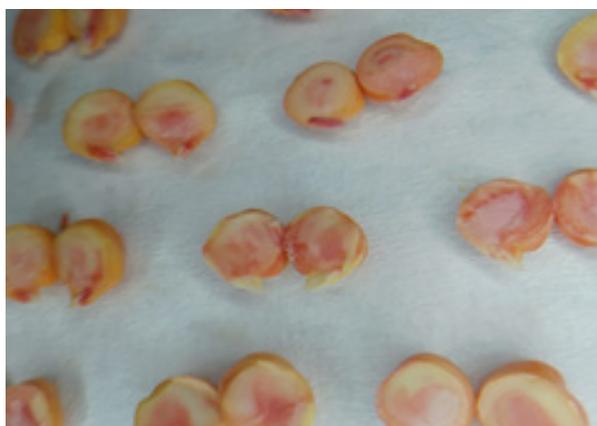


INFORME GOIANO

CIRCULAR DE PESQUISA APLICADA

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA EXECUÇÃO DE TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GRÃO DE BICO



Expediente:

Aurélio Rúbio Neto
Editor-chefe
Jacson Zuchi
Editor-chefe substituto
Tatianne Silva Santos
Supervisora editorial
Maria Luíza Batista Bretas
Revisora gramatical
Guilherme Cardoso Furtado
Diagramador
Cláudia Sousa Oriente de Faria
Coordenadora de produção gráfica

Autores:

Larissa Katiê Moreira Ribeiro
Engenheira Agrícola, Mestranda em Bioenergia e
Grãos (IF Goiano - Campus Rio Verde)
Jacson Zuchi
Professor de Tecnologia de Sementes, IF Goiano -
Polo de Inovação
Adriana Rodolfo Costa
Professora do Curso de Engenharia Agrícola da UEG,
Campus Sudoeste UnU Santa Helena de Goiás
Patrícia Cardoso Silva
Engenheira Agrícola, Mestranda em Ciências Agrá-
rias-Agronomia (IF Goiano - Campus Rio Verde)

Importância e relevância

Originária do sudeste da Turquia, a planta de grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*), pertencente à família Fabaceae, é classificada como herbácea anual (SINGH; SAXENA, 1999). É rica em nutrientes, contendo fibras, proteínas, vitaminas, carboidratos e sais minerais (NASCIMENTO et al., 1998), sendo que cerca de 80% da massa total do grão é composta por carboidratos e proteínas de alta digestibilidade (FERREIRA et al., 2006). Por isso, este grão, vem sendo utilizado principalmente para a alimentação humana e animal (MOHAMMADI et al., 2005). Segundo Artiaga et al. (2015), é a segunda leguminosa mais produzida no mundo.

O grão-de-bico é cultivado em 14,5 milhões de hectares em 58 países, com uma produção total de 14,7 milhões de toneladas, sendo que 73,5% na região da Ásia (FAO, 2018). No Brasil, a produção dessa leguminosa é primária e não atende à demanda interna de consumo, por isso,

faz-se necessário a importação de grande volume de grãos (AVELAR et al., 2018). Em 2019, o Brasil exportou 60 toneladas de grão de bico, dos quais 79% foram destinados à Índia, e importou pouco mais de 7 mil toneladas do México e Argentina (BRASIL, 2020) para atender o consumo interno.

O grão-de-bico é uma leguminosa tolerante ao déficit hídrico, com adaptação em regiões de clima seco e ameno e possui propriedades favoráveis de alta rusticidade, como baixa incidência de pragas e doenças (BRAGA et al., 1997). No entanto, para a expansão da espécie no Brasil é necessário se investir em uma série de fatores, incluindo a necessidade de melhorar o sistema de produção de sementes (PARAÍSO et al., 2019).

Existem dois tipos de grão-de-bico que se diferenciam quanto ao tamanho, forma e cor da semente: o desi e o kabuli. O primeiro possui sementes coloridas e tegumento espesso, ao passo que o segundo – o tipo kabuli – tem

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA EXECUÇÃO DE TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GRÃO DE BICO

sementes de tamanho maior, com tegumento fino, liso, coloração branca ou bege e formato de “cabeça de carneiro”, o que eleva seu preço no mercado (NASCIMENTO et al., 2016). A semente de grão-de-bico é constituída por tegumento e embrião, sem a presença de endosperma se tratando, portanto, de uma semente exalbuminosa (TRANCOSO, 2018).

