

## Nota Científica

# Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de angico

Daniel Santos Pinho<sup>1</sup>, Eduardo Euclides de Lima e Borges<sup>2</sup>, Ana Paula Vilela Carvalho<sup>2</sup>, Viviana Borges Corte<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), SCEN, trecho 02, Ed. Sede do Ibama, CEP 70818-900, Brasília, DF, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa (UFV), Depto. Engenharia Florestal, Avenida P. H. Rolfs s/n - Campus UFV, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Depto. Ciências Biológicas, Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil

\*Autor correspondente:  
danielspinho@hotmail.com

**Termos para indexação:**  
Qualidade fisiológica  
Germinação  
*Anadenanthera peregrina*

**Index terms:**  
Physiological quality  
Germination  
*Anadenanthera peregrina*

**Histórico do artigo:**  
Recebido em 15 fev 2011  
Aprovado em 26 ago 2011  
Publicado em 30 set 2011

doi: 10.4336/2011.pfb.31.67.269

**Resumo** - Este trabalho teve por objetivo adequar a metodologia do teste em sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. As sementes foram pré-condicionadas por imersão em água destilada a 25 °C por 14 horas. O tegumento foi retirado e os embriões submersos em solução de tetrazólio (pH 6,5) nas concentrações de 0,1%; 0,05% e 0,01%, sendo mantidos no escuro a 25 °C por três e cinco horas e a 30 °C por 24 horas. Avaliaram-se a intensidade e localização da coloração, presença de áreas leitosas e aspecto dos tecidos. Os embriões foram classificados em nove classes de viabilidade. O melhor tratamento como substituto do teste padrão de germinação foi a concentração de 0,1% e a incubação a 30 °C por 24 horas. Sementes viáveis de *A. peregrina* foram classificadas nas classes 1, 2 e 3.

## Adjustment methodology of the tetrazolium test for viability evaluation of angico seeds

**Abstract** - The aim of this experiment was to evaluate the best concentration and the incubation time to test germination in seeds of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. The seeds were preconditioned at 25 °C for 14 hours immersed in distilled water. The coat were removed and the embryos submerged in tetrazolium solution (pH 6.5) solution in the concentrations of 0.1%; 0.05% and 0.01%, being kept in dark at 25 °C for three and five hours and at 30 °C for 24 hours. It was evaluate the intensity and localization of the coloration, presence of milky areas, tissues aspect. The embryos were classified in nine classes of viability. The best treatment as substitute of the germination test was the 0.1% tetrazolium incubated at 30 °C for 24 hours. Viable seeds of *A. peregrina* were classified in classes 1, 2 and 3.

O teste do tetrazólio tem por objetivo determinar rapidamente a viabilidade das sementes, particularmente daquelas que possuem germinação lenta ou que apresentam dormência (Brasil, 1992). O teste do tetrazólio tem assumido posição de destaque para a análise de algumas culturas, devido principalmente ao grande número de informações fornecidas (Krzyzanowski et al., 1999).

O teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, particularmente a desidrogenase do

ácido málico, que catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, ocorrendo a redução do sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT), formando o trifênilformazan e indicando viabilidade celular e do tecido (Krzyzanowski et al., 1999).

Segundo Krzyzanowski et al. (1999), o teste não é afetado por diversas condições que podem interferir no teste padrão de germinação, sendo necessários equipamentos simples e baratos para a sua realização. No entanto, requer treinamento especial para a correta interpretação dos resultados.

A metodologia do teste vem sendo aprimorada, principalmente para sementes de milho, algodão, feijão, amendoim e soja (Krzyzanowski et al., 1999). Para espécies florestais destaca-se a utilização do teste em sementes de *Mauritia flexuosa* (Spera et al., 2001), *Senna multijuga* e *Senna macranthera* (Ferreira et al., 2004), *Peltophorum dubium* (Oliveira et al., 2005), *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Schultz-Bip, *Eremanthus glomerulatus* Less e *Eremanthus Incanus* (Velten & Garcia, 2005) e *Tabebuia aurea* (Oliveira et al., 2006). Os tempos de pré-embebição e de incubação, a concentração da solução de tetrazólio e a avaliação adequada do teste são fundamentais para que se obtenham resultados confiáveis quanto à viabilidade e vigor (Oliveira et al., 2005).

