

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGROECOLOGIA

KATHLEEN LINS DOS SANTOS

METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Albizia*
polycephala (Benth.) Killip

Rio Largo – AL

2023

KATHLEEN LINS DOS SANTOS

METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Albizia polycephala* (Benth.) Killip

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agroecologia da Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, como pré-requisito para a obtenção do título de Bacharela em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. João Luciano de Andrade Melo Junior

Rio Largo - AL
2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana - CRB4 - 1512

S237m Santos, Kathleen Lins dos.

Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de *Albizia polycephala* (Benth.) Killip. / Kathleen Lins dos Santos. – 2023.

27f.: il.

Orientador(a): João Luciano de Andrade Melo Junior.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agroecologia) – Graduação em Agroecologia, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2023.

Inclui bibliografia

1. Angico-branco. 2. Caatinga. 3. Viabilidade e o vigor das sementes. I. Título.

CDU: 631.95: 631.531

FOLHA DE APROVAÇÃO

KATHLEEN LINS DOS SANTOS


METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Albizia polycephala* (Benth.) Killip

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Agroecologia do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias – CECA, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, e aprovado em 22 de dezembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
 JOÃO LUCIANO DE ANDRADE MELO JUNIOR
Data: 07/01/2024 23:09:22-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. João Luciano de Andrade Melo Junior – UFAL (Orientador)

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 VANUZE COSTA DE OLIVEIRA
Data: 16/01/2024 18:34:06-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Profa. Dr.^a. Vanuze Costa de Oliveira – UFAL (Examinadora interna)

Documento assinado digitalmente
 LUAN DANILO FERREIRA DE ANDRADE MELO
Data: 18/01/2024 10:10:53-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. Luan Danilo Ferreira de Andrade Melo – UFAL (Examinador interno)

Rio Largo - AL

Dezembro-2023

Á minha vó Maria Cícera de Jesus, que sempre acreditou, incentivou e apoiou meus
sonhos. Dedico!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que sempre me deu forças, saúde e segurou minhas mãos para nunca desistir, que sempre me protegeu e guiou meus passos nessa caminhada.

Á minha mãe Ana Maria de Jesus Lins, que é minha melhor amiga, meu porto seguro, meu ponto de paz, que sempre fez e faz tudo por mim.

Á minha vó Maria Cícera de Jesus, que é meu referenciou de amor, dedicação e de força, que sempre me incentivou e acreditou nos meus sonhos.

Ás minhas irmãs Francielly e Francylaine, que são a minha melhor versão, minha melhor companhia, que são minha outra metade, sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos e nos meus estudos, que por vezes abdicaram de sonhos pessoais para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus tios Adriana e Luciano, e todos familiares que contribuíram para que eu pudesse concluir minha graduação.

Á minha amiga e companheira de caminhada Bianca Nicácio, começamos a caminha juntas e isso tornou tudo mais leve, sempre me apoiou e puxou minha orelha quando necessário. Rimos e choramos juntas, e que seja assim daqui para frente.

Ao meu orientador professor Dr. João Luciano, por toda dedicação, paciência, orientação e a sua competência em ensinar sempre que precisei. Serei sempre grata.

Ao curso de Agroecologia e aos meus colegas de graduação, por estarem comigo em todos os momentos de descobertas, aprendizagem e de diversão ao longo de todo o processo.

Aos professores que fizeram parte da minha graduação, que semearam conhecimento que me permitiu melhor desempenho durante o processo de formação.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem participar, pelo tempo disponibilizado para avaliação deste trabalho, contribuindo com sugestões.

Ao Campus de Engenharia e Ciências Agrárias (CECA) e a Universidade Federal de Alagoas (UFAL), que foram imprescindíveis para meu processo de formação profissional, pela tenacidade, e por tudo que vive e aprendi ao longo dos anos de curso.

“Não tenha medo do sofrimento, Pois nenhum coração
jamais sofreu quando foi em busca dos seus sonhos.”

(Paulo Coelho, 1990)

RESUMO

A utilização do teste de tetrazólio no controle de qualidade de sementes é amplamente difundida, por agilizar o manejo de lotes para o mercado, obtendo-se prévia e rapidamente, informações inteiramente confiáveis. Entretanto, para assegurar a sua rapidez e eficácia, faz-se necessário definir condições específicas de preparo e de coloração das sementes. A *Albizia polycephala* (Benth.) Killip, pertencente à família Fabaceae, e conhecida popularmente como angico-branco, é uma espécie endêmica do Brasil, ocorrendo na Caatinga. O angico-branco é uma espécie arbórea rara, muito pouco conhecida tecnicamente. Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram estabelecer o procedimento mais adequado para condução do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade e o vigor das sementes de *A. polycephala*, concomitantemente à sua otimização. Para a padronização do teste de tetrazólio, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$ (duas concentrações da solução de tetrazólio x três períodos de coloração + controle = teste de germinação), com quatro repetições de 25 sementes. Apenas os cotilédones contendo o embrião foram colocados em copos de plástico de 50 mL, e imersos em solução do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, nas concentrações de 0,05 e 0,075%, pelos períodos de coloração de 1, 2 e 3 horas, em câmara do tipo *Biochemical Oxygen Demand* a 30 °C no escuro. A avaliação do potencial fisiológico dos cinco lotes de sementes de *A. polycephala* foi realizada utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes. A melhor condição do teste de tetrazólio foi aplicada a sementes colhidas em 2022, e sementes recém-colhidas (2023). Baseado nos padrões de coloração e de sanidade dos tecidos, foram classificadas como viáveis, as sementes cujo eixo embrionário apresentou coloração rosa, e como não viáveis, as sementes que apresentaram o eixo embrionário descolorido ou com coloração amarela ou vermelho muito intenso. Classes 1 e 2 identificaram sementes viáveis e vigorosas. Sementes de *A. polycephala* classificadas nas Classes 1 e 2 mostraram maior potencial fisiológico, com germinação de 99% e uniformidade de germinação de 0,5439 *bit*. Classe 3 identificou sementes viáveis e não vigorosas. Sementes de *A. polycephala* classificadas nessa classe germinaram e produziram plântulas normais somente sob condições ideais. Classe 4 identificou sementes não viáveis. Danos mostrados nessa classe comprometeram o desenvolvimento normal das plântulas de *A. polycephala*. O procedimento mais adequado para condução do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade e o vigor das sementes de *A. polycephala* é o uso da concentração de 0,05%, pelo período de concentração de 3 horas.