A semente de grão-de-bico é composta por um embrião e dois cotilédones que são envoltos pelo tegumento (Figura 1A). Ela também dispõe do hilo, isto é, um ponto de fixação da semente à vagem, na parte superior ao hilo, possui um pequeno orifício denominado de micrópila, e no corpo da semente a rafe (Figura 1B).

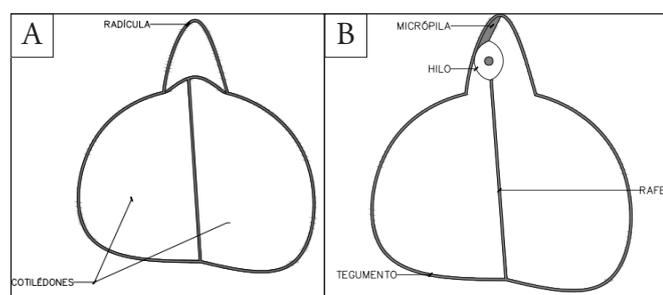


Figura 1. Sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), com o embrião envolto pelo tegumento (A) e a sementes de seus constituintes (B). Fonte: Os autores.

Dentre os testes possíveis de serem utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de sementes destaca-se o tetrazólio, o qual, segundo Araújo et al. (2019), é amplamente utilizado para estimar a viabilidade de sementes de várias espécies agrícolas como por exemplo feijão-caupi (RODRIGUES et al., 2015), arroz (CARVALHO et al., 2019), soja (PEREIRA et al., 2019) cenoura (LIMA et al., 2018). Essa notoriedade se deve à rapidez e eficácia no fornecimento de resultados (ARAÚJO et al., 2019) além de ser econômico (LIMA et al., 2018).

O teste de tetrazólio é um teste bioquímico, baseado na atividade enzimática das desidrogenases, as quais catalisam reações respiratórias no interior das células vegetais (CARVALHO et al., 2019). 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, 2009; FRANÇA NETO et al., 2000), outros aspectos devem ser considerados, sendo esta

adequação importante para eficácia do método (CARVALHO et al., 2017). O conhecimento dos aspectos botânicos, anatômicos e morfológicos da semente e plântula também são necessários para a boa interpretação do teste.

Neste sentido, objetiva-se com esta circular buscar ajustes dos procedimentos de preparo das sementes de grão-de-bico para condução adequada e eficaz do teste de tetrazólio.

Pré-condicionamento hídrico das sementes

O pré-condicionamento é indicado para sementes que estejam com o teor de água abaixo de 12% base úmida (b.u.). Caso não ocorra este procedimento, as sementes coloridas pela solução do sal de tetrazólio produzirão sintomas nas extremidades das radículas, com danos vermelhos escuros, que podem ser confundidos com danos mecânicos ou deterioração por umidade.

Para a realização do pré-condicionamento, necessita-se de “gerbox” com tela de alumínio, contendo 40 mL de água, pelo período de 24 horas a 25 °C conforme a figura 2. Durante o pré-condicionamento, a semente se hidrata lentamente, o que permite maior tempo para a reorganização das membranas, possibilitando que os tecidos se desenvolvam de maneira mais ordenada e reduzindo os riscos da ocorrência de danos ao eixo embrionário causados pela rápida embebição (BRACCINI et al., 1997).

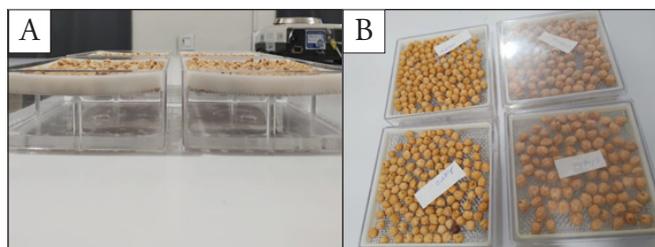


Figura 2. Pré-condicionamento de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), na visão lateral (A) e disposta sobre a tela de alumínio no gerbox na visão superior (B). Fonte: Os autores.

Após realização do pré-condicionamento das sementes, recomenda-se determinar o teor de água destas. Para a determinação o teor de água das sementes de grão-de-bico, recomenda-se a utilização do método da estufa a 105°C ± 2°C por 24 horas (BRASIL, 2009).