Comumente conhecida como angico, angico-vermelho, angico-do-morro, angico branco, paricá, paricá de terra-firme, a *Anadenanthera peregrina* (L.) Speng. é pioneira, pertencente à família Leguminosae-Mimosoideae (Mimosaceae), e possui ampla distribuição geográfica (Lorenzi, 1998). A espécie ocorre em florestas estacionais nos estados do Paraná (Silva & Scarioti, 2004), Minas Gerais (Araújo et al., 2006), São Paulo (Ushizima et al., 2003) e Goiás (Silva & Scariot, 2003).

A época de maturação dos frutos e sementes de *A. peregrina* na região da Chapada dos Guimarães coincide com o final da estação seca, quando diversas espécies do cerrado estão com poucas folhas (Costa et al., 2003). Ainda segundo os autores, a espécie apresenta frutos secos, deiscentes, sem atrativos para os animais. São legumes achatados que se abrem apenas de um lado, expondo suas sementes que caem imediatamente após a deiscência dos frutos. As sementes são leves, achatadas, escuras, discóides, de formato orbicular. A morfologia das sementes permite que sejam dispersas por vento forte a curtas distâncias, porém, com maior frequência, estabelecendo-se junto à árvore matriz, ficando caracterizada para esta espécie a síndrome barocórica.

*A. peregrina* provê 90% de exudados consumidos por grupos de saguis da espécie *Callithrix flaviceps* (Primates, Callitrichidae) acompanhados na Reserva Biológica Caratinga, MG, sendo a sua fonte preferida de goma (Corrêa et al., 2000). Em função de seu potencial de atração da fauna, essa espécie e, em especial, por suas características de crescimento, é indicada para recuperação de áreas degradadas por mineração (Araújo et al., 2006).

Pela importância ecológica e econômica da espécie e pelas vantagens apresentadas pelo teste do tetrazólio, este trabalho teve como objetivo avaliar a melhor concentração da solução de tetrazólio e o tempo de incubação das sementes da referida espécie, assim como propor uma metodologia de análise e classes de viabilidade.

Foram utilizadas sementes de *A. peregrina* colhidas na região de Viçosa, MG, em setembro de 2005. As sementes foram armazenadas no Laboratório de Análise de Sementes Florestais (LASF) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em embalagem de papelão, em câmara fria a, aproximadamente, 5 °C e 60% de umidade relativa até a data do início dos trabalhos. O teor de água inicial das sementes foi determinado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas com quatro repetições de 25 sementes, de acordo com a metodologia de Brasil (1992).

Para o teste de tetrazólio, as sementes de *A. peregrina* foram pré-condicionadas por imersão em água destilada a 25 °C por 14 horas. Posteriormente, o tegumento das sementes foi retirado manualmente e os embriões colocados em recipientes plásticos e submersos em solução de tetrazólio (pH 6,5) nas concentrações de 0,1%, 0,05% e 0,01%, mantidos no escuro à temperatura de 25 °C, por três e cinco horas, e a 30 °C, por 24 horas, para coloração. Após estes períodos, os embriões foram lavados em água corrente e submersos em água até o momento da avaliação. Cada embrião foi cortado longitudinalmente avaliando-se a intensidade da coloração, presença de áreas leitosas, aspectos dos tecidos e localização da coloração em relação aos cotilédones e ao eixo embrionário. Os embriões foram classificados individualmente em categorias de viáveis e inviáveis de acordo com os padrões propostos por Grabe (1976), International Seed Testing Association (1993) e Moore (1972):

Categoria 1 (viável): embrião com coloração rosa com aspecto normal e firme;

Categoria 2 (viável): menos de 50% dos cotilédones descoloridos, não afetando a região de ligação com o eixo embrionário. Demais regiões com coloração rosa ou mais escura e tecidos firmes;

Categoria 3 (viável): menos de 50% dos cotilédones com coloração vermelho-intenso, não afetando a região de ligação com o eixo embrionário. Demais regiões com coloração rosa ou mais escura e tecidos firmes;

Categoria 4 (inviável): eixo embrionário com regiões descoloridas, afetando o cilindro central;

Categoria 5 (inviável): mais de 50% dos cotilédones descoloridos ou com coloração vermelho-intenso;

Categoria 6 (inviável): região dos cotilédones com coloração vermelho-intenso ou descolorida, afetando o eixo embrionário;

Categoria 7 (inviável): cotilédones descoloridos e eixo embrionário com coloração vermelho-intenso;

Categoria 8 (inviável): embrião com coloração vermelho-intenso e tecidos flácidos;

Categoria 9 (inviável): embrião completamente descolorido, com tecidos flácidos.