Palavras-chave: Angico-branco. Caatinga. Viabilidade e o vigor das sementes.

ABSTRACT

The use of the tetrazolium test in seed quality control is widespread, as it speeds up the handling of batches for the market, obtaining entirely reliable information in advance and quickly. However, to ensure its speed and effectiveness, it is necessary to define specific conditions for preparing and coloring the seeds. *Albizia polycephala* (Benth.) Killip, belonging to the Fabaceae family, and popularly known as angico-branco, is a species endemic to Brazil, occurring in the Caatinga. The white angico is a rare tree species, technically very little known. In this context, the objectives of this work were to establish the most appropriate procedure for conducting the tetrazolium test to evaluate the viability and vigor of *A. polycephala* seeds, concomitantly with its optimization. To standardize the tetrazolium test, a completely randomized experimental design was used, in a 2x3+1 factorial scheme (two concentrations of tetrazolium solution x three periods of coloring + control = germination test), with four replications of 25 seeds. Only the cotyledons containing the embryo were placed in 50 mL plastic cups, and immersed in a solution of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride salt, at concentrations of 0.05 and 0.075%, for staining periods of 1, 2 and 3 hours, in a Biochemical Oxygen Demand type chamber at 30 °C in the dark. The evaluation of the physiological potential of the five lots of *A. polycephala* seeds was carried out using a completely randomized experimental design, with four replications of 50 seeds. The best condition of the tetrazolium test was applied to seeds harvested in 2022, and recently harvested seeds (2023). Based on the coloring and health standards of the tissues, seeds whose embryonic axis showed a pink color were classified as viable, and seeds with a discolored embryonic axis or a very intense yellow or red color as non-viable. Classes 1 and 2 identified viable and vigorous seeds. *A. polycephala* seeds classified in Classes 1 and 2 showed greater physiological potential, with germination of 99% and germination uniformity of 0.5439 bits. Class 3 identified viable and non-vigorous seeds. Seeds of *A. polycephala* classified in this class germinated and produced normal seedlings only under ideal conditions. Class 4 identified non-viable seeds. Damage shown in this class compromised the normal development of *A. polycephala* seedlings. The most appropriate procedure for conducting the tetrazolium test to evaluate the viability and vigor of *A. polycephala* seeds is the use of a concentration of 0.05%, for a concentration period of 3 hours.

Keywords: Angico branco. Caatinga. Seed viability and vigor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classes para avaliação da viabilidade e vigor de sementes de <i>A. polycephala</i> pelo teste de tetrazólio.	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de sementes viáveis de <i>A. polycephala</i> , em função de diferentes concentrações do sal de tetrazólio e períodos de coloração.	22
Tabela2. Porcentagem de sementes viáveis de <i>A. polycephala</i> , em relação aos resultados do teste de germinação.	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Características gerais da <i>Albizia polycephala</i> (Bent) Killip.....	14
2.2 Testes de tetrazólio	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Testes de tetrazólio em sementes de <i>A. polycephala</i>	19
3.2 Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES	28
6. REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A *Albizia polycephala* (Benth.) Killip, pertencente à família Fabaceae, e conhecida popularmente como angico-branco ou farinha-seca, é uma espécie endêmica do Brasil. Essa espécie florestal pode ser encontrada em vários estados brasileiros, desde regiões da Caatinga (LORENZI, 2016) até a Mata Atlântica. O angico-branco pode atingir até 25 m de altura, possui potencial madeireiro, ornamental, e para produção de celulose. Por conta de sua rusticidade, apresenta potencial para compor plantios diversos (ROLIM; MENEZES; SRBEK-ARAUJO, 2016), pode ser indicada para áreas com recuperação ou reposição de vegetação. Outra característica interessante, é que essa espécie tem simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, essa associação pode apresentar vários benefícios para o solos, principalmente para os de regiões semiáridas.

Assim como tantas outras espécies florestais, o angico-branco é considerada uma arbórea rara, pouco conhecida tecnicamente (SEQUEIRA et al., 2002), sua propagação é feita por sementes e em até cinco meses suas mudas estão prontas para transplante em campo. No entanto, para viabilizar a propagação efetiva dessa e de outras espécies florestais é preciso realizar testes que garantam a qualidade de suas sementes. Comumente é usado o teste de germinação, porém quando se trata de espécies florestais esse pode apresentar baixa viabilidade, pois sementes dessas espécies têm características bem peculiares, como por exemplo germinação lenta e sensibilidade ao armazenamento. Testes rápidos, seria a solução mais viável para determinar o potencial fisiológico de sementes florestais, a exemplo temos o teste de tetrazólio.