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA EXECUÇÃO DE TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GRÃO DE BICO

Pré-embebição das sementes

Cem sementes de grão de bico (quatro sub amostras com 25 sementes), inteiras e com aspectos íntegros (com tegumento intacto), devem ser pré-embebidas. Esta etapa consiste em deixar as amostras de sementes imersas em um copo com 100 ml de água, durante 16 horas (Figura 3A). Este procedimento pode também ser realizado com folhas de papel “germitest” umedecidas na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, e mantidas em Germinador (Mangelsdorf) a 25 °C (Figura 3B).

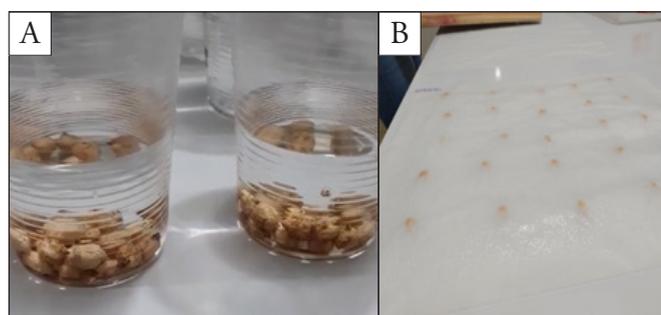


Figura 3. Pré-embebição de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*), via imersão (A) e acondicionamento em folhas de papel “germitest” umedecidas (B). Fonte: Os autores.

Reação em solução de sal de tetrazólio e avaliação das sementes

Após a pré-embebição, as sementes são submersas em solução de tetrazólio na concentração de 0,075% e, na ausência de luz, em câmara B.O.D, são mantidas a 41 °C por quatro horas. Ao imergir a semente em solução de tetrazólio, ela se difunde nos tecidos, resultando na formação de um composto vermelho em tecido viável (vivo). No entanto, em tecidos mortos (deteriorados) não ocorre reação com a solução, permanecendo a cor natural da semente (RODRIGUES et al., 2015). Desta forma, torna-se possível classificar as sementes em viável e inviável (BRASIL, 2009).

Após a reação na solução de tetrazólio, as sementes devem ser avaliadas individualmente, com uso de lupa estereoscópica, com aumento mínimo de 6 vezes, para a categorização de viabilidade e nível de vigor (Figura 4 A e B).

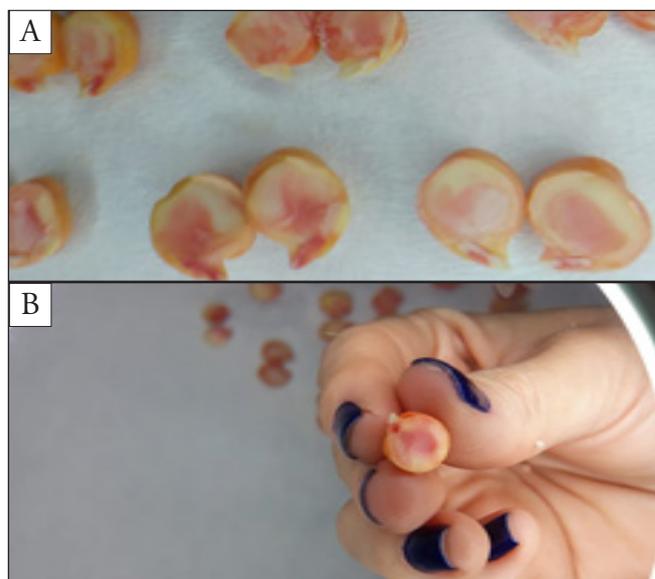


Figura 4. Sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*), seccionadas longitudinalmente (A) e observadas com o auxílio de lupa estereoscópica (B). Fonte: Os autores.

O procedimento consiste no seccionamento longitudinal através do centro do eixo embrionário de cada semente com o auxílio de uma lâmina de barbear (Figura 5). Em seguida, as sementes são avaliadas tanto internamente quanto externamente com auxílio de uma lupa de seis aumentos, associada a uma iluminação fluorescente. A localização e a profundidade de cada dano são decisivas para a classificação dos danos.