A obtenção de coloração uniforme e adequada para a interpretação segura e eficiente é um dos fatores para o sucesso do uso do teste em determinada espécie (Bhering et al., 2005). Os resultados do teste de tetrazólio foram comparados com os do teste de germinação.

Para o teste de germinação, as sementes foram imersas em solução de captan 0,5% por 60 segundos. Em seguida, foram colocadas para germinar em caixas tipo “gerbox” forradas com papel de filtro umedecido com água destilada até o ponto de saturação. Foram utilizadas 100 sementes, distribuídas em quatro repetições. O teste foi conduzido em temperatura constante de 25 °C e luz constante com quatro lâmpadas fluorescentes (20 W) em câmara de germinação. As avaliações foram feitas a cada 24 horas até o quinto dia, sendo consideradas germinadas as sementes com protrusão da radícula.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), realizando-se análise de variância (Anova). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância e 95% de probabilidade.

As sementes de *A. peregrina* apresentaram teor médio de água inicial de 9,95%. Para sementes de *A. colubrina*, estudadas por Garcia et al. (2004), o teor médio de água foi de 8,1%. Já para *Piptadenia viridiflora* os valores variaram entre 16,66% e 13,01% (Pessoa et al., 2010).

Foi observada diferença significativa entre os tratamentos aplicados e o teste de germinação, com exceção apenas da maior concentração de tetrazólio seguida por incubação mais longa (Tabela 1), indicando que este procedimento do teste de tetrazólio, na concentração de 0,1% seguida por incubação a 30 °C por 24 horas, pode ser utilizado para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *A. peregrina*, fornecendo resultados mais rápidos que o teste padrão de germinação. De acordo com Ferreira et al. (2004), os resultados dos testes de germinação e de tetrazólio devem ser próximos, com margem de 5% de diferença entre eles. Para

sementes de *Tabebuia aurea*, a concentração de 0,1% de tetrazólio e incubação a 28 °C por 24 horas gerou resultados similares aos encontrados na germinação em laboratório, com diferenças de viabilidade e germinação entre 2% e 12%, indicando que o teste é adequado para analisar a viabilidade das sementes (Oliveira et al., 2006). Em sementes de *Peltophorum dubium* foi recomendada a concentração de 0,1% de tetrazólio, com incubação das sementes por 150 minutos (Oliveira et al., 2005). Já para sementes de *Senna multijuga* e *S. macranthera*, a concentração ideal da solução de tetrazólio foi de 0,075% e incubação por cinco e sete horas, respectivamente (Ferreira et al., 2004).

**Tabela 1.** Resultados do teste de germinação (TG) e teste do tetrazólio em diversas concentrações e tempos (TZ) em sementes de *Anadenanthera peregrina*.

Testes	Germinação (%)	Sementes viáveis (%)
TG	80 A	-
TZ 0,1% / 24 h	-	79,90 A
TZ 0,1% / 5 h	-	72,50 B
TZ 0,1% / 3 h	-	64,70 C
TZ 0,05% / 5 h	-	70,59 BC
TZ 0,05% / 3 h	-	56,25 D
TZ 0,01% / 5 h	-	42,86 E
TZ 0,01% / 3 h	-	34,38 F

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As concentrações que diferiram significativamente do teste de germinação deve-se à pouca ou nenhuma coloração do eixo embrionário e dos cotilédones. Segundo Krzyzanowski et al. (1999), a escolha da concentração e do tempo de incubação das sementes no teste de tetrazólio deve se basear na facilidade de diferenciação das sementes viáveis e inviáveis.

Com base nas observações de intensidade da coloração, de profundidade, de localização e firmeza dos tecidos, estabeleceram-se nove classes de viabilidade. As classes foram adaptadas às apresentadas nos padrões propostos por Grabe (1976), International Seed Testing Association (1993) e Moore (1972). A viabilidade das sementes são representadas pelas classes 1, 2 e 3.

