

**JOYCE DE OLIVEIRA ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE GRÃO-DE-BICO (*Cicer arietinum* L.): TESTES DE VIGOR E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A663a  
2019 Araújo, Joyce de Oliveira, 1991-  
Avaliação do potencial fisiológico de sementes de  
grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) : testes de vigor e atividade de  
enzimas antioxidantes / Joyce de Oliveira Araújo. – Viçosa, MG,  
2019.

86 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 76-84.

1. *Cicer arietinum* L.. 2. Vigor. 3. Grão-de-bico.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.  
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.73

JOYCE DE OLIVEIRA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE GRÃO-DE-BICO (*Cicer arietinum* L.): TESTES DE VIGOR E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 23 de agosto de 2019.

Assentimento:



---

Joyce de Oliveira Araújo  
(Autora)



---

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias  
(Orientadora)

À minha mãe Júlia Maria (in memoriam)  
por todo amor, sabedoria e educação.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por Seu amor incondicional, amparo e bênçãos concedidas durante essa caminhada.

Aos meus pais, Itair e Júlia, pela educação recebida através de bons exemplos e valores que levarei comigo por toda vida.

Aos meus irmãos, pelo apoio e por acreditarem em mim e a todos familiares que sempre estiveram ao meu lado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, por contribuir com minha formação profissional e pela oportunidade.

À professora, pesquisadora e orientadora Dra. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pelos ensinamentos, apoio e compreensão.

À Embrapa Hortaliças e ao coorientador Dr. Warley Marcos Nascimento pelo fornecimento das sementes e pelas colaborações nesta pesquisa.

Ao coorientador Dr. Laércio Junio da Silva por sua amizade, sugestões, disponibilidade e suporte durante a realização deste trabalho.

A Dra. Ariadne Santos Oliveira pela amizade, empenho e contribuição no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Dr. Wagner Luiz Araújo e a Dra. Auxiliadora Oliveira Martins pelo auxílio nas análises enzimáticas.

Ao professor Dr. Luíz Antônio Dos Santos Dias pela contribuição nas análises estatísticas.

Aos técnicos do laboratório de sementes e aos amigos do Grupo de Estudos em Sementes (GSEM): Wander, José Custódio, Tainara, Daniel, André, Camila, Tássia, Manuel, Nayara, Rafaela, Ana Clara, Rubens, João Paulo, Dalton, Guilherme, Miquéias, Bruno, Wagner e Larissa, pelo prazer da convivência, ensinamentos e por toda ajuda.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

ARAÚJO, Joyce de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.): testes de vigor e atividade de enzimas antioxidantes.** Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

O cultivo de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) vem se destacando no agronegócio brasileiro com grande potencial para autossuficiência e exportação. Nesse contexto, a avaliação da qualidade fisiológica das sementes é fundamental para assegurar produtividade elevada, identificando lotes com maior potencial de se estabelecerem adequadamente em campo. Os objetivos desse trabalho foram adequar metodologias para os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e análise computadorizada de imagens por meio do Sistema de Análise de Plântulas (SAPL<sup>®</sup>) para avaliação no potencial fisiológico de sementes grão-de-bico, bem como analisar se a atividade de enzimas antioxidantes apresenta relação com o vigor das sementes. Sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, e de quatro lotes da cv. Cícero, foram inicialmente submetidas a testes para a caracterização do seu potencial fisiológico. O teste de envelhecimento acelerado foi conduzido pelo método tradicional (100% UR) e com solução saturada de NaCl (76% UR), a 41° C por 24, 36, 48 e 72 h. Para o teste de condutividade elétrica, foram avaliados 4 volumes de água (75, 100, 150 e 250 mL) e 5 períodos de embebição das sementes (2, 4, 8, 12 e 24 horas). Pelo SAPL<sup>®</sup>, foram feitas determinações do comprimento total de plântulas, comprimento da parte aérea, comprimento da radícula e dos índices de uniformidade, crescimento e vigor corrigido aos 4, 5 e 8 dias após a semeadura. Foram determinadas também a atividade das enzimas catalase, peroxidase do ascorbato, peroxidase e superóxido dismutase. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. Para os testes de avaliação da qualidade inicial, SAPL<sup>®</sup> e análise de enzimas antioxidativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Os dados de envelhecimento acelerado e de condutividade elétrica foram analisados em esquema fatorial, onde os fatores quantitativos foram submetidos à análise de regressão e os qualitativos ao teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e comprimento de plântula e índices de vigor pelo SAPL<sup>®</sup> foram eficientes para classificar os lotes de grão-de-bico em níveis de vigor. Para o teste de envelhecimento acelerado, recomenda-se a utilização de 41°C/48h com solução de NaCl saturada (76% UR). O teste de condutividade elétrica deve ser conduzido com 50 sementes imersas em 150 mL de água, a 25 °C, por 24 horas. O comprimento

total das plântulas, da radícula e o índice de vigor corrigido obtidos aos 4 dias após a semeadura pelo SAPL<sup>®</sup> permitiram separar os lotes quanto ao vigor. A maior atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) pode ser relacionada ao potencial fisiológico das sementes, o que não ocorre para a superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX).

Palavras-chave: Testes de vigor. Análise computadorizada. Qualidade fisiológica.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Joyce de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Evaluation of the physiological potential of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds: vigor tests and activity of antioxidant enzymes.** Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The chickpea culture has been standing out in Brazilian agribusiness with high potential for self-sufficiency and exportation. In this context, the evaluation of physiological quality of the seeds is fundamental to assure elevated productivity, through identification of higher potential batches to be properly established on the field. The objectives of this study were to adapt methodologies for accelerated aging, electrical conductivity and computerized image analysis through the Seedling Analysis System (SAPL<sup>®</sup>) to evaluate the physiological potential of chickpea seeds, as well as to analyze if the activity of antioxidant enzymes is related to seed vigor. Seeds from five lots of chickpeas, cv. BRS Aleppo, and four lots of cv. Cicero, were initially subjected to tests to characterize their physiological potential. The accelerated ageing test was conducted over the traditional methodology (100% UR) and over saturated solution of NaCl (76% UR), at 41° C for 24, 36, 48 and 72 hours. For the electrical conductivity studies, 4 water volumes were tested (75, 100, 150 e 250 mL) x 4 seeds immersion cycles (2, 4, 8, 12 and 24 hours). Over SAPL<sup>®</sup>, it was determined the seedlings total length, aerial part length, radicle length and uniformity index, growth index, and corrected vigor index over 4, 5 and 8 days after the seeding. The activity of the catalase, ascorbate peroxidase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes were established. The completely randomized design was used. For the initial quality tests, SAPL<sup>®</sup>, and antioxidative enzymes analysis, the averages were compared by the Tukey test ( $P \leq 0,05$ ). The accelerate ageing and the electrical conductivity data were analyzed over factorial scheme, in which the quantitative factors were submitted to regression analysis, while the qualitative ones have been submitted to the Tukey ( $P \leq 0,05$ ) test. The accelerate ageing and electrical conductivity tests, seedling length through SAPL<sup>®</sup> and the analysis of antioxidative enzymes were all efficient in classifying the chickpea seed lots into vigor levels. As for the accelerate ageing test, it is recommended to use 41°C/48 h and 76% UR. The electrical conductivity test must be conducted with 50 seeds, immerse into 150 mL water, at 25 °C, for 24h. The total seedling, root length and corrected vigor index obtained over 4 days via SAPL<sup>®</sup>, have allowed the separation of the seed lots in vigor levels. The high activity of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes may be related to the physiological

potential of seeds, which does not occur for superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX).

Keywords: Vigor tests. Computer analysis. Physiological quality.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Padrão de plântulas normais (A) e anormais (B) adotados na avaliação do teste de envelhecimento acelerado. Foto: Joyce de O. Araújo. .... 33
- Figura 2:** Aquisição das imagens e processamento individual de plântulas no SAPL<sup>®</sup>. Foto: Joyce de O. Araújo. .... 35
- Figura 3:** Tissuelyser utilizado no experimento (A), sementes de grão-de-bico após serem maceradas (B) e (C), resultando em um material com granulometria finíssima. Fotos: Joyce de O. Araújo. .... 36
- Figura 4:** Porcentagem de germinação de cinco lotes de sementes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, após o envelhecimento acelerado em água (100% UR) e em solução saturada de NaCl (76% UR) por períodos de 24, 36, 48 e 72 horas. .... 42
- Figura 5:** Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os diferentes procedimentos do teste de envelhecimento acelerado realizados em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t..... 44
- Figura 6:** Ilustração de todos os volumes de solução para sementes da cv. BRS Aleppo após 24 horas de embebição (A); para todos os volumes estudados foram utilizados copos plásticos com capacidade de 300 mL. Diferenças no tamanho das sementes da cv. BRS Aleppo e cv. Cícero após 24 horas de embebição (50 sementes imersas em 75 mL de água) (B). Fotos: Joyce de O. Araújo. .... 47
- Figura 7:** Condutividade elétrica de sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, após embebição por 2, 4, 8, 12 e 24 horas em 75, 100, 150 e 250 mL de água. .... 48
- Figura 8:** Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os diferentes procedimentos do teste de condutividade elétrica

realizados em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t..... 50

**Figura 9:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e as variáveis obtidas na análise computadorizada de plântulas realizada em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t..... 53

**Figura 10:** Atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) superóxido dismutase (SOD) em sementes de cinco lotes de grão-de-bico cv. BRS Aleppo. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Barras: desvio padrão. .... 54

**Figura 11:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e a atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) e superóxido dismutase (SOD) determinada em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t..... 56

**Figura 12:** Porcentagem de germinação de quatro lotes de sementes de grão-de-bico, cv. Cícero, após o envelhecimento acelerado em água (100% UR) e em solução saturada de NaCl (76% UR) por períodos de 24, 36, 48 e 72 horas. .... 61

**Figura 13:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os diferentes procedimentos do teste de envelhecimento acelerado realizados em sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t..... 62

**Figura 14:** Ilustração de todos os volumes de solução para sementes da cv. Cícero após 24 horas de embebição; para o todos os volumes foram utilizados copos plásticos com capacidade de 300 mL. Foto: Joyce de O. Araújo..... 65

**Figura 15:** Condutividade elétrica de sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero, após embebição por 2, 4, 8, 12 e 24 horas em 75, 100, 150 e 250 mL de água..... 66

**Figura 16:** Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os diferentes procedimentos do teste de condutividade elétrica realizados em sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo (P < 0,05) pelo teste t..... 67

**Figura 17:** Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e as variáveis obtidas na análise computadorizada de plântulas realizada em sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo (P < 0,05) pelo teste t..... 70

**Figura 18:** Atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) superóxido dismutase (SOD) em sementes de quatro lotes de grão-de-bico cv. Cícero. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05). Barras: desvio padrão. .... 71

**Figura 19:** Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e a atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) e superóxido dismutase (SOD) determinadas em cinco lotes de sementes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo (P < 0,05) pelo teste t. .... 73

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Caracterização da qualidade inicial de cinco lotes de grão-de-bico cv. BRS Aleppo, avaliados pelo grau de umidade (GU), peso de mil sementes (PMS), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF), massa seca de plântula (MS) e germinação a baixa temperatura (GBT)..... 40
- Tabela 2:** Teor de água (%) obtidos antes e após os períodos de envelhecimento acelerado tradicional (100% UR) e com solução de NaCl (76% UR) em lotes de sementes de grão-de-bico cv. BRS Aleppo. .... 41
- Tabela 3:** Germinação (%) de cinco lotes grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, após diferentes tempos de envelhecimento acelerado a 41 °C pelo método tradicional e com solução saturada de NaCl..... 41
- Tabela 4:** Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de cinco lotes de sementes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, em diferentes volumes de água e períodos de embebição..... 46
- Tabela 5:** Resultados médios de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento radicular (CR), comprimento total (CT), índice de uniformidade (IU), índice de crescimento (IC) e índice de vigor corrigido (IVC), obtidos pelo SAPL<sup>®</sup> aos quatro, cinco e oito dias após a semeadura de cinco lotes de sementes de grão-de-bico..... 51
- Tabela 6:** Caracterização da qualidade inicial de quatro lotes de grão-de-bico cv. Cícero, avaliados pelo grau de umidade (GU), peso de mil sementes (PMS), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência de plântula (E), índice de velocidade de emergência (IVE) e massa seca de plântula (MS)..... 57
- Tabela 7:** Teor de água (%) obtidos antes e após os períodos de envelhecimento acelerado tradicional (100% UR) e com solução de NaCl (76% UR) em lotes de sementes de grão-de-bico cv. Cícero..... 58
- Tabela 8:** Germinação (%) de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero, após diferentes tempos de envelhecimento acelerado a 41 °C pelo método tradicional e com solução saturada de NaCl. .... 59

**Tabela 9:** Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de quatro lotes de sementes de grão-de-bico, cv. Cícero em diferentes volumes de água e períodos de embebição. .... 63

**Tabela 10:** Resultados médios de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento radicular (CR), comprimento total (CT), índice de uniformidade (IU), índice de crescimento (IC) e índice de vigor corrigido (IVC), obtidos pelo SAPL<sup>®</sup> na avaliação de quatro lotes de sementes de grão-de-bico, aos quatro, cinco e oito dias..... 68

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Testes de vigor .....</b>	<b>18</b>
2.1.1. Envelhecimento acelerado .....	20
2.1.2. Condutividade elétrica .....	22
<b>2.2. Análise computadorizada de plântulas .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3. Enzimas do sistema antioxidativo em sementes .....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Caracterização da qualidade inicial dos lotes .....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Determinação do grau de umidade .....	29
3.1.2. Peso de mil sementes .....	30
3.1.3. Teste de germinação .....	30
3.1.4. Primeira contagem de germinação .....	30
3.1.5. Germinação a baixa temperatura .....	30
3.1.6. Teste de frio .....	30
3.1.7. Emergência de plântulas .....	31
3.1.8. Índice de velocidade de emergência (IVE) .....	31
3.1.9. Matéria seca de plântulas .....	31
<b>3.2. Ensaio I – Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de sementes de grão-de-bico .....</b>	<b>31</b>
3.2.1. Envelhecimento acelerado tradicional .....	32
3.2.2. Envelhecimento acelerado com solução salina .....	32
<b>3.3. Ensaio II – Teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de grão-de-bico .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4. Ensaio III - Análise computadorizada de plântulas utilizando o SAPL® .....</b>	<b>33</b>
<b>3.5. Ensaio IV – Atividade de enzimas antioxidativas em semente de grão-de-bico.....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Extração enzimática .....	36
3.5.2. Determinação do teor de proteínas .....	36
3.5.3. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT) .....	36
3.5.4. Determinação da atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) .....	37
3.5.5. Determinação da atividade da enzima peroxidase (POX) .....	37

3.5.6. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) .....	37
<b>3.6. Delineamento experimental e análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Cultivar BRS Aleppo .....</b>	<b>39</b>
4.1.1. Caracterização da qualidade dos lotes de grão-de-bico .....	39
4.1.2. Ensaio I - Envelhecimento acelerado .....	40
4.1.3. Ensaio II - Condutividade elétrica .....	45
4.1.4. Ensaio III - Análise computadorizada de plântulas .....	50
4.1.5. Ensaio IV - Atividade enzimática.....	53
<b>4.2. Cultivar Cícero.....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Caracterização da qualidade dos lotes de grão-de-bico .....	56
4.2.2. Ensaio I - Envelhecimento acelerado .....	58
4.2.3. Ensaio II - Condutividade elétrica .....	62
4.2.4. Ensaio III - Análise computadorizada de plântulas .....	68
4.2.5. Ensaio IV – Atividade enzimática .....	70
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>73</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As pulses, sementes secas comestíveis de leguminosas como feijões e ervilhas secas, lentilha e grão-de-bico são ricas em proteínas, fibras, minerais e vitaminas, e por isto vêm ocupando papel de destaque nos debates sobre nutrição humana. O ano de 2016 foi declarado pela ONU como o Ano Internacional das Pulses, com implementação de ações de expansão no cultivo e incentivo ao consumo.

Além da sua importância para a nutrição, saúde humana e segurança alimentar global, as pulses também contribuem para a sustentabilidade ambiental do planeta. Podem ser cultivadas com relativamente menos água do que outras culturas, como o feijão, e enriquecem o solo com nutrientes, sendo interessantes para serem cultivadas no inverno em sistemas de rotação de culturas no Brasil (NASCIMENTO et al., 2016).

Dentre as pulses, destaca-se o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) que é a segunda leguminosa mais consumida no mundo, atrás somente da soja. A área cultivada é de 14,8 milhões de hectares com uma produtividade de 0,96 t.ha<sup>-1</sup> (NASCIMENTO et al., 2016; FAO, 2017). A Índia é atualmente o maior país produtor com 64% da produção mundial (GAUR et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2016).

No Brasil, seu consumo e produção vem aumentando a cada ano, sendo necessário importar a maior parte do que é consumido, cerca de 8 mil toneladas, gerando gastos no valor de 6,8 milhões de dólares (MDIC/SECEX, 2016). O consumo crescente se deve ao alto valor nutritivo dos seus grãos, possuindo 20 a 22% de proteína, além de serem ricos em fibras, minerais e  $\beta$ -caroteno (GAUR et al., 2010; HOSKEM et al., 2017). Estudos nutricionais mostram que o grão-de-bico é bem mais rico em nutrientes do que o feijão, leguminosa mais consumida pela população brasileira (LIMA et al., 2011).

O Brasil tem grande potencial para a produção de grão-de-bico, já que apresenta nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul características de clima e altitude favoráveis para o cultivo (EMBRAPA, 2017). Apesar disto, só nos últimos anos pesquisas vem sendo desenvolvidas visando disponibilizar cultivares adaptadas às nossas condições edafoclimáticas bem como tecnologia adequada para a produção. Em 2017, a produção se expandiu para os estados de MT, GO, DF, MG e BA com registros de rendimentos de até 3000 Kg/ha (NASCIMENTO; SILVA, 2019).

Mais recentemente, o governo brasileiro vem incentivando as pesquisas e o cultivo no país visando tanto aumentar a produção para consumo interno, reduzindo as importações, como aumentar a exportação para países consumidores, especialmente a Índia. Nesse país, a

demanda pode chegar a 30 milhões de toneladas de grão-de-bico por ano até 2030, por se tratar de importante fonte de proteína vegetal para grande parte da população que tem dieta vegetariana. Já existe um convênio firmado entre os governos brasileiro e indiano e a primeira exportação de grão-de-bico ocorreu em 2016 (NASCIMENTO; SILVA, 2019).

Com a expansão dos cultivos, a demanda por sementes também cresce. Neste contexto, a disponibilidade de sementes de alta qualidade no mercado é importante para se obter rápida emergência de plântulas em campo, lavouras uniformes e assegurar alta produtividade.

A comercialização de sementes, incluindo o de grão-de-bico tem sido realizada principalmente com base nos resultados do teste de germinação. Esse teste é conduzido sob ótimas condições controladas e ideais em laboratório, permitindo que as sementes expressem a capacidade máxima para originar plântulas normais (MARCOS-FILHO, 2015a). Trata-se de um teste padronizado que permite a reprodutibilidade de resultados e de grande importância para viabilizar o comércio de sementes. No entanto, não reflete o desempenho das sementes sob condições de campo ou após determinado período de armazenamento, pois lotes com germinação semelhante podem apresentar desempenhos distintos devido às diferenças no vigor (NASCIMENTO et al., 2011; MARCOS-FILHO, 2015b).

Nesse sentido, se torna interessante a utilização de testes de vigor com o objetivo de complementar as informações fornecidas pelo teste de germinação, possibilitando, assim, obter informações mais seguras sobre o desempenho dos lotes em campo e no armazenamento. Tais informações são essenciais para o controle de qualidade das sementes que serão disponibilizadas aos agricultores para o plantio.

As informações sobre metodologias adequadas para a avaliação do vigor das sementes de grão-de-bico ainda são escassas. Com a expansão da cultura no Brasil e com desenvolvimento de novos cultivares adaptados às nossas condições, estudos sobre o tema são relevantes para assegurar a comercialização de lotes com alto potencial fisiológico.

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram adequar metodologias para os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e a análise computadorizada de imagens por meio do SAPL<sup>®</sup> para a avaliação do vigor de sementes de *Cicer arietinum*, bem como analisar se a atividade das enzimas do sistema antioxidativo estão relacionadas ao vigor das sementes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Testes de vigor

Segundo a AOSA (2009), o vigor de sementes compreende um conjunto de propriedades que determina o potencial para uma rápida e uniforme emergência de plântulas sob ampla diversidade de condições ambientais. Assim, a avaliação do vigor tem como objetivos básicos identificar adequadamente quais os lotes apresentam maior potencial para se estabelecerem em campo, detectar diferenças significativas no potencial fisiológico de lotes com germinação semelhante, distinguir, com segurança, lotes de alto dos de baixo vigor, classificar lotes em diferentes níveis de vigor, de maneira proporcional à emergência de plântulas em campo e também estimar o potencial de armazenamento (MARCOS-FILHO, 1999).

As informações fornecidas por meio dos testes de vigor são essenciais para se complementar as informações geradas pelo teste de germinação o qual é conduzido sob condições ideais de temperatura, umidade, luz, para que as sementes expressem o seu potencial máximo de germinação. Segundo Marcos-Filho (2009), o teste de germinação é eficiente em, pelo menos, dois aspectos: fornece informações sobre a capacidade de germinação sob condições ótimas de ambiente e é um teste padronizado, com ampla possibilidade de reprodução dos resultados, sendo base para a comercialização de sementes.

Assim, a correspondência entre os resultados do teste de germinação e a emergência de plântulas em campo somente é constatada sob condições extremamente favoráveis de ambiente. Torna-se necessário, portanto, obter informações sobre o vigor das sementes, as quais estão relacionadas ao desempenho destas em diferentes condições de ambiente, além de auxiliarem no controle de qualidade dos lotes destinados à comercialização.

