araucaria angustifolia* pode ser conduzida por meio da imersão das sementes em água, por 18 horas, seguida da remoção do tegumento e do megagametófito, e imersão em solução de tetrazólio 0,1% ou 0,5%, a 25°C por uma hora.

STATUS DA SUBMISSÃO

Recebido: 29 out., 2013

Aceito: 17 jul., 2014

Publicado: 21 nov., 2014

AUTOR(ES) PARA CORRESPONDÊNCIA

Juliano Pereira Gomes

Departamento de Engenharia Florestal,
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC,
CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil
e-mail: julianopgomes@yahoo.com.br

REFERÊNCIAS

Azeredo GA, Paula RC, Valeri SV. Viabilidade de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. pelo teste de tetrázólio. *Revista Brasileira de Sementes* 2011; 33(1): 61-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222011000100007>

Brasil. Ministério do Meio Ambiente - MMA. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. *Diário Oficial da União*, Brasília; 2008.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Regras para análise de sementes*. Brasília; 2009. 395 p.

Carvalho NM, Silva JB, Silveira CM, Horvat RA. Método alternativo para submeter sementes de amendoim à solução de tetrázólio. *Revista Brasileira de Sementes* 2009; 31(1): 18-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000100002>

Cervi F, Mendonça EAF. Adequação do teste de tetrázólio para sementes de algodoeiro. *Revista Brasileira de Sementes* 2009; 31(1): 177-186. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000100020>

Cordenunsi BR, Menezes EW, Genovese MI, Colli C, Souza AGA, Lajolo FM. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52(11): 3412-3416. PMID:15161207. <http://dx.doi.org/10.1021/jf034814l>

Crawley MJ. Seed predation and plant population dynamics. In: Fenner M, editor. *The ecology of regeneration in plant communities*. New York: Cabi Publishing; 2000. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851994321.0167>

Eira MTS, Salomão NA, Cunha R, Carrara DK, Mello CMC. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. – Araucariaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 1994; 16(1): 71-75.

Fogaça CA, Krohn NG, Souza MA, Paula RC. Teste de tetrázólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. *Revista Floresta* 2011; 41(4): 895-904.

França Neto JB, Krzyzanowski FC, Costa NP. Metodologia do teste de tetrázólio em sementes de soja. In: Krzyzanowski FC, Vieira RD, França Neto JB, editores. *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES; 1999.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GCD, Berti Filho E et al. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ; 2002.

Guedes RS, Alves EU, Gonçalves EP, Viana JS, Silva KB, Gomes MSS. Metodologia para teste de tetrázólio em sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2010; 12 (1): 120-126. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000100017>

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. *Manual técnico de vegetação brasileira*. Rio de Janeiro; 2012. 271 p. Manuais Técnicos em Geociências n. 2.

Kalil Filho NA, Lopes AJ, Rêgo GM, Tomachitz A. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de imbuia pelo teste de tetrázólio. *Pesquisa Florestal Brasileira* 2008; (57): 69-72.

Lazarotto M, Piveta G, Muniz MFB, Reiniger LRS. Adequação do teste de tetrázólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. *Semina: Ciências Agrárias* 2011; 32(4): 1243-1250. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1243>

Marcos Filho J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ; 2005. 495 p.

Marcos Filho J, Cícero SM, Silva WR. *Avaliação da qualidade das sementes*. Piracicaba: FEALQ, 1987. 320 p.

Medeiros ACS, Abreu DCA. Desidratação ultra-rápida de embriões. *Pesquisa Florestal Brasileira* 2007; (54): 19-125.

Mecke R. Insetos do pinheiro brasileiro. Tübingen: Attempto Service GmbH; 2002. 79 p.

Oliveira LM, Carvalho MLM, Davide AC. Teste de tetrázólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprenkel) Taubert Leguminosae Caesalpinioideae. *Cerne* 2005; 11(2): 159-166.

Panza V, Lainez V, Maroder H, Prego I, Maldonado S. Storage reserves and cellular water in nature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2002; 140(3): 273-281. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1095-8339.2002.00093.x>

Ribeiro LM, Garcia QS, Oliveira DMT, Neves SC. Critérios para o teste de tetrázólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2010; 45(4): 361-368. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000400003>

Ribeiro MC, Metzger, JP, Martensen AC, Ponzoni, FJ, Hirota MM. The Brazilian Atlantic Forest: How much

- is left, and how is the remaining Forest distributed
Implications for conservation. *Biological Conservation* 2009; 142(6): 1141-1153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>
- Roversi T, Theisen G. Teste de tetrazólio. *Informativo Fundacep* 2005; 12(1): 1-2.
- Santos SRG, Paula RC, Fogaça CA, Môro FV, Costa RS. Viabilidade de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – Euphorbiaceae – pelo teste de tetrazólio. *Científica* 2006; 34(1): 39-45.
- Tompsett PB. Desiccation studies in relation to the storage Araucaria seed. *Annals of Applied Biology* 1984; 105(3): 581-586. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.1984.tb03085.x>
- Vibrans AC, Sevegnani L, Uhlmann A, Schorn LA, Sobral MG, Gasper AL et al. Structure of mixed ombrophylous Forests with *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) under external stress in Southern Brazil. *Revista de Biologia Tropical* 2011; 59(30): 1371-1387. PMID:22017139.
- Zucareli C, Malavasi MM, Fogaça CA, Malavasi UC. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr) para o teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes* 2001; 23(2): 186-191.