

## **Adequação do teste tetrazólio para concentração, temperatura e tempo de embebição, e sua influência na qualidade fisiológica de sementes de grão-de-bico**

Cândido Alves da Costa, João Batista C. Menezes, Josiany Thamara Alves de Souza, Delacyr da Silva Brandão Junior, Humberto Alencar Paraíso, Luan Souza de Paula Gomes & Guilherme Brandão Santos

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Caixa Postal 135, 39404-547, Montes Claros, MG; E-mail: candido-costa@ufmg.br

### **Resumo**

O trabalho objetivou adequar o teste de tetrazólio para sementes de grão-de-bico. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2 (três períodos de embebição e duas concentrações da solução de tetrazólio), com quatro repetições. Foram utilizados dois lotes de sementes (1-Janaúba e 2-Januária). A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada pelos testes de germinação e de tetrazólio. Foram determinadas quatro classes de vigor das sementes. A germinação das sementes de Januária foi superior à de Janaúba. O lote 2 apresentou valores de massa seca e de plântulas normais superiores aos do lote 1. Não houve diferenças estatísticas para massa seca e umidade de semente dos dois lotes. No teste do tetrazólio, não houve diferença entre os lotes quanto às classes de vigor. A embebição das sementes a 41 °C/6 h, resultou em menor porcentagem de sementes vigorosas/viáveis em comparação a 41 °C/4 h e 30 °C/18 h, indicando danos às sementes. As concentrações de tetrazólio não tiveram influência nas classes de vigor e viabilidade de ambos os lotes. No lote 1, houve interação significativa para classes 2 e 4 e temperatura/tempo de embebição. A temperatura e o tempo de embebição de 41 °C/6 h e 30 °C/18 h apresentaram menor e maior percentuais nas classes 2 e 4, respectivamente. No lote 2 houve interação significativa apenas para a classe 4. A temperatura e tempo de embebição de 41 °C/6 h apresentaram maior percentual de sementes na classe 4. Conclui-se que o teste de tetrazólio foi eficiente para a determinação do vigor e da viabilidade das sementes; a concentração de 0,075% é indicada, pois utiliza menor quantidade de sal de tetrazólio; a combinação de 41 °C/6h é indicada devido à rapidez e à influência positiva no percentual de sementes viáveis e vigorosas (classes 1 e 2).

**Palavras-chave:** *Cicer arietinum*, germinação, vigor, viabilidade de sementes.

### **Abstract**

**Adequacy of the tetrazolium test for concentration, temperature and imbibition time, and their influence on the physiological quality of chickpea seeds.**

The aim of this study was to adjust the tetrazolium test for chickpea seeds. Three imbibition times and two concentrations of the tetrazolium solution were used in the completely randomized design, in a 3x2 factorial scheme, with four replications. Two seed lots (1-Janaúba and 2-Januária) were used. Germination of the Januária seeds was superior to that of Janaúba. Lot 2 presented values of dry mass and normal seedlings higher than those of lot 1. There were no statistical differences for dry mass and seed moisture of the two lots. In the tetrazolium test, there was no difference between batches regarding vigor classes. Seed imbibition at 41 °C /6 h resulted in a lower percentage of

vigorous / viable seeds compared to 41 °C/4 h and 30 °C /18 h, indicating seed damage. Tetrazolium concentrations did not influence the vigor and viability classes of both lots. In lot 1, there was significant interaction for classes 2 and 4 and temperature /imbibition time. The temperature and the imbibition time of 41 °C/6 h and 30 °C/18 h presented lower and higher percentages in classes 2 and 4, respectively. In lot 2, there was significant interaction only for class 4. The temperature and imbibition time of 41 °C/6 h presented a higher percentage of seeds in class 4. It was concluded that the tetrazolium test was efficient for determination of vigor and of seed viability; the concentration of 0.075% is indicated because it uses less amount of tetrazolium salt; the combination of 41 °C/6h is indicated because of the rapidity and positive influence on the percentage of viable and vigorous seeds (classes 1 and 2).

**Keywords:** *Cicer arietinum*; germination, seed vigor, seed viability.

### Introdução

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) é considerado mundialmente uma das mais importantes leguminosas de grãos alimentares (Nascimento, 2016). Seu cultivo ocorre em diversas partes do mundo e em determinadas regiões apresenta grande importância econômica e social. É caracterizada por apresentar um bom valor nutritivo e pode ser utilizada na alimentação humana, na medicina e na indústria.

O grão-de-bico tem demonstrado uma excelente adaptação aos solos do cerrado brasileiro (Artiaga et al., 2015). Vários estudos foram realizados em diferentes épocas e regiões na tentativa de encontrar as melhores condições de cultivo. Informações sobre produtividade, melhor época de plantio, tipo de solo, irrigação e cultivar, há muito tempo vem sendo trabalhadas. Faz-se necessário um estudo bem aprofundado de outros fatores, como por exemplo, melhorias nos processos de produção de sementes.