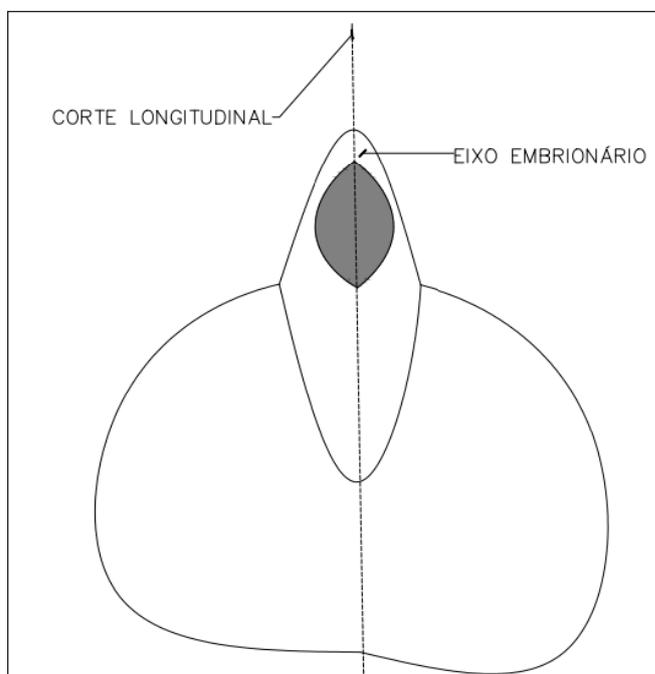


Figura 5. Ilustração do local de corte longitudinal da semente de grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*), orientado através da parte central do eixo embrionário e do hilo. Fonte: Os autores.

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA EXECUÇÃO DE TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GRÃO DE BICO

Classificação das sementes para categorização da viabilidade e vigor

O teste de tetrazólio consiste na avaliação de cada semente individualmente onde as mesmas são classificadas como viável ou não viável (MOORE; SMITH, 1956), estas informações são anotadas na ficha de avaliação do teste de tetrazólio. As informações obtidas de cada semente podem ser classificadas em quatro classes, conforme detalhamento e ilustrações a seguir:

Classe I (Sementes viáveis sem nenhuma lesão externa ou interna) as sementes dessa classe são consideradas viáveis e vigorosas, e inclui sementes com tecidos firmes, ausência de lesões, coloração uniforme (Figura 6A).

Classe II (Sementes viáveis com lesões externas superficiais) as sementes dessa classe são consideradas viáveis e

vigorosas compostas por sementes de tecido firme de coloração quase inteiramente uniforme e com lesões superficiais externas (Figura 6B e 6C).

Classe III (Sementes viáveis com lesões externas e internas menores que 50% do seu tecido de reserva e sem atingirem o cilindro central das sementes) as sementes dessa classe são consideradas viáveis, mas não vigorosas, possuem lesões no eixo embrionário e nas partes vitais, mas esses não afetam o cilindro central (Figura 6D e 6E).

Classe IV (Sementes não viáveis com lesões maiores que 50% do tecido de reserva e com lesões no seu cilindro central) são sementes com danos que comprometem o desenvolvimento normal das plântulas considerando assim sementes inviáveis (Figura 6F, 6G, 6H e 6I).

