



TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE ORQUÍDEAS

Ceci Castilho Custódio, Silvério Takao Hosomi, Nelson Barbosa Machado Neto

PROBLEMÁTICA

As orquídeas são plantas pertencentes a uma família botânica abrangente que apresenta representantes em praticamente todos os biomas do globo sendo a segunda família em número de espécies, atrás apenas da Asteraceae. As diversas espécies desenvolveram adaptações a estes ambientes de modo que a diversidade de habitat, desde terrícolas, rupícolas, epífitas etc, formas florais, tamanho das sementes, agentes polinizadores o que as tornaram atrativas aos humanos que desenvolveram uso medicinal, condimentar e ornamental. O hábito de colecionar também é muito comum e existem coleções admiráveis reunidas em orquidários. No entanto, o desmatamento legal ou ilegal e a degradação dos ambientes naturais vêm colocando muitas das espécies desta família em risco. Assim, a multiplicação via sementes, que permite a recombinação genética, é fundamental para a produção de mudas com objetivo de reintrodução e preservação em coleções *ex situ*, enquanto para a produção de mudas ornamentais a multiplicação assexuada assume maior importância. Para utilização das sementes é necessário o conhecimento da viabilidade destas sementes e para isso pode-se utilizar a germinação que em orquídeas pode ser simbiótica ou assimbiótica ou utilizar uma metodologia indireta, conhecida como teste de tetrazólio, que verifica regiões vivas na semente mediante a coloração de células que apresentam atividade respiratória. Deste modo, conduzir o teste de tetrazólio de maneira adequada é uma etapa importante para selecionar as porções de sementes que devem ser preservadas para fins de produção de mudas.

CONHECIMENTO PRÉVIO

O teste de tetrazólio em sementes teve início a partir de trabalhos pioneiros anteriores a segunda guerra mundial na Alemanha e Japão. Com o término da guerra, houve um grande progresso no aprimoramento deste teste pelos americanos. Em 1985 o Manual do Teste de Tetrazólio (Moore, 1985) publicado pela International Seed Testing Association (ISTA) contemplava metodologia para 650 espécies.

No Brasil, este teste ganhou visibilidade para determinação de viabilidade e vigor, principalmente para uso em sementes de soja a partir da publicação de manual específico em 1985 pela Embrapa, seguido de atualizações posteriores, cursos para treinamentos e desenvolvimento do teste para sementes de algodão, amendoim, feijão, girassol, milho, soja, trigo, de espécies forrageiras e hortícolas em diversas instituições de pesquisa e universidades brasileiras (França-Neto e Krzyzanowski, 2020).

Em orquídeas, o tamanho diminuto da semente, que varia de 0,05 a 6 mm (Arditti e Ghani, 2000), técnicas de captura de imagens tiveram que ser desenvolvidas para facilitar a interpretação da coloração das sementes, e devido ao fato dessas sementes não apresentarem o aparato necessário para o catabolismo das substâncias de reserva e reativação do metabolismo respiratório, foi necessário desenvolver o pré-condicionamento das sementes em solução de sacarose (Hosomi

et al., 2011). Adicionalmente, algumas sementes de orquídeas apresentam o tegumento escurecido que necessita ser descolorido, após a coloração com a solução de tetrazólio, para que seja possível a visualização do embrião e outras apresentam o tegumento com uma camada mais resistente que dificulta a penetração da solução de tetrazólio, o que levou ao desenvolvimento de metodologia utilizando hipoclorito de sódio como agente descolorante ou escarificante (Custódio et al., 2016).

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, com *Cattleya tigrina* A.Rich e *Cattleya walkeriana* Gardner, os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial $3 \times 4 \times 4$, com três repetições por tratamento. As sementes de cada espécie foram por 24h ou pré-condicionadas em água ou em 10% sacarose ou não pré-condicionadas. Estas foram então distribuídas entre quatro tempos de exposição (3, 6, 12 e 24h) e quatro concentrações de solução de tetrazólio (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0% w/v).