Em síntese, o objetivo básico de se avaliar o vigor de sementes é identificar possíveis diferenças na qualidade fisiológica de lotes com germinação semelhante, já que é comum lotes de sementes com valores próximos de germinação exibirem comportamentos distintos no campo e/ou armazenamento. Tais diferenças podem ser explicadas pelo fato de que as primeiras alterações nos processos bioquímicos associados à deterioração das sementes ocorrem bem antes que o declínio da capacidade germinativa seja verificado (DELOUCHE; BASKIN, 1973). Estes autores relacionaram uma sequência hipotética de eventos que progridem com o decorrer da deterioração, iniciando-se com a desestruturação das membranas celulares. A partir daí, ocorre redução da atividade respiratória e biossintética, diminuição da velocidade de

germinação, redução do potencial de conservação, menor taxa de crescimento das plântulas, maior sensibilidade a condições de estresse, redução da emergência de plântulas em campo, aumento da ocorrência de plântulas anormais e, finalmente, morte da semente (DELOUCHE; BASKIN, 1973).

Assim, quaisquer destes eventos que precedem a perda do poder germinativo podem servir como base para a avaliação do vigor. Segundo a AOSA (2009), os principais testes de vigor são baseados, portanto, em parâmetros que caracterizam o processo de deterioração. Em geral, quanto mais distante da perda de germinação estiver o parâmetro empregado para a avaliação do vigor, mais promissor poderá ser o teste, por permitir detectar o processo de deterioração em fase inicial.

Os testes de vigor podem ser classificados em diferentes categorias de acordo com o parâmetro no qual se baseia. Para McDonald (1975), podem ser classificados como físicos, fisiológicos, bioquímicos e de resistência a estresse. Os testes físicos avaliam características morfológicas ou físicas das sementes que possam estar associados ao vigor, tais como tamanho, densidade e coloração das sementes. Os fisiológicos baseiam-se em atividades fisiológicas específicas que tenham sua manifestação dependente do vigor, destacando-se os testes de classificação do vigor de plântulas, primeira contagem de germinação, velocidade de emergência e crescimento de plântulas. Já os testes bioquímicos avaliam as mudanças bioquímicas relacionadas ao vigor das sementes; entre eles destacam-se os testes de tetrazólio, condutividade elétrica e lixiviação de potássio. Por fim, os testes de resistência ao estresse avaliam o comportamento das sementes quando expostas a condições desfavoráveis do ambiente, com destaque para o teste de frio, envelhecimento acelerado, deterioração controlada, germinação a baixa temperatura e imersão em soluções tóxicas (MARCOS-FILHO, 1999).

Dentre os testes relacionados acima, a AOSA (2009) destaca como os mais indicados para a avaliação do vigor os testes de frio, envelhecimento acelerado, germinação a baixa temperatura, tetrazólio, condutividade elétrica, crescimento de plântulas e classificação do vigor de plântulas.

Como o vigor da semente é produto de um conjunto de características que irão determinar o seu desempenho no campo ou no armazenamento, recomenda-se que a avaliação do vigor deva ser feita com base na combinação de resultados de diferentes testes de vigor, considerando a finalidade do uso dos resultados e as limitações de cada teste (MARCOS-FILHO, 2015b).

### 2.1.1. Envelhecimento acelerado

O teste de envelhecimento acelerado é, dentre os disponíveis, um dos mais sensíveis e eficientes para a avaliação do vigor de sementes (MARCOS-FILHO, 2015a). Segundo Delouche e Baskin (1973), o decréscimo do potencial de armazenamento é a segunda manifestação fisiológica da deterioração de sementes, após a redução da velocidade de germinação. Sendo assim, o envelhecimento acelerado é um teste importante por permitir estimar o potencial de armazenamento das sementes (MARCOS-FILHO, 1999). Além disso, permite inferir sobre o potencial de emergência de plântulas em campo, possibilitando selecionar os melhores lotes para semeadura. Também permite detectar diferenças na qualidade fisiológica de lotes comercializáveis com germinação semelhante (MARCOS-FILHO, 1999). Diante desses usos distintos, o envelhecimento acelerado tem sido um dos testes de vigor mais empregados em programas de controle de qualidade de empresas de sementes, visando garantir a qualidade dos lotes destinados à comercialização.

O teste de envelhecimento acelerado é um teste de estresse que avalia o comportamento das sementes submetidas a condições adversas de temperatura e umidade relativa. Tem como princípio o fato de que a taxa de deterioração das sementes aumenta consideravelmente quando expostas a condições de altas temperaturas e umidade relativa, considerados fatores ambientais importantes na velocidade e intensidade de deterioração (AOSA, 2009; MARCOS-FILHO, 2009). Assim, sementes de alto vigor terão maior tolerância ao estresse e, conseqüentemente, maior capacidade de produzir plântulas normais após serem submetidas às condições do teste quando comparadas com as de menor vigor. Já lotes de menor vigor serão mais afetados em sua capacidade de produzir plântulas normais após o envelhecimento.

A interação entre temperatura e o período de exposição das sementes são fatores importantes para se garantir a eficiência do teste na avaliação do vigor (MARCOS-FILHO, 1999). As temperaturas utilizadas variam entre 40 e 45 °C, sendo 42 ou 41 °C as mais comuns (AOSA, 2009). Segundo Tomes et al. (1988) a elevação da temperatura promove efeitos mais drásticos sobre a germinação das sementes do que o prolongamento do período de envelhecimento artificial. Temperaturas muito alta podem promover a desnaturação de proteínas e queda excessiva da viabilidade das sementes. Sendo assim, muitos estudos indicam o uso de temperatura a 41 °C para condução do teste de envelhecimento acelerado para várias espécies (FREITAS; NASCIMENTO, 2006; BETOLIN et al., 2011; LOPES et al., 2012; ALVARENGA et al., 2013; MARCOS-FILHO, 2015a). Recomenda-se a condução do teste a 41 °C por 48 horas para sementes de soja (MARCOS-FILHO et al., 1990; MARCOS-FILHO,

2009) e de feijão (BERTOLIN et al., 2011). Contudo, sementes de feijão com porcentagem de germinação semelhante apresentaram níveis distintos de vigor pelo teste de envelhecimento acelerado realizado com maior temperatura (43 °C) e menor tempo de exposição (24 h), fornecendo resultados semelhantes aos obtidos a 41 °C por 48 h (BERTOLIN et al., 2011).

O teste de envelhecimento acelerado pelo método tradicional é conduzido em caixas gerbox contendo 40 mL de água em seu interior, de modo a se obter uma umidade relativa em torno de 100% durante o período de envelhecimento. Diferenças na absorção de água pelas sementes quando expostas à esta atmosfera úmida, podem acarretar variações acentuadas no teor de água das sementes, especialmente para as de menor tamanho como as hortaliças (JIANHUA; MCDONALD, 1996).

As variações no grau de umidade entre amostras, antes de serem submetidas ao teste, não devem ultrapassar a 2 pontos percentuais, pois sementes mais úmidas, geralmente, são mais sensíveis ao envelhecimento acelerado, o que pode comprometer os resultados. Deste modo, se faz necessário a uniformização do teor de água das sementes antes de se realizar o teste. Também é importante monitorar o teor de água logo após as amostras serem retirada do envelhecimento, não podendo ter variações superiores a 4 pontos percentuais entre as amostras, para assim garantir a uniformidade do teste (MARCOS-FILHO, 1999).

Assim, a alta umidade relativa empregada no teste de envelhecimento tradicional aliada com a alta temperatura pode promover uma rápida e desuniforme absorção de água, levando a grandes variações no grau de umidade das amostras após o envelhecimento.

Para contornar este problema, Jianhua e McDonald (1996) propuseram uma metodologia alternativa substituindo-se a água por igual volume de solução saturada de um sal, que pode ser KCl, NaCl ou NaBr, de modo a se obter umidade relativa de 87%, 76% ou 55%, respectivamente, ou seja, valores inferiores ao utilizado no método convencional (100%). Com isto, a absorção de água pelas sementes é mais lenta, havendo ainda a possibilidade de redução de incidência de microrganismos durante o teste, o que pode interferir nos resultados.

O método alternativo tem sido utilizado principalmente para sementes pequenas, especialmente de hortaliças, para as quais a desuniformidade na absorção de água entre as amostras no método tradicional pode resultar em deterioração diferenciada, comprometendo os resultados pós-envelhecimento (RODO; MARCOS FILHO, 2003; RAMOS et al., 2004).

A eficiência da utilização de solução salina saturada para a condução do teste de envelhecimento acelerado foi relatada para várias espécies como trigo (MERIAUX et al., 2007), berinjela (LOPES et al., 2013), milho doce (ALVARENGA et al., 2013) e outras.

O uso de solução salina saturada, no envelhecimento acelerado, também, mostrou ser eficiente na avaliação do vigor de leguminosas. Para sementes de lentilha, Freitas e Nascimento (2006) recomendaram a utilização de com solução saturada de NaCl, a 41 °C por 48 horas. Em sementes de ervilha, Nascimento et al. (2007) avaliaram o envelhecimento acelerado a 41 °C por períodos de 24; 48 e 72 horas, com e sem uso de solução saturada de NaCl. Os autores verificaram que quando conduzido pelo método modificado (com solução saturada de NaCl), a 41 °C por 48 horas, houve melhor classificação dos lotes em níveis de vigor. Já para soja e feijão, recomenda-se o uso desta mesma combinação entre temperatura e tempo de exposição, mas pelo método tradicional com 100% de UR (MARCOS-FILHO, 2015a; BERTOLIN et al., 2011). Dourado et al. (2013) verificaram que o teste para sementes de feijão caupi deve ser conduzido com solução salina de NaCl, não sendo conclusivos quanto à temperatura e tempo de envelhecimento.

Embora o teste de envelhecimento acelerado venha sendo amplamente estudado visando a sua adequação para muitas espécies, ainda há poucas informações sobre a utilização do teste em sementes de grão-de-bico. O envelhecimento acelerado a 45 °C por 72 h foi utilizado por Kapoor et al. (2010) para provocar a deterioração das sementes e monitorar as alterações fisiológicas e bioquímicas decorrentes deste processo em variedades dos grupos desi e kabuli. Os autores concluíram que as cultivares apresentaram resposta diferenciada ao envelhecimento. Por sua vez, Samarah e Abu-Yahia (2008) utilizaram a temperatura de 40 °C por 96 h para avaliar o vigor de sementes de grão-de-bico, pelo teste de envelhecimento acelerado, em estudo relacionado à maturação de sementes.

Desta forma, estudos de adequação de metodologia de envelhecimento acelerado para sementes de grão-de-bico que possibilitam a utilização desse teste de forma eficiente no controle de qualidade das sementes durante as diferentes etapas do processo produtivo até a comercialização se fazem necessário.

### **2.1.2. Condutividade elétrica**

O teste de condutividade elétrica é um método rápido e prático de avaliação do vigor de sementes, fácil de ser conduzido na maioria dos laboratórios de análise de sementes. É classificado como um teste bioquímico, pois baseia-se na capacidade de reorganização do sistema de membranas celulares, que é uma das primeiras alterações que ocorrem nas sementes em decorrência da deterioração (DELOUCHE; BASKIN, 1973), e que está relacionada ao vigor das sementes.

A organização das membranas celulares é máxima por ocasião da maturidade fisiológica; com a secagem das sementes ao final da maturação ocorre um processo de desorganização estrutural das membranas acarretando uma perda temporária de sua integridade (BEWLEY; BLACK, 1994). Quando sementes secas são embebidas em água, a capacidade de reorganização do sistema de membranas é readquirida e a velocidade deste processo está relacionada ao vigor da semente. Quanto maior a velocidade de restabelecimento da integridade das membranas, menor lixiviação de eletrólitos irá ocorrer (POWELL, 1986). De acordo com Bewley e Black (1994), logo no início da embebição a integridade das membranas é incompleta; contudo, com o decorrer do tempo esta situação se altera com a retomada natural de sua configuração mais estável. Em sementes deterioradas ou não viáveis, este reparo ocorre de forma bem mais lenta ou pode até não ocorrer, de modo que a lixiviação de exsudatos celulares será tão mais intensa quanto menos vigorosa for a semente (MARCOS-FILHO, 2015a).

Assim, o valor da condutividade elétrica, medido em função da quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes, está diretamente relacionado à integridade das membranas celulares, podendo ser utilizado como um parâmetro para avaliar o vigor das sementes (POWELL, 1986; VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999; AOSA, 2009). A qualidade das sementes é avaliada indiretamente através da determinação da condutividade elétrica na solução de embebição das sementes. Os menores valores, correspondentes à menor liberação de exsudatos, indicam alto potencial fisiológico, ou seja, maior vigor (AOSA, 2009).

Por se tratar de um teste simples, que está relacionado à reestruturação das membranas celulares, uma das manifestações iniciais do processo de deterioração (DELOUCHE; BASKIN, 1973), e que permite a obtenção de resultados em período de tempo relativamente curto, o teste de condutividade elétrica tem se mostrado promissor para utilização nos programas de controle de qualidade. Dependendo da espécie, os resultados podem ser obtidos em períodos inferiores a 24 horas, permitindo que as tomadas de decisões durante o processo produtivo e quanto ao manejo de lotes no controle de qualidade das sementes sejam agilizadas.

Diversos fatores afetam os resultados do teste como presença de danos mecânicos ou por insetos nas sementes (LOEFFLER et al., 1988), genótipo, teor de água na semente, tratamento químico da semente, além de características próprias da metodologia, como número de sementes por repetição, temperatura, volume de água e tempo de embebição (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999; AOSA, 2009).

O teste de condutividade elétrica tem sido indicado para sementes de leguminosas principalmente ervilha e soja (AOSA, 2009), e tem sido considerado eficiente para avaliar o vigor de sementes de várias espécies, mas não para todas as que já foram estudadas. Marcos-

Filho (2015a) elaborou uma relação de algumas espécies para as quais o teste já foi estudado, informando as metodologias recomendadas para cada uma delas. Ele atribuiu o insucesso do teste em algumas situações à influência do genótipo, associada a características do tegumento.

Para espécies que têm sementes grandes, como soja, ervilha e feijão tem sido recomendada a utilização de amostras de 50 sementes embebidas em 75 mL de água por 24 horas (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999; AOSA, 2009; MARCOS-FILHO, 2015a). Em soja, Dias e Marcos-Filho (1996) observaram que períodos de embebição mais curtos (8 e 12 horas) permitiram a identificação de diferenças mais acentuadas de vigor entre os lotes, enquanto leituras realizadas a partir de 16 horas foram mais sensíveis às variações de qualidade das sementes, classificando os lotes em níveis de vigor.

Para Moura et al. (2017), o teste da condutividade elétrica foi eficiente na determinação da qualidade fisiológica das sementes de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata*, com baixo efeito das temperaturas de 25 e 30 °C, sendo que o tempo de embebição pode ser reduzido para 20 h. Em ervilha, Machado et al. (2011), avaliando as temperaturas de 20 e 25 °C e volumes de 75 e 250 mL de água, concluíram que o teste de condutividade elétrica utilizando 250 mL de água, na temperatura de 25 °C por 24 horas é promissor para a diferenciação dos lotes de sementes.

Em sementes de grão-de-bico, há poucos estudos relacionados à adequação de metodologia deste teste para avaliação do vigor das sementes. Samarah e Abu-Yahia (2008) utilizaram o teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes colhidas em diferentes épocas, utilizando 4 repetições de 25 sementes imersas em 75 mL de água por 24 h a 25 °C. Já 250 mL de água destilada foi utilizada por Khajeh-Hosseini e Rezazadeh, 2011. Também Trancoso (2018), ao utilizarem o teste de condutividade elétrica com 50 sementes imersas em 250 mL de água por 24 horas identificaram diferenças no potencial fisiológico de sementes colhidas em diferentes estádios de maturação. A autora constatou ainda que o teste foi eficiente para monitorar a redução da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento por seis meses. Resultados semelhantes foram obtidos com sementes de lentilha, mas utilizando 75 mL de água (TORRES, 2018).

Os resultados relacionados à eficiência do teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor das sementes de grão-de-bico ainda não são consistentes possivelmente devido às metodologias que vêm sendo empregadas. Segundo Khajeh-Hosseini e Rezazadeh (2011), diferenças na lixiviação de solutos pelas sementes de grão-de-bico podem ser detectadas com 2 horas de embebição, mas salientam que pesquisas adicionais são necessárias para ajustar uma metodologia precisa para o teste de condutividade elétrica, especialmente para definir valores

de condutividade que diferenciem lotes de alto e baixo vigor. Os autores afirmam também que os resultados do teste podem ser particularmente úteis para avaliar o desempenho de sementes sob condições adversas de campo. Estes autores verificaram correlação significativa entre os resultados de condutividade elétrica obtidos com 250 mL de água após períodos de embebição de 2 h e 24 h e a emergência em campo; afirmaram ainda que lotes de baixo vigor podem ser identificados com 2 h de embebição (KHAJEH-HOSSEINI; REZAZADEH, 2011). Por outro lado, Ram et al. (1989), utilizando 75 mL de água por 24 horas não constataram associação entre os resultados de condutividade elétrica e emergência de plântulas. Também Qasim et al. (2010) não encontraram correlação entre os resultados de condutividade elétrica, avaliada em amostras de 5 g de sementes embebidas em 50 mL de água após diferentes períodos variando de 30 minutos a 24 horas, e a emergência em campo.

Mais recentemente, Dias et al. (2019) avaliaram a condutividade elétrica utilizando amostras de 50 e 75 sementes imersas em 75 e 100 mL de água após 2, 4, 8, 12, 24 e 30 h, constatando que o uso de 75 sementes embebidas em 100 mL de água por 30 horas foi o procedimento mais adequado para avaliação do vigor dos lotes. Contudo, vale destacar que os lotes avaliados apresentavam valores de germinação muito contrastantes, variando de 94 a 48% de modo que os resultados de condutividade elétrica apenas confirmaram o que o teste de germinação já havia identificado. Em pesquisas relacionadas à definição de metodologias para a avaliação do vigor de sementes é importante que sejam utilizados também lotes com germinação semelhante, de modo a verificar se diferem quanto ao vigor. Sendo assim, estudos considerando este aspecto são importantes para sementes de grão-de-bico.

## **2.2. Análise computadorizada de plântulas**

A avaliação automatizada do desempenho de plântula por meio do processamento computadorizado de imagens pode constituir uma ferramenta eficiente para distinguir lotes de sementes quanto seu potencial fisiológico. Tal procedimento permite a obtenção de resultados confiáveis e rapidez na avaliação de plântulas, possibilita a análise de um grande número de amostras, além de fornecer um banco de dados e imagens que podem ser consultados quando necessário. A eficiência da análise computadorizada de plântulas na avaliação do vigor em sementes foi relatada para várias espécies, entre elas, milho (CASTAN et al., 2018), feijão (GOMES JÚNIOR et al., 2014), soja (YAGUSHI et al., 2014), berinjela (SILVA; CICERO, 2014), trigo (BRUNES et al., 2016) e amendoim (BARBOSA et al., 2016).

Alguns softwares foram desenvolvidos para auxiliar na análise computadorizada de plântulas, entre eles estão o Seed Vigor System (SVIS<sup>®</sup>), o Sistema automatizado do vigor de sementes (Vigor-S<sup>®</sup>), GroundEye<sup>®</sup> e o Sistema de análise de plântulas (SAPL<sup>®</sup>). Contudo, esse último se destaca em relação aos demais por ser um software gratuito e com baixo custo na aquisição das imagens que podem ser obtidas utilizando uma câmera digital ou até mesmo smartphones.

O SAPL<sup>®</sup>, foi desenvolvido recentemente na Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Esse software utiliza-se do processamento digital de imagens, para a avaliação do vigor de sementes a partir do desempenho de plântulas, fornecendo informações sobre o comprimento total de plântulas, comprimento radicular e do hipocótilo, além de fornecer índices baseados na velocidade de crescimento e uniformidade. Medeiros e Pereira (2018) confirmaram a eficiência do SAPL<sup>®</sup> na determinação do potencial fisiológico em sementes de soja. O uso da análise de plântulas utilizando o SAPL<sup>®</sup> também foi eficaz na avaliação do vigor de sementes de moringa (REIS, 2017) e milho (MEDEIROS et al., 2018).

Para que a análise computadorizada de plântulas seja eficiente na avaliação do vigor de sementes, é essencial a adequação de metodologias para cada espécie. Ainda não há relatos na literatura sobre procedimentos baseados em análise de imagens que possibilitam a distinção de lotes de grão-de-bico quanto ao vigor. Logo, trabalhos realizados para esse fim são justificáveis.

### **2.3. Enzimas do sistema antioxidativo em sementes**

A peroxidação de lipídios tem sido relatada como a principal causa da deterioração de sementes que leva à redução da viabilidade e vigor (KUMAR et al., 2015). Este processo resulta da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas altamente reativas que possuem pelo menos um elétron não pareado em seus orbitais, podendo reagir com outras moléculas, causando a oxidação dessas (MITLLER; BLUMWALD, 2017). As formas mais comuns de EROs encontrados em células vegetais são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (KUMAR et al., 2015).

As EROs são produzidas pelas sementes tanto em condições normais como quando submetidas a situações de estresse ou em decorrência do processo de deterioração, e em altos níveis podem gerar estresse oxidativo acarretando em dano celular e perda da viabilidade das sementes (DEMIDCHIK, 2015). A intensidade de danos celulares é determinada pela capacidade das células de eliminar as EROs, o que pode ocorrer via sistema enzimático ou não enzimático (KIBINZA et al., 2011; DONÀ et al., 2013). O sistema enzimático antioxidativo é

composto por várias enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase (POX) e a peroxidase do ascorbato (APX) que desempenham papel fundamental na neutralização das EROs (RAJJOU E DEBEAUJON, 2008; SHARMA et al., 2012).