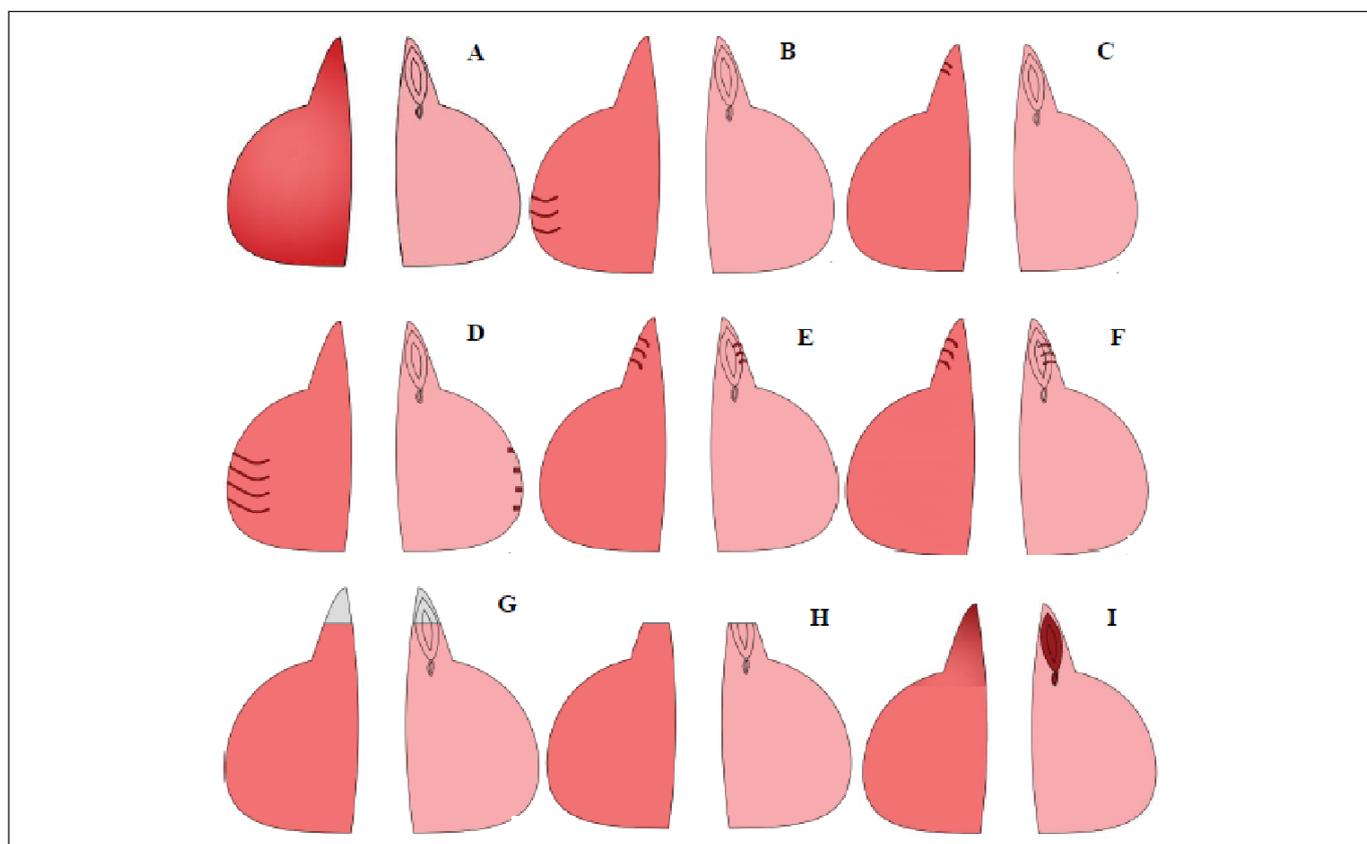


Figura 6. Semente de grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*), com coloração uniforme sem nenhum dano na parte externa e interna (A). Pequenos danos localizados na superfície externa dos cotilédones na região oposta ao eixo embrionário (B). Danos localizados no eixo embrionário. Estas lesões são superficiais e não são observadas nos tecidos internos do eixo embrionário, após seccioná-los, conforme ilustrado (C). Danos localizados nos cotilédones, na região oposta ao eixo embrionário, cuja superfície interna dos cotilédones pode apresentar pequenas áreas mais escuras (D). Dano localizado na superfície do eixo embrionário que não se aprofunda além do córtex, ou seja, sem afetar o cilindro central (E). Dano forte sobre o eixo embrionário atingindo uma profundidade superior à metade da espessura do cilindro central (F). Extremidade da radícula apresentando coloração branco-leitosa (tecido morto) atingindo não só o córtex, mas também o cilindro central (G). Fratura da extremidade da radícula, afetando não só o córtex, mas também o cilindro central (H) Eixo embrionário apresentando uma coloração vermelho carmim forte distribuída por toda a sua extensão incluindo cilindro central (I). Fonte: Os autores.