No segundo, sementes pré-condicionadas com solução de sacarose 10% por 24h, de *Dactylorhiza fuchsii* foram escarificadas com 0,5% de hipoclorito de sódio (NaOCl) por quatro tempos de exposição (1; 2,5; 5 e 10 minutos) com ou sem vácuo e depois coloridas com solução de tetrazólio 1%. Também, sementes de *Vanda curvifolia* foram pré-condicionadas com solução de sacarose 10% por 24h, coloridas com solução de tetrazólio 1% e depois, para descoloração do tegumento, incubadas em 0,5; 1; 1,5 ou 2% em NaOCl por 5, 10, 15 e 40 minutos.

A coloração com a solução de tetrazólio foi conduzida a 40 °C, por 24h, no escuro. Cada repetição foi conduzida com 10 a 20 mg de semente.

As avaliações de viabilidade foram conduzidas por análise digital de imagens (Hosomi et al., 2011). Gotas contendo as sementes foram distribuídas em lâminas de vidro para microscopia e as imagens capturadas por um scanner de mesa HP G2710 com alta resolução para obtenção de imagens de qualidade e que pudessem ser amplificadas usando programas de computador como o Paint®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar que as sementes de *Cattleya tigrina* (Figura 1) que foram pré-condicionadas por 24h em sacarose e coradas com tetrazólio à 1% por outras 24h, apresentaram o melhor resultado de viabilidade e uma alta relação com a germinação (97% de viabilidade e 100% de germinação; Figura 1; A-4) com prazos menores não houve essa relação tão estreita com a germinação (Figura 1; A-1 a A-3). As sementes não pré-condicionadas apresentaram menor viabilidade (Figura 1, B-1 a B-4). O mesmo comportamento foi demonstrado em *Cattleya walkeriana* (94% de viabilidade e 98% de germinação, dados não apresentados).

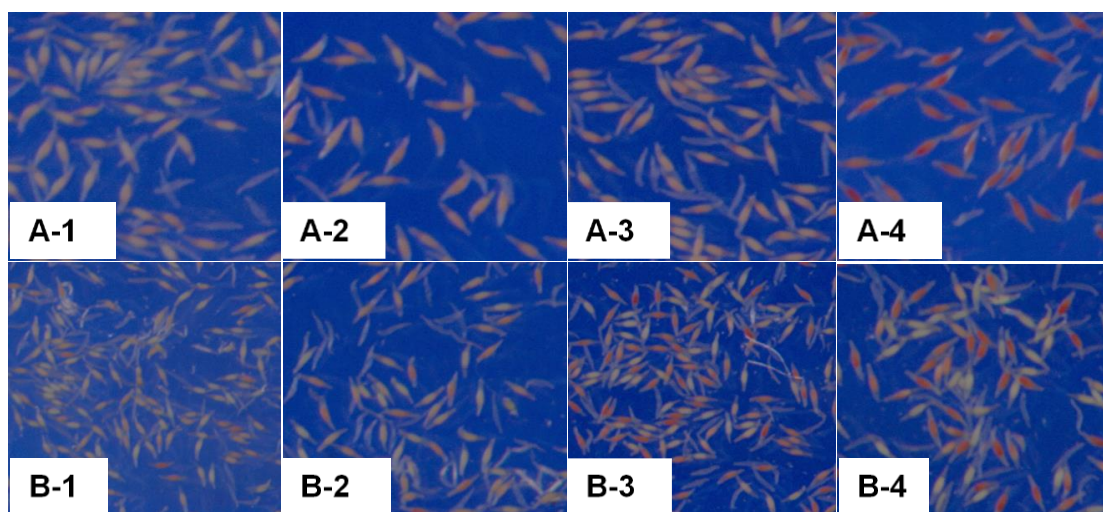


Figura 1 - Imagens digitalizadas em scanner de mesa de sementes de *Cattleya tigrina* submetidas ao teste de tetrazólio expostas por um período de 6 horas à solução. A- Sementes pré-condicionadas em solução de sacarose a 10% e B- sementes sem pré-condicionamento. Concentrações de 1- 0,1%; 2- 0,25%; 3- 0,5% e 4- 1% do sal de tetrazólio (HOSOMI et al., 2011).

