



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PIBIC - 2012/13

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO
PARA SEMENTES DE *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A.DC.**

PROJETO DE ORIGEM:

*Aplicabilidade do teste de tetrazólio para sementes
de espécies florestais nativas*

PLANO DE TRABALHO DE PESQUISA DO ALUNO

PIBIC 2012 - 2013

**Curitiba
Abril de 2012**

SUMÁRIO

1. Introdução e contextualização	1
2. Objetivo	3
3. Roteiro de atividades do aluno	3
4. Cronograma	5

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

O *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC conhecida popularmente como jaracatiá ou mamão-de-veado é uma espécie arbórea nativa, pertencente à família Caricaceae (LORENZI, 2002). Por se tratar de uma planta pioneira, é presença obrigatória na recomposição de áreas degradadas, além de possuir um grande potencial de exploração, pois a partir do caule e dos frutos, podem ser fabricados doces e compotas (TRABAQUINI et al., 2008 citado por SILVA et al., 2009), tornando-se uma possível fonte de renda para os agricultores. No entanto devido ao uso indiscriminado da planta, esta está incluída na Lista Vermelha de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná (CARVALHO, 2006).

A dispersão das sementes do jaracatiá ocorre por pássaros e macacos, a qual é afetada diretamente pelo desmatamento e fragmentação dos habitats ocasionando a diminuição e extinção de seus dispersores, prejudicando assim a propagação desta espécie (TRABANQUINI et al., 2008 citado por Silva et al., 2009).

Segundo Davide e Silva (2008), as sementes são responsáveis pela dispersão e perpetuação da espécie. No entanto o princípio para a obtenção de plântulas também tem relação com a função de uma semente, com a qualidade que apresenta. Todavia, a maioria dos programas de implantação de florestais nativas no Brasil não dispensa grande atenção a qualidade das sementes, por essa razão, busca-se desenvolver e aperfeiçoar testes rápidos e confiáveis que ofereçam a caracterização do potencial e qualidade fisiológica das sementes para fins de semeadura, armazenamento (FIGLIOLIA et al., 1993).

Diferentes testes devem ser utilizados para avaliar a qualidade das sementes. Dentre eles pode-se citar o teste de tetrazólio que vem se destacando, pois, além de avaliar vigor, pode determinar a viabilidade das sementes após tratamentos pré-germinativos, danos por secagem, por insetos e umidade bem como, para detectar danos mecânicos e/ou beneficiamento (BRASIL, 2009).

Segundo Marcos Filho (2005), o teste de tetrazólio se baseia na alteração da coloração dos tecidos vivos em presença de uma solução de sal de tetrazólio, refletindo a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade

respiratória. Quando as sementes são imersas na solução de tetrazólio, esta se difunde através dos tecidos ocorrendo, nas células vivas, a reação de redução, resultando na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifênilformazan, indicando haver atividade respiratória e, conseqüentemente, que o tecido é viável. Tecidos inviáveis não reagem com a solução, permanecendo na sua cor natural e tecidos em deterioração apresentam coloração vermelho-intenso.

A importância de uma metodologia de fácil aplicação, visando determinar o poder germinativo através de um teste rápido, ficou evidenciada para o uso do teste de tetrazólio em sementes de espécies florestais nativas como para Ferreira et al. (2001) com sucupira-branca (*Pterodon pubescens*), Mendonça et al. (2001) com louro-pardo (*Cordia trichotoma*), Santos et al. (2006) com branquilha (*Sebastiania commersoniana*), Oliveira et al. (2005) com ipê (*Tabebuia serratifolia*) e Fogaça (2003) com guaritá (*Astronium graveolens*) e angico (*Parapiptadenia rígida*).

Os dados obtidos pelo teste de tetrazólio podem ser utilizados no estabelecimento de bases para a comercialização, determinação do ponto de colheita e controle de qualidade das sementes durante o armazenamento (MARCOS FILHO et al., 1987). Entretanto, para o jaracatiá assim como para várias espécies nativas que podem apresentar comportamento recalcitrante (CARVALHO, 2006), a metodologia adequada para análise de vigor das sementes, segundo seu potencial de armazenamento, bem como as condições ideais de armazenamento, ainda é inexistente.

Em complemento ao teste de tetrazólio pode-se citar o teste de condutividade elétrica que se baseia no princípio de que, com o processo de deterioração, ocorre a lixiviação dos constituintes celulares das sementes embebidas em água, devido à perda da integridade dos sistemas de membranas celulares. Desse modo, baixa condutividade significa alta qualidade da semente, e alta condutividade sugere o menor vigor desta, ou seja, maior saída de lixiviados da semente (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). Esta avaliação é de grande interesse na determinação do vigor de sementes, em virtude de permitir que o processo de deterioração seja detectado em sua fase inicial, possibilitando que os

efeitos nessa fase sejam reduzidos ou minimizados (DIAS; MARCOS FILHO, 1995). Teste este que também já vem sendo realizado em algumas espécies florestais como para Marques et al. (2002) com sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*), Santos e Paula (2005) com branquilha (*Sebastiania commersoniana*) e Soto et al. (2009) com farinha-seca (*Albisia hassleri*).

2. OBJETIVO

Padronizar a metodologia do teste de tetrazólio e avaliar a aplicabilidade deste teste na avaliação do vigor de sementes de *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A.DC., submetidas a diferentes condições de armazenamento.