A superóxido dismutase (SOD) promove a remoção do ânion superóxido, produzindo peróxido hidrogênio e água, sendo considerada uma enzima antioxidativa da primeira linha de defesa contra as formas reativas de oxigênio (GILL et al., 2015). A SOD pode ser encontrada no citoplasma e matiz mitocondrial e é produzida nas primeiras horas de embebição em sementes viáveis, sendo relatada redução na sua atividade com a queda do potencial fisiológico das sementes (BORGES et al., 2015; ABREU et al., 2013). O decréscimo na atividade da SOD pode ter uma grande contribuição na deterioração de sementes, uma vez que o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$  é associado positivamente com a perda da viabilidade, germinação e vigor de sementes (BAILLY, 2004; CHENG; SONG, 2008; KIBINZA et al., 2006; SAHU et al., 2017). Assim, redução na atividade da SOD por meio da deterioração já foi observada em sementes de girassol (BAILLY et al., 1996) e soja (XIN et al., 2014), ocasionando queda no vigor.

A catalase (CAT) é uma enzima abundante nos peroxissomos, atua convertendo o peróxido de hidrogênio em água e liberando oxigênio. Esta enzima é fundamental nos sistemas de proteção e reparo durante a deterioração associada ao acúmulo de  $H_2O_2$  (KIBINZA et al., 2011). De acordo com Marcos-Filho (2015a), decréscimos na atividade dessa enzima podem provocar menor capacidade de prevenção de danos oxidativos e perda de viabilidade mais rápida. Desta forma, espera-se que com a redução do vigor das sementes a atividade da CAT também diminua (BAILLY, 2004).

Já as peroxidases (POX) são enzimas presentes na parede celular, citosol e vacúolo e que utilizam o peróxido de hidrogênio para oxidarem substâncias doadoras de hidrogênio, como fenóis, ácido ascórbico, aminoácidos, diaminas e alguns íons orgânicos (PASSARDI et al., 2004). A enzima peroxidase do ascorbato (APX) reduz o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  utilizando o ascorbato como um agente redutor (MITLLER; BLUMWALD, 2017). Xin et al. (2014) verificaram redução na atividade de APX em sementes de soja deterioradas por meio de envelhecimento artificial.

Segundo Bailly (2004), sementes de baixo vigor possuem menor eficiência na remoção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo assim o estresse oxidativo e, conseqüentemente, a oxidação de lipídeos de membranas, proteínas e ácidos nucleicos, além de morte celular. Essa baixa eficiência se deve ao fato de sementes menos vigorosas apresentarem maior grau de deterioração em relação a sementes consideradas como de alto vigor. Sabe-se que há uma seqüência de eventos que caracterizam a deterioração das sementes, culminando em decréscimo

do vigor e posteriormente em perda do poder germinativo. (DELOUCHE; BASKIN, 1973). Logo, há uma estreita relação entre a deterioração e perda do vigor em sementes.

De acordo com Marcos-Filho (2015a), dentre as alterações enzimáticas mais frequentes durante o processo de deterioração estão as alterações na estrutura de enzimas, inativação progressiva de enzimas, redução ou paralização da síntese de algumas enzimas e menor atividade de enzimas respiratórias. Sendo assim, sementes em processo de deterioração podem ter os sistemas de defesa antioxidativo comprometidos. Em contrapartida, sementes vigorosas possuem um mecanismo antioxidante de defesa completo e eficiente para evitar os estresses oxidativos durante a germinação (BAILLY, 2004).

A redução da atividade de enzimas antioxidativas tem sido associada à redução da qualidade das sementes durante a deterioração (TIMÓTEO; MARCOS-FILHO, 2013; ATAÍDE et al., 2012). Sharma et al. (2018) observaram que a atividade da SOD e CAT diminuíram significativamente em sementes de feijão mungo submetidas à deterioração. Estes autores ainda citam que a atividade destas enzimas está diretamente relacionada à integridade das mitocôndrias durante o processo germinativo. Por outro lado, Yin et al. (2015) não observaram alterações nas atividades da SOD e CAT em sementes de canola submetidas ao envelhecimento artificial quando comparadas às não envelhecidas.

Contudo, estudos relacionados à atividade de enzimas antioxidantes para a seleção de lotes quanto ao vigor ainda são pouco relatados na literatura. A avaliação das enzimas do sistema antioxidativo (SOD, CAT e APX) foi uma alternativa eficiente para a diferenciar lotes de sementes de milho (BORBA et al., 2014) e soja (BANDEIRA et al., 2014) com pequenas diferenças no vigor. Em milho, o autor constatou que foi possível detectar diferenças tênues, não verificadas nos testes comumente utilizados para avaliação da qualidade fisiológica, permitindo separar lotes homogêneos e com alta germinação, quanto ao vigor. Em sementes de soja, Bandeira et al. (2014), constataram que os resultados dos testes de germinação e vigor têm relação com a atividade destas enzimas, que foram consideradas ferramentas eficientes para detectar pequenas diferenças no vigor dos lotes. Contudo, os autores ressaltam que para que tais avaliações enzimáticas possam se constituir em ferramenta complementar para identificação de pequenas diferenças na classificação de lotes de sementes quanto ao vigor, se faz necessário o emprego do teste de envelhecimento acelerado e de quantificação de peróxidos, para se obter resultados mais conclusivos.

Sendo assim, estudos que visem relacionar o nível de vigor das sementes com a atividade de enzimas antioxidantes, podem fornecer informações interessantes e podem permitir detectar diferenças na qualidade fisiológica dos lotes de sementes.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Pesquisa de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Foram utilizados dois cultivares de grão de bico do grupo Kabuli, sendo cinco lotes de sementes da cultivar BRS Aleppo e quatro lotes da cultivar Cícero, safra 2018, fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Unidade Descentralizada Hortaliças. As sementes de cada lote foram acondicionadas em sacos de papel kraft e mantidas em câmara fria  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  e 50% UR) durante todo o período experimental.

Inicialmente, as sementes de cada lote foram submetidas a testes para a caracterização da sua qualidade inicial e, posteriormente, foram realizados quatro ensaios. O primeiro ensaio consistiu na adequação de metodologia do teste de envelhecimento acelerado e o segundo na do teste de condutividade elétrica, ambos ensaios foram realizados com o objetivo de se determinar o método mais adequado para a avaliação do vigor das sementes. No terceiro ensaio, realizou-se a análise computadorizada de plântulas utilizando o software SAPL<sup>®</sup> também com o propósito de definir uma metodologia eficiente para a avaliação do potencial fisiológico das sementes de grão-de-bico. Já no quarto ensaio procedeu-se a avaliação de enzimas do sistema antioxidativo na tentativa de diferenciar os lotes de grão-de-bico verificando se essas enzimas detectam diferenças no vigor das sementes.

Para os testes de caracterização da qualidade inicial dos lotes e para o ensaio III as sementes de cada lote foram tratadas com o fungicida Derosal Plus<sup>®</sup> (Carbendazim, 150 g/L + Tiram, 350 g/L) na dosagem de 200 mL.100 Kg<sup>-1</sup> de sementes. No teste de envelhecimento acelerado (ensaio I) realizou-se o tratamento das sementes com o mesmo fungicida e dose somente após as sementes serem submetidas ao envelhecimento. Já no teste de condutividade elétrica (ensaio II) e na avaliação da atividade de enzimas antioxidantes (ensaio IV) não houve tratamento das sementes com fungicida.

#### **3.1. Caracterização da qualidade inicial dos lotes**

##### **3.1.1. Determinação do grau de umidade**

Foi utilizado o método de estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ , por um período de 24 horas, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Utilizou-se quatro repetições de 25 sementes para cada lote e os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida).

### **3.1.2. Peso de mil sementes**

Foi obtido utilizando-se oito repetições de 100 sementes por lote, as quais foram pesadas em balança de precisão 0,1 g, conforme os procedimentos descritos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em gramas.

### **3.1.3. Teste de germinação**

Oito repetições de 25 sementes foram distribuídas em papel toalha tipo germitest umedecido com a quantidade de água equivalente a 2,0 vezes o peso do papel seco. Após a semeadura, confeccionou-se rolos que foram mantidos em germinador à temperatura de 20 °C. As avaliações foram realizadas aos 5 e 8 dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais obtidas no oitavo dia, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### **3.1.4. Primeira contagem de germinação**

Foi realizada juntamente com o teste de germinação, calculando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quinto dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

### **3.1.5. Germinação a baixa temperatura**

A metodologia utilizada foi semelhante à descrita para o teste de germinação, porém os rolos foram colocados em sacos plásticos e mantidos em câmara incubadora (tipo BOD) à temperatura de 15 °C, sendo realizada uma única avaliação no quinto dia após a semeadura (DIAS;ALVARENGA, 1999). O resultado foi expresso em porcentagem de plântulas normais com tamanho maior ou igual a 4,0 cm.

### **3.1.6. Teste de frio**

Utilizou-se como substrato papel germitest umedecido conforme descrito para o teste de germinação, no entanto, o substrato foi mantido à temperatura de 10°C durante 24 horas, antes da semeadura. O teste foi realizado oito repetições de 25 sementes e essas foram distribuídas sobre duas folhas de papel germitest. Em seguida, adicionou-se 40 mL de solo sobre as sementes que foram cobertas com mais uma folha de papel para confecção dos rolos.

Os rolos confeccionados foram colocados em sacos plásticos e mantidos em câmara tipo BOD a 10 °C por um período de 7 dias. Após esse período, removeu-se os sacos plásticos e os rolos foram transferidos para germinador a 20 °C por mais 5 dias para então se proceder a avaliação da porcentagem de plântulas normais.

### **3.1.7. Emergência de plântulas**

O teste foi conduzido em câmara de crescimento vegetal em badenjas plásticas contendo mistura de solo e areia na proporção de 1:2, umedecido até atingir 60% da capacidade de retenção (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes semeadas a 2,0 cm de profundidade. A porcentagem de emergência foi calculada computando-se o total de plântulas emergidas após a completa estabilização do estande. Foram consideradas emergidas, as plântulas que se apresentaram com as plúmulas acima da superfície do substrato.

### **3.1.8. Índice de velocidade de emergência (IVE)**

Calculado a partir dos valores diários obtidos do número de plantas emergidas, do primeiro ao último dia de duração do teste de emergência, conforme Maguire (1962).

### **3.1.9. Matéria seca de plântulas**

Foi realizado com as plântulas obtidas ao final do teste de germinação. Com um auxílio de um bisturi os cotilédones foram removidos e as plântulas, separadas por repetição, colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação de ar forçada a 65 °C, durante 72 horas. Após a secagem, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador. Em seguida, procedeu-se a pesagem das amostras em balança com precisão de quatro casas decimais (0,0001 g) e o peso obtido foi dividido pelo número de plântulas da respectiva repetição, sendo o resultado expresso em mg/plântula (NAKAGAWA, 1999).

## **3.2. Ensaio I – Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de sementes de grão-de-bico**

As sementes de cada lote foram submetidas ao teste de envelhecimento acelerado, empregando-se dois procedimentos: o envelhecimento tradicional (água destilada) e o método alternativo utilizando solução saturada de NaCl. Ambos os procedimentos foram realizados

pelo método do gerbox de acordo com a metodologia descrita pela AOSA (1983), e Marcos-Filho (2009) conforme descrito a seguir.

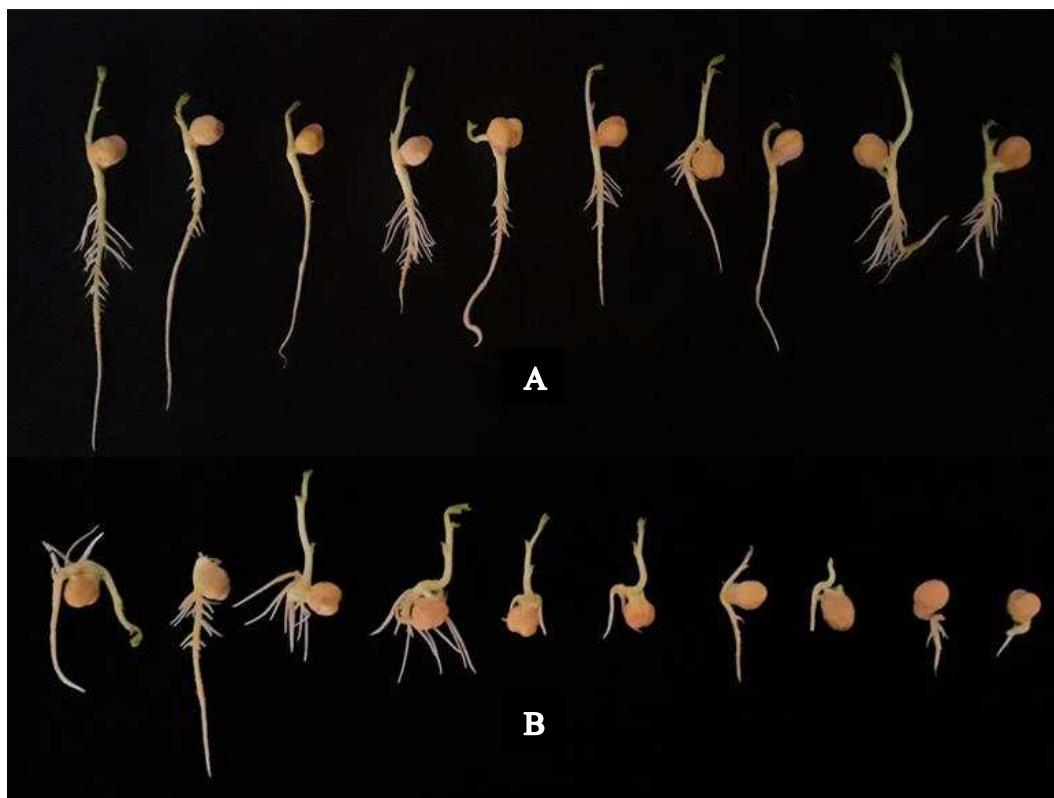
### **3.2.1. Envelhecimento acelerado tradicional**

Realizado com 250 sementes que foram distribuídas, em camada uniforme, sobre a tela metálica acoplada em caixa plástica tipo gerbox, contendo ao fundo 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas de modo a obter 100% UR em seu interior, e mantidas em câmara tipo BOD à temperatura de 41 °C por períodos de 24, 36, 48 e 72 horas. Decorridos esses períodos, foi conduzido o teste de germinação com oito repetições de 25 sementes, conforme descrito anteriormente, obtendo-se a porcentagem de plântulas normais no quinto dia após a semeadura. Na figura 1, é possível verificar o padrão de plântulas normais e anormais adotados no teste de envelhecimento acelerado.

### **3.2.2. Envelhecimento acelerado com solução salina**

Foi conduzido de forma similar ao envelhecimento acelerado tradicional, porém adicionando-se, ao fundo da caixa gerbox, 40 mL de solução saturada de NaCl (40 g de NaCl/100 mL de água) ao invés de água destilada, de forma a se obter, aproximadamente, 76% de UR no interior de cada caixa (JIANHUA; MCDONALD, 1996). As caixas foram mantidas em BOD na temperatura de 41 °C por 24, 36, 48 e 72 horas. Após cada período, 200 sementes de cada tratamento (oito repetições de 25 sementes), foram submetidas ao teste de germinação, calculando-se a porcentagem de plântulas normais no quinto dia após a semeadura.

Após cada período de envelhecimento acelerado, duas repetições de 25 sementes foram utilizadas para a determinação do grau de umidade conforme metodologia descrita para a caracterização inicial da qualidade dos lotes.



**Figura 1:** Padrão de plântulas normais (A) e anormais (B) adotados na avaliação do teste de envelhecimento acelerado. Foto: Joyce de O. Araújo.

### 3.3. Ensaio II – Teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de grão-de-bico

As sementes de cada lote foram submetidas ao teste de condutividade elétrica, realizado de acordo com a metodologia descrita por Vieira e Krzyzanowski (1999) e pela AOSA (1983). Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas em balança de precisão 0,001 g, e em seguida, as sementes de cada repetição foram colocadas em copos plásticos contendo os seguintes volumes de água destilada: 75, 100, 150 e 250 mL. Os copos foram mantidos em incubadora BOD regulada a 25 °C por períodos de 4, 8, 12 e 24 horas. Após cada período, os copos foram retirados da incubadora, os exsudatos foram agitados com um bastão de vidro e a condutividade elétrica das soluções de embebição foi determinada em condutivímetro (Digimed modelo CD 21) devidamente calibrado. Os resultados obtidos foram divididos pelo peso das sementes das respectivas repetições e o resultado final expresso em  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$  de sementes.

### 3.4. Ensaio III - Análise computadorizada de plântulas utilizando o SAPL<sup>®</sup>

Inicialmente foi realizado o teste de comprimento de plântulas com oito repetições de 10 sementes de grão-de-bico por lote. As sementes foram distribuídas em uma linha traçada no terço superior do papel de germinação, no sentido longitudinal. As sementes foram

posicionadas de forma que o hilo estivesse direcionado para a parte inferior do papel e os rolos foram acondicionados em sacos plásticos, colocados verticalmente no germinador por períodos de três, quatro, cinco e oito dias a 20 °C. Ao final de cada período, as plântulas foram transferidas do papel de germinação para uma base fotográfica, feita de folha de espuma vinílica acetinada (E.V.A) de coloração azul, contendo onze células de cinco centímetros de largura, divididas por faixas brancas e, em seguida fotografadas (Figura 2).

A aquisição de imagens foi feita por meio de fotografias, utilizando-se uma câmera digital Nikon, modelo Coolpix P510, configurada em 16 Megapixels, com 1/15 segundos de velocidade de disparo do obturador e f/3.3 de abertura do diafragma. A câmera foi mantida a uma altura de 40 cm e angulação de 90° em relação a base fotográfica, para isso foi utilizado um suporte do tipo copystand. A intensidade luminosa incidente sobre a base fotográfica foi de 260 lux.

As imagens foram armazenadas e, posteriormente, inseridas no arquivo default selecionado do software SAPL® instalado em notebook DELL inspiron 13 série 7000, Windows 10 Professional. Na sequência, foi realizado o preenchimento da contribuição do valor de crescimento e uniformidade para o cálculo do índice de vigor (70 e 30%, respectivamente). Após registro dos valores iniciais, procedeu-se o carregamento e processamento das imagens das plântulas por repetição e lote, como mostrado na Figura 2.

O software forneceu medições do comprimento da parte aérea (CPA), radicular (CR) e plântula inteira (CT). Posteriormente os valores de comprimento de plântulas obtidos pelo SAPL® foram inseridos no pacote SeedCalc do software R (SILVA et al., 2019) para gerar índices mais recentes de uniformidade (CASTAN et al., 2018), crescimento (MEDEIROS et al., 2019) e vigor corrigido (MEDEIROS; PEREIRA, 2018) conforme as fórmulas descritas abaixo:

$$IC = \left( \frac{\text{médiaCT}}{X_{\text{máx}}} \right) \times 1000$$

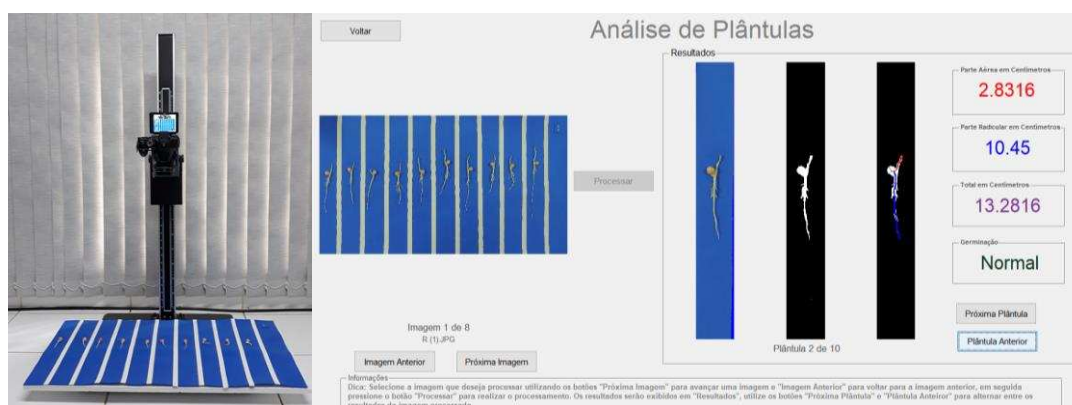
Em que: IC, o índice de crescimento; médiaCT, a média do comprimento total de plântulas da repetição;  $X_{\text{máx}}$ , a média do comprimento total de 5% das maiores plântulas do experimento.

$$IU = \left[ 1 - \frac{\sum_{i=1}^n |X_i - \bar{X}|}{n \times \bar{X}} \right] \times 1000 - \left[ n_{\text{dead}} \times \left( \frac{50}{n_{\text{total}}} \right) \right]$$

Em que: IU é o índice de uniformidade;  $X_i$ , o comprimento da plântula analisada;  $\bar{X}$ , o comprimento médio de plântulas do lote de sementes analisado; n, a variável número de plântulas totais avaliadas;  $n_{\text{dead}}$ , o número de sementes não germinadas ou mortas presentes no lote avaliado; e  $n_{\text{total}}$ , o número total de plântulas.

$$IVC = [(IC \times Pc) + (IU \times Pu)] \times \left( \frac{G}{100} \right)$$

Em que: IVC é o índice de vigor corrigido; IC é o índice de crescimento e IU é o índice de uniformidade escolhido pelo usuário; Pc e Pu são pesos ajustáveis na fórmula para o crescimento e uniformidade, porém com valores referência de 70 e 30, respectivamente; G é o percentual de germinação do lote.

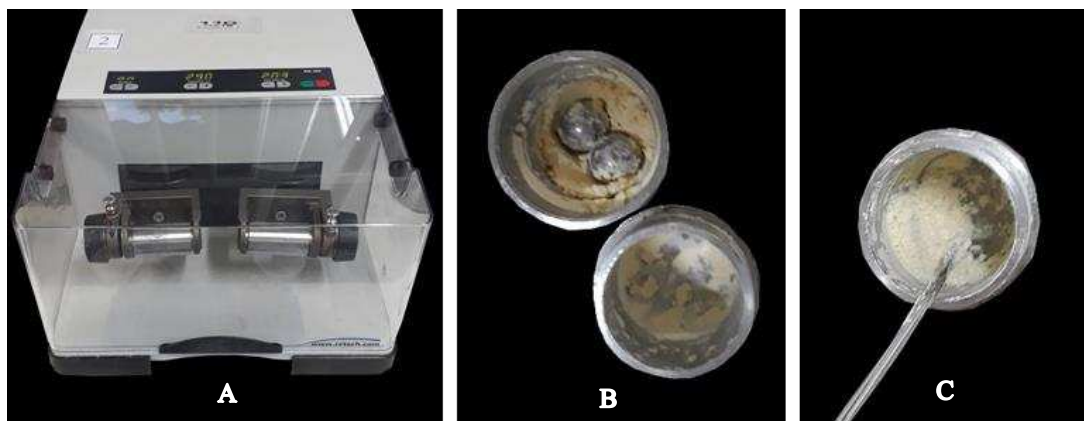


**Figura 2:** Aquisição das imagens e processamento individual de plântulas no SAPL<sup>®</sup>. Foto: Joyce de O. Araújo.

