

ADEQUAÇÃO DO TESTE DE VIABILIDADE COM TETRAZÓLIO PARA SEMENTES DE ANDIROBA

Suzana Helen da Silva MEDEIROS¹
Isolde Dorothea Kossmann FERRAZ²
Semirian Campos AMOÊDO³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM; ²Orientadora CBIO/INPA; ³Co-orientara CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

Na região de Manaus são conhecidas duas espécies do gênero *Carapa*, *C. guianensis* Aubl. e *C. procera* D. C., que pertencem a família Meliaceae. Ambas possuem o mesmo nome popular, andiroba. São árvores de pequeno a grande porte, sendo dificilmente diferenciadas pela população, por apresentar características semelhantes na morfologia dos frutos, sementes, folhas, na casca do tronco, etc., podendo ocorrer em várzea ou em áreas alagadas ao longo de igapós e na terra firme. A madeira é umas das mais estudadas da região amazônica, sucedânea ao mogno, utilizada em fabricações de móveis, caixotaria fina, construção civil, entre outros. Atualmente o interesse econômico da andiroba tem crescido consideravelmente devido à exploração comercial do óleo extraído das sementes, para fins medicinais e cosméticos. Na região de Manaus essa prática é quase exclusivamente extrativista (Mendonça e Ferraz 2007).

As sementes de ambas as espécies são recalcitrantes e perdem a germinabilidade em poucos dias, quando secadas em ambiente natural (Ferraz *et al.* 2002). O período para a germinação das sementes com tegumento varia de 1 a 6 meses para *C. guianensis* e de 1 a 5 semanas para *C. procera*. Neste período, *C. guianensis* alcançou 30% de germinação enquanto *C. procera* apresentou 90% em estudos no viveiro. A germinação pode ser acelerada pela remoção do tegumento para ambas as espécies, reduzindo o tempo médio para 24 dias em *C. guianensis*, e 6 dias para *C. procera* (Ferraz *et al.* 2002). Entretanto, a retirada necessita habilidade especial além de ser demorada, pois é difícil separar o tegumento das sementes túrgidas e ferimentos dos embriões devem ser evitados. Desta forma, é desejável que outras ferramentas estejam disponíveis além do teste direto de germinação.

A solução incolor de tetrazólio (cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio), forma um composto insolúvel de coloração vermelho (formazan), pela reação com hidrogênio liberado na atividade de desidrogenases em tecidos com respiração celular. A coloração permite delimitar o tecido que respiram das que não apresentam atividade metabólica, mantendo estes descoloridos (Marcos Filho 2005). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi elaborar um protocolo para a coloração topográfica das sementes de andiroba com tetrazólio e validar a possibilidade do seu uso como teste indireto para determinar a viabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das sementes de andiroba foi realizada na Reserva Ducke, uma área de 10.000 ha de floresta de terra firme ao norte de Manaus, compreendida entre as coordenadas 59°52'40" e 59°52'00" de longitude Oeste e, entre 03°00'00" e 03°08'00" de latitude Sul que possui além da área preservada, vários plantios de andiroba instalados desde os anos de 1964 (Volpato *et al.* 1972). Para o transporte, as sementes foram colocadas em sacos plásticos e encaminhadas para o laboratório de sementes do INPA. No beneficiamento manual, as sementes infestadas com insetos e/ou deterioradas foram descartadas. Até o início do experimento as sementes foram armazenadas em sacos plásticos a 15 °C.

Após imersão das sementes em água destilada por 24 horas, as mesmas foram cortadas em quatro partes. Cada parte foi imersa imediatamente em uma das concentrações de tetrazólio testadas (0,05%; 0,10%; 0,25% e 0,5%) e o conjunto das quatro concentrações foi mantida a 25, 30 ou 35 °C. Durante um período de 6 horas as sementes foram avaliadas individualmente. Aplicando quatro níveis de coloração: sem cor, leve coloração rosa em toda a extensão da semente (coloração fraca); boa tonalidade de rosa (coloração adequada); coloração muito forte (excesso de cor) (Mendonça *et al.* 2001). A avaliação inicial se baseou na coloração da massa cotiledonar considerando o tamanho grande das sementes consistindo de cotilédones fundidos e um eixo embrionário minúsculo (Ferraz *et al.* 2002).

Na validação do protocolo foram utilizadas sementes com diferentes graus de germinabilidade. Baseado no conhecimento que as sementes de andiroba são recalcitrantes e perdem a germinabilidade com dessecação, os diferentes graus de germinabilidade foram atingidos pelo dessecação a diferentes teores de água pré-determinados (45%, 43%, 40%, 35%, 30% e 20%). Utilizando um ventilador mantido em temperatura ambiente de 25 °C. Baseado no peso inicial das amostras e no teor de água inicial das sementes foi calculado o peso correspondente ao teor de água desejado (Hong e Ellis 1996). A cada teor de água foram testadas 120 sementes, sendo 60 sementes destinadas ao teste de germinação e 60 sementes para a coloração com tetrazólio e a confirmação do teor de água das sementes, avaliadas em quatro repetições de 15 sementes, respectivamente.