Alta produção de sementes influencia na disponibilização das sementes aos produtores, visto que existe uma carência de sementes de grão-de-bico no Brasil. A qualidade é um fator determinante no processo de estabelecimento das lavouras, sendo essencial que as sementes apresentem elevada qualidade física, fisiológica, genética e sanitária.

Muitos testes são utilizados para avaliar a qualidade física e fisiológica das sementes no Brasil. O teste de germinação é um dos mais utilizados devido determinar o valor das sementes destinadas à semeadura, ser de fácil reprodução e também por permitir a comparação entre lotes (Marcos Filho; 2005).

Não há metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes (RAS) recomendando o uso do teste de tetrazólio em sementes de grão-de-bico. Esse teste apresenta como vantagens a agilidade e, a análise detalhada do vigor e da viabilidade das sementes. Nas análises é possível identificar os tipos de danos ocasionados na semente responsáveis pela perda do vigor e da viabilidade. As partes que não são coradas, geralmente brancas, representam os tecidos mortos das sementes. De forma geral, é possível diagnosticar a presença, a localização e a natureza dos distúrbios que podem ocorrer nos tecidos da semente (França Neto, 1998; Marcos Filho, 2005).

Na realização do teste de tetrazólio, é necessário definir as condições de pré-condicionamento das sementes como temperatura e tempo de embebição. Esse processo consiste em hidratar a semente com a finalidade de promover a atividade metabólica e respiratória da semente preparando a mesma para o teste. Isso permite uma maior difusão da solução de tetrazólio e definição da coloração. Outros parâmetros que também devem ser definidos são a concentração da solução de cloreto 2,3,5-trifenil

cloreto de tetrazólio, a temperatura e o tempo de exposição das sementes ao processo de coloração. É importante ressaltar que todos esses fatores são estabelecidos em função da espécie estudada.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de adequar o teste de tetrazólio para sementes de grão-de-bico visando à avaliação de período e temperatura de pré-condicionamento das sementes, além de concentração das soluções de tetrazólio. Com isso, propor uma separação em classes quanto à viabilidade e vigor das sementes e também buscar redução no tempo de execução do teste e na concentração da solução de tetrazólio.

### Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (LAS-ICA/UFMG). O delineamento estatístico empregado na avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi o inteiramente casualizado (DIC) com 12 tratamentos e quatro repetições em esquema fatorial 2x3x2, sendo lotes, tempo de embebição e concentração da solução do sal de tetrazólio, respectivamente. Foram utilizados dois lotes de sementes oriundos de campos experimentais. O lote 1 foi obtido em Janaúba (lat. 15°29'S, long. 44°22'W, classificação climática Köppen: Aw, altitude: 434 m). O lote 2 foi oriundo de Janaúba (lat. 15°48'S, long. 43°18'W, classificação climática Köppen: Aw, altitude: 533 m).

As sementes de cada lote foram submetidas a três períodos e temperaturas de embebição: 4 h de embebição a 31 °C; 6 h de embebição a 41 °C e 18 h de embebição a 30 °C. Posteriormente, as sementes foram embebidas em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio nas concentrações de 0,1% e 0,075%. As definições das concentrações de tetrazólio, dos períodos de tempo e das temperaturas de embebição foram embasadas em recomendações para sementes de soja e de grão-de-bico sugeridas pelas Regras para Análise de Sementes e pelo Manual of Seed Handling in Genebanks (Rao et al., 2006; Brasil, 2009). As sementes permaneceram em solução de tetrazólio durante 4 h a 30 °C. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, no programa estatístico R.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada pelos testes de germinação e de tetrazólio. O teste de germinação foi conduzido em câmara BOD em temperatura constante de 20 °C. O substrato empregado na realização do teste foi o papel Germitest® em sistema de rolo, sendo usadas quatro repetições de 25 sementes cada.

As sementes foram distribuídas no substrato umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. As avaliações foram realizadas diariamente (protrusão de radícula). No quinto e oitavo dia após a montagem do teste de germinação, foi realizada a contagem do número de plântulas normais. Consideram-se como normais as plântulas com estruturas essenciais completas, bem desenvolvidas, proporcionais e sadias. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas Brasil (2009).

Para a determinação de massa de matéria seca de plântulas e sementes, foi utilizado o método da estufa a 65 °C, durante 72 horas, para o grau de umidade das sementes foi utilizado o método da estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 horas. Os dados de massa de matéria seca de sementes foram convertidos para porcentagem.