### 3.5. Ensaio IV – Atividade de enzimas antioxidativas em semente de grão-de-bico

Na quantificação das enzimas antioxidativas utilizou-se sementes em processo de germinação. Para a ativação do metabolismo celular, seis repetições de 10 sementes para cada lote foram semeadas em papel germitest, conforme metodologia descrita para o teste de germinação. Após a semeadura, confeccionou-se os rolos que foram mantidos em germinador a temperatura de 20 °C pelo período de 24 horas. Decorrido o período de embebição, os rolos foram retirados do germinador e procedeu-se a retirada do tegumento com um auxílio de um estilete, de forma a evitar danos no embrião. Em seguida, os cotilédones e eixo embrionário foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C.

As sementes de cada lote foram liofilizadas (Liofilizador Scanvac CoolSafe) e posteriormente maceradas utilizando-se um Tissuelyser da Retsch, vibratório, modelo MM 400 na frequência de 29,0 Hz e tempo de 2 min por subamostra, de forma a obter-se um material com granulometria finíssima (Figura 3). Em seguida, o material foi armazenado em microtubos tipo eppendorf de 2 mL e mantido em dessecador até o momento das avaliações. A quantificação da atividade enzimática foi realizada por meio de leituras de absorvâncias utilizando o espectrofotômetro para ELISA, modelo Multiskan GO.



**Figura 3:** Tissuelyser utilizado no experimento (A), sementes de grão-de-bico após serem maceradas (B) e (C), resultando em um material com granulometria finíssima. Fotos: Joyce de O. Araújo.

### 3.5.1. Extração enzimática

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidativas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD), os extratos enzimáticos brutos foram obtidos por meio de aproximadamente 80 mg de embrião, retirado do material macerado no tissuelyser, seguido da adição de 1.000  $\mu\text{L}$  do meio de extração e, então, centrifugado a 15.000 g por 15 min., a 4 °C. O meio de extração consistiu de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (2 mM), ascorbato (20 mM), triton (0,1%), dithiothreitol (DTT) (2 mM) e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 200% (p/p) (adaptado de GIANNOPOLITIS; REIS, 1977; NAKANO; ASADA, 1981; HAVIR et al., 1987; PEIXOTO, 1991).

### 3.5.2. Determinação do teor de proteínas

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. Para isso, 5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto foram adicionados a 250  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford, seguido de agitação. Após 5 minutos, foi realizada a leitura da absorvância da amostra em leitor de ELISA no comprimento de onda de 595 nm.

### 3.5.3. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto em 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação e o volume por reação foi completado para 200  $\mu\text{L}$  com água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup>. O meio de reação foi constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM e água ultrapura (HAVIR et al., 1987). O peróxido de hidrogênio

foi o último a ser adicionado na placa de Elisa utilizando-se uma pipeta multicanal. O decréscimo na absorvância a 240 nm a 25 °C foi medido durante dois minutos de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ANDERSON et al., 1995) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

#### **3.5.4. Determinação da atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX)**

Para determinação da atividade da enzima peroxidase do ascorbato 15  $\mu\text{L}$  de extrato bruto enzimático foi acrescido em 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação e o volume completado para 200  $\mu\text{L}$  com água ultrapura. Foi utilizado no meio de reação tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ascorbato 1 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM e água ultrapura (NAKANO; ASADA, 1981), sendo o peróxido de hidrogênio adicionado ao final na placa de Elisa com o auxílio de uma pipeta multicanal. Em seguida, realizou-se a leitura da absorvância no comprimento de onda de 290 nm a 25 °C durante dois minutos em leitor de ELISA. O cálculo da atividade enzimática foi feito com base no coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (NAKANO; ASADA, 1981) e o resultado expresso em  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

#### **3.5.5. Determinação da atividade da enzima peroxidase (POX)**

Foi determinada a atividade da enzima peroxidase utilizando-se 100  $\mu\text{L}$  de extrato bruto adicionado a 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 25 mM, pirogalol 20 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM e água ultrapura (adaptado de KAR E MISHRA, 1976). O peróxido de hidrogênio foi o último a ser adicionado na placa de Elisa, utilizando-se uma pipeta multicanal. O incremento da absorvância durante os dois minutos de reação a 420 nm, a 25 °C, indicou produção de purpurogalina. A leitura da absorvância foi realizada com o auxílio do leitor de ELISA e para o cálculo da atividade enzimática utilizou-se o coeficiente de extinção molar  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (CHANCE; MAEHLEY, 1955). O resultado foi expresso em  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

#### **3.5.6. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)**

A enzima superóxido dismutase foi determinada por meio de 20  $\mu\text{L}$  de extrato bruto acrescido de 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação e 80  $\mu\text{L}$  de água ultrapura Milli-Q®, totalizando um volume de 200  $\mu\text{L}$  por reação. O meio de reação foi constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$ , metionina 13 mM, riboflavina 2  $\mu\text{M}$  e água ultrapura (GIANNOPOLITIS; REIS, 1977). A reação foi conduzida a

25 °C, em placa de Elisa com volume final 200 µL por reação. A placa de Elisa foi colocada dentro de uma câmara de reação iluminada com luz fluorescente de 15 watts por 10 minutos. Decorrido o período de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi determinada pela absorvância medida em leitor de ELISA a 560 nm (GIANNOPOLITIS; REIS, 1977). Uma outra placa contendo o mesmo meio de reação, mas colocada no escuro sob o mesmo período de tempo, serviu de branco e o valor de absorvância encontrado, no mesmo comprimento de onda, foi subtraído da leitura das amostras que receberam iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). O resultado foi expresso em  $U \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  proteína.

### **3.6. Delineamento experimental e análise estatística**

Os testes foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro, seis ou oito repetições conforme o teste. Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Os dados referentes aos testes para a caracterização inicial da qualidade fisiológica dos lotes, análise computadorizada de plântulas (ensaio III) e determinação da atividade de enzimas antioxidativas (ensaio IV) foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas para cada lote foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o ensaio I, os dados obtidos no teste de envelhecimento acelerado tanto pelo método tradicional como alternativo, foram submetidos à análise de variância seguindo esquema fatorial 5 (lotes) x 5 (períodos de envelhecimento – 0, 24, 36, 48 e 72 h) para a cultivar BRS Aleppo e 4 (lotes) x 5 (períodos de envelhecimento), para a cv. Cícero. Então, comparou-se as médias obtidas dos fatores qualitativos, para cada lote, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, enquanto os períodos de envelhecimento (fator quantitativo) foram submetidos à análise de regressão.

No ensaio II, os dados obtidos no teste de condutividade elétrica também foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 5 (lotes) x 3 volumes de água (75, 150 e 250 mL) x 4 (períodos de embebição – 4, 8, 12, 24 e 48 h) para a cv. BRS Aleppo e 4 (lotes) x 3 (volumes) x 4 (períodos) para a cv. Cícero. As médias obtidas dos fatores qualitativos, para cada tratamento, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, e realizou-se a análise de regressão para o fator quantitativo.

Foram calculados ainda os coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) para todas as combinações entre os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, análise computadorizada de plântulas, determinação da atividade de enzimas antioxidativas e os demais testes de avaliação da qualidade fisiológica realizados. A significância dos valores de  $r$  foi determinada pelo teste  $t$  a 5% de probabilidade. Para todas as análises, foi utilizado o software estatístico R 3.5.2 (R CORE TEAM, 2018).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.1. Cultivar BRS Aleppo**

##### **4.1.1. Caracterização da qualidade dos lotes de grão-de-bico**

Observa-se que o teor de água das sementes foi semelhante para todos os lotes variando de 12,2 a 12,8% (Tabela 1). Segundo Marcos-Filho (2015a), a uniformização do teor de água das sementes é importante para permitir padronização das avaliações e comparação segura do potencial fisiológico dos lotes analisados.

O peso de mil sementes dos lotes 1, 2 e 5 foi superior ao obtido para os lotes 3 e 4, sendo o lote 4 o que apresentou menor valor (Tabela 1). Sementes mais densas geralmente são as que possuem embriões bem formados e com maiores quantidades de reservas apresentando, possivelmente, mais chances de serem vigorosas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Houve diferença significativa na germinação dos lotes, com maiores valores para os lotes 1 e 2 e menor valor para o lote 4 (Tabela 1). Os lotes 3 e 5 foram inferiores ao lote 2, mas não diferiram do lote 1. Com exceção do lote 4, todos os demais lotes apresentaram alta germinação, acima de 90%. Contudo, mesmo o lote 4 atendeu ao padrão mínimo de germinação estabelecido para a comercialização de sementes de grão-de-bico que é 80% (BRASIL, 2012).

Pela primeira contagem do teste de germinação, que avalia indiretamente a velocidade de germinação, verifica-se que o lote 4 não diferiu do lote 5, mas foi inferior aos lotes 1, 2 e 3 (Tabela 1). Resultado semelhante também foi encontrado na emergência de plântulas, onde o lote 4 teve desempenho inferior aos demais. Tanto a primeira contagem de germinação como a emergência de plântulas foram conduzidas em temperatura e umidade consideradas ideais para a germinação e desenvolvimento de plântulas da espécie em questão, o que pode ter favorecido o desempenho dos lotes com germinação acima de 90%.

**Tabela 1:** Caracterização da qualidade inicial de cinco lotes de grão-de-bico cv. BRS Aleppo, avaliados pelo grau de umidade (GU), peso de mil sementes (PMS), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), teste de frio (TF), massa seca de plântula (MS) e germinação a baixa temperatura (GBT).

Lotes	GU (%)	PMS (g)	G (%)	PCG (%)	E (%)	IVE (índice)	TF (%)	MS (mg.plântula <sup>-1</sup> )	GBT (%)
1	12,7	391,3 a	95 ab	75 a	99 a	5,7 a	97 a	39,2 ab	87 a
2	12,8	389,5 a	97 a	79 a	98 a	5,5 a	96 a	39,6 a	90 a
3	12,8	373,5 b	90 b	79 a	94 a	5,2 ab	89 ab	35,3 ab	73 b
4	12,7	350,4 c	80 c	56 b	84 b	4,1 c	73 c	25,5 c	44 c
5	12,2	398,1 a	91 b	68 ab	92 a	4,8 b	88 b	32,8 b	80 ab
F	-	66,07*	23,51*	5,68*	12,49*	19,00*	24,82*	15,03*	64,47*
CV(%)	-	1,24	3,01	11,41	3,63	5,51	4,31	8,63	6,17

\* = significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; F = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

De modo geral, os resultados obtidos no índice de velocidade de emergência, teste de frio e massa seca de plântula foram semelhantes em termos de classificação dos lotes em níveis de vigor (Tabela 1). Nestes testes, os lotes 1, 2 e 3 não diferiram entre si sendo superiores ao lote 4, o de menor vigor, ficando o lote 5 numa posição intermediária. Qasim et al. (2010) obtiveram alta correlação entre os resultados do teste de frio e os de emergência de plântulas de grão-de-bico. Já pelo teste de germinação a baixa temperatura, os lotes 1 e 2 foram mais vigorosos em relação aos lotes 3 e 4, sendo o lote 4 inferior aos demais. Nota-se que pelos demais testes utilizados os lotes 1, 2 e 3 não diferiram entre si. Assim, o teste de germinação a baixa temperatura mostrou-se mais eficiente para a separação dos lotes em níveis de vigor.

Em síntese, pelos testes utilizados para a caracterização da qualidade inicial das sementes, o lote 4 foi o menos vigoroso e os lotes 1 e 2, em geral, foram os que apresentaram maior vigor e, dependendo do teste, ficando os lotes 3 e 5 numa posição intermediária.

#### 4.1.2. Ensaio I - Envelhecimento acelerado

Verifica-se na Tabela 2, dentro de cada período estudado, que não houve variações expressivas no teor de água das sementes após serem submetidas ao envelhecimento acelerado com 100% UR e 76% UR. As variações máximas encontradas no método tradicional e em solução salina foram de 2,4 e 1,1 pontos percentuais, respectivamente. Tais variações se encontram dentro do limite relatado por Marcos-Filho (1999), que indica como toleráveis variações de até 4 pontos percentuais entre as amostras ao final do envelhecimento acelerado, não afetando assim a obtenção de resultados consistentes.

**Tabela 2:** Teor de água (%) obtidos antes e após os períodos de envelhecimento acelerado tradicional (100% UR) e com solução de NaCl (76% UR) em lotes de sementes de grão-de-bico cv. BRS Aleppo.

Lote	Umidade inicial (%)	Tradicional (água)				Solução Saturada (NaCl)			
		24 h	36 h	48 h	72 h	24 h	36 h	48 h	72 h
1	12,7	19,6	23,6	24,6	26,5	13,6	13,6	13,5	13,5
2	12,8	20,6	21,4	25,2	27,6	13,7	13,7	13,6	14,1
3	12,8	20,8	23,8	25,1	26,6	13,6	13,8	14,0	13,9
4	12,7	20,0	21,9	24,3	26,0	13,5	13,8	13,4	13,0
5	12,2	19,2	23,0	24,1	26,5	13,4	13,6	13,8	14,0

Comparando os dois métodos de envelhecimento acelerado (Tabela 2), nota-se que com uso de solução saturada de NaCl (76% UR) houve menor absorção de água pelas sementes, resultando em deterioração menos drástica que pode ser comprovada pelos valores mais altos de germinação após o envelhecimento acelerado obtidos com a solução saturada em relação aos valores atingidos quando se utilizou água, 100% UR (Tabela 3).

O envelhecimento acelerado pelo método tradicional (100% UR) permitiu a separação dos lotes quanto ao vigor nos quatro períodos de tempo analisados (Tabela 3). Para os tempos de 36 e 72 horas, os resultados foram semelhantes com os lotes 1 e 2 mais vigorosos que os demais. Já nos períodos de 24 e 48 horas, maior vigor foi observado para os lotes 1 e 2, menor vigor para os lotes 3 e 4, que não diferiram estatisticamente entre si, e vigor intermediário para o lote 5.

**Tabela 3:** Germinação (%) de cinco lotes grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, após diferentes tempos de envelhecimento acelerado a 41 °C pelo método tradicional e com solução saturada de NaCl.

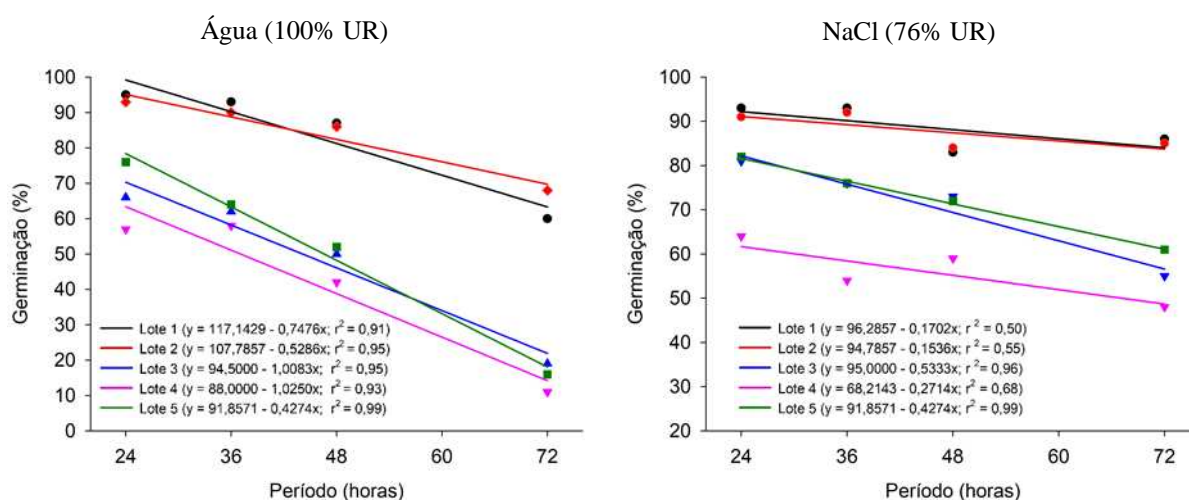
Lote	Tradicional (água)				Solução Saturada (NaCl)			
	24 h	36 h	48 h	72 h	24 h	36 h	48 h	72 h
1	95 a A	93 a A	87 a A	60 a B	93 a A	93 a A	83 a A	86 a A
2	93 a A	90 a A	86 a A	68 a B	91 ab A	92 a A	84 a A	85 a A
3	66 c B	62 b B	50 bc B	19 b B	81 c A	76 b A	73 b A	55 bc A
4	57 c B	58 b A	42 c B	11 b B	64 d A	54 c A	59 c A	48 c A
5	76 b A	64 b B	52 b B	16 b B	82 bc A	76 b A	72 b A	61 b A
CV(%)	2,91							

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na linha comparando os métodos em cada tempo e letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao se utilizar solução de NaCl saturada (76% UR), portanto umidade relativa mais baixa de modo a reduzir o estresse causado às sementes, em todos os períodos estudados foi possível separar os lotes em níveis de vigor (Tabela 3). Os resultados obtidos em todos os períodos foram semelhantes, com pequenas variações. Em geral, maior vigor foi observado para os lotes 1 e 2, conforme também relatado no método tradicional (100% UR) e menor vigor para o lote 4, sendo

os lotes 3 e 5 classificados como de médio vigor. Assim, verifica-se que foi possível classificar os lotes em três diferentes níveis de vigor em todos os períodos de envelhecimento com solução salina, o que não foi observado no teste conduzido pelo método tradicional. Neste, apenas nos períodos de 24 e 48 horas houve maior estratificação dos lotes em níveis de vigor.

Ao comparar os tempos de envelhecimento acelerado, observa-se que houve redução linear da germinação com o aumento do tempo de envelhecimento para todos os lotes em ambos os métodos estudados (Figura 4). No entanto, a queda da germinação se deu de forma mais acentuada quando se utilizou o envelhecimento acelerado tradicional (100% UR), devido ao maior estresse e deterioração em relação à condução do teste com solução salina (76% UR). No envelhecimento com solução saturada de NaCl, é possível observar três categorias de vigor em todos os períodos estudados, sendo os lotes 1 e 2 os de maior vigor, os lotes 3 e 4 os de médio vigor e o lote 5 inferior aos demais. Nota-se, contudo, que esta diferença entre os lotes é mais nítida nos períodos de 24, 36 e 48 horas. No período de 72 horas, os valores para os lotes 3, 4 e 5 são mais próximos, conforme já havia sido constatado pelo teste de comparação de médias (Tabela 3). Pelo método tradicional (Figura 4), os valores obtidos para esses três lotes são mais próximos em todos os períodos testados, ficando mais evidente a superioridade dos lotes 1 e 2 em relação aos demais, conforme observado também na Tabela 3.



**Figura 4:** Porcentagem de germinação de cinco lotes de sementes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, após o envelhecimento acelerado em água (100% UR) e em solução saturada de NaCl (76% UR) por períodos de 24, 36, 48 e 72 horas.

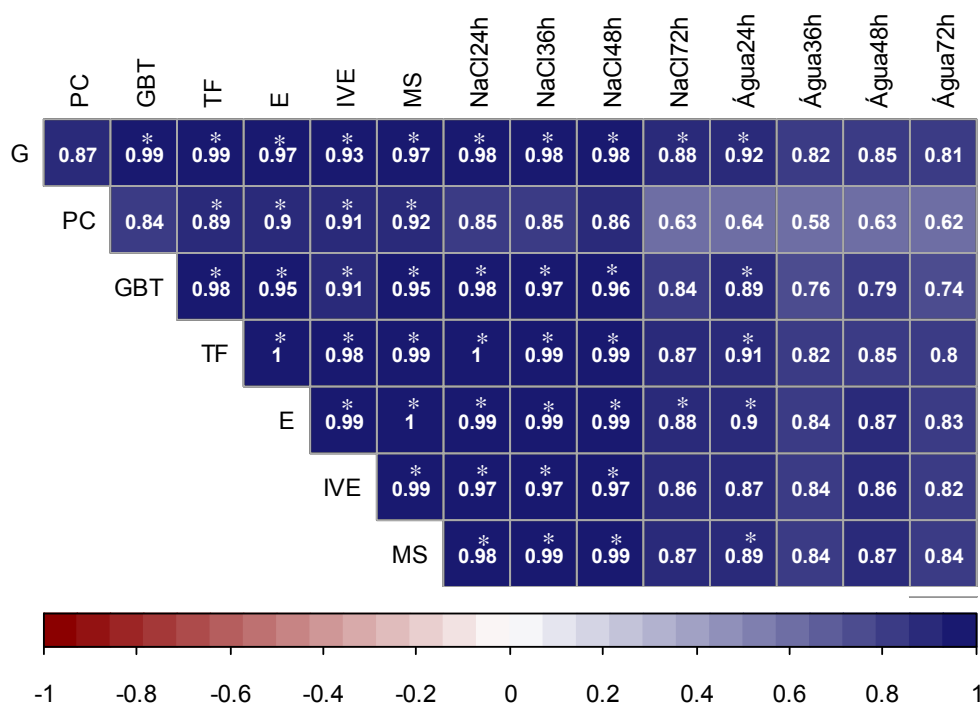
Ainda na Figura 4, é possível verificar que no envelhecimento tradicional, no período de 72 horas, houve decréscimo muito acentuado na germinação, principalmente nos lotes de 3, 4 e 5, indicando assim que esse período foi muito drástico na avaliação de sementes de grão-de-bico. Samarah e Abu-Yahya (2008) ao utilizar o envelhecimento tradicional em um período

ainda maior, 96 horas, a 40 °C em estudo sobre maturação em sementes de grão-de-bico, constataram que o teste de envelhecimento foi eficiente na discriminação da qualidade das sementes nos diferentes estágios de maturidade estudados. Ram et al. (1989) relatou que o período de 96 horas de envelhecimento acelerado e 100% UR apresentou relação com a emergência em campo. Porém, nos dois estudos citados também houve redução severa na germinação das sementes, principalmente nos lotes que não apresentavam alto potencial fisiológico; além disso, nesses trabalhos não foram testadas diferentes condições para a condução do teste envelhecimento acelerado para determinar a mais adequada para a avaliação do vigor.

