

Foto: Caroline Jácome Costa



Recomendações para o Teste de Tetrazólio em Sementes de Leucena (*Leucaena leucocephala* e *L. leucocephala* x *L. diversifolia*)

Caroline Jácome Costa¹
Carolina Paula dos Santos²
Paulo Rossi³

A leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) é uma espécie arbustivo-arbórea, com altura variando de 3 m a 20 m, pertencente à família Fabaceae, originária da América Central. É considerada uma espécie versátil, produtora de forragem de alto valor nutritivo, com múltiplos usos. A espécie apresenta grande produção de madeira, forragem e sementes. Estas são elípticas, de coloração amarronzada e apresentam dormência causada pela impermeabilidade do tegumento. Embora o genótipo mais plantado no País seja a cultivar australiana 'Cunningham', ela apresenta algumas limitações, como suscetibilidade ao psilídeo (*Heteropsylla cubana* Crawford), crescimento lento na fase de estabelecimento das plantas, presença de fatores antinutricionais na forragem e intolerância ao frio e a solos ácidos, que têm levado ao desenvolvimento de híbridos interespecíficos para transferência de genes desejáveis à *L. leucocephala* (BARCELLOS, 2006). Nesse sentido, os cruzamentos que

originaram híbridos entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia* têm se mostrado promissores, em ensaios de desempenho agrônomo no Cerrado, apresentando características superiores de adaptação a solos ácidos (ARAÚJO NETO et al., 1994; BARCELLOS, 2006)

A formação de novas áreas de pastagens que incluam a leucena requer sementes de elevada qualidade, ressaltando a importância do desenvolvimento e aprimoramento de testes que permitam a avaliação da qualidade das sementes.

O teste de germinação tem sido o método tradicionalmente empregado para avaliação do potencial fisiológico de sementes de espécies cultivadas, determinando a proporção de sementes capazes de produzir plântulas normais, sob condições favoráveis de temperatura, luz, umidade e aeração. Por ser conduzido sob condições

¹ Engenheira Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, caroline.costa@cpac.embrapa.br

² Estudante de Biologia da Faculdade Alvorada, Estagiária da Embrapa Cerrados, carolina.paula@cpac.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, Assistente da Embrapa Cerrados, paulo.rossi@cpac.embrapa.br

ideais, o teste de germinação pode superestimar o potencial de desempenho das sementes sob condições de campo. Dessa forma, busca-se desenvolver e aprimorar testes que possam complementar as informações fornecidas pelo teste de germinação, oferecendo caracterização mais ampla do potencial fisiológico das sementes. Entre esses testes, destaca-se 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. O teste de tetrazólio permite rápida avaliação da viabilidade e vigor das sementes, além de auxiliar na identificação das causas da perda de 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). 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, com atividade respiratória e metabólica normais, as enzimas do grupo das desidrogenases liberam íons hidrogênio (H^+) que reagem com o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, formando um composto insolúvel e estável, de coloração avermelhada, denominado trifenilformazan (DELOUCHE et al., 1976). A intensidade e a localização das partes coloridas e descoloridas são utilizadas na interpretação do teste. Sementes viáveis tendem a absorver a solução de tetrazólio lentamente, desenvolvendo coloração mais suave do que sementes deterioradas, que adquirem coloração vermelho-carmim forte. Tecidos mortos, nos quais não há atividade dessas enzimas, são caracterizados pela coloração branca ou amarelada e textura flácida (FRANÇA NETO, 1999).

Para que os resultados do teste sejam satisfatórios, é necessário que a solução de tetrazólio seja adequadamente absorvida pelas sementes, o que faz com que algumas espécies necessitem passar por outras etapas preparatórias previamente à imersão na solução de tetrazólio. Em geral, as sementes devem ser pré-embebidas em água antes de serem submetidas à imersão na solução de tetrazólio, para ativar o metabolismo enzimático, etapa conhecida como pré-condicionamento. Após

o pré-condicionamento, muitas espécies ainda necessitam passar por outras etapas, que envolvem, mais comumente, a punção, o corte e a remoção do tegumento. No caso das sementes de leucena, que apresentam tegumento impermeável, são recomendados vários procedimentos para o preparo das sementes antes da coloração: punção, corte ou lixamento dos tegumentos, em zona não decisiva; corte longitudinal através do tegumento ou remoção da parte distal da semente. Para a coloração, recomendam-se, atualmente, as concentrações de 0,5 % a 1,0 % da solução de tetrazólio, por 6 a 24 horas (BRASIL, 1992). Haja vista serem faixas de valores amplas e específicas para *L. leucocephala*, e considerando que novas cultivares e híbridos estão em desenvolvimento por instituições de pesquisa, há necessidade de aperfeiçoar as recomendações para realização do teste de tetrazólio em sementes de leucena.