O teste de tetrazólio é um teste bioquímico que pode ser usado para avaliar detalhadamente o vigor, determinar a viabilidade das sementes, danos por secagem ou por umidade, por insetos, e para detectar possíveis danos mecânicos de colheita e de beneficiamento (SANTOS; VIEIRA; PANOBIANCO, 2019; MARCOS-FILHO, 2015). A utilização do teste de tetrazólio no controle de qualidade de sementes é amplamente difundida, por agilizar o manejo de lotes para o mercado, obtendo-se prévia e rapidamente, informações inteiramente confiáveis (RAMÍREZ et al., 2021; PEREIRA et al., 2020).

No teste de tetrazólio, as enzimas desidrogenases atuam na respiração celular, produzindo uma substância vermelha, estável e não-difusível. Este composto chamado trifetilformazan, é formado a partir da redução do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio.

Como resultado desta reação, as partes vivas da semente são tingidas de vermelho, enquanto as mortas mantêm a cor original, permitindo distinguir os tecidos por sua condição (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2019).

O teste de tetrazólio é rotineiramente utilizado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes, podendo ser concluído em poucas horas e a baixo custo (MERCADO; CALEÑO; ROZO, 2020). Entretanto, para assegurar a sua rapidez e eficácia, faz-se necessário definir condições específicas de preparo e de coloração das sementes (BELNIAKI et al., 2020; PARAÍSO et al., 2019; SOUSA et al., 2017).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi estabelecer o procedimento mais adequado para condução do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade e o vigor das sementes de *A. polycephala*, concomitantemente à sua otimização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais da *Albizia polycephala* (Bent) Killip

Albizia polycephala (Benth) Killip, popularmente conhecida como angico-branco, pertence à família Fabaceae - Mimosoideae. Esta espécie é encontrada naturalmente na floresta latifoliada semidecíduas bacias de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Alto Uruguai (LORENZI, 2000). É uma espécie pioneira, com potencial para restauração ambiental (MORAES et al. 2006), assim como para ornamentação e arborização urbana (LORENZI 2000). A árvore tem floração abundante (CARVALHO, 2003) e grande quantidade de sementes (MA, 2004).

É uma planta semidecídua, heliófita, com indivíduos que atingem altura entre 8 e 25 m e com tronco de 40 a 60 cm de diâmetro na idade adulta (SEQUEIRA et al., 2002; CARVALHO, 2006). Tipo de fruto de monzê é uma vagem deiscente, achatada, de cor creme quando madura, contendo de três a sete sementes amareladas e duras, florescendo durante os meses de novembro a dezembro, com maturação nos períodos de maio a junho (BARROSO et al., 2004). Pertencente ao grupo ecológico das climax exigentes de luz, com dispersão anemocórica (AL-VARENGA et al., 2006), ocorre no interior de florestas primárias, bem como nas associações secundárias (capoeira e capoeirões) de florestas ombrófilas e estacionais, ocupando o dossel florestal e se apresentando em pequenas populações com distribuição descontínua (CARVALHO, 2006; CAIAFA; MARTINS, 2010; VALE et al., 2013).

A madeira do camunzé é dura, medianamente resistente e de pouca durabilidade em condições naturais (COSTA et al., 2012). Contudo, é uma espécie florestal que tem sido amplamente utilizada em sistemas agroflorestais para o sombreamento do café, em função da baixa competição que apresenta com outras espécies vegetais por luz, água e nutriente (ASPTA, 2005).

A preocupação em restabelecer ambientes degradados fez com que nos últimos anos muitas espécies, entre elas o angico-branco, passassem a ter interesse em sua propagação, visando à necessidade de recuperação de áreas degradadas (NETO et al. 2003). Para tanto, é de extrema importância desenvolver técnicas mais efetivas para aumentar a produção e fomentar o manejo das sementes da maioria dessas espécies, de modo a fornecer dados que possam caracterizar seus atributos físicos e fisiológicos (NETO et al. 2003).

A semente é o principal meio para a reprodução da maioria das espécies lenhosas, e suas características morfológicas externas, por não variarem com as condições ambientais, são importantes para auxiliar a identificação da família, gênero e espécie, além de o seu conhecimento poder auxiliar os estudos de germinação e armazenamento e os métodos de cultivo (GROTH, 1985; AMORIM et al., 1997).

O conhecimento das características morfológicas e ecofisiológicas das sementes, visando a uma posterior produção de mudas para recuperar e, ou, enriquecer áreas degradadas, resultantes da exploração desordenada dos recursos naturais, é importante para a manutenção da biodiversidade. O conhecimento da anatomia, morfologia e fisiologia das sementes é de grande importância, pois o plantio dessas espécies exige cuidados especiais (ATHIÉ et al., 1998).

Outra característica importante da semente é a viabilidade, que é a habilidade de germinar por períodos variáveis e geneticamente determinados. Os fatores ambientais e as condições de armazenamento têm efeitos decisivos na viabilidade de qualquer espécie (MALAVASI, 1988). Os testes de viabilidade podem ser diretos e indiretos, em que os diretos determinam a germinação, medindo a emergência e avaliação de plântulas, enquanto os indiretos estimam a capacidade germinativa da semente (PIÑA-RODRIGUES e SANTOS, 1988; FRANÇA NETO, 1999; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O teste de germinação tem sido o método tradicionalmente empregado para avaliação da viabilidade das sementes. Todavia, em alguns casos, a obtenção dos resultados requer longos períodos, limitando a tomada de decisão durante o controle de qualidade das sementes (Brasil, 1992).