Para o teste de envelhecimento acelerado para sementes de soja e feijão é recomendada a temperatura de 41 °C por 48 horas, pelo método tradicional (MARCOS-FILHO, 1999; AOSA, 2009). Contudo, para sementes de grão-de-bico, observou-se, nesse mesmo método e período, alta incidência de microrganismos e muitas sementes mortas com excesso de exsudato no seu entorno, indicativo de deterioração excessiva provocada principalmente pela alta umidade relativa. Segundo Trancoso (2018), o tegumento das sementes de grão-de-bico apresenta predominância de pectinas e celulose na sua constituição. Com a hidratação, observa-se que o tegumento apresenta um aspecto de gel, o que facilita o crescimento e ação de microrganismos, podendo ser um fator determinante para que os resultados com 76% UR tenham sido mais adequados. Este aspecto de gel não é geralmente observado no tegumento de sementes de soja e feijão.

Em geral, fica evidente o aumento da taxa de deterioração com o aumento do período de exposição ao teste, sobretudo quando se utiliza 100% UR, fato também observado em sementes de feijão (SANTOS et al., 2004; BINOTTI et al., 2008; BERTOLIN et al., 2011). Kapoor et al. (2010), em um estudo sobre deterioração de sementes de grão-de-bico após essas serem submetidas ao envelhecimento com 100% UR a 45 °C por 24, 48 e 72 horas, constataram reduções na qualidade fisiológica das sementes, como também nos teores de proteína e açúcar, com o aumento do tempo de envelhecimento acelerado.

Verifica-se que houve correlação altamente significativa entre tratamentos de envelhecimento acelerado e os demais testes de vigor, exceto com os de primeira contagem (Figura 5). Contudo, como já mencionado nos comentários sobre a Tabela 1, a primeira contagem de germinação não permitiu separação eficiente dos lotes em diferentes níveis de vigor, pois diferenciou apenas o lote de pior qualidade dos demais.



**Figura 5:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os diferentes procedimentos do teste de envelhecimento acelerado realizados em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

A correlação entre os dados do teste de envelhecimento acelerado com os obtidos nos demais testes de avaliação da qualidade das sementes reforça a sua eficiência para a avaliação do vigor das sementes de grão-de-bico. Cabe ressaltar que as maiores correlações significativas foram obtidas com o uso de solução saturada de NaCl por 24, 36 e 48 horas. Em contrapartida, no envelhecimento tradicional não houve correlação significativa para os períodos de 36, 48 e 72 horas com os resultados dos demais testes. (Figura 5). Em outras leguminosas, como ervilha (NASCIMENTO et al., 2007), lentilha (FREITAS; NASCIMENTO, 2006) e feijão caupi (DOURADO et al., 2013) também houve maior eficácia quando o teste de envelhecimento foi realizado com 76% de umidade relativa em relação ao método de envelhecimento tradicional, sendo o tempo de 48 horas a 41 °C o mais indicado. Maior eficiência do teste de envelhecimento acelerado com uso de solução saturada de sal na classificação de lotes com diferentes níveis de vigor também foi observado em sementes de hortaliças como cenoura (RODO et al., 2000), melão (TORRES; MARCOS-FILHO, 2003), pepino (TORRES, 2005), brócolis (FESSEL et al., 2005), alface (KIKUTI; MARCOS-FILHO, 2012), rúcula (FREITAS et al., 2018). É importante salientar que este método alternativo foi inicialmente desenvolvido para sementes de hortaliças, especialmente as de menor tamanho, buscando utilizar uma condição menos

estressante do que a proporcionada pelo método tradicional com 100% de UR (JIANHUA; MCDONALD, 1996).

#### **4.1.3. Ensaio II - Condutividade elétrica**

No teste de condutividade elétrica, vale lembrar que maiores valores indicam menor vigor, devido a menor velocidade de organização das membranas com a hidratação e consequentemente, maior lixiviação de solutos (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999). No volume de 75 mL, houve separação dos lotes quanto ao potencial fisiológico já com 2 horas de embebição, com menor vigor para o lote 4, vigor intermediário para os lotes 3 e 5 e maior vigor para os lotes 1 e 2 (Tabela 4). Contudo, nos períodos mais longos, ou seja, 12 e 24 horas, a separação foi ainda mais nítida, com maior vigor para o lote 2, seguido pelo lote 1, 3 e 5, com menor vigor para o lote 4. Assim, os lotes 1 e 2 que apresentaram qualidade fisiológica semelhante nos demais períodos, foram estatisticamente diferentes com 12 e 24 horas de embebição. Nos períodos de 8, 12 e 24 horas, a classificação dos lotes quanto ao vigor foi semelhante quando foram utilizados os volumes de 100, 150, 250 mL. Maior vigor foi observado para os lotes 1 e 2 (menor lixiviação) seguidos pelos lotes 3 e 5, permanecendo o lote 4 como o de menor vigor.

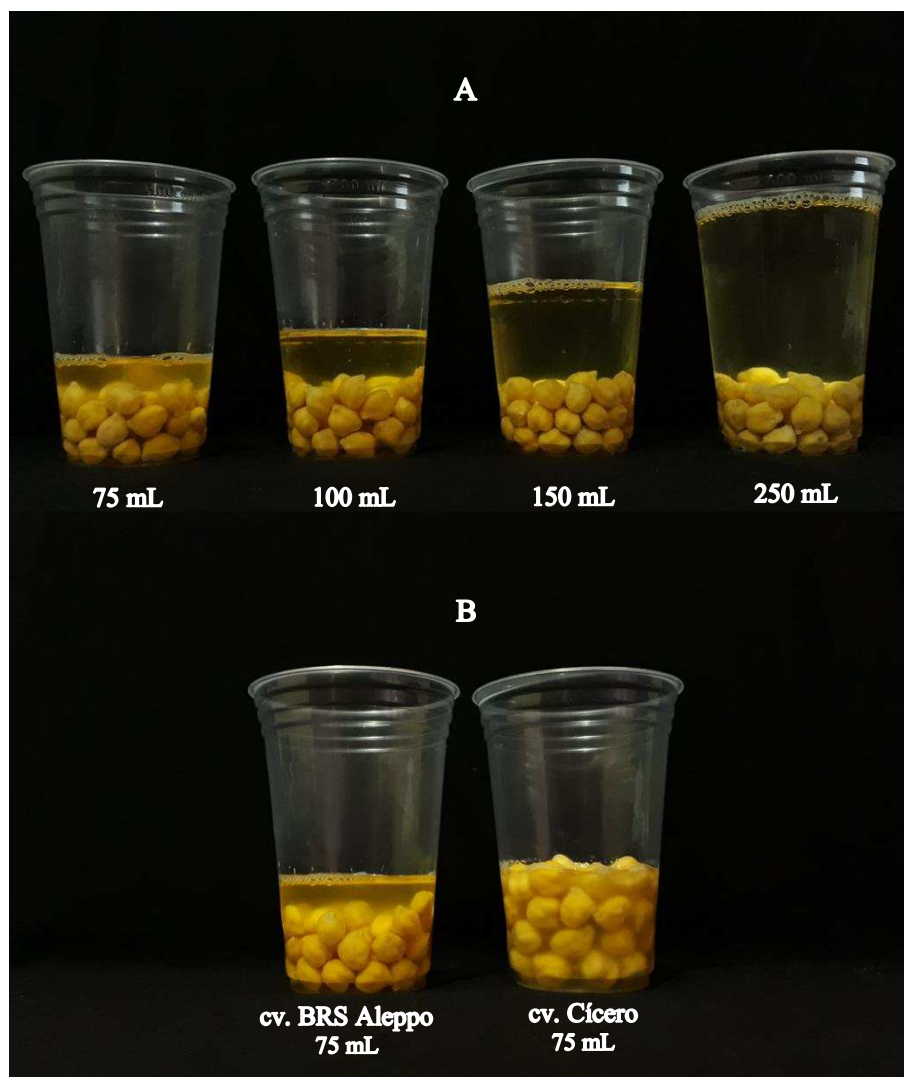
Ao se comparar os diferentes volumes de água utilizados (Tabela 4), observa-se que, em geral, maiores e menores valores de condutividade foram obtidos com 75 mL e 250 mL, respectivamente. Assim, com o aumento do volume de água houve maior diluição da solução de embebição das sementes, conforme já era esperado.

Apesar de ter permitido a separação dos lotes quanto ao vigor, o volume de 75 mL de água dificultou a avaliação, pois as sementes embebidas aumentaram de tamanho e o volume da solução ficou insuficiente, dificultando inserir o eletrodo do condutivímetro para as leituras (Figura 6A). Em grão-de-bico há diferenças no peso e tamanho das sementes entre cultivares (NASCIMENTO et al., 2016; DIAS et al., 2019). O peso de mil sementes da cv. BRS Aleppo é de cerca de 390 g (Tabela 1), enquanto para a cv. Cícero pode atingir mais de 600 g (NASCIMENTO et al., 2016). Sendo assim, a leitura da condutividade no volume de 75 mL em cultivares cujas sementes são maiores do que as da cv. BRS Aleppo, é ainda mais dificultada. Na figura 6B é possível visualizar a diferença nos volumes ocupados pelas sementes das cultivares BRS Aleppo e Cícero, após 50 sementes de cada cultivar serem colocadas para embeber em 75 mL durante um período de 24 horas.

**Tabela 4:** Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de cinco lotes de sementes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, em diferentes volumes de água e períodos de embebição.

Período de embebição	Lotes	Volume de água (mL)			
		75	100	150	250
2 h	1	21,29 A c	16,93 B c	11,11 C c	9,15 C c
	2	21,49 A c	17,64 B c	10,86 C c	9,06 C c
	3	28,23 A b	21,54 B b	13,92 C bc	10,43 D bc
	4	35,80 A a	27,74 B a	18,06 C a	14,50 D a
	5	30,80 A b	25,99 B a	16,97 C ab	12,46 D ab
4 h	1	29,12 A d	23,60 B d	16,25 C c	10,99 D c
	2	28,39 A d	23,83 B d	16,05 C c	11,81 D c
	3	36,76 A c	29,85 B c	20,10 C b	14,03 D c
	4	51,32 A a	39,96 B a	25,49 C a	22,21 D a
	5	41,81 A b	35,50 B b	23,30 C ab	18,68 D b
8 h	1	37,58 A d	30,62 B d	21,60 C d	16,50 D d
	2	36,33 A d	30,36 B d	21,17 C d	16,61 D d
	3	47,13 A c	37,78 B c	26,16 C c	20,05 D c
	4	67,27 A a	52,17 B a	35,20 C a	29,49 D a
	5	56,37 A b	46,73 B b	31,14 C b	24,63 D b
12 h	1	45,02 A d	35,50 B d	25,41 C d	19,73 D d
	2	41,26 A e	35,12 B d	24,20 C d	18,98 D d
	3	54,44 A c	44,42 B c	30,45 C c	23,61 D c
	4	78,65 A a	62,73 B a	42,10 C a	34,70 D a
	5	67,14 A b	56,01 B b	37,01 C b	28,91 D b
24 h	1	56,77 A d	43,74 B d	31,07 C d	23,98 D d
	2	50,54 A e	43,35 B d	30,04 C d	22,82 D d
	3	66,08 A c	53,70 B c	36,17 C c	28,17 D c
	4	91,91 A a	73,71 B a	52,24 C a	40,97 D a
	5	81,48 A b	65,89 B b	46,03 C b	34,54 D b
CV(%)		6,66			

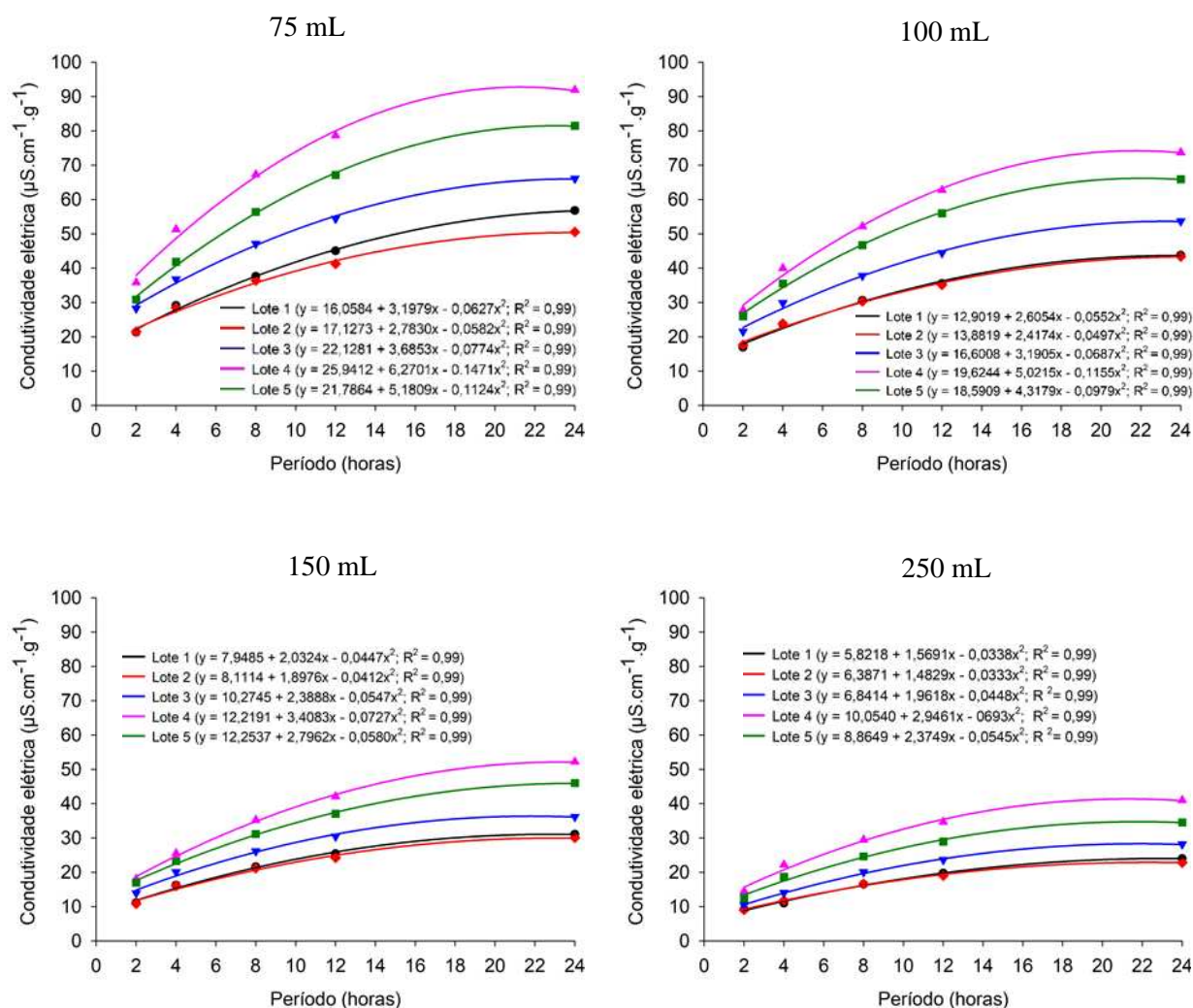
Médias seguidas pelas mesmas letras, dentro de cada período de embebição, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 6:** Ilustração de todos os volumes de solução para sementes da cv. BRS Aleppo após 24 horas de embebição (A); para todos os volumes estudados foram utilizados copos plásticos com capacidade de 300 mL. Diferenças no tamanho das sementes da cv. BRS Aleppo e cv. Cícero após 24 horas de embebição (50 sementes imersas em 75 mL de água) (B). Fotos: Joyce de O. Araújo.

Houve aumento da condutividade elétrica com o aumento do tempo de embebição em todos os volumes de água testados (Figura 7). Para todos os volumes, em geral, maior condutividade elétrica, indicando menor vigor, foi obtido para as sementes do lote 4 e menores valores para os lotes 1 e 2, ou seja, maior vigor, sendo os lotes 3 e 5 classificados como de médio vigor.

O volume de 75 mL, como já mencionado, embora tenha sido eficiente para a separação dos lotes quanto ao vigor (Figura 7), dificultou a realização das leituras conforme comentado anteriormente. No volume de 100 mL, a separação dos lotes em níveis de qualidade foi mais nítida em relação aos volumes de 150 mL e 250 mL, principalmente com relação aos lotes de vigor intermediário.



**Figura 7:** Condutividade elétrica de sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, após embebição por 2, 4, 8, 12 e 24 horas em 75, 100, 150 e 250 mL de água.

Com 100 e 150 mL, a diferença entre os valores de condutividade dos lotes já pode ser observada nos períodos iniciais de embebição se mantendo até 24 horas permitindo a separação dos lotes em diferentes níveis de potencial fisiológico (Tabela 4 e Figura 7). No entanto, é importante levar em consideração a praticidade para a realização do teste, e neste aspecto os períodos de 8 e 12 horas não são tão práticos como o de 24 horas. Além disso, o período de 24 horas, possibilitou maiores valores de condutividade o que é desejável, pois possibilita uma diferença ainda maior nas leituras entre os lotes com diferentes níveis de vigor. Machado et al. (2011) recomendam a condução do teste de condutividade elétrica com o período de 24 horas de embebição para sementes de ervilha. Em sementes de soja, períodos de embebição mais curtos (4 e 8 horas) permitiram a identificação de diferenças mais acentuadas de vigor entre os lotes, enquanto avaliações realizadas a partir de 16 horas mostraram-se mais sensíveis às variações de vigor das sementes (DIAS; MARCOS-FILHO, 1996). Em sementes de feijão-

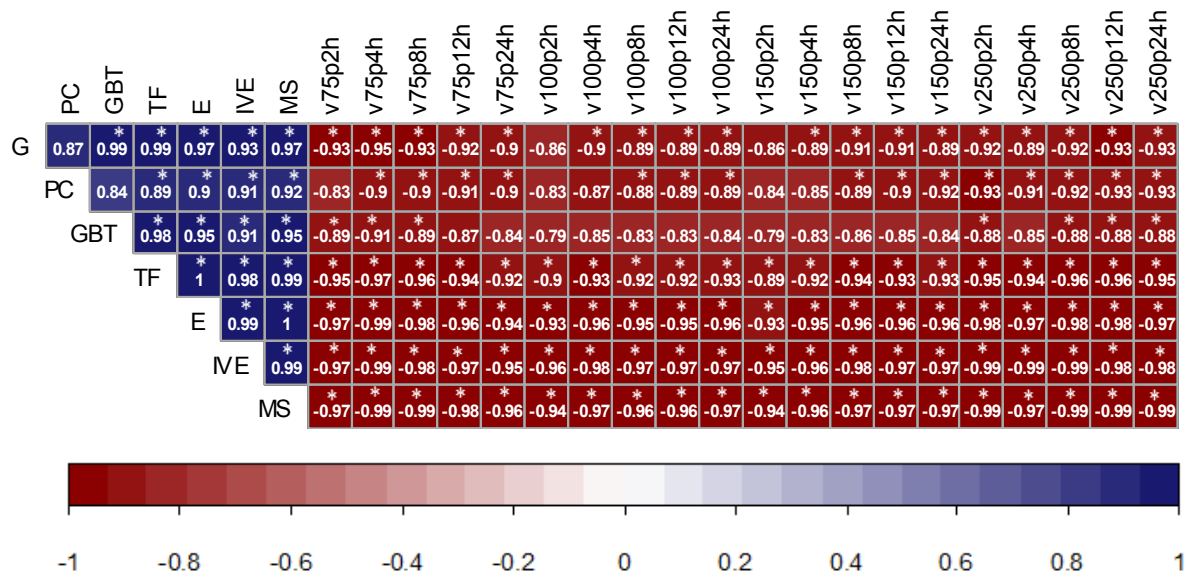
mungo-verde (*Vigna radiata*), o teste de condutividade elétrica permitiu a separação dos lotes quanto ao vigor a partir de 3 horas de embebição (Araujo et al., 2011), mostrando-se adequado para a avaliação do potencial fisiológico destas sementes utilizando-se 50 sementes em 75 mL de água.

Dias et al. (2019) encontraram melhores resultados no teste de condutividade elétrica com sementes de grão-de-bico utilizando o volume de 100 mL, porém esses autores recomendaram a utilização de amostras de 75 sementes e a avaliação da condutividade após 30 horas de embebição. De acordo com observações realizadas na presente pesquisa, com 30 horas de imersão em água já ocorre a emissão da radícula das sementes de lotes mais vigorosos. Além disso, 75 sementes imersas em 100 mL de água dificulta a realização das leituras de condutividade devido ao aumento do volume das sementes embebidas, situação semelhante à observada na presente pesquisa ao se empregar 50 sementes em 75 mL de água, sobretudo em cultivares que possuem sementes de maior tamanho.