No teste de tetrazólio, foram avaliadas 25 sementes em cada repetição, de forma individual, sendo feito um seccionamento longitudinal na semente separando os cotilédones. Foram observadas as partes externa e interna da semente, verificando-se a

ocorrência de danos nos cotilédones e no eixo embrionário. Também foi verificada a profundidade e a extensão de cada dano. Em seguida, foi realizado o agrupamento das sementes em grupos de sementes viáveis e vigorosas, viáveis e não vigorosas e não viáveis, sendo esse processo baseado nos danos observados nas estruturas das sementes. Para definição de classes de vigor de acordo com o teste de tetrazólio foi utilizada a proposta de Paraíso (2016), sendo classe 1 as sementes viáveis e vigorosas; classe 2 as sementes viáveis e vigorosas; classe 3 as sementes viáveis e não vigorosas; e classe 4 as sementes não viáveis.

Paraíso (2016) propôs essa classificação para facilitar a determinação de viabilidade e vigor das sementes. A classe 1 foi formada por sementes de tecidos firmes apresentando uma coloração uniforme ao longo de toda a extensão do embrião e com ausência de danos. A classe 2 foi composta por sementes de tecidos geralmente firmes de coloração quase toda uniforme, mas com presença de danos, mas são consideradas viáveis e vigorosas. Os danos encontrados nessa classe estão longe do eixo embrionário e das áreas vitais da semente. A classe 3 agrupou sementes com presença de danos no eixo embrionário ou nas áreas vitais das sementes. Na classe também foi possível observar sementes apresentando grandes extensões de tecidos mortos e vários tipos de danos atuando simultaneamente. Entretanto, as sementes pertencentes a essa classe ainda foram consideradas viáveis, porém de não vigorosas. A classe 4 foi caracterizada por sementes com presença de danos que comprometem o desenvolvimento normal da plântula, ou seja, sementes inviáveis.

## Resultados e Discussão

No teste de germinação, as sementes do lote 2 apresentaram média estatisticamente superior ao percentual de germinação do lote 1. Houve diferença estatística no número de plântulas normais, sendo que sementes do lote 2 tiveram maior média de plântulas normais do que as do lote 1. Em relação à massa de matéria seca de plântulas, as médias das plântulas do lote 2 foram superiores do que as do lote 1. As médias de massa de matéria seca e de teor de umidade de semente dos dois lotes não apresentaram diferença estatística (quadro 1).

A partir do teste de germinação é possível afirmar que as sementes do lote de Janaúria (lote 2) possuem viabilidade maior que as sementes do lote de Janaúba (lote 1). As sementes foram armazenadas nas mesmas condições e pelo mesmo período de tempo. As diferenças encontradas no teste de germinação entre os lotes podem ser explicadas não somente pelo fato do cultivo em diferentes localidades, mas também pelo fato de que o campo experimental onde as sementes do lote de Janaúba foram cultivadas enfrentou adversidades climáticas e fitossanitárias.

Os resultados de porcentagem de germinação, número de plântulas normais e massa de matéria seca de plântulas normais do lote 2 mostra que as sementes desse lote são mais vigorosas do que as do lote de Janaúba.

No teste do tetrazólio, em relação à classificação de sementes vigorosas/viáveis e viáveis, não houve diferença estatística entre os lotes. Quanto ao período e temperatura de embebição a combinação 41 °C – 6 h diferiu das demais possibilitando a identificação de sementes vigorosas/viáveis (quadro 2).

Os resultados do teste de tetrazólio indicaram que os dois lotes avaliados têm a mesma viabilidade e vigor, resultado não confirmado pelo teste de germinação. O teste de tetrazólio indicou atividade metabólica nos tecidos das sementes, resultado nem sempre corroborado pelo teste de germinação. Resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al., (2010) em sementes de pepino. Em relação às temperaturas

e tempos de embebição, apenas para o tempo de 41 °C – 6 h houve diferença estatística entre as classes (Vigorosas/Viáveis e Viáveis), para as demais temperaturas e tempos não houve diferença estatística entre as médias. Estes resultados indicam que para sementes de grão-de-bico a temperatura de 41 °C com tempos menores de embebição (quatro ou seis horas) é suficiente como padrão para o teste de tetrazólio. Trabalho realizado por Rao et al., (2006) recomenda o pré-condicionamento das sementes de grão-de-bico em um tempo de 18 horas e que, posteriormente, as mesmas sejam expostas numa solução de tetrazólio com concentração de 1,0% e a 30 °C num período de 6 a 24 horas. Essa recomendação de 1,0% na concentração da solução de tetrazólio não corrobora com os resultados encontrados neste trabalho. As concentrações de tetrazólio não influenciaram significativamente nas classes de vigor e viabilidade nos dois lotes (quadros 3 e 4). No lote 1, houve interação significativa para as classes (2 e 4) e temperatura e tempo de embebição, sementes classificadas na classe 2 são sementes consideradas vigorosas e viáveis enquanto que as sementes classificadas na classe 4 são consideradas inviáveis. A temperatura e tempo de embebição de 41°C - 6 h e 30 °C – 18 h apresentou menores percentuais de sementes na classe 2 e os maiores percentuais de sementes na classe 4.