Para sementes de *Vanda curvifolia* o clareamento com hipoclorito de sódio a 0,5% por tempos variando de 5 a 10 minutos não apresentou diferenças entre si (Figura 2 – III - IV) ao passo que o aumento da concentração do hipoclorito leva a perda de viabilidade (Figura 2 – V a VI). Para *Dactylorhiza fuchsii* não foi preciso o clareamento, mas sim uma escarificação prévia com hipoclorito de sódio 0,5% por 2,5 minutos antes do pré-condicionamento, para permitir que tetrazólio pudesse penetrar adequadamente na semente (dados não apresentados).

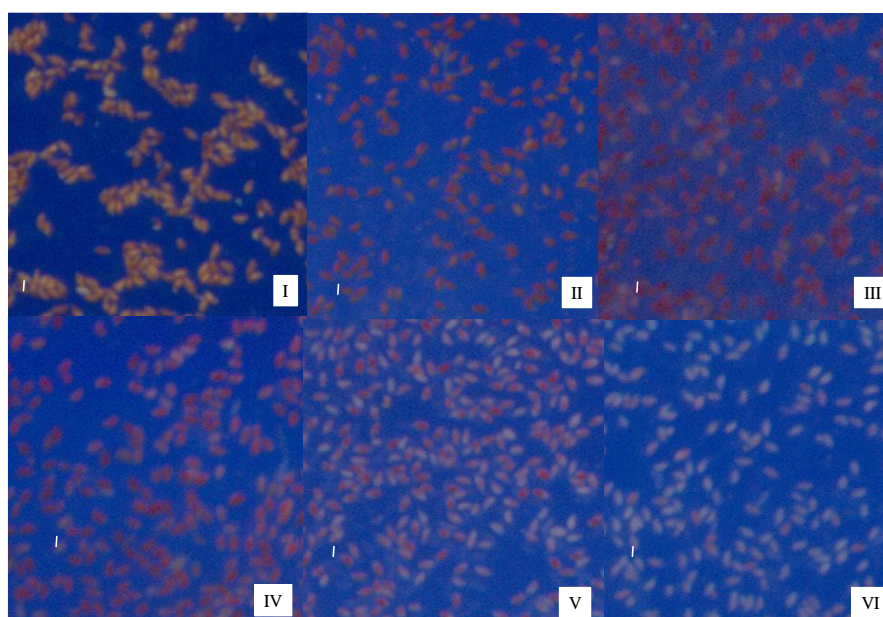


Figura 2 - Viabilidade de sementes de *Vanda curvifolia* pré-condicionadas com sacarose após clareamento com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio por períodos variados. (I) Sementes umedecidas; (II) sementes coradas com tetrazólio não submetidas ao clareamento; (III) NaOCl 0,5% por 10 minutos; (IV) NaOCl 0,5% por 20 minutos; (V) NaOCl a 2% por 20 minutos; e (VI) NaOCl a 2% durante 40 minutos. Barras de escala - 134 µm. (CUSTÓDIO et al., 2016)

APLICAÇÃO PRÁTICA

O uso do teste de tetrazólio, como preconizado nos trabalhos citados (Hosomi et al., 2011; Custódio et al., 2016) em sementes de orquídeas tem sido utilizado por diversos pesquisadores e em diversas espécies de orquídeas dos mais diferentes grupos (Seaton et al., 2018; Figura 3) com variações na metodologia resumidas na Tabela 1, indicando as que fornecem resultados mais adequados.

Tabela 1 – Resumo dos procedimentos metodológicos e dos resultados obtidos em diferentes grupos de orquídeas.

Grupo	Pré-condicionamento (sacarose 10%) 24h	Escarificação pré coloração com tetrazólio (hipoclorito de sódio 0,5%) por 5 min	Clareamento pós coloração com tetrazólio (hipoclorito de sódio 0,5%) por 5 a 10 min	Resultado
<i>Cattleya</i>	-	-	-	-
<i>Disa</i>	+	-	-	+
<i>Grammatophyllum</i>				
<i>Dactylorhiza</i>	-	-	-	-
	+	+	-	+
<i>Vanda</i>	-	-	-	-
<i>Aerides</i>	+	-	+	+

- ausência de utilização ou resultado inadequado; + utilização ou resultado adequado.

Ele é eficiente para a determinar a viabilidade das sementes de orquídeas e pela alta relação com a germinação (HOSOMI et al., 2012), pode ser utilizado para monitorar lotes de sementes armazenados para conservação.