Os valores de condutividade obtidos para os 5 lotes com o volume de 250 mL foram mais próximos em todos os períodos, devido à maior diluição da solução de embebição ao se utilizar maior volume de água (Figura 7). Valores muito próximos podem dificultar a interpretação e a classificação dos lotes em níveis de vigor, principalmente quando se utiliza na avaliação um grande número de lotes. Segundo Khajeh-Hosseini e Rezazadeh (2011), o teste de condutividade elétrica realizado com 250 mL de água por 2 e 24 horas forneceu um indicativo de emergência em campo para alguns lotes de grão-de-bico. Trancoso (2018), ao utilizarem o teste de condutividade elétrica com 50 sementes imersas em 250 mL de água por 24 horas, identificaram diferenças no potencial fisiológico de sementes de grão-de-bico colhidas em diferentes estádios de maturação. A autora constatou ainda que o teste foi eficiente para monitorar a redução da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento por seis meses. Todavia, em ambos trabalhos, as leituras de condutividade obtidas também foram baixas, embora estatisticamente diferentes. Deve-se considerar que, muitas vezes, em programas de controle de qualidade das sementes, são utilizados os valores absolutos de condutividade para a comparação dos diferentes lotes, de modo que diferenças mais acentuadas entre as leituras de condutividade podem facilitar a interpretação dos resultados para seleção dos lotes de melhor e pior desempenho.

A partir da análise de correlação apresentada na Figura 8, podem ser observadas correlações negativas e significativas entre os testes de qualidade inicial e os de condutividade elétrica nos diferentes procedimentos testados. Vale lembrar que as correlações são negativas pois quanto maior os valores de condutividade menor o vigor das sementes. Esses resultados

confirmam os obtidos com os testes de comparação de médias (Tabela 4), no qual em todos os tratamentos de condutividade elétrica foi possível separar os lotes em níveis de vigor. Qasim et al. (2010) não obteve correlação significativa entre os resultados de condutividade elétrica e emergência de plântulas de grão-de-bico em campo. Vale ressaltar que estes autores utilizaram metodologia diferente, com amostras de 5 g de sementes imersas em 50 mL de água por diferentes períodos de embebição.



**Figura 8:** Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os diferentes procedimentos do teste de condutividade elétrica realizados em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

#### 4.1.4. Ensaio III - Análise computadorizada de plântulas

Os dados obtidos na análise computadorizada de plântulas por meio do processamento de imagens no software SAPL<sup>®</sup> se encontram na Tabela 5. Constata-se que com 4 dias de germinação não houve diferença significativa entre os lotes quanto ao comprimento da parte aérea (CPA) das plântulas e, com 5 dias, apenas o lote 4 foi inferior aos demais. Somente no 8º dia foi possível notar diferença mais evidente entre os lotes, com maior vigor para o lote 1, que não diferiu do lote 2 e menor vigor para o lote 4 que não diferiu do lote 5. Vale ressaltar que aos 4 e 5 dias, o tamanho da parte aérea das plântulas foi inferior a 1,0 cm, podendo ser considerado ainda muito pequeno em comparação com o comprimento radicular (CR). Aos 8 dias verifica-se que os valores de CPA foram maiores, variando de 2,27 a 3,72 cm/plântula.

**Tabela 5:** Resultados médios de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento radicular (CR), comprimento total (CT), índice de uniformidade (IU), índice de crescimento (IC) e índice de vigor corrigido (IVC), obtidos pelo SAPL<sup>®</sup> aos quatro, cinco e oito dias após a semeadura de cinco lotes de sementes de grão-de-bico.

Lote	CPA	CR (mm.plântula <sup>-1</sup> )	CT	IU	IC Índices	IVC
4 dias						
1	6,5 a	56,1 a	62,7 a	834,4 a	762,1 a	744,6 a
2	6,5 a	56,8 a	63,4 a	847,5 a	770,1 a	769,5 a
3	7,0 a	45,8 b	52,8 b	807,0 a	634,9 b	617,9 b
4	6,6 a	36,3 c	42,8 c	649,5 b	521,2 b	447,8 c
5	7,3 a	42,8 bc	50,1 bc	766,5 ab	608,1 b	596,6 b
F	3,80 <sup>ns</sup>	17,00*	17,40*	6,70*	15,60*	28,50*
CV (%)	5,01	9,06	7,70	7,87	8,15	7,63
5 dias						
1	9,1 a	73,1 a	82,3 a	840,1 a	758,6 a	743,9 a
2	9,3 a	71,8 a	81,1 a	855,6 a	755,0 a	761,6 a
3	9,8 a	55,4 b	65,3 b	781,4 ab	605,0 b	592,1 b
4	7,5 b	44,6 c	51,8 c	621,0 b	484,3 bc	420,3 c
5	9,2 a	53,6 bc	62,8 b	747,6 ab	585,3 c	576,9 b
F	6,13*	30,32*	38,40*	5,90*	24,10*	32,25*
CV (%)	7,92	7,51	6,08	10,0	7,53	7,90
8 dias						
1	34,4 a	125,2 a	159,6 a	829,8 a	725,4 a	718,9 a
2	37,2 ab	122,0 a	159,2 a	816,4 a	727,2 a	731,3 a
3	31,4 bc	88,0 b	119,7 b	796,9 a	539,4 b	555,0 b
4	22,7 d	74,5 c	97,4 c	578,0 b	421,7 c	386,1 c
5	26,6 cd	87,1 bc	113,7 bc	735,2 a	522,1 b	533,3 b
F	27,28*	60,95*	55,57*	8,90*	28,4*	39,5*
CV(%)	7,35	5,88	5,80	9,20	8,10	7,81

\*, <sup>ns</sup> = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; F = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para o comprimento radicular (CR) e comprimento do total de plântula (CT), houve diferenças entre os lotes quanto ao vigor já no 4º dia após a semeadura (Tabela 5), sendo que os lotes 1 e 2 foram os mais vigorosos e o lote 4 o de pior vigor, que não diferiu do lote 5, ficando o lote 3 em posição intermediária. Essa mesma tendência foi observada com 5 e 8 dias após a semeadura. Como a maior precocidade na obtenção de resultados é desejável em testes de vigor, considera-se mais interessante a realização das avaliações do CR e CT com 4 dias. Medeiros e Pereira (2018), ao analisarem a eficiência do SAPL<sup>®</sup> na classificação quanto ao

vigor em lotes de soja, concluíram que a análise de plântulas realizada no 4º dia após a semeadura mostrou-se mais adequada para avaliar o potencial fisiológico dos lotes.

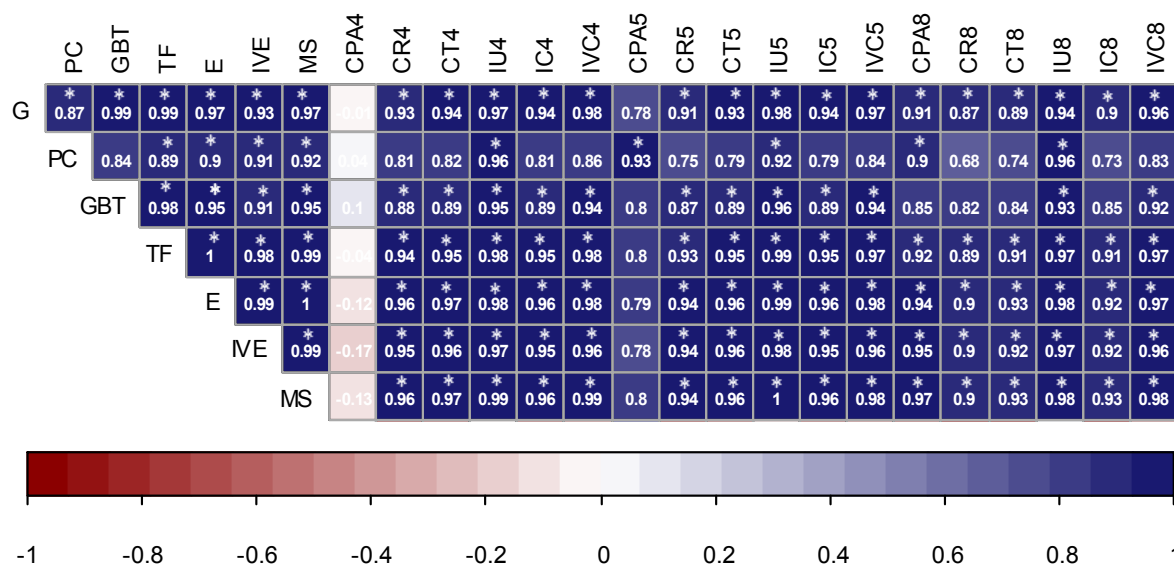
Medeiros e Pereira (2018) relataram que tanto o índice de vigor corrigido como o de crescimento possibilitaram distinção dos lotes de soja pela sua qualidade fisiológica. No presente trabalho, da mesma maneira, estes índices foram eficientes para avaliar o vigor das sementes, sendo que com 4 dias o índice de vigor corrigido já permitiu a estratificação dos lotes em níveis de vigor (Tabela 5). Por outro lado, o índice de crescimento somente foi eficaz para a classificação dos lotes com 5 e 8 dias. Porém, embora com 4 dias não tenha sido observado diferença significativa entre os lotes intermediários (lote 3 e 5) e o de pior vigor (lote 4), observa-se que numericamente o lote 4 possui menor índice de comprimento em relação aos demais.

Ainda na Tabela 5, o índice de uniformidade (IU) não se mostrou eficaz, pois permitiu somente a separação dos lotes em dois níveis de vigor sendo, em geral, os lotes 1, 2 e 3 superiores ao lote 4. Medeiros e Pereira (2018) também observaram que o índice de uniformidade não mostrou ser eficiente na discriminação dos lotes de soja em relação ao vigor. Estes autores justificaram tais resultados à taxa de crescimento que se manteve homogênea para todos os lotes. Outros autores também relatam a ineficácia do índice de uniformidade na classificação de lotes em níveis de vigor em sementes de pepino (CHIQUITO et al., 2012), girassol (CALDEIRA et al., 2014) e cenoura (MARCHI; CICERO, 2017).

De acordo com a Figura 9, correlações não significativas foram obtidas entre o comprimento da parte aérea no 4º e 5º dia com os demais testes de qualidade inicial dos lotes. Isso se deve ao fato de que com 4 e 5 dias, a parte aérea ainda não tinha se desenvolvido muito bem em todos lotes estudados, dificultando as avaliações desta variável. Neste trabalho, observou-se que plântulas de grão-de-bico tendem a desenvolver mais rápido o sistema radicular do que a parte aérea. O atraso no desenvolvimento da parte aérea, também foi observado na primeira contagem de germinação, o que explica a correlação significativa e alta com p-valor de 0,0223 (dado não apresentado) entre essa variável e o comprimento da parte aérea com 5 dias.

Para as outras variáveis geradas na análise computadorizada de plântulas, houve correlação significativa e alta com a maioria dos testes de avaliação da qualidade fisiológica inicial dos lotes. Correlações altas e significativas entre testes de vigor e as variáveis de comprimento geradas no SAPL<sup>®</sup> também foram observadas por Medeiros et al. (2018), em estudo sobre processamento digital de imagens na determinação do vigor de sementes de milho. Além disso, estes autores constataram que não há diferença entre a medição de plântulas

realizada de modo manual e a automatizada, por meio de análise de imagens. Diante dos resultados obtidos, pode-se perceber que o uso da análise computadorizada de plântulas por meio do SAPL<sup>®</sup> apresenta grande potencial e eficácia na determinação da qualidade fisiológica dos lotes de sementes de grão-de-bico.

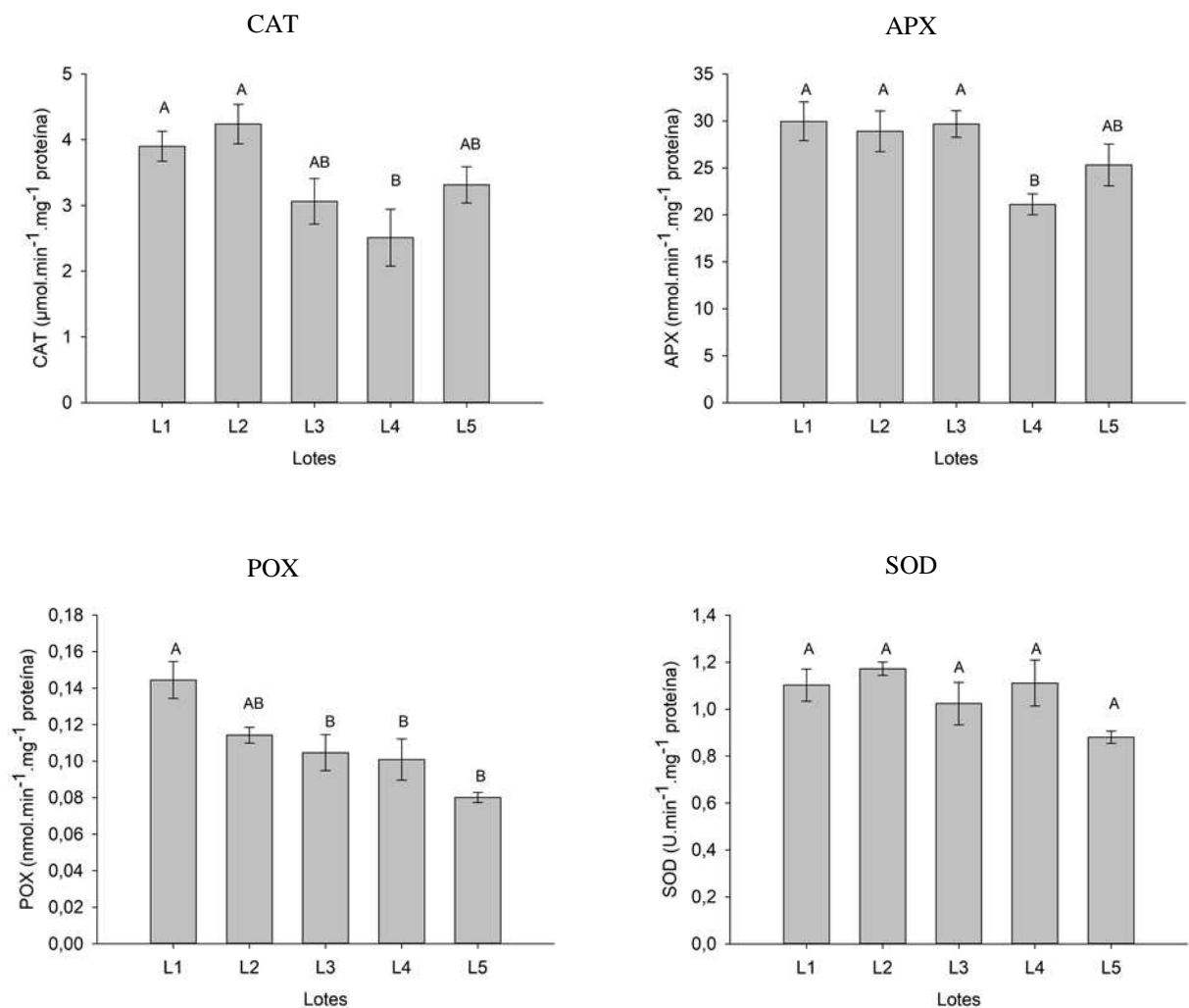


**Figura 9:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e as variáveis obtidas na análise computadorizada de plântulas realizada em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

#### 4.1.5. Ensaio IV - Atividade enzimática

Ao se determinar a atividade das enzimas do sistema antioxidante nas sementes dos 5 lotes, observa-se que não houve diferença significativa entre os lotes quanto à atividade da SOD (Figura 10). Em geral, a atividade das enzimas CAT e APX foi maior para os lotes 1 e 2 em relação ao lote 4, embora a atividade da APX nas sementes do lote 3 também tenha sido superior à obtida para o lote 4. Estes resultados estão coerentes com aqueles obtidos na maioria dos testes de avaliação da qualidade fisiológica dos lotes (Tabela 1), onde os lotes 1 e 2 foram, de modo geral, superiores ao lote 4.

Com relação à POX (Figura 10), maior atividade ocorreu nas sementes do lote 1 que não diferiu do lote 2. Menor atividade desta enzima foi obtida nas sementes dos lotes 3, 4 e 5, que não diferiram entre si, sendo inferiores ao lote 1. De modo geral, pode-se afirmar que para os lotes de maior vigor (lotes 1 e 2) a atividade da POX esteve relacionada com os resultados obtidos nos demais testes empregados (Tabela 1). Contudo, não permitiu a separação entre os lotes de médio e baixo vigor (lotes 3, 4 e 5).

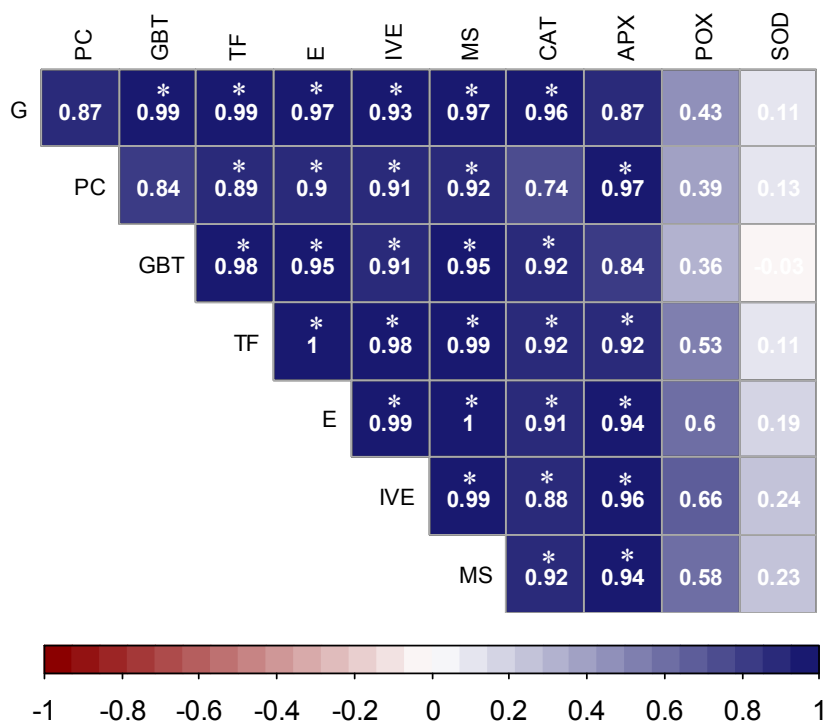


**Figura 10:** Atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) superóxido dismutase (SOD) em sementes de cinco lotes de grão-de-bico cv. BRS Aleppo. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Barras: desvio padrão.

Em geral, considerando estes resultados, pode-se inferir que os lotes de maior potencial fisiológico (1 e 2) tiveram maior atividade das enzimas CAT, APX e POX, sendo esta última pouco eficiente na identificação dos lotes de pior desempenho. De acordo com Deuner et al. (2011), o balanço entre a produção e a remoção intracelular de EROs, especialmente de peróxido de hidrogênio, está diretamente relacionado à capacidade das células de manterem alta atividade da SOD, CAT e APX. Para manter a homeostase celular, evitando o dano oxidativo, ocorre ativação do sistema de defesa antioxidativo das sementes, o qual inclui as enzimas antioxidantes (KUMAR et al., 2015). A atuação eficiente do sistema de defesa antioxidante está diretamente relacionada ao sucesso na germinação das sementes (GOMES; GARCIA, 2013).

Assim, a atividade de enzimas antioxidantes pode ser uma ferramenta interessante para separar lotes de sementes em diferentes níveis de qualidade fisiológica. Bandeira et al. (2014) verificaram que a atividade de enzimas como a SOD, CAT e APX foi mais sensível do que os testes de germinação, primeira contagem e crescimento de plântulas para a diferenciação de lotes de soja quanto ao potencial fisiológico. Estes autores verificaram alta atividade destas enzimas na parte aérea das plântulas aos 8 dias de germinação nos lotes de maior vigor. Já ao avaliarem a atividade destas enzimas na raiz primária, não obtiveram resultados relacionados ao vigor dos lotes, com maior atividade da SOD e APX para o lote de menor potencial fisiológico, não ocorrendo diferença significativa para a CAT. Para Borba et al. (2014), a avaliação das enzimas do sistema antioxidativo (SOD, CAT e APX) também foi uma alternativa eficiente para a diferenciar lotes de sementes de milho com pequenas diferenças no vigor. Reduções na atividade da SOD devido à deterioração foram observadas em sementes de girassol (BAILLY et al., 1996) e soja (XIN et al., 2014), e os resultados foram associados à perda de vigor. De maneira semelhante, Sharma et al. (2018) observaram que a atividade da SOD e CAT diminuiu significativamente em sementes de feijão-mungo submetidas à deterioração. Por outro lado, Yin et al. (2015) não observaram alterações nas atividades da SOD e CAT em sementes de colza submetidas ao envelhecimento artificial quando comparadas às sementes não envelhecidas.

Houve correlação altamente significativa entre os resultados de praticamente todos testes de avaliação da qualidade fisiológica e a atividade das enzimas CAT e APX, indicando que estas determinações estão associadas ao potencial fisiológico dos lotes estudados, o que não ocorreu para a POX e SOD (Figura 11). Estas informações estão de acordo com os resultados da Figura 10, na qual o lote 4, indicado como de menor vigor pelos demais testes de vigor empregados, apresentou menor atividade das enzimas CAT e APX.



**Figura 11:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e a atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) e superóxido dismutase (SOD) determinada em sementes de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

## 4.2. Cultivar Cícero

### 4.2.1. Caracterização da qualidade dos lotes de grão-de-bico

Os resultados referentes a caracterização inicial da qualidade fisiológica dos lotes se encontram na Tabela 6. O grau de umidade inicial das sementes mostrou-se semelhante para todos os lotes estudados, variando de 12,3 a 12,5%. Dessa forma, a diferença de teor de água entre os lotes está dentro dos limites considerados ideais para a condução de testes que avaliem o potencial fisiológico das sementes, permitindo a obtenção de resultados consistentes (MARCOS-FILHO, 1999).

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), em uma mesma espécie, as sementes de maior peso, por serem mais bem nutridas durante o seu desenvolvimento, possuem embriões bem formados e com maior quantidade de reservas, sendo, potencialmente, mais vigorosas. Houve diferença significativa entre o peso de mil sementes de todos os quatro lotes, com maior valor para o lote 3, seguido sequencialmente pelos lotes 4, 1 e 2, sendo este o de menor peso

(Tabela 6). O peso de mil sementes está relacionado ao tamanho das sementes e variou de 503,8 g (lote 2) a 606,6 g (lote 3).