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA EXECUÇÃO DE TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GRÃO DE BICO

Considerações Finais

O teste de tetrazólio se mostrou eficaz para análise da qualidade fisiológica de sementes de grão-de-bico, tendo-se em vista sua praticidade e rapidez no processo de avaliação. Mas por ser um teste de subjetividade e não ser reconhecido como um teste oficial pelo o MAPA (Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento), faz-se necessário o uso de testes complementares como o de germinação de sementes e emergência de plântulas para a garantia da efetividade de seus resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. O.; PINHEIRO, D. T.; DIAS, D. C. F. S.; HILST, P. C.; MEDEIROS, A. D. Adequacy of the tetrazolium test to evaluate the viability of *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 4. 2019. p. 470-477.
- ARTIAGA, O. P.; SPEHAR, C. R.; BOITEUX, L. S.; NASCIMENTO, W. M. Avaliação de genótipos de grão-de-bico em cultivo de sequeiro nas condições de cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1. 2015. p. 102-109.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Tetrazolium testing handbook**: contribution nº 29 to the Seed vigor testing handbook: 2002 update. Ithaca: AOSA. 2002. 26 p.
- AVELAR, R. I. S.; COSTA, C. A.; ROCHA, F. S.; OLIVEIRA, N. L. C.; NASCIMENTO, W. M. Yield of chickpeas sown at different times. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 4. 2018. p. 900-906.
- BRACCINI, A. L.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, C. S.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, M. C. L. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, após o processo de hidratação-desidratação e envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 6. 1997. p. 1053-1066.
- BRAGA, N.R.; VIEIRA, C.; VIEIRA, R. F. Comportamento de cultivares de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) na microrregião de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 44, n. 255. 1997. p. 577-591.
- BRASIL. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. MAPA/ACS. 2009. 305 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. MAPA/ACS. 2009. 399 p.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior-MDIC/COMEX, **Exportação e importação geral**. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral> Acesso em: 03 abr. 2020.
- CARVALHO, I. L.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. M.; JÁCOME, C. C.; SOARES, V. N. Methodological adjustments to the tetrazolium test in rice seeds. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 1. 2017. p. 041-049.
- CARVALHO, I. L.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. M.; COSTA, C. J.; SOARES, V. N. Preparo da semente de arroz para execução do teste de tetrazólio. **Colloquium Agrariae**, v. 15, n.1. 2019. p. 51-63.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Área colhida, rendimento e produção nos principais países produtores de grão-de-bico**, 2018.
- FERREIRA, A. C. P.; BRAZACA, S. G. C.; ARTHUR, V. Alterações químicas e nutricionais do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) cru irradiado e submetido à cocção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1. 2006. p. 80-88.
- FRANÇA NETO, J. de B.; PEREIRA, L. A. G.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. da. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja**. Embrapa-CNP-So. 2000. 72 p.
- LAZAROTTO, M.; PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B. et al. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qua-

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA EXECUÇÃO DE TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GRÃO DE BICO

lidade de sementes de *Ceiba speciosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4. 2011. p. 1243-1250.

LIMA, C. B.; BOAVENTURA, A. C.; VILLELA, T. T. Comparing procedures for performing tetrazolium test on carrot seeds. **Horticultura Brasileira**, v. 36, n. 2. 2018. p. 240-245.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq. 2005. 495 p.

MOHAMMADI, G.; JAVANSHIR, A.; KHOOIE, F. R.; MOHAMMADI, S. A.; SALMASI, S. Z. Critical period of weed interference in chickpea. **Weed Research**, v. 45, n. 1. 2005. p. 57-63.

NASCIMENTO, W.M.; PESSOA, H. B. S. V.; GIORDANO, L. B. **Cultivo do grão-de-bico**. Gama: CNPH, p.13, 1998. (Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças, 14).

NASCIMENTO, W. M. et al. Grão-de-bico. In: Hortaliças leguminosas. CARDOSO, et al., Embrapa Hortaliças. 2016. p. 89–118.

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**, v. 41, n. 1. 2019. p. 7-12.

PEREIRA, D.F.; BUGATTI, P.H.; LOPES, F.M.; SOUZA, A.L.S.M.; SAITO, P.T.M. Contributing to agriculture by using soybean seed data from the tetrazolium test. **Data in Brief**, v. 23. 2019. 103 p.

RODRIGUES, A. P. M.S.; MENDONÇA JÚNIOR, A. F.; TORRES, S. B.; NOGUEIRA, N. W.; FREITAS, R. M. O. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3. 2015. p. 638-644.

SINGH, K. B.; SAXENA, M. C. Chickpeas. The Tropical Agriculturalist Series. CTA/Macmillan/ICARDA. Mac-

millan Education Ltd. UK. 1999. 134 p.

TRANCOSO, A.C.R. Alterações anatômicas, histoquímicas e fisiológicas durante a maturação de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). **Dissertação de Mestrado**, UFV – Viçosa, MG, 2018.