Para o teste de germinação as sementes foram semeadas em bandejas plásticas (31 x 11 x 6 cm) contendo vermiculita umedecida como substrato, mantidas em sala com temperatura controlada a 25 °C. O acompanhamento foi diário, tendo como critério de germinação a protrusão da raiz primária (≥ 5 mm).

Para o teste de tetrazólio o tegumento foi retirado na região do eixo embrionário e sendo este cuidadosamente cortado com bisturi para exposição à solução de tetrazólio na concentração, na temperatura e no período de incubação no escuro, definidos no experimento anterior. Após a coloração, foi tomada uma imagem digital de todas as amostras para a avaliação posterior. Das mesmas sementes foi retirada uma amostra para a confirmação do teor de água, determinado pelo método estufa a 105 °C após atingir o peso da massa constante.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado de seis tratamentos com quatro repetições cada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes submetidas à solução de tetrazólio a 0,05%, por até seis horas, apresentaram intensidade razoável de coloração, porém, menos uniforme, comparativamente à solução de tetrazólio à 0,10%, por três a seis horas. A solução de tetrazólio a 0,25% também proporcionou coloração satisfatória em três horas à 30 °C e em duas horas a 35 °C, porém, promoveu coloração muito intensa em algumas sementes, dificultando a interpretação do teste; as sementes submetidas a 0,50% coloriram em menos de duas horas, porém, com intensidade elevada. Desta forma, foi estabelecida a concentração de 0,10% de tetrazólio e o período de incubação de três horas a 30 °C. O protocolo proposto difere das recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil 2009), onde são indicadas concentrações de 0,5 a 1,0% de tetrazólio e períodos de 6 a 24 horas de incubação de uma forma generalista. Entretanto França Neto (1999) mostrou resultados satisfatórios com concentrações de 0,10%. No caso das sementes de andiroba concentrações mais elevadas e maior tempo de exposição não mostraram bons resultados devido à saturação e heterogeneidade da coloração que não permitiu uma boa análise. A possibilidade de reduzir a concentração reduz também significativamente os custos do teste principalmente em sementes grandes como as de andiroba (5 a 11cm de diâmetro).

Na validação do teste de tetrazólio, as imagens das sementes foram agrupadas em cinco classes baseada na intensidade de coloração do eixo embrionário e do tecido cotiledonar e, destas, quatro classes foram consideradas como viáveis (Figura 1). Os resultados da aplicação desta classificação sobre as 360 sementes com diferentes teores de água estão ilustrados na Figura 2. Com teor de água inicial (43 a 45%) a viabilidade de ambas as espécies foi alta 86,7 % para *C. procera* (Figura 2 A) e 93,3% para *C. guianensis* (Figura 2 B). Com dessecação observou-se redução da viabilidade e abaixo de 30,0% de teor de água todas as sementes de *C. procera* tinham perdido a viabilidade e abaixo de 34,5% as de *C. guianensis*. Os resultados são similares aos estudos anteriores e correspondem à expectativa (Connor *et al.* 1998).

No segundo passo o teste de viabilidade deve ser comparado com a germinabilidade. Na Figura 2 foram indicadas as percentagens de germinação alcançadas após 10, 20 e 30 dias. Segundo Ferraz *et al.* (2002), o período para a germinação das sementes de andiroba com tegumento, como neste estudo, variou de 1 a 6 meses para *Carapa guianensis* e de 1 a 5 semanas para *Carapa procera*. Os resultados ainda não são conclusivos, pois os estudos de germinação continuam em observação.

Entretanto, já pode ser visto que em todos os teores de água indicados com sementes viáveis, foram observadas sementes germinadas e em nenhum dos teores de água indicados como letais houve germinação de sementes. Após 30 dias de observação há uma superestimação do teste de tetrazólio em comparação ao teste de germinação. Deve se lembrar que o tetrazólio colore os tecidos que respiram, ou seja, àqueles metabolicamente viáveis, já o teste de germinação avalia o funcionamento integral do embrião que resulta no alongamento do eixo embrionário e desenvolvimento da plântula. Desta forma, uma superestimação da viabilidade em relação à germinabilidade é esperada e comum. Neste experimento, ajustes na classificação da viabilidade das sementes de andiroba podem ser ainda feitas, quando o teste de germinação for concluído.