Procedimentos destinados ao preparo e coloração de sementes para o teste de tetrazólio têm sido desenvolvidos para várias espécies. Em se tratando de sementes de leucena, cujo tegumento é impermeável e cujo período de coloração recomendado pelas regras para análise de sementes é longo, procedimentos visando acelerar a obtenção dos resultados de viabilidade das sementes, por meio do teste de tetrazólio, têm sido testados. Entre eles, podem-se citar o corte lateral e o corte lateral seguido de imersão das sementes em água e posterior remoção do tegumento, para acelerar a penetração da solução de tetrazólio nos tecidos. Deve-se destacar que tais procedimentos têm sido empregados após a escarificação manual das sementes e pré-condicionamento (embebição, por 18 horas, entre folhas de papel umedecido, a 25 °C). No laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Cerrados, tem-se observado que sementes de leucena da cultivar 'Cunningham' (*L. leucocephala*) e do híbrido interespecífico (*L. leucocephala* x *L. diversifolia*) CPAC 4111, submetidas ao corte lateral, sem remoção do tegumento, não se colorem adequadamente, independentemente do emprego de diferentes concentrações da solução de tetrazólio (0,075 %, 0,150 % e 1,000 %, m/v) e períodos de 2 e 4 horas de coloração (Fig. 1A).

Por outro lado, sementes submetidas ao corte lateral, seguido da imersão em água e posterior remoção do tegumento, apresentam padrões variados de coloração, dependendo da combinação entre a concentração da solução de tetrazólio e o período de coloração (Fig. 1B). Observa-se que a combinação que tem permitido a melhor coloração, em termos de intensidade e uniformidade, sendo adequada para avaliação do potencial fisiológico das sementes, é a concentração da solução de tetrazólio de 0,150 % e o período de coloração de duas horas. Sementes submetidas à solução de tetrazólio a 0,075 %, por quatro horas, apresentam intensidade razoável de coloração, porém menos uniforme, comparativamente à solução de tetrazólio a 0,150 %, por duas e quatro horas. A solução

de tetrazólio a 1,000 % promove coloração muito intensa das sementes, dificultando a avaliação do seu potencial fisiológico.

Desse modo, é possível reduzir o período de coloração do teste de tetrazólio em sementes de leucena de seis para duas horas, com economia significativa do sal de tetrazólio, uma vez que as Regras para Análise de Sementes recomendam concentrações de 0,5 % a 1,0 % e os resultados obtidos permitem a utilização de solução de tetrazólio a 0,150 %. Todavia, tais ganhos apenas são passíveis de serem obtidos se as sementes passarem por uma etapa de preparo que envolve o corte lateral, seguido da imersão das sementes em água, a 30 °C, por uma hora e posterior remoção do tegumento.