3. ROTEIRO DE ATIVIDADES DO ALUNO

O experimento será realizado no laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica – Campus Toledo, no período de agosto de 2012 a julho de 2013. Serão coletados os frutos de matrizes na região oeste do Paraná nos meses de janeiro a março de 2013, época de frutificação (LORENZI, 2002).

Em seguida, as sementes serão separadas em diferentes lotes de acordo com o tempo de armazenamento, sendo o lote I: sementes recém-colhidas; lote II: sementes armazenadas por 15 dias; lote III: sementes armazenadas por 30 dias; sendo o armazenamento em geladeira com temperatura média de 10°C e em sacos plásticos impermeáveis de polietileno com 0,15mm de espessura, adaptado Cavalcanti (2007), para as condições e prazos dos seguintes projetos.

O lote I será avaliado a partir da determinação do peso de mil sementes e do grau de umidade, metodologia adaptada de Brasil (2009). O grau de umidade também será aplicado para os demais lotes.

Para o teste de tetrazólio, as sementes do lote I serão submetidas aos seguintes pré-tratamentos: sementes intactas ou seccionadas longitudinalmente submetidas à embebição em água destilada por 24 horas, e sementes embebidas entre rolo de papel germitest, umedecido com água 2,5 vezes o peso do papel. Estas serão acondicionadas em câmaras de germinação reguladas a temperatura de 25°C, no período de 24 horas. Decorrido as preparações descritas acima, as sementes do lote I serão imersas em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio

por 2h30min na concentração de 0,5% e em câmara BOD, a 35°C no escuro. Serão utilizadas 400 sementes, divididas em 4 repetições de 25 sementes em cada tratamento, metodologia baseada em Fogaça (2003).

Após a finalização da coloração, as sementes do lote I serão lavadas em água corrente e mantidas submersas até o momento da análise. As sementes intactas serão seccionadas longitudinalmente, com o auxílio de bisturi e com cuidado para não lesionar o embrião. A avaliação será feita analisando a uniformidade da coloração, com auxílio de um microscópio estereoscópio.

As sementes do lote I, após a definição dos pré-condicionamentos adequados, serão imersas em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio por 1h30min, 2h30min e 3h30min nas concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75% em câmara BOD, a 35°C no escuro. Serão utilizadas 900 sementes, com quatro repetições de 25 sementes, metodologia baseada em Fogaça (2003).

Paralelamente, será realizado o teste de germinação para fins comparativos ao teste de tetrazólio. Será utilizado areia, papel germiteste e vermiculita. O substrato Germitest e a areia serão previamente autoclavados. Cada Gerbox previamente higienizado com lisoforme e álcool 70%, conterá uma camada de aproximadamente 2cm de areia ou vermiculita ou 3 folhas de Germitest. Os substratos areia e vermiculita serão umedecidos com água destilada até o limite de saturação, e o germitest umedecido 2,5 vezes o peso do papel. Os tratamentos serão acondicionados em câmara de germinação (BOD) com temperatura constante de 30°C e fotoperíodo de 12hs. Serão utilizadas quatro repetições de 25 sementes, totalizando 300 sementes. A avaliação será realizada através da contagem diária das sementes germinadas até a sua estabilização, levando em consideração as sementes com raiz maior ou igual a 2mm (HADAS, 1976), também será determinada a velocidade média de germinação (v), calculada segundo Labouriau (1983).

As sementes dos lotes II e III, após a definição dos procedimentos adequados (melhor concentração da solução, tempo de exposição e substrato para germinação), serão submetidas ao teste de tetrazólio para avaliar o vigor das sementes armazenadas. Serão utilizadas 100 sementes, com quatro repetições de

25 sementes, para cada lote armazenado. A avaliação será feita com o auxílio de microscópio estereoscópio e o resultado será expresso em porcentagem de viabilidade.

Além do teste de tetrazólio, sementes dos três lotes serão submetidos ao teste de condutividade elétrica, também utilizado para avaliar o vigor das sementes. Para este teste serão utilizadas 4 repetições de 50 sementes para cada lote. Cada repetição será previamente pesada e posteriormente transferida para recipientes com 75ml de água deionizada e autoclavada, permanecendo à temperatura de 25°C. Após 24 horas, se fará a leitura da solução de embebição, utilizando condutivímetro. O resultado da leitura será dividido pelo peso da subamostra, expresso em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de semente, metodologia adaptada de Soto et al.,(2009).

Os experimentos serão conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para determinar as melhores condições do teste de tetrazólio será utilizado um delineamento experimental com arranjo fatorial 3X3, (melhor tempo de exposição e concentração do sal). Para confirmar a confiabilidade do teste de tetrazólio, serão comparadas as médias dos testes de germinação com as médias da porcentagem de viabilidade obtidas nos testes de tetrazólio. Assim os dados obtidos, serão submetidas à análise de variância (teste F), e suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. CRONOGRAMA

Ano	2012					2013						
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Revisão Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Seleção de matrizes			x	x	x							
Coleta de sementes e beneficiamento					x	x	x					
Teste de germinação						x	x	x				
Teste de Tetrazólio lote I						x						
Teste de Tetrazólio lote II e III							x	x				
Teste de Condutividade elétrica						x	x	x				
Análise e interpretação dos resultados										x	x	x
Publicação e uso dos resultados na divulgação do projeto										x	x	x
Elaboração e Entrega de Relatórios						x	x				x	x