**Tabela 6:** Caracterização da qualidade inicial de quatro lotes de grão-de-bico cv. Cícero, avaliados pelo grau de umidade (GU), peso de mil sementes (PMS), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência de plântula (E), índice de velocidade de emergência (IVE) e massa seca de plântula (MS).

Lotes	GU (%)	PMS (g)	G (%)	PCG (%)	GBT (%)	TF (%)	E (%)	IVE (índice)	MS (mg.plântula <sup>-1</sup> )
1	12,5	520,5 c	68 b	22 b	34 b	57 b	64 b	3,1 a	32,3 b
2	12,3	503,8 d	78 a	41 a	55 a	82 a	79 ab	3,7 a	31,2 b
3	12,5	606,6 a	80 a	30 ab	57 a	80 a	81 a	3,7 a	39,0 a
4	12,4	542,7 b	81 a	38 a	55 a	76 a	78 ab	3,6 a	38,3 a
F	-	372,83*	9,49*	7,88*	67,11*	47,16*	4,47*	1,26 <sup>ns</sup>	14,87*
CV(%)	-	0,86	5,05	18,57	5,47	4,62	9,73	14,91	5,98

\*, <sup>ns</sup> = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; F = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 6, verifica-se menor germinação para as sementes do lote 1 em relação aos demais que não diferiram entre si. Resultados similares também foram obtidos nos testes de germinação a baixa temperatura e teste de frio. Já pela primeira contagem de germinação, o lote 1, com menores valores que os lotes 2 e 4, não diferiu significativamente do lote 3. Assim, considerando que este teste é um indicativo da velocidade de germinação (NAKAGAWA, 1999), pode-se afirmar que as sementes do lote 2 e 4 germinaram mais rápido que as do lote 1. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os lotes quanto ao índice de velocidade de emergência.

A emergência de plântulas foi maior para o lote 3 e menor para o lote 1 e ambos os lotes não diferiram significativamente dos lotes 2 e 4 (Tabela 6). Com relação à massa seca de plântulas, maiores valores foram observados para os lotes 3 e 4, que foram superiores aos lotes 1 e 2.

De modo geral, em todos os testes, verificou-se menor potencial fisiológico para as sementes do lote 1. Dependendo do teste empregado os lotes 2, 3 e 4 não diferiram do lote 1. Assim, o lote 3 não diferiu deste lote na primeira contagem de germinação, o que também ocorreu para os lotes 2 e 4 na emergência de plântulas (Tabela 6). Marcos-Filho (2015a) ressalta a importância da utilização de mais de um teste para analisar o vigor das sementes, pois pode haver variação no comportamento dos lotes em função do método empregado, sobretudo em lotes de qualidade mediana.

#### 4.2.2. Ensaio I - Envelhecimento acelerado

Observa-se na tabela 7, dentro de cada período estudado, que não houve variações expressivas no teor de água das sementes após serem submetidas ao envelhecimento acelerado com 100% UR e 76% UR. Sendo as variações máxima encontradas no método tradicional e em solução salina de 2,8 e 0,7 pontos percentuais, respectivamente. Tais variações se encontram dentro do limite tolerável de 4 pontos percentuais entre as amostras ao final do envelhecimento acelerado, possibilitando assim, a obtenção de resultados consistentes (MARCOS-FILLHO, 1999).

Além disso, é possível verificar que as sementes envelhecidas pelo método tradicional (com água) apresentaram acréscimos no grau de umidade com o aumento do período de envelhecimento (Tabela 7). Tais acréscimos foram ainda maiores no período de 24 horas. Segundo Marcos-Filho (2015a), em sementes secas, devido ao seu baixo potencial mátrico, há alta força de retenção de água; logo quando colocadas em contato com substratos ou ambientes úmidos há uma rápida hidratação nas primeira 8 a 16 horas de embebição. Também, nota-se que o teor de água das sementes após o envelhecimento com solução salina foi inferior ao método tradicional, o que é explicado pela menor umidade relativa (76%) utilizada neste tratamento.

**Tabela 7:** Teor de água (%) obtidos antes e após os períodos de envelhecimento acelerado tradicional (100% UR) e com solução de NaCl (76% UR) em lotes de sementes de grão-de-bico cv. Cícero.

Lote	Umidade inicial (%)	Tradicional (água)				Solução Saturada (NaCl)			
		24 h	36 h	48 h	72 h	24 h	36 h	48 h	72 h
1	12,5	19,6	22,2	23,9	26,8	13,0	13,5	13,8	13,7
2	12,3	19,4	22,4	23,9	25,1	13,1	13,4	13,6	13,5
3	12,5	19,7	22,2	24,5	27,9	13,3	13,1	13,5	13,3
4	12,4	19,2	21,4	23,9	26,7	13,3	13,6	13,4	13,3

Pelos resultados de germinação (Tabela 8), após as sementes serem submetidas ao envelhecimento acelerado tradicional (100 % UR), verifica-se que no período de 24 horas houve a separação dos lotes em dois níveis de qualidade fisiológica, com maior vigor para os lotes 3, 4 e 5 em relação ao lote 1. Já a partir de 36 horas de envelhecimento, em geral, houve maior estratificação dos lotes em níveis de qualidade, com menor vigor para o lote 1, ocorrendo variações quanto ao lote de maior vigor. No período de 36 h, o lote 3 foi superior aos demais, ficando os lotes 2 e 4 em posição intermediária. Já com 48 h de envelhecimento, os lotes 2 e 3 foram superiores ao lote 1, mas não diferiram do lote 4 e após 72 h o lote 4 foi superior aos lotes 1 e 2. Contudo, neste período os valores obtidos foram muito baixos, indicando

deterioração excessiva dos lotes, chegando a provocar a perda de viabilidade das sementes do lote 1. No período de 48 horas, embora o envelhecimento tradicional não tenha sido tão drástico como observado no período de 72 horas, também se verificam valores de germinação baixos, variando entre 18 e 31%, o que pode ser um indicativo de que, para lotes que não apresentam alto potencial fisiológico como os lotes da cv. Cícero, 48 horas pode ser excessivo. Já nos períodos de 24 e 36 horas não se observou redução severa da porcentagem de germinação após o envelhecimento, possibilitando a separação dos lotes em níveis de vigor, sem provocar a deterioração excessiva das sementes.

**Tabela 8:** Germinação (%) de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero, após diferentes tempos de envelhecimento acelerado a 41 °C pelo método tradicional e com solução saturada de NaCl.

Lote	Tradicional (água)				Solução Saturada (NaCl)			
	24 h	36 h	48 h	72 h	24 h	36 h	48 h	72 h
1	37 b B	35 c A	18 b B	1 c B	48 b A	32 b A	30 b A	25 c A
2	56 a A	48 b B	31 a B	16 b B	60 a A	57 a A	50 a A	51 a A
3	60 a A	59 a A	29 a B	21 ab B	66 a A	55 a A	47 a A	39 b A
4	55 a B	48 b A	25 ab B	25 a B	64 a A	50 a A	50 a A	48 a A
CV(%)	3,41							

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na linha comparando os métodos em cada tempo e letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim, pode-se considerar que o envelhecimento acelerado com 100% UR por 72 h foi muito drástico não permitindo uma avaliação adequada do nível de qualidade dos lotes, fato também observado e discutido para as sementes da cv. BRS Aleppo (Tabela 3). Há relatos de condução do teste de envelhecimento acelerado em sementes de grão-de-bico utilizando 100% UR por 96 h (RAM et al., 1989), porém também causando diminuição severa na germinação das sementes, principalmente nos lotes que não apresentavam alto potencial fisiológico, como é o caso dos lotes da cv. Cícero utilizados no presente trabalho. Deve-se ressaltar que os autores citados acima não testaram outros tempos de envelhecimento acelerado para determinar o mais indicado para a avaliação do vigor destas sementes.

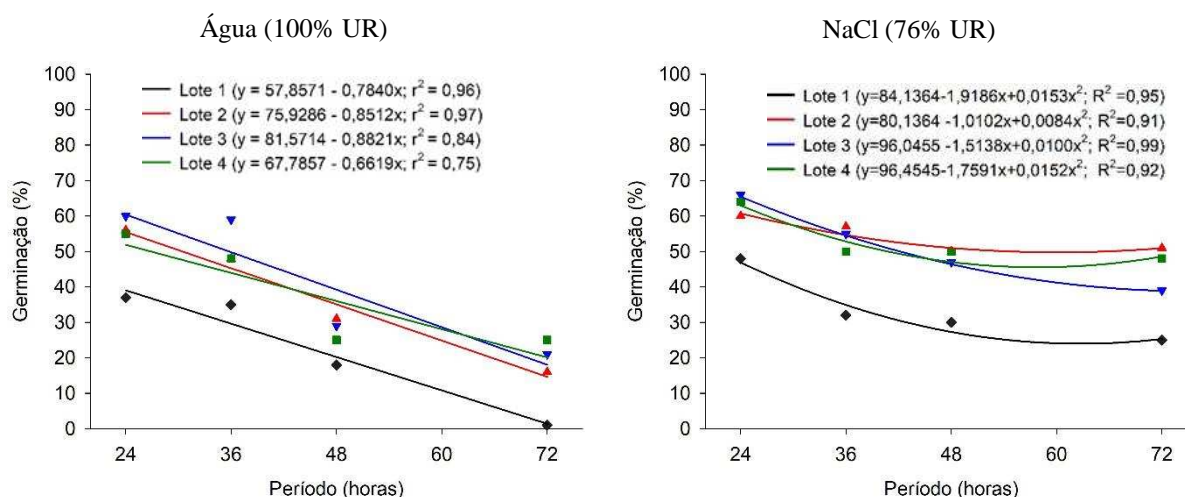
Nos lotes de menor qualidade fisiológica da cv. Cícero também se observou alta incidência de microrganismos e de presença de exsudato junto das sementes, conforme comentado para a cv. BRS Aleppo, especialmente no período de 72 horas e 100% UR. Além disso observou-se que essa ocorrência foi maior nas sementes da cv. Cícero. Tal fato pode estar relacionado com a menor qualidade fisiológica das sementes dessa cultivar em relação a da BRS Aleppo, na presente pesquisa. Segundo Dias et al. (2019), sementes de grão-de-bico da

cv. Cícero têm apresentado menor qualidade fisiológica quando comparadas com outros cultivares.

Os resultados do envelhecimento acelerado em solução salina de NaCl (76% UR) obtidos no período de 24 horas (Tabela 8) foram semelhantes aos obtidos no mesmo período com 100% UR, com menor vigor para o lote 1 em relação aos demais, o que também ocorreu nos períodos de 36 e 48 horas. Assim, nestes períodos, foi possível separar os lotes em dois níveis de qualidade fisiológica. Já com 72 horas de envelhecimento, observou-se melhor desempenho para os lotes 2 e 4, que não diferiram entre si, seguidos pelo lote 3, sendo o lote 1 inferior aos demais. Os resultados obtidos no período de 36 e 48 horas em solução saturada de NaCl foram semelhantes, sendo o lote 1 o menos vigoroso em comparação com os demais.

Em síntese, observa-se que em todos os períodos testados, em ambos os procedimentos, o lote 1 apresentou menor potencial fisiológico ocorrendo algumas variações quanto aos lotes de melhor desempenho, o que também foi observado nos testes utilizados para a caracterização da qualidade inicial dos lotes (Tabela 6). Em geral, o lote 4 esteve entre os de melhor desempenho em todas os procedimentos de envelhecimento testados.

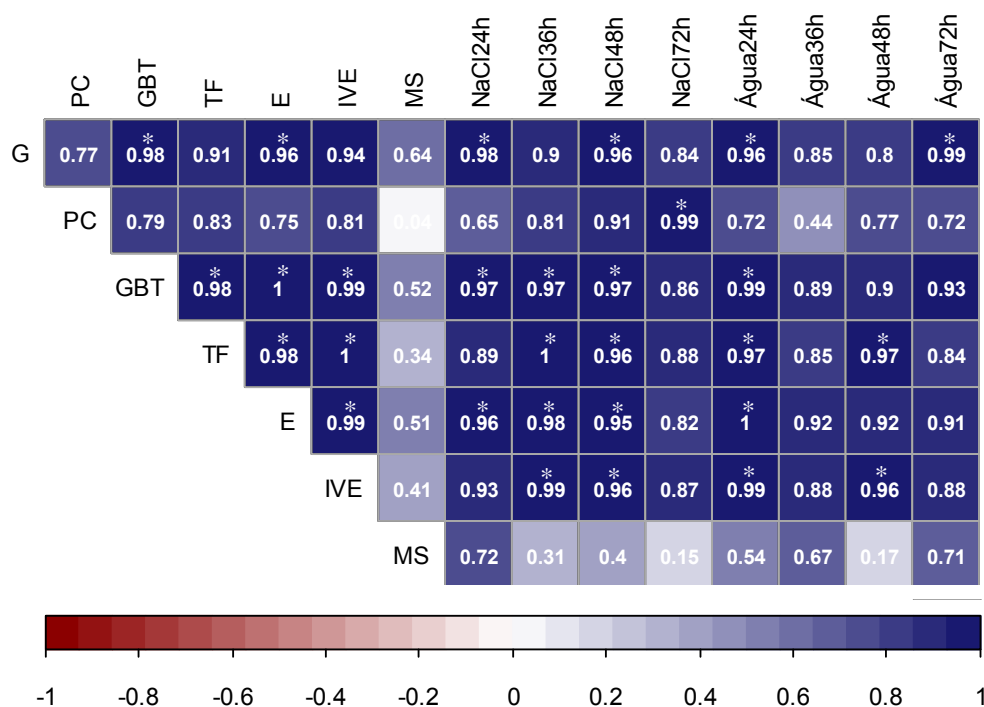
Comparando os períodos de envelhecimento, houve redução da germinação com o aumento do tempo em ambas as condições de umidade relativa estudadas (Figura 12) com menores valores no período de 72 horas. Contudo, quando se utilizou 100% UR o decréscimo foi mais acentuado de modo que neste período houve praticamente perda total da viabilidade das sementes do lote 1, conforme já comentado. Freitas e Nascimento (2006), também relataram que o envelhecimento tradicional por 72 horas foi muito drástico em sementes de lentilha. A utilização de UR de 76% provocou redução menos acentuada na germinação após o envelhecimento acelerado. Isso se deve à menor umidade relativa a que as sementes foram expostas (76%), o que acarretou menor estresse por umidade e, conseqüentemente, em menor deterioração em relação ao envelhecimento utilizando água (100% UR). Verifica-se que a utilização de solução salina também permitiu a estratificação dos lotes em níveis de vigor, com menor vigor para o lote 1 em todos os períodos avaliados, conforme verificado na Tabela 8.



**Figura 12:** Porcentagem de germinação de quatro lotes de sementes de grão-de-bico, cv. Cícero, após o envelhecimento acelerado em água (100% UR) e em solução saturada de NaCl (76% UR) por períodos de 24, 36, 48 e 72 horas.

Para o teste envelhecimento acelerado para sementes de soja e feijão é recomendada a temperatura de 41 °C por 48 horas, pelo método tradicional (MARCOS-FILHO, 1999; AOSA, 2009). Contudo, para sementes de grão-de-bico, observou-se alta incidência de microrganismos e muitas sementes mortas com excesso de exsudato no seu entorno, indicativo de deterioração excessiva provocada principalmente pela alta umidade relativa conforme também comentado para a cv. BRS Aleppo.

Quando se analisa a Figura 13, observa-se que correlações significativas e altas foram observadas entre a maioria dos testes de caracterização da qualidade dos lotes e o envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl nos períodos de 36 e 48 horas e também com o envelhecimento acelerado tradicional por 24 horas. Considerando a menor incidência de microrganismos nos testes com 76% UR, pode-se considerar que a utilização de solução salina é um método promissor para a avaliação do vigor de lotes de sementes de grão-de-bico. Embora ambos os períodos citados tenham proporcionado resultados semelhantes, o período de 48 horas pode ser considerado mais adequado em relação à praticidade, permitindo que o teste seja conduzido dentro do horário comercial de funcionamento de laboratórios de análise de sementes. A eficácia do envelhecimento com solução salina na avaliação do potencial fisiológico foi comprovada em sementes de ervilha (NASCIMENTO et al., 2007), lentilha (FREITAS; NASCIMENTO, 2006) e feijão caupi (DOURADO et al., 2013), sendo o período de 48 horas de envelhecimento, a 41 °C, o procedimento mais indicado para as espécies citadas.



**Figura 13:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os diferentes procedimentos do teste de envelhecimento acelerado realizados em sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

#### 4.2.3. Ensaio II - Condutividade elétrica

Na Tabela 9 encontram-se os valores médios obtidos no teste de condutividade elétrica dos quatro lotes de sementes de grão-de-bico. Quando as sementes foram colocadas para embeber em 75 mL de água nos períodos de 2, 4 e 8 horas os resultados foram similares, sendo os lotes 3 e 4 superiores aos lotes 1 e 2, cujos valores de condutividade foram maiores, indicando maior desorganização das membranas celulares (POWELL, 1986). Resultados semelhantes, separando os lotes em dois níveis de potencial fisiológico, também foram observados com 100 mL por 2, 4, 8 e 12 h e com 250 mL nos períodos de 8, 12 e 24 h. Nota-se que, na maioria dos testes utilizados para a caracterização da qualidade inicial dos lotes, o lote 1 foi inferior aos demais (Tabela 6). Nos períodos mais curtos (2 e 4 h) com maior volume de água (250 mL), não foi possível separar os lotes em níveis de qualidade fisiológica, provavelmente devido à maior diluição da solução de embebição associada ao menor tempo de lixiviação. O volume de 250 mL de água foi utilizado para a condução do teste de condutividade elétrica em sementes de grão-de-bico (KHAJEH-HOSSEINI; REZAZADEH, 2011) e de ervilha (MACHADO et al., 2011).

No teste conduzido com 75 mL de água por 12 e 24 h (Tabela 9), o lote 2 foi inferior ao lote 4, ficando os lotes 1 e 3 em posição intermediária, não concordando com os resultados da maioria dos testes relacionados na Tabela 6, onde o lote 1 foi sempre inferior aos demais. Também no teste conduzido com 24 h e 100 mL de água constatou-se maior lixiviação (menor vigor) para as sementes do lote 2 em relação ao lote 1.

**Tabela 9:** Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de quatro lotes de sementes de grão-de-bico, cv. Cícero em diferentes volumes de água e períodos de embebição.

Período de embebição	Lotes	Volume de água (mL)			
		75	100	150	250
2 h	1	27,06 A a	23,68 B a	18,35 C a	9,64 D a
	2	26,76 A a	22,36 B a	15,82 C b	9,47 D a
	3	21,94 A b	16,54 B b	12,04 C c	8,50 D a
	4	21,89 A b	16,80 B b	11,64 C c	8,34 D a
4 h	1	36,28 A a	31,30 B a	23,70 C a	13,97 D a
	2	36,00 A a	29,79 B a	20,63 C b	13,95 D a
	3	29,58 A b	23,61 B b	16,48 C c	12,56 D a
	4	29,27 A b	23,91 B b	15,65 C c	12,22 D a
8 h	1	46,99 A a	42,69 B a	31,23 C a	19,75 D a
	2	48,29 A a	42,48 B a	28,88 C b	20,39 D a
	3	40,17 A b	31,44 B b	22,67 C c	17,31 D b
	4	39,55 A b	31,87 B b	21,55 C c	16,94 D b
12 h	1	53,65 A b	48,52 B a	36,51 C a	24,14 D a
	2	57,49 A a	49,77 B a	35,09 C a	25,07 D a
	3	49,02 A c	39,12 B b	28,13 C b	21,39 D b
	4	48,13 A c	39,54 B b	26,73 C b	20,95 D b
24 h	1	59,13 A c	54,68 B b	44,20 C a	31,21 D a
	2	60,47 A bc	61,20 A a	43,83 B a	31,07 C a
	3	63,62 A a	50,05 B c	38,24 C b	27,18 D b
	4	62,06 A ab	51,04 B c	35,42 C c	27,02 D b

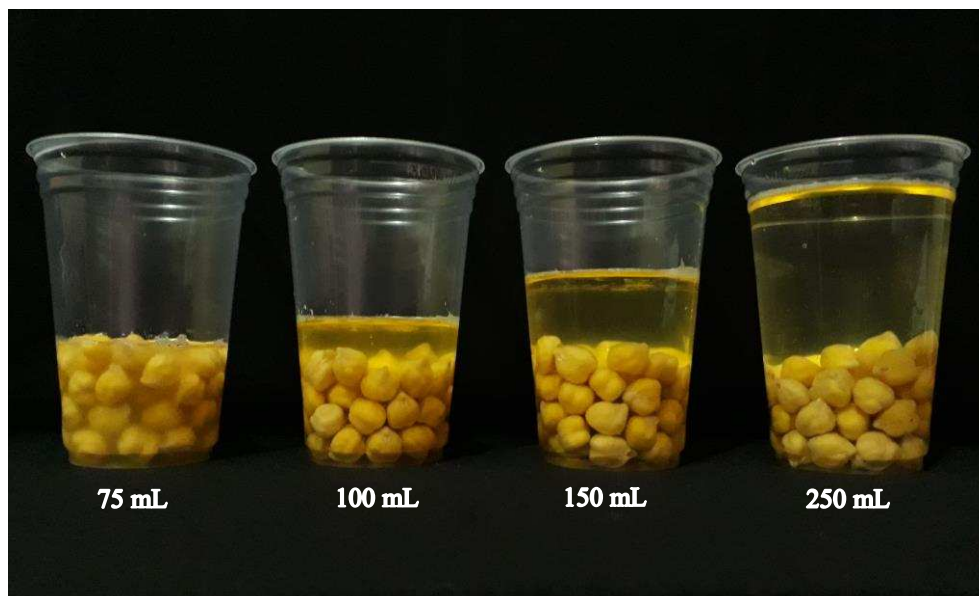
Médias seguidas pelas mesmas letras, dentro de cada período de embebição, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ao se utilizar 150 mL, em praticamente todos os períodos estudados, observou-se classificação semelhante para os lotes quanto ao potencial fisiológico, com maior vigor para os lotes 3 e 4 e menor vigor para o lote 1, sendo o lote 2 inferior aos lotes 3 e 4, mas superior ao lote 1, ou seja, em posição intermediária. Logo, esses resultados sugerem maior eficiência do teste de condutividade elétrica para sementes de grão-de-bico da cv. Cícero quando se utiliza 150 mL de água, já sendo possível detectar diferenças entre os lotes a partir de 2 horas de embebição. Resultados semelhantes foram obtidos por Khajeh-Hosseini e Rezazadeh (2011) que detectaram diferenças na lixiviação de solutos pelas sementes de grão-de-bico com 2 horas

de embebição. Em soja, Dias e Marcos-Filho (1996) observaram que períodos de embebição mais curtos (8 e 12 horas) permitiram a identificação de diferenças mais acentuadas de vigor entre os lotes. Para a cv. BRS Aleppo, o teste conduzido com 100 mL de água foi tão eficiente quanto com 150 mL (Tabela 4).