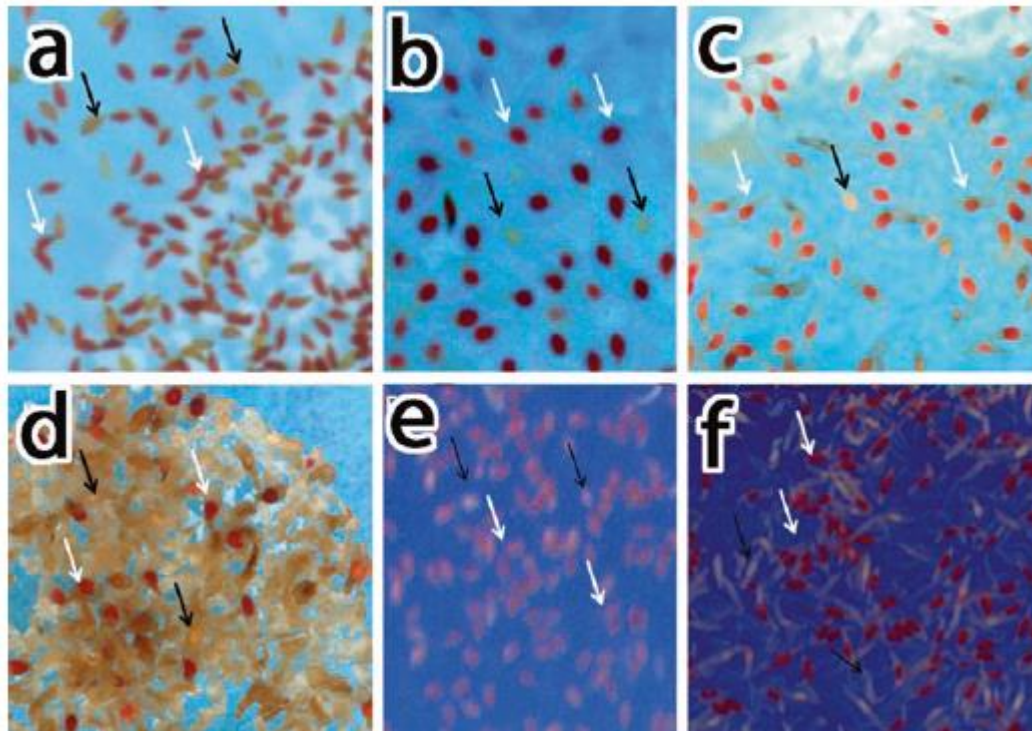


Figura 3 - Sementes coloridas com tetrazólio de espécies com diferentes formas de vida. (a) *Aerides odorata*, espécie epífita de floresta tropical úmida; (b) *Grammatophyllum speciosum*, espécie epífita de floresta tropical úmida; (c) *Dactylorhiza fuchsii*, geófito tuberoso de pastagens temperadas e florestas abertas; (d) *Disa uniflora*, geófito tuberosa encontrada crescendo ao longo de riachos perenialmente úmidos; (e) *Vanda curvifolia*, chamaefito epifítico de floresta tropical úmida; (f) *Cattleya intermedia*, epífita com pseudobulbos, da Mata Atlântica (SEATON et al., 2018).

LITERATURA CITADA

ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytology**, v. 145, p. 367-421, 2000.

CUSTÓDIO, C.C.; MARKS, T.R.; PRITCHARD, H.W.; HOSOMI, S.T.; MACHADO-Neto, N.B. Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). **Seed Science and Technology**, v. 44, p. 177-188, 2016.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F.C. **Teste de tetrazólio para a determinação do vigor em sementes**. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França-Neto, J.B.; Marcos-Filho, J. Vigor de sementes: conceitos e testes. 2 ed. Londrina: ABRATES, 2020. P. 404-417.

HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTODIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, p. 178-189, 2011.



HOSOMI, S.T. et al. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 1, p. 127-136, 2012.

MOORE, R.P. **Handbook on tetrazolium testing**. Zurich: International SeedTesting Association, 1985. 99p.

SEATON, P.T. et al. **Orchid seed and pollen: a toolkit for long-term storage, viability assessment and conservation**. In: Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 71-98.