2.2 Testes de tetrazólio

O teste de tetrazólio, um teste indireto, é o que vem apresentando os melhores resultados, pois permite uma rápida estimativa da germinação e também o diagnóstico da situação da semente (PIÑA-RODRIGUES e SANTOS, 1988; FRANÇA NETO, 1999; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). O teste de tetrazólio é um dos principais métodos de avaliação da qualidade de sementes (BRASIL, 1992; ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS, 2002; MARCOS FILHO, 2005) e tem sido amplamente utilizado em razão de sua rapidez, precisão, baixo custo e possibilidade de estimativa do vigor (FRANÇA NETO et al., 2000; MARCOS FILHO, 2005).

O teste de tetrazólio, que consiste em um método rápido para avaliar a viabilidade e o vigor de sementes, baseando-se na atividade de enzimas do grupo das desidrogenases, presentes nos tecidos vivos. Neste teste, as sementes permanecem em contato com uma solução incolor de cloreto de tetrazólio (2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio), que é absorvida pelos tecidos da semente. Nos tecidos vivos que apresentam atividades respiratória e metabólica normais, as enzimas do grupo das desidrogenases liberam íons hidrogênio (H⁺) com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio reage, formando um composto insolúvel e estável, de coloração avermelhada, denominado trifenilformazan (DELOUCHE et al., 1976).

A intensidade e localização das partes coloridas e descoloridas são utilizadas para a interpretação do teste. As sementes viáveis tendem a absorver a solução de tetrazólio lentamente, desenvolvendo coloração mais suave do que sementes deterioradas, que adquirem coloração rosa forte. Os tecidos mortos, nos quais não há atividade dessas enzimas, são caracterizados pela coloração branca ou amarelados e textura flácida (FRANÇA NETO, 1999). O teste de tetrazólio permite rápida avaliação da viabilidade e do vigor das sementes e, por vezes, auxilia na identificação das causas da perda da viabilidade das mesmas, além de requerer equipamentos simples e de baixo custo para sua execução (DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1998; FRANÇA NETO, 1999).

De acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), o principal objetivo do teste de tetrazólio é a distinção das sementes viáveis das não viáveis. A eficiência do teste em avaliar o vigor e a viabilidade das sementes está relacionada ao desenvolvimento de metodologia adequada para cada espécie, de modo a definir as condições mais apropriadas para o preparo, pré-condicionamento e coloração das sementes. Assim, o preparo e o pré-condicionamento das sementes antes da coloração são fatores decisivos. Bittencourt et al. (1997).

Diversos fatores podem interferir na obtenção de resultados satisfatórios no teste de tetrazólio, principalmente aqueles relacionados à metodologia de execução como, por exemplo, o preparo das sementes antes da coloração. Para facilitar a penetração da solução de tetrazólio o pré-condicionamento das sementes (umedecimento) e o corte são necessários para algumas espécies (BRASIL, 1992).

A obtenção de coloração uniforme e adequada para uma interpretação segura e eficiente também é fator de grande importância para o sucesso do uso do teste em determinada espécie. Como regra geral, Moore (1986) recomenda o uso de soluções de

tetrazólio nas concentrações de 1,0 a 0,1%, enquanto Grabe (1976) afirma que solução a 1% deve ser utilizada para sementes de leguminosas, que não são seccionadas através do embrião antes da coloração. Para sementes de cucurbitáceas, as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) recomendam o uso de solução a 1% por 24 horas, não se referindo à temperatura que deve ser utilizada nesta etapa. No entanto, estudos específicos com algumas espécies têm indicado o uso de soluções menos concentradas e temperaturas de 35 a 40° C, sem interferir na precisão dos resultados (FRANÇA NETO et al., 1998; DIAS & BARROS, 1999; BHERING et al., 1999).

Para a obtenção de coloração ideal em sementes de soja, França Neto et al. (1998) recomendam o uso de solução a 0,075%, a 35 ou 40° C, por 150 a 180 minutos. A coloração vermelha-brilhante ou rosa-brilhante se desenvolve quando o hidrogênio resultante do processo de respiração das células vivas combina-se com a solução de tetrazólio absorvida. Os tecidos do embrião viável absorvem a solução de tetrazólio lentamente e tendem a desenvolver uma coloração mais leve que os embriões deteriorados que adquirem uma cor vermelha-carmim forte. A presença de tecidos não coloridos, firmes e sadios sugere maior resistência à penetração da solução de tetrazólio do que a morte do tecido. O tecido morto geralmente é caracterizado por cor branca ou amarelada e textura flácida (BHERING et al., 1996; FRANÇA NETO, 1999).

Para a adequação da metodologia do teste de tetrazólio para novas espécies, além da definição da concentração da solução, do tempo de exposição e da temperatura (BRASIL, 1992; FRANÇA NETO et al., 2000; BHERING et al., 2005), outros aspectos devem ser considerados. Como o principal objetivo do teste é verificar a condição fisiológica de estruturas essenciais à germinação (LAKON, 1949), o conhecimento da anatomia do embrião é imprescindível (FRANÇA NETO et al., 2000; MARCOS FILHO, 2005).