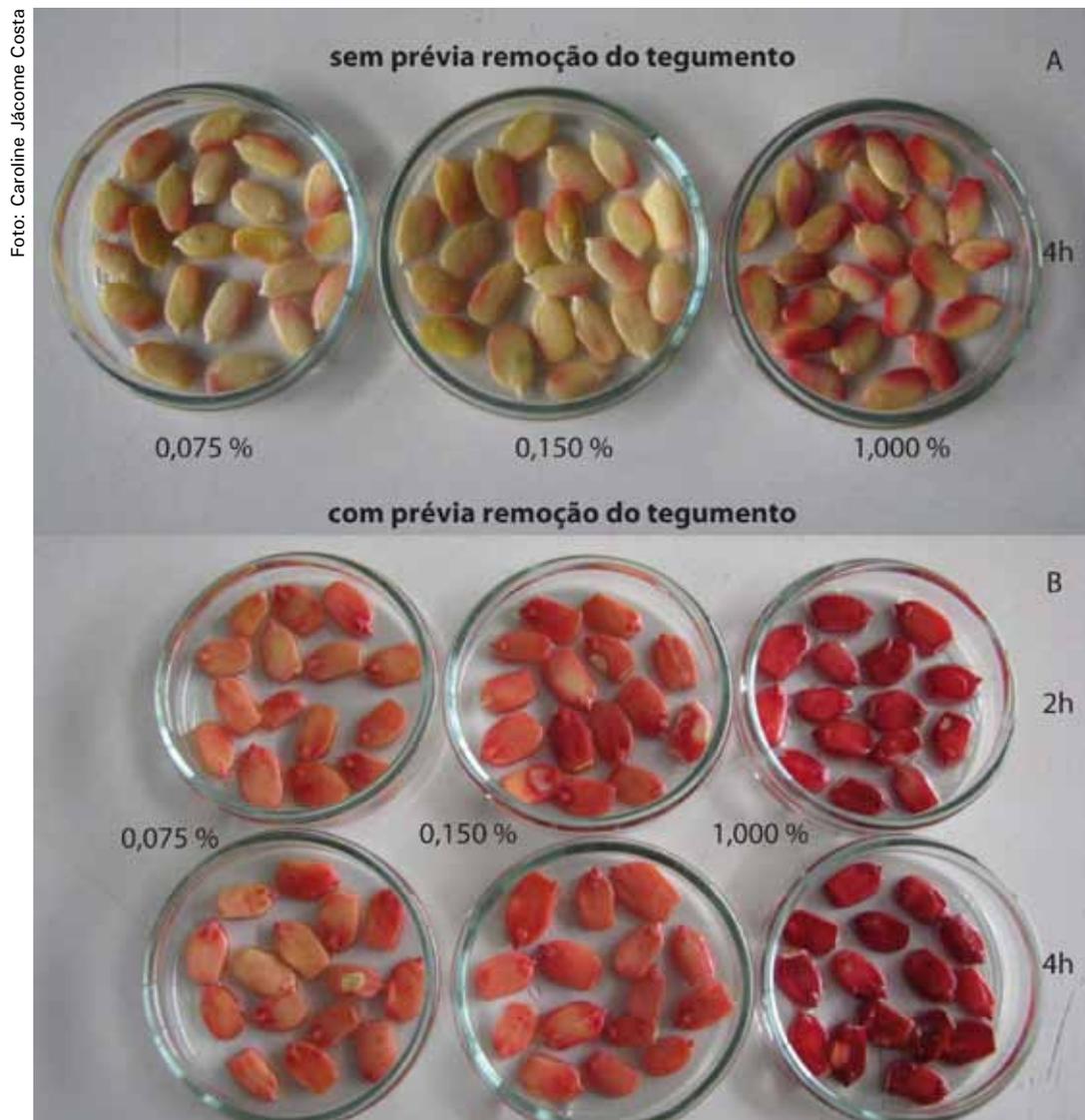


Fig. 1. Sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* e *L. leucocephala* x *L. diversifolia*) submetidas ao corte lateral, sem prévia remoção do tegumento, após quatro horas de coloração em solução de tetrazólio a 0,075 %, 0,150 % e 1,000 % (A). Sementes de leucena submetidas ao corte lateral e posterior remoção do tegumento, após duas e quatro horas de coloração em solução de tetrazólio a 0,075 %, 0,150 % e 1,000 % (B).

Procedimentos

Para a condução do teste de tetrazólio em sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* e *L. leucocephala* x *L. diversifolia*), os seguintes procedimentos podem ser adotados, sequencialmente:

- (1) Escarificação física das sementes, para permitir a embebição e facilitar a posterior remoção do tegumento.
- (2) Pré-condicionamento das sementes, por 18 horas, entre folhas de papel umedecido, a 25 °C, destinada a reativar o metabolismo das sementes.
- (3) Corte lateral das sementes, para facilitar a embebição e posterior remoção do tegumento (Fig. 2A).
- (4) Imersão das sementes em água, a 30 °C, por uma hora, para facilitar a remoção do tegumento (Fig. 2B).
- (5) Remoção do tegumento das sementes, para melhor expor os tecidos à solução de tetrazólio (Fig. 2C).
- (6) Imersão das sementes em solução de tetrazólio a 0,150 % por 2 horas, a 35 °C, no escuro.

Referências

- ARAÚJO NETO, R. B.; SIQUEIRA, S. C. P.; GIRARDI, J. L. **Comportamento de cultivares híbridos de *Leucaena* spp. em condições de Cerrado de Roraima**. Boa Vista: EMBRAPA-CPAF, 1994. 5 p. (EMBRAPA-CPAF. Comunicado Técnico, 3).
- BARCELLOS, A. O. **Avaliação agrônômica de híbrido interespecífico de *Leucaena* e sua qualidade em associação com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. 2006. 217 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília, DF: AGIPLAN, 1976. 103 p.
- FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1998. 72 p.
- FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. Cap. 8, p.1-7.