CONCLUSÃO

Foi possível adequar o teste de viabilidade para sementes de andiroba com possibilidade de avaliação após três horas, em comparação de 25 e 180 dias para o teste de germinação para *C. procera* e *C. guianensis*, respectivamente. Na validação do teste de tetrazólio com sementes de diferentes qualidades, os resultados dos testes germinação apóiam os da viabilidade, entretanto, não são conclusivos ainda, devido a germinação demorada que ainda está em observação.

Classe 1. Sementes viáveis: coloração uniforme rosa brilhante, principalmente no eixo embrionário, apresentando tecido com aspecto normal e firme.



Classe 2. Sementes viáveis: semelhante ao anterior, porém, com regiões descoloridas nos cotilédones. Redução na coloração na face interna do eixo embrionário.



Classe 3. Sementes viáveis: apresentam coloração branco leitoso em menos de 50% dos cotilédones, identificando tecido em deterioração, assim como, regiões amareladas próximo ao eixo embrionário.



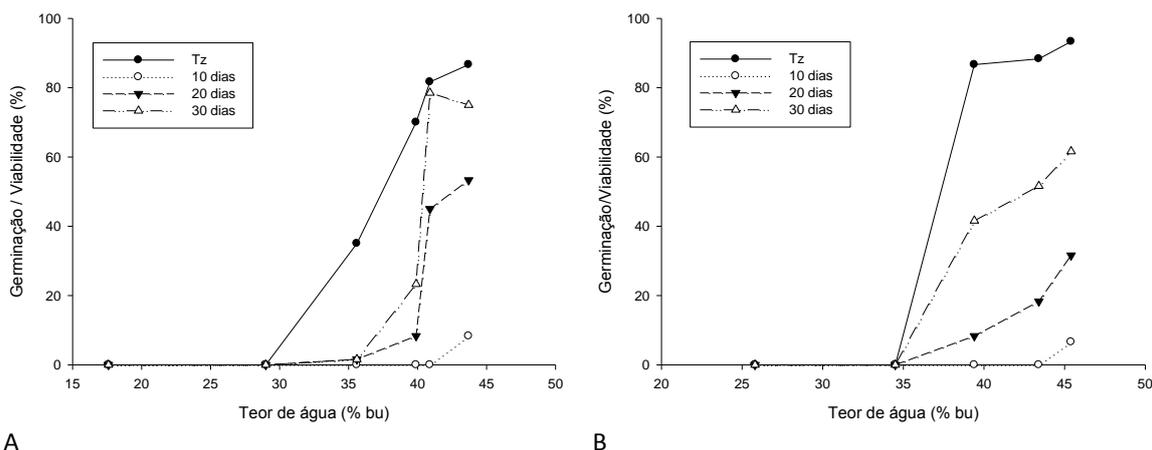
Classe 4. Sementes inviáveis: Eixo embrionário 70% branco leitoso e cotilédones com regiões em vermelho.



Classe 5. Sementes inviáveis: Eixo embrionário completamente branco leitoso e cotilédones amarelados.



Figura 1. Agrupamento das sementes de *C. guianensis* de acordo com os padrões de coloração em cinco classes de viabilidade indicando 3 exemplos para cada classe.



A B
Figura 2. Efeito do teor de água sobre a viabilidade determinada pelo teste de tetrazólio (Tz) em comparação dos resultados de germinação, 10, 20 e 30 dias após a semeadura das sementes de *C. procera* (A) e *C. guianensis* (B).

REFERÊNCIAS

- Brasil, 2009. *Regras para análise de sementes* / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ACS, Brasília, Brasil. 399 pp.
- Connor, K.F.; Ferraz, I.D.K.; Bonner, F.T.; Vozzo, J.A. 1998. Effects of desiccation on seeds of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa procera* D. C. *Seed Technology*, 20:71-82.
- Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P.T.B. 2002. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta Amazonica*, 32: 647-661.
- França Neto, J.B.; Kryzanowski, F.C.; Costa, N.P. 1998. O teste de tetrazólio em sementes de soja. *EMBRAPA CNPSo, Documentos 116*. Londrina. 72 pp.
- Hong, T.D.; Ellis, R.H. 1996. *A protocol to determine seed storage behavior*. International Plant Genetic Resources Institute, 162pp.
- Mendonça, A.P.; Ferraz, I.D.K. 2007. Óleo de andiroba: o processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 37: 353-364.
- Mendonça, E.A.F.; Ramos, N.P.; Paula, R.C. 2001. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, 23: 64-71.
- Volpato, E.; Schmidt, P.B.; Araujo, V.C. 1972. *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba). Estudos comparativos de tratamentos silviculturais. *Acta Amazonica*, 2:71-8.