O teste de tetrazólio apresenta várias vantagens: não é afetado por diversas condições que podem alterar os resultados do teste padrão de germinação, como a presença de fungos; enfoca as condições físicas e fisiológicas do embrião de cada semente individualmente; permite rápida avaliação da viabilidade; permite em algumas espécies, como soja e feijão, a identificação de diferentes níveis de viabilidade; pode fornecer o diagnóstico da causa da perda da viabilidade das sementes e requer equipamento simples e barato (DELOUCHE et al., 1976; FRANÇA NETO et al., 1998; FRANÇA NETO, 1999). A vantagem significativa do teste de tetrazólio é a

possibilidade de aplicá-lo na pré-colheita a fim de direcionar o campo de produção de determinada espécie (FRANÇA NETO et al., 2015).

Conforme Piña-Rodrigues e Santos (1988), o teste de tetrazólio não é muito difundido entre espécies perenes, como florestais e frutíferas, embora apresente excelentes condições para ser utilizado rotineiramente, uma vez que muitas dessas espécies necessitam de longo período para germinarem. Em vista dessa situação, pesquisas têm sido desenvolvidas procurando abreviar o prazo requerido para obtenção dos resultados do teste de tetrazólio, a partir da definição de metodologia adequada e padronizada para cada espécie (NASCIMENTO e CARVALHO, 1998). Neste contexto, o teste de tetrazólio tem se mostrado uma alternativa promissora pela qualidade e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor da semente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitotecnia, do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, Brasil. As sementes de *Albizia polycephala* foram colhidas em áreas da Caatinga localizadas no Alto Sertão dos estados de Alagoas e Pernambuco, durante as safras de 2022 e a primeira safra de 2023. Após a colheita, as sementes foram separadas em cinco lotes, beneficiadas e armazenadas em câmara fria (± 20 °C e umidade relativa entre 50 e 55%), até a condução do experimento. Os ensaios foram divididos em duas etapas: na primeira avaliou-se a metodologia mais adequada do teste de tetrazólio, na segunda verificou-se o potencial fisiológico dos diferentes lotes de sementes de *A. polycephala* com posterior classificação do vigor das sementes.

3.1 Testes de tetrazólio em sementes de *A. polycephala*

Para definir a metodologia mais adequada para o teste de tetrazólio e assegurar a viabilidade das sementes de *A. polycephala*, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$, sendo duas concentrações da solução de tetrazólio, três períodos de coloração, mais um tratamento controle com teste de germinação padrão, com quatro repetições de 25 sementes.

Para o teste de germinação (controle), as sementes foram dispostas entre duas folhas de papel germitest umedecidas com um volume de água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato, em seguida essas folhas foram enroladas, colocadas em sacos plásticos e em seguida na câmara do tipo *Biochemical Oxygen Demand*, regulada a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas (BRASIL, 2013).

Para garantir uma maior absorção da solução de tetrazólio, antes da realização do teste, as sementes foram embaladas em folhas papel *germitest*, e umedecidas com quantidade de água equivalente 2,5 vezes do seu peso seco, em seguida foram colocadas em câmara do tipo *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.) a 30°C por três horas. Passado esse período, as sementes foram cortadas longitudinalmente com lâmina de bisturi n.º 22 através da metade distal dos cotilédones, deixando-se o eixo embrionário intacto (MASULLO *et al.*, 2017; BRASIL, 2009).

Após o corte das sementes, separou-se em copos plásticos apenas os cotilédones com o embrião. Esses cotilédones foram imersos em solução do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, nas concentrações de 0,05 e 0,075%, pelos períodos de coloração de 1, 2 e 3 horas, em câmara do tipo B.O.D. a 30 °C, sob escuro.

Ao final de cada período de coloração, descartou-se a solução de tetrazólio, e as sementes foram lavadas em água corrente e mantidas submersas em água até o momento das avaliações.

Definido a metodologia mais adequada do teste de tetrazólio, esse foi aplicado para os cinco lotes de sementes, para assim ser avaliado o potencial fisiológico das sementes de *A. polycephala*. Para essa avaliação, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes.

A avaliação das sementes submetidas as diferentes concentrações da solução de tratrazólio, foi efetuada de forma individual, em ambiente com iluminação fluorescente, com o auxílio de uma lupa de ampliação em 6x. Para captar imagens das sementes avaliadas, as mesmas foram dispostas sobre vidro de *scanner* de mesa, e digitalizadas, com imagens armazenadas em arquivo formato JPG.

Baseado nos padrões de coloração e de sanidade dos tecidos, foram classificadas como viáveis, as sementes cujo eixo embrionário apresentou coloração rosa, e como não viáveis, as sementes que apresentaram o eixo embrionário descolorido ou com coloração amarela ou vermelho muito intenso (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018; BRASIL, 2009).

Para separar diferentes categorias de sementes dentro desses dois grupos, as sementes com diferentes potenciais fisiológicos foram avaliadas uma a uma quanto à condição dos tecidos (firmes ou flácidos) e cor dos mesmos, e pela posição e tamanho dos danos observados nos cotilédones, plúmula e eixo hipocótilo-radícula (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018; MASULLO *et al.*, 2017).

A viabilidade determinada pelo teste de tetrazólio foi expressa em porcentagem de sementes viáveis (Tzv). Além dessa variável, foram calculadas a porcentagem de sementes vigorosas (Tzvg), e o produto da viabilidade e vigor (Tzvvg) em nível de repetições obtido pela expressão $Tzvvg = [(Tzv)(Tzvg)]/100$ (GARCIA *et al.*, 2020; MASULLO *et al.*, 2017; BRASIL, 2009).