Não foi encontrada nenhuma semente com o eixo embrionário com regiões descoloridas, como proposto na categoria 4, sendo, portanto, retirada das classes propostas. Além disso, no presente trabalho, foi proposta uma nova classe (classe nove) em que as sementes

apresentaram os cotilédones com coloração vermelho intenso, com presença de fungos na região de ligação do eixo embrionário com os cotilédones.

A metodologia indicada como substituta do teste padrão de germinação para sementes de *A. peregrina* foi o uso da concentração de 0,1% incubado por 24 horas a 30 °C. Estabeleceram-se nove classes de viabilidade para as sementes de *A. peregrina* pelo teste do tetrazólio, sendo as sementes viáveis representadas pelas classes 1, 2 e 3.

## Referências

- ARAÚJO, F. S.; MARTINS, S. V.; MEIRA NETO, J. A. A.; LANI, J. L.; PIRES, I. E. Estrutura da vegetação arbustivo-arbórea colonizadora de uma área degradada por mineração de caulim, Brás Pires, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 107-116, 2006.
- BHERING, M. C.; DIAS, D. C. F. S.; BARROS, D. I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 27, n. 1, p. 176-182, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.
- COSTA, R. B.; CONTINI, A. Z.; MELO, E. S. P. Sistema reprodutivo de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg e *Vochysia haenkiana* (Spreng.) Mart. em fragmento de cerrado na Chapada dos Guimarães – MT. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 33, n. 2, p. 305-310, 2003.
- CORRÊA, H. K. M.; COUTINHO, P. E. G.; FERRARI, S. F. Between-year differences in the feeding ecology of highland marmosets (*Callithrix aurita* and *Callithrix flaviceps*) in south-eastern Brazil. **Journal of Zoology**, London, v. 252, n. 4, p. 421-427, Dec. 2000.
- FERREIRA, R. A.; DAVIDE, A. C.; MOTTA, M. S. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn., num banco de sementes em solo de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Santa Maria, RS, v. 26, n. 1, p. 24-31, 2004.
- GARCIA, L. C.; NOGUEIRA, A. C.; ABREU, D. C. A. Influência do envelhecimento acelerado no vigor de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan – mimosaceae. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 14, n. 1, p. 85-90, 2004.
- GRABE, D. F. **Manual do teste de tetrazólio**. Brasília, DF: AGIPLAN, 1976. 85 p.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**. Zurich, Switzerland, 1993. 363 p. (Seed science and technology, supplement, 21).
- KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1998. 352 p.
- 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.; DAVIDE, A. C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert – Leguminosae Caesalpinioideae. **Revista Cerne**, Lavras, MG, v. 11, n. 2, p. 159-166, 2005.
- OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.
- PESSOA, R. C.; MATSUMOTO, S. N.; MORAIS, O. M.; VALE, R. S.; LIMA, J. M. Germinação e maturidade fisiológica de sementes de *Piptadenia viridiflora* (Kunth.) Benth relacionadas a estádios de frutificação e conservação pós-colheita. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 4, p. 617-625, 2010.
- SILVA, L. A.; SCARIOT, A. Composição florística e estrutura da comunidade arbórea em uma floresta estacional decidual em afloramento calcário (fazenda São José, São Domingos, GO, bacia do rio Paraná). **Acta Botânica Brasilica**, Brasília, DF, v. 17, n. 2, p. 305-313, 2003.
- SILVA, L. A.; SCARIOT, A. Comunidade arbórea de uma floresta estacional decídua sobre afloramento calcário na bacia do rio Paraná. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p. 61-67, 2004.
- SPERA, M. R. N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J. B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 12, p. 1567-1572, 2001.
- USHIZIMA, T. M.; BERNARDI, J. V. E.; LANDIM, P. M. B. Estudo da distribuição espacial do angico (*Anadenanthera peregrina*) na floresta estadual “Edmundo Navarro de Andrade” - Rio Claro, SP, Brasil, empregando metodologia geoestatística. **HOLOS Environment**, Rio Claro, SP, v. 3, n. 1, p. 59-73, 2003.
- VELTEN, S. B.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Brasília, DF, v. 19, n. 4, p. 753-761, 2005.