No lote 2, houve interação significativa apenas para a classe 4. A temperatura e o tempo de embebição de 41 °C – 6 h apresentou o maior percentual de sementes na classe 4.

### Conclusão

A temperatura de 41°C e tempos de embebição de 4 e 6 horas, na concentração de 0,075% do sal de tetrazólio, apresentaram resultados satisfatórios para a adequação do teste para sementes de grão de bico. Uma menor concentração, 0,075%, é capaz de tornar o teste de tetrazólio mais rápido e com menor custo, pois quando comparado com a concentração de 0,1%, ainda permite a visualização do teste de forma bem clara.

### Referências

- Artiga, O.P., Spehar, C.R., Boiteux, L.S. & Nascimento, W.M. 2015. Avaliação de genótipos de grão de bico em cultivo de sequeiro nas condições de Cerrado. *Agrária* 10(1): 102-109.
- BRASIL, 2009. 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, 395p.
- França Neto, J.B., Krzyzanowski, F.C. & Costa, N.P. 1998. O teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 72 p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 116).
- Lima, L.B., Pinto, T.L. F. & Novembre, A.D.L.C. 2010. Avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de pepino pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, nº 1, p.060-068,
- Marcos-Filho, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, 495p.
- Nascimento, W.M. 2016. Hortaliças Leguminosas. In: Grão-de-bico. Ed. NASCIMENTO, W. M. N., Brasília – EMBRAPA, 232p.
- Paraiso, H. A. 2016. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de grão de bico. Montes Claros. 47p. Monografia (Graduação). Instituto de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, MG.

Rao, N. K., Hanson. J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8, Bioversity International, Rome, Italy. 163p.

Quadro 1- Dados médios da porcentagem de germinação, número de plântulas normais, massa de matéria seca de plântulas, massa de matéria seca de sementes e teor de umidade de dois lotes de sementes de grão-de-bico.

Lote	Germinação (%)	Plântulas normais	Matéria seca de plântulas (%)	Massa de matéria seca de sementes (%)	Teor de umidade (%)
Janaúba (lote 1)	78,50 b	7,75 b	86,43 a	90,70 <sup>ns</sup>	9,29 <sup>ns</sup>
Januária (lote 2)	93,50 a	15,65 a	84,39 b	90,09 <sup>ns</sup>	9,90 <sup>ns</sup>

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

Quadro 2 - Valores médios do teste de tetrazólio em função das classes de vigor e do período e temperatura de embebição de sementes de dois lotes de sementes de grão-de-bico.

Lote	Vigorosas/Viáveis	Viáveis
Janaúba (lote 1)	0,40 a	0,36 a
Januária (lote 2)	0,42 a	0,33 a
Temperatura/tempo de embebição	Vigorosas/Viáveis	Viáveis
41 °C - 4 h	0,47 a	0,33 a
41 °C - 6 h	0,32 b	0,34 a
30 °C - 18 h	0,44 a	0,37 a

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

Quadro 3 - Porcentagem de sementes de grão-de-bico (classes) em função da temperatura e período de embebição e da concentração de tetrazólio. Lote 1, Janaúba.

Classe (viabilidade e vigor de sementes)	Temperatura e período de embebição			Conc. Tetra %	
	41 °C - 4 h	41 °C - 6 h	30 °C - 8 h	0,075	0,100
C1	0,193 a	0,182 a	0,216 a	0,181a	0,213a
C2	0,294 a	0,208 b	0,233 b	0,252a	0,238a
C3	0,296 a	0,299 a	0,320 a	0,314a	0,295a
C4	0,203 b	0,289 a	0,216 b	0,232a	0,240a

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

Quadro 4 - Porcentagem de sementes de grão-de-bico (classes) em função da temperatura e período de embebição e da concentração de tetrazólio. Lote 2, Januária.

Classes (viabilidade e vigor de sementes)	Temperatura e período de embebição			Conc. Tetra %	
	41 °C – 4 h	41 °C – 6 h	30 °C – 8 h	0,075	0,100
C1	0,220 a	0,156 a	0,200 a	0,201a	0,183a
C2	0,256 a	0,242 a	0,247 a	0,263a	0,252a
C3	0,283 a	0,292 a	0,291 a	0,271a	0,307a
C4	0,230 ab	0,283 a	0,213 b	0,248a	0,237a

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