3.2 Análise estatística

Os dados de Tzv, Tzvg e Tzvvg foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo a comparação de médias feita pelo teste de Tukey e pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* ASSISTAT 7.6 beta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se diferenças significativas nos períodos de coloração em *A. polycephala* (valor calculado do teste $F = 1187,07$), sendo as menores porcentagens de sementes viáveis, 49 e 34%, obtidas para a imersão em solução do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, pelo período de coloração de 1 hora, nas concentrações de 0,05 e 0,075%, respectivamente (Tabela 1). Esses resultados podem ser atribuídos à dificuldade de distinção das classes de viabilidade, devido ao curto tempo que o sal teve para penetrar nos tecidos da semente.

Tabela 1. Porcentagem de sementes viáveis de *A. polycephala*, em função de diferentes concentrações do sal de tetrazólio e períodos de coloração.

Período de coloração (h)	Concentração (%)		Média
	0,05	0,075	
1	49 Ca	34 Bb	41
2	63 Ba	40 Bb	51
3	96 Aa	69 Ab	82
Média	69	47	58
Períodos (P)	1187,07**		
Concentrações (Con.)	667,70**		
Interação P x Con.	75,54**		
CV (%)	6,43		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). (**) Significativo a 1% de probabilidade.

Observou-se também, diferenças significativas em função das concentrações do sal de tetrazólio ($F = 667,70$), na concentração de 0,05%, pelo período de 3 horas, foi obtida a maior porcentagem de sementes viáveis de *A. polycephala*, 96%. Baseando-se nesse padrão de coloração dos tecidos, foi possível uma avaliação visual mais fácil e diferenciação das classes. Da mesma forma, houve diferença significativa para a interação P x Con. (valor calculado do teste $F = 75,54$), verificando-se que a imersão das sementes de *A. polycephala* na solução do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, pelo período de coloração de 3 horas, na concentração de 0,05%, permite determinar com eficiência a qualidade fisiológica de sementes desta espécie (Tabela 1).

Houve diferença significativa entre as médias das combinações períodos de coloração x concentrações e o tratamento adicional teste de germinação ($F = 693,31$). Mas, não foi observada diferença significativa para a porcentagem de sementes viáveis de *A. polycephala* obtida no período de 3 horas, na concentração de 0,05%, 96%, em relação aos resultados do teste de germinação, 99% (Tabela 2). Portanto, a viabilidade das sementes de *A. polycephala* pode ser avaliada utilizando a concentração de 0,05% de tetrazólio, pelo período de 3 horas de imersão no sal.

Tabela 2. Porcentagem de sementes viáveis de *A. polycephala*, em relação aos resultados do teste de germinação.

Teste de tetrazólio	Tzv
1h 0,05%	49 *
1h 0,075%	34 *
2h 0,05%	63 *
2h 0,075%	40 *
3h 0,05%	96 ns
3h 0,075%	69 *
Germinação (%)	99
F	693,31 **
CV (%)	8,23

(^{ns} e *): As médias das combinações períodos de coloração x concentrações não diferem e diferem, respectivamente, do tratamento adicional teste de germinação pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. (**) Significativo a 1% de probabilidade.

Essa combinação tempo de imersão x concentração foi a que proporcionou a melhor interpretação dos resultados de sementes viáveis, permitindo mitigar subjetividades durante a avaliação do teste.

Vale ressaltar a necessidade de estabelecer o procedimento mais adequado para condução do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade e vigor de sementes de *A. polycephala*.

A escolha da metodologia adequada para o teste de tetrazólio deve se basear na facilidade de diferenciar tecidos viáveis e inviáveis, e na capacidade de separar lotes com qualidades fisiológicas distintas (MASULLO *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2016; MARCOS-FILHO, 2015). Entretanto, não foram encontrados trabalhos definindo condições específicas de preparo e de coloração das sementes de *A. polycephala*.

Em espécies florestais o uso de baixas concentrações do sal de tetrazólio para o teste de viabilidade também foram objeto de estudo por diversos pesquisadores (RAMÍREZ *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2020; MASULLO *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Ramírez *et al.* (2021) adequaram a metodologia para a realização do teste de tetrazólio, verificando a viabilidade das sementes armazenadas de *Himatanthus sucuuba* Wood comparando os resultados dos testes de germinação e tetrazólio. O teste de tetrazólio na concentração de 0,075% a 40 °C durante 1,5 horas mostrou-se eficiente para avaliar a viabilidade e vigor das sementes de *H. sucuuba*, e para a avaliação as sementes foram distribuídas em seis classes.

Pereira *et al.* (2020) adequaram a metodologia do teste de tetrazólio para estimar a viabilidade e vigor em sementes de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. O período de 8 horas de pré-embecção e 4 horas de coloração na solução de tetrazólio a 0,075%, sob 35 ou 40 °C, é adequado para estimar a viabilidade e vigor de sementes de *P. stipulacea*. As sementes foram divididas em quatro classes.

Masullo *et al.* (2017) buscaram otimizar a aplicação do teste de tetrazólio em sementes florestais de *Platymiscium floribundum* Vog., *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. e *Acacia polyphylla* DC., reduzindo a subjetividade da interpretação dos resultados e adequaram metodologias para avaliar a qualidade de sementes por meio do teste de tetrazólio. As concentrações e tempo de imersão ideais para cada espécie foram: *P. floribundum* – 0,5 e 1,0% por 1 hora; *L. muehlbergianus* – 0,1% por 6 horas e *A. polyphylla* – 0,5% por 4 horas. O protocolo e a metodologia apresentaram alta eficiência de acordo com os parâmetros estabelecidos, e cada semente foi classificada em três classes de vigor.