Foto: Caroline Jácome Costa

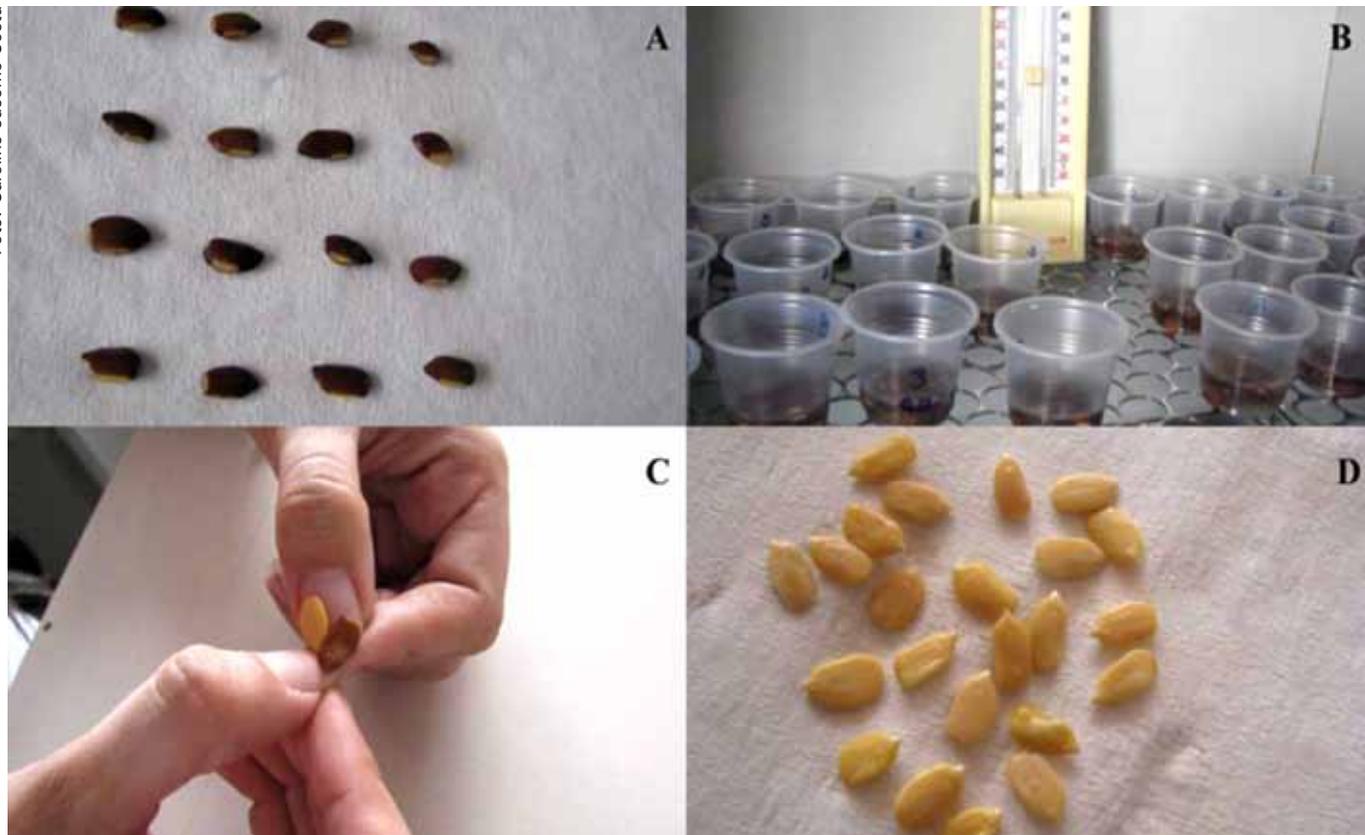


Fig. 2. Etapas preparatórias para a coloração de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* e *L. leucocephala* x *L. diversifolia*) a serem submetidas ao teste de tetrazólio: corte lateral das sementes (A), seguido da imersão em água, a 30 °C, por uma hora (B), e posterior remoção do tegumento (C-D).

Tetrazolium Test Recommendations for Leucaena Seeds (*Leucaena leucocephala* and *L. leucocephala* x *L. diversifolia*)

Abstract

The formation of new areas of pastures that include the Leucaena spp. requests high quality seeds, emphasizing the importance of the development of tests to seed quality evaluation. The tetrazolium test constitutes a promising alternative for seed viability and vigor evaluation. Besides the obtaining of fast results, it generates information that allow the identification of the causes of loss of seed viability, being recommended for viability evaluation of seeds that need to be sowed soon after the harvest and to complement the results of the germination test of seeds that present dormancy. The efficiency of the test depends on the development of appropriate methodology for each species that recommends the appropriate conditions of pre-conditioning, preparation and coloration of the seeds. The tetrazolium test is efficient in evaluating leucaena seed viability through the lateral cut and subsequent seed coat removal and immersion in tetrazolium solution to 0,15 % for two hours.

Index terms: Leucaena leucocephala, Leucaena diversifolia, germination, viability.

Comunicado Técnico, 160

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

Endereço: BR 020 Km 18 Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa postal: 08223 CEP 73310-970

Fone: (61) 3388-9898 Fax: (61) 3388-9879

sac@cpac.embrapa.br

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2009): 100 exemplares

Edição online (2009)

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: *Fernando Antônio Macena da Silva*

Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*

Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Expediente

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Equipe de revisão: *Francisca Elijani do Nascimento,*
Jussara Flores de Oliveira Arbués

Assistente de revisão: *Elizelva de Carvalho Menezes*

Editoração eletrônica: *Fabiano Bastos*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*
Alexandre Moreira Veloso