Sousa *et al.* (2017) desenvolveram procedimentos do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade e vigor de sementes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz. A coloração foi obtida com a imersão da semente em solução de tetrazólio de 0,075%, por 1,5 horas, a 41 °C, sendo as sementes distribuídas em três classes de viabilidade e vigor.

Oliveira *et al.* (2016) estabeleceram a melhor concentração da solução de tetrazólio e o período de coloração para a avaliação da viabilidade de sementes de *Simira gardneriana* M.R. Barbosa & Peixoto. O teste de tetrazólio foi eficiente para estimar a viabilidade de sementes de *S. gardneriana*, sendo a concentração de 0,075% por 6 horas, a 35 °C a melhor condição.

Utilizando a técnica do pré-umedecimento das sementes entre papel toalha, seguida do corte longitudinal através da metade distal dos cotilédones, imersos em solução do sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, nas concentrações de 0,05 e 0,075%, pelos períodos de coloração de 1, 2 e 3 horas, foi possível propor uma classificação de vigor em sementes de *A. polycephala*, baseando-se em quatro classes distintas de viabilidade, classificando-as como viáveis ou não viáveis, com base na condição dos tecidos (firmes ou flácidos) e cor dos mesmos, e pela posição e tamanho dos danos observados (Figura 1).

Classes 1 e 2 identificaram sementes viáveis e vigorosas.

Classe 1: Viáveis; alto vigor. As sementes apresentaram todos os tecidos com aspectos normal e firme, e foram caracterizadas pela coloração rosa, uniforme e superficial.

Classe 2: Viáveis; médio vigor. Pequenas lesões superficiais sobre o eixo embrionário, sem afetar o cilindro central, e sobre a superfície interna dos cotilédones, observando-se pequenas áreas de coloração vermelho muito intenso.

Sementes de *A. polycephala* classificadas nas Classes 1 e 2 mostraram maior potencial fisiológico, com germinação de 99% e uniformidade de germinação de 0,5439 *bit*.

Classe 3 identificou sementes viáveis e não vigorosas.

Classe 3: Viáveis; baixo vigor. As sementes exibiram lesões com uma maior extensão das áreas afetadas, porém a área de tecidos lesionados nos cotilédones é $\leq 50\%$, que não compromete o transporte de reservas para o eixo hipocótilo-radícula com coloração vermelho muito intenso ou amarela ou descolorido.

Sementes de *A. polycephala* classificadas nessa classe germinaram e produziram plântulas normais somente sob condições ideais.

Classe 4 identificou sementes não viáveis.

Classe 4: Não viáveis. Semente com tecido flácido e descolorido ou morto com extensão $> 50\%$, podendo apresentar coloração amarela ou vermelho muito intenso em volta de toda extensão do eixo embrionário.

Danos mostrados nessa classe comprometeram o desenvolvimento normal das plântulas de *A. polycephala*.

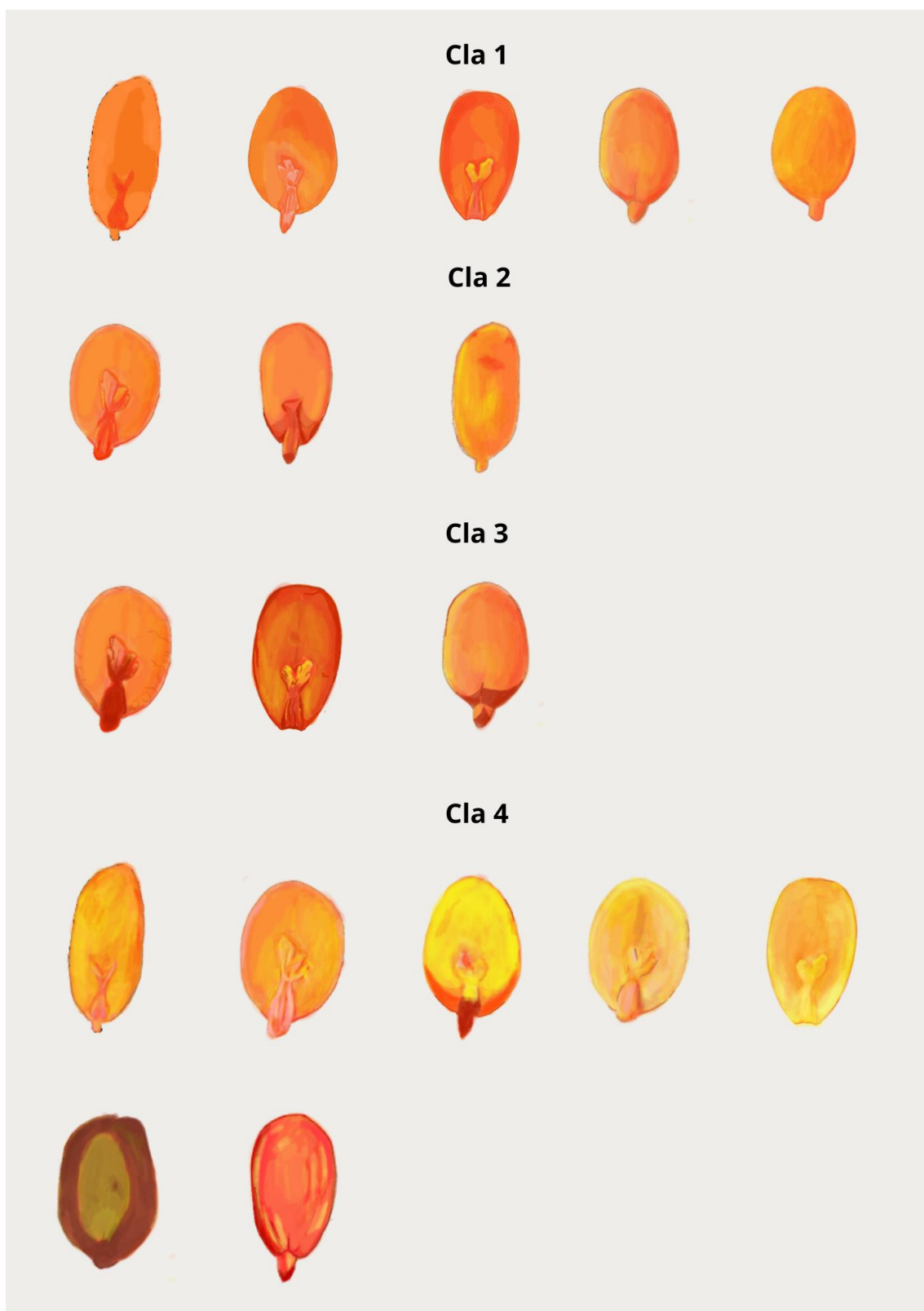


Figura 1. Classes para avaliação da viabilidade e vigor de sementes de *A. polycephala* pelo teste de tetrazólio.

Comparando com os resultados de Belniaki *et al.* (2020) onde estabeleceram metodologia para condução do teste de tetrazólio em sementes de *Bactris gasipaes* Kunth, obtendo resultados rápidos e correlacionados ao teste de germinação, mediante imersão das sementes em água, e posterior corte longitudinal adjacente ao embrião e imersão de metade da semente em solução a 1,0%, por 4 horas a 30 °C. Assim, foi possível separar as sementes de *B. gasipaes* em duas classes. Para a *A. polycephala* foi encontrado a melhor concentração da solução a 0,05%, por três horas.

4. CONCLUSÕES

O procedimento mais adequado para condução do teste de tetrazólio na avaliação da viabilidade e o vigor das sementes de *A. polycephala* é o uso da concentração de 0,05%, pelo período de concentração de 3 horas.

5. REFERÊNCIAS

BELNIAKI, A. C.; MICHELON, T. B.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Rapid results of peach palm seed viability: a methodological proposition for the tetrazolium test. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, e202042034, p. 1-9, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v42234727>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária/Coordenação Geral de Apoio Laboratorial. Brasília, DF: MAPA/SDA/CGAL, 2013. 97 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395 p.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Soja. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2018. 108 p. (Documentos/Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n. 406).

GARCIA, E. B.; ÁVILA, M. R.; FONSECA JÚNIOR, N. S.; NAGASHIMA, G. T. Imagens digitalizadas na avaliação do teste de tetrazólio em sementes de trigo. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 16, n. 6, p. 67-78, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n6.a408>

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2016. 384 p.

MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>

MASULLO, L. S.; PIÑA-RODRIGUES, M. C. F.; FIGLIOLIA, M. B.; AMÉRICO, C. Optimization of tetrazolium tests to assess the quality of *Platymiscium floribundum*, *Lonchocarpus muehlbergianus* and *Acacia polyphylla* DC. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 189-197, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n2167534>

MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q.; ROZO, L. Y. M. Improvement of the methodology of the tetrazolium test using different pretreatments in seeds of the genus

Epidendrum (Orchidaceae). **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, e202042013, p. 1-8, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v42231028>

OLIVEIRA, F. N.; TORRES, S. B.; NOGUEIRA, N. W.; FREITAS, R. M. O. Viability of *Simira gardneriana* M.R. Barbosa & Peixoto seeds by the tetrazolium test. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 7-13, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v38n1153565>

PARAÍSO, H. A.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; AVELAR, R. I. S.; COSTA, C. A.; GOMES, L. S. P.; NASCIMENTO, W. M. Adjustments in the tetrazolium test methodology for assessing the physiological quality of chickpea seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 41, n. 1, p. 7-12, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n1187777>

PEREIRA, K. T. O.; PAIVA, E. P.; NETA, M. L. S.; BENEDITO, C. P.; TORRES, S. B. Physiological quality evaluation of *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke seeds by tetrazolium test. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 51, n. 1, e20196712, p. 1-9, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20200019>

RAMÍREZ, L. H. S.; MENDES, A. M. S.; IMAKAWA, A. M.; SAMPAIO, P. T. B.; MELO, M. G. G. Viabilidade de sementes armazenadas de *Himatanthus sucuuba* Wood pelo teste de tetrazólio. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 333-349, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.5902/1980509842809>

ROLIM, S. G.; MENEZES, L. F. T.; SRBEK-ARAÚJO, A. C. **Floresta Atlântica de Tabuleiro: diversidade e endemismos na Reserva Natural Vale**. 2016. 496 p.

SANTOS, F. S.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test for *Pinus taeda*: preparation, staining, and seed viability classes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 54, e01088, p. 1-5, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.01088>

SEQUEIRA, F. P.; SILVA, A. J. C.; CARPANEZZI, A. A.; FOWLER, J. A. P. **Quebra de dormência de sementes de *Albizia polycephala* (Benth.) Killip**. I EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA *Embrapa Florestas* Colombo – 03 a 05 de dezembro de 2002.

SOUSA, D. M. M.; BRUNO, R. L. A.; SILVA, K. R. G.; TORRES, S. B.; ANDRADE, A. P. Viabilidade e vigor de sementes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz pelo teste de tetrazólio. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 381-388, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.2017004>