Confrontando os resultados de condutividade elétrica (Tabela 9) com os das Tabelas 7 e 8, pode-se afirmar que os resultados de condutividade elétrica foram coerentes com os demais testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes, principalmente com relação à identificação do lote de pior e melhor desempenho. Destaca-se aqui os resultados obtidos com 150 mL de água nos períodos de 2, 4, 8 e 24 h que permitiram separar os lotes em três níveis de potencial fisiológico.

O teste de condutividade elétrica para soja, ervilha e feijão é realizado com amostras de 50 sementes embebidas em 75 mL de água por 24 horas (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999; AOSA, 2009; MARCOS-FILHO, 2015a). Para sementes de grão-de-bico, Samarah e Abu-Yahia (2008) utilizaram 25 sementes imersas em 75 mL de água. Conforme já comentado nos resultados referentes à cv. BRS Aleppo, a utilização de 50 sementes imersas em 75 mL de água, como utilizado no presente estudo, dificulta a realização das leituras de condutividade devido ao aumento de volume das sementes após a hidratação (Figuras 6 e 14). Para a cv. Cícero, cujas sementes são maiores do que as da cv. BRS Aleppo, a dificuldade é ainda maior para inserir a célula do condutivímetro na solução de embebição. Em um trabalho com estas duas cultivares, Dias et al. (2019) utilizaram amostras de 50 e 75 sementes imersas em 75 e 100 mL de água por diferentes períodos de tempo. Os autores concluíram que o uso de 75 sementes imersas em 100 mL de água por 30 h foi o procedimento mais adequado para avaliação do vigor dos lotes. Contudo, pelas ilustrações das Figuras 6 e 14, pode-se constatar que 75 sementes imersas em 100 mL de água podem dificultar a realização das leituras de condutividade. Uma das recomendações da AOSA (2009) para a condução deste teste é de que não haja contato direto entre a célula do condutivímetro e as sementes, somente com a solução, o que ficaria difícil com esta combinação de 75 sementes e 100 mL de água. Assim, para sementes maiores como as de grão-de-bico, alguns autores têm utilizado volumes de até 250 mL para a condução do teste de condutividade (KHAJEH-HOSSEINI; REZAZADEH, 2011), mas este volume não se mostrou adequado no presente estudo.

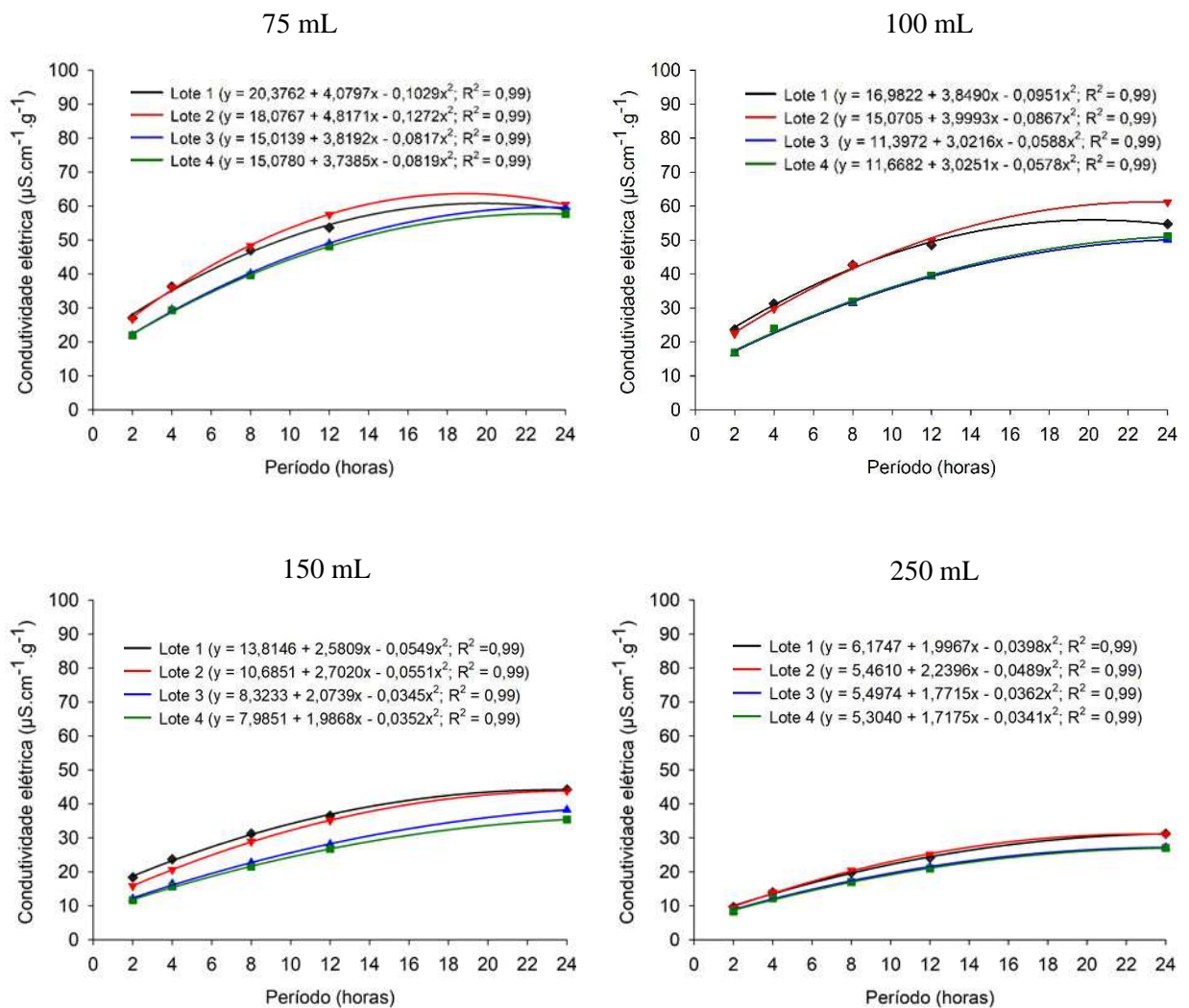


**Figura 14:** Ilustração de todos os volumes de solução para sementes da cv. Cícero após 24 horas de embebição; para o todos os volumes foram utilizados copos plásticos com capacidade de 300 mL. Foto: Joyce de O. Araújo.

Analisando a Figura 15, verifica-se que com o aumento dos períodos de embebição há aumento dos valores de condutividade elétrica, para todos os volumes estudados, assim como observado para as sementes da cultivar BRS Aleppo (Figura 5).

Com o aumento do volume de água houve redução dos valores de condutividade de todos os lotes, de modo que valores mais altos foram obtidos com 75 mL de água e os mais baixos com 250 mL (Tabela 9). Conforme ilustrado na Figura 14 e comentado para a cv. BRS Aleppo no volume de 150 mL há maior quantidade de solução para se realizar a leitura da condutividade em relação ao volume de 100 mL.

Nos períodos de até 12 horas de embebição em 75 mL de água (Figura 15), observa-se que os valores de condutividade obtidos para os lotes 3 e 4 foram bem próximos, como também observado para os lotes 1 e 2, conforme observado na Tabela 9. Com o decorrer da embebição, ou seja, com 24 horas, houve aumento da condutividade de todos os lotes e os valores praticamente se igualaram (Figura 15). Porém, como já discutido neste trabalho, o volume de 75 mL não é indicado para a realização do teste de condutividade com 50 sementes de grão-de-bico devido à falta de praticidade na condução do teste, principalmente na cv. Cícero, cujas sementes apresentam maior tamanho em relação a outras cultivares. Logo, com 12 horas de embebição, já se observa redução no volume de solução disponível para a realização da leitura, dificultando inserir a célula do condutivímetro.

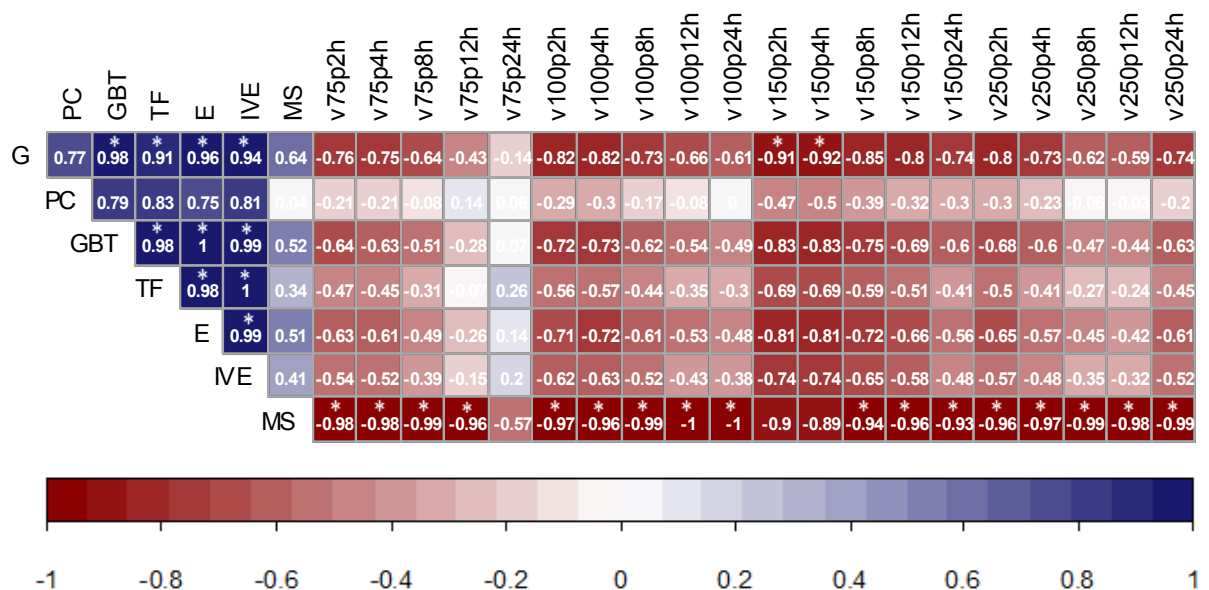


**Figura 15:** Condutividade elétrica de sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero, após embebição por 2, 4, 8, 12 e 24 horas em 75, 100, 150 e 250 mL de água.

No volume de 100 mL nos períodos mais curtos de embebição (Figura 15), os resultados foram semelhantes aos de 75 mL, mas com o decorrer da lixiviação ficou evidente maior lixiviação para as sementes do lote 2 em relação aos demais, o que indicaria este lote como inferior, não concordando com os resultados dos demais testes de avaliação da qualidade fisiológica (Tabela 6). Já com 150 mL, é possível verificar que o aumento da condutividade ao longo do tempo foi similar para todos os lotes, que mantiveram o mesmo comportamento em todos os períodos avaliados, havendo diferenciação quanto ao potencial fisiológico coerente com os demais testes utilizados. Com 250 mL, o aumento da condutividade ao longo do tempo de embebição foi menor, devido ao maior volume de água, de modo que os valores obtidos para os quatro lotes foram bem próximos, dificultando uma diferenciação mais nítida quanto ao potencial fisiológico de cada um.

Os coeficientes de correlações linear de Pearson entre os dados de condutividade elétrica e os obtidos nos testes de qualidade fisiológica inicial dos lotes encontram-se na Figura 16. Nota-se que houve correlação significativa entre a massa seca de plântulas e os resultados de condutividade elétrica, exceto para 150 mL por 4 e 8 horas e para 75 mL por 24 horas de embebição, sendo que esse último não apresentou correlação com nenhum dos testes de caracterização inicial da qualidade dos lotes. Ram et al. (1989), não encontraram correlação significativa entre os resultados do teste de condutividade elétrica, avaliado com 25 sementes de grão-de-bico imersas em 75 mL de água por 24 horas, e a emergência de plântulas. O teste de condutividade elétrica conduzido com amostras de 5g de sementes imersas em 50 mL de água por diferentes períodos de tempo não apresentou correlação significativa com a emergência em campo em diferentes épocas de semeadura (Qasim et al., 2010). Constatase, portanto, a importância de se testar diferentes procedimentos para a condução deste teste para se estabelecer metodologia adequada e que forneça resultados relacionados à emergência e também a outros testes de avaliação do potencial fisiológico das sementes, como foi feito no presente estudo.

De acordo com Delouche e Baskin (1973), a desestruturação da membrana é um dos primeiros eventos que caracterizam a deterioração de sementes. Logo, o teste de condutividade permite detectar o início da perda de vigor dos lotes, sendo um teste interessante por fornecer resultados em 24 horas ou menos, conforme observado no presente estudo para sementes de grão-de-bico.



**Figura 16:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e os

diferentes procedimentos do teste de condutividade elétrica realizados em sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

#### 4.2.4. Ensaio III - Análise computadorizada de plântulas

Com relação à análise computadorizada de plântulas, observa-se na Tabela 10 que aos quatro dias após a semeadura houve diferença entre os lotes para todas as variáveis exceto índice de uniformidade (IU), que também não diferiu nas avaliações feitas aos 5 e 8 dias. Para a cultivar BRS Aleppo, como discutido anteriormente no item 4.1.4., o IU também não se mostrou eficiente para avaliar o potencial fisiológico das sementes de grão-de-bico.

**Tabela 10:** Resultados médios de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento radicular (CR), comprimento total (CT), índice de uniformidade (IU), índice de crescimento (IC) e índice de vigor corrigido (IVC), obtidos pelo SAPL<sup>®</sup> na avaliação de quatro lotes de sementes de grão-de-bico, aos quatro, cinco e oito dias.

Lote	CPA	CR (mm.plântula <sup>-1</sup> )	CT	IU	IC Índices	IVC
4 dias						
1	7,5 ab	35,01 b	42,5 b	683,2 a	580,1 b	415,5 b
2	6,6 b	43,9 a	50,6 a	797,6 a	690,9 a	563,8 a
3	7,3 ab	42,8 a	50,2 a	749,2 a	685,2 a	542,4 a
4	7,6 a	39,7 ab	47,3 ab	726,7 a	645,5 ab	502,4 a
F	4,05*	6,46*	6,34*	2,11 <sup>ns</sup>	6,34*	14,44*
CV (%)	5,82	7,81	6,23	8,86	6,23	6,81
5 dias						
1	7,5 b	44,0 b	51,47 b	649,3 a	579,2 b	408,2 b
2	6,7 b	56,2 a	62,88 a	783,0 a	707,7 a	569,6 a
3	7,6 b	53,6 a	61,20 a	746,4 a	688,8 a	543,7 a
4	8,7 a	48,4 ab	57,13 ab	690,8 a	642,9 ab	493,0 a
F	12,43*	6,21*	5,54*	2,69 <sup>ns</sup>	5,54*	12,45*
CV (%)	6,13	8,63	7,42	10,04	7,42	8,01
8 dias						
1	14,17 ab	71,13 b	85,31 a	605,59 a	525,73 a	373,8 b
2	10,79 b	90,45 a	101,24 a	738,23 a	623,90 a	513,4 a
3	12,16 b	86,02 ab	97,93 a	728,97 a	603,49 a	493,7 a
4	17,49 a	78,97 ab	96,46 a	657,30 a	594,44 a	460,0 ab
F	12,84*	4,16*	2,28 <sup>ns</sup>	2,29 <sup>ns</sup>	2,28 <sup>ns</sup>	6,86*
CV(%)	12,13	10,14	9,61	12,14	9,61	10,24

\*, <sup>ns</sup> = significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; F = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

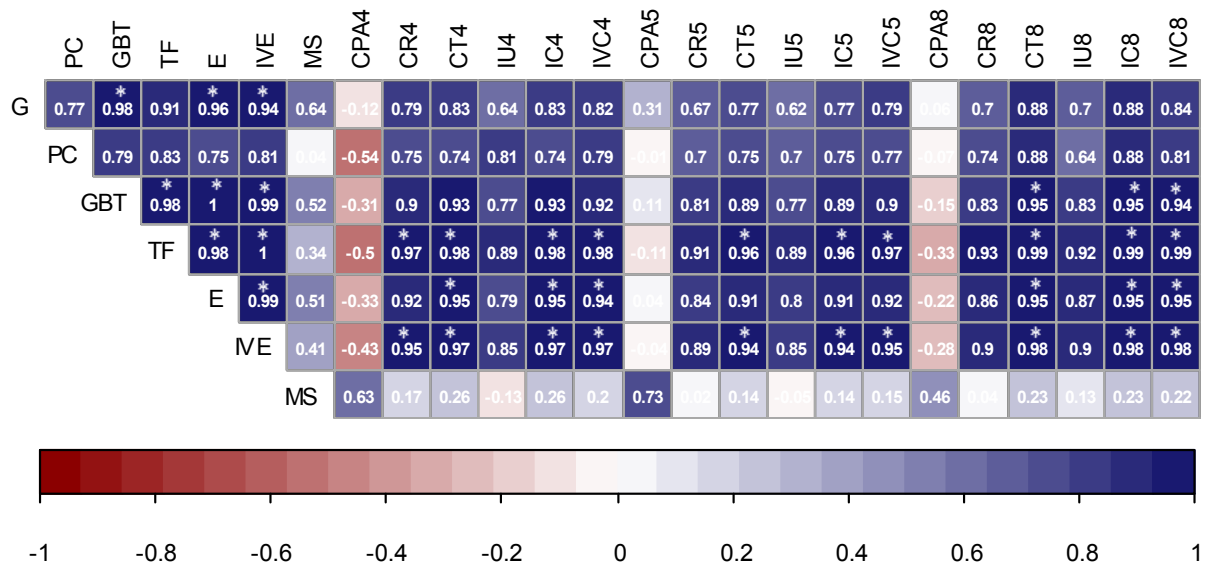
Aos 4 dias, maior e menor comprimento da parte aérea (CPA) foram obtidos para os lotes 4 e 2, respectivamente (Tabela 10); já aos 5 e 8 dias o lote 4 foi superior aos demais. Quanto ao comprimento da radícula (CR), valores significativamente superiores foram obtidos para os lotes 2 e 3 em comparação com o lote 1, aos 4 e 5 dias, sendo que aos 8 dias esta superioridade apenas se manteve para as sementes do lote 2.

Resultados semelhantes foram obtidos para o comprimento total de plântula (CT) aos 4 e 5 dias. Aos 8 dias não houve diferença significativa entre os lotes quanto ao CT. Deste modo, pode-se afirmar, conforme comentado para os lotes da cv. BRS Aleppo que as avaliações relacionadas ao comprimento das plântulas realizadas aos 4 e 5 dias foram mais efetivas em comparação com 8 dias para detectar diferenças no potencial fisiológico dos lotes.

Os resultados obtidos para o índice de crescimento (IC) aos 4 e 5 dias foram semelhantes aos de CR e CT, com melhor desempenho para os lotes 2 e 3 em relação ao lote 1 (Tabela 10). Aos 8 dias, o índice de crescimento (IC) foi semelhante para todos os lotes. Já o índice de vigor corrigido (IVC) aos 4 e 5 dias, separou os lotes em duas categorias, com melhor desempenho para os lotes 2, 3 e 4 e pior para o lote 1. Aos 8 dias, apenas os lotes 2 e 3 permaneceram com desempenho superior ao lote 1. Tanto o IVC como IC permitiram a separação de lotes de sementes de soja quanto à qualidade fisiológica (MEDEIROS; PEREIRA, 2018).

Em síntese, verifica-se que pelo SAPL<sup>®</sup> foram obtidos resultados coerentes com os demais testes de avaliação da qualidade das sementes (Tabela 6), principalmente quanto à indicação do lote 1 como inferior aos demais na maioria das avaliações, exceto para CPA aos 4 e 8 dias. Conforme já comentado para a cv. BRS Aleppo, o crescimento da parte aérea das plântulas de grão-de-bico é mais lento e, nestas avaliações, elas ainda não tinham atingido 1,0 cm, o que só foi verificado aos 8 dias. No entanto, aos 8 dias não foi possível detectar diferenças entre os lotes quanto ao CT, IU e IC. Assim, considera-se que as avaliações das plântulas aos 4 e 5 dias foram mais eficientes para a separação dos lotes quanto ao potencial fisiológico, conforme também comentado para a cv. BRS Aleppo (Tabela 5). Deve-se ressaltar, contudo, que as avaliações referentes ao comprimento da parte aérea não foram tão eficientes quanto às demais para a identificação do lote de pior desempenho (lote 1) conforme observado nos demais testes conduzidos na presente pesquisa. Desta forma, como comentado para a cv. BRS Aleppo, resultados consistentes com o SAPL<sup>®</sup> foram constatados já com 4 dias, o que é interessante em termos de rapidez para a obtenção de resultados referentes ao potencial fisiológico dos lotes. Resultados semelhantes foram obtidos por Medeiros e Pereira (2018), os quais utilizando o SAPL<sup>®</sup> concluíram que a análise de plântulas realizada no 4º dia após a semeadura mostrou-se mais adequada para avaliar o potencial fisiológico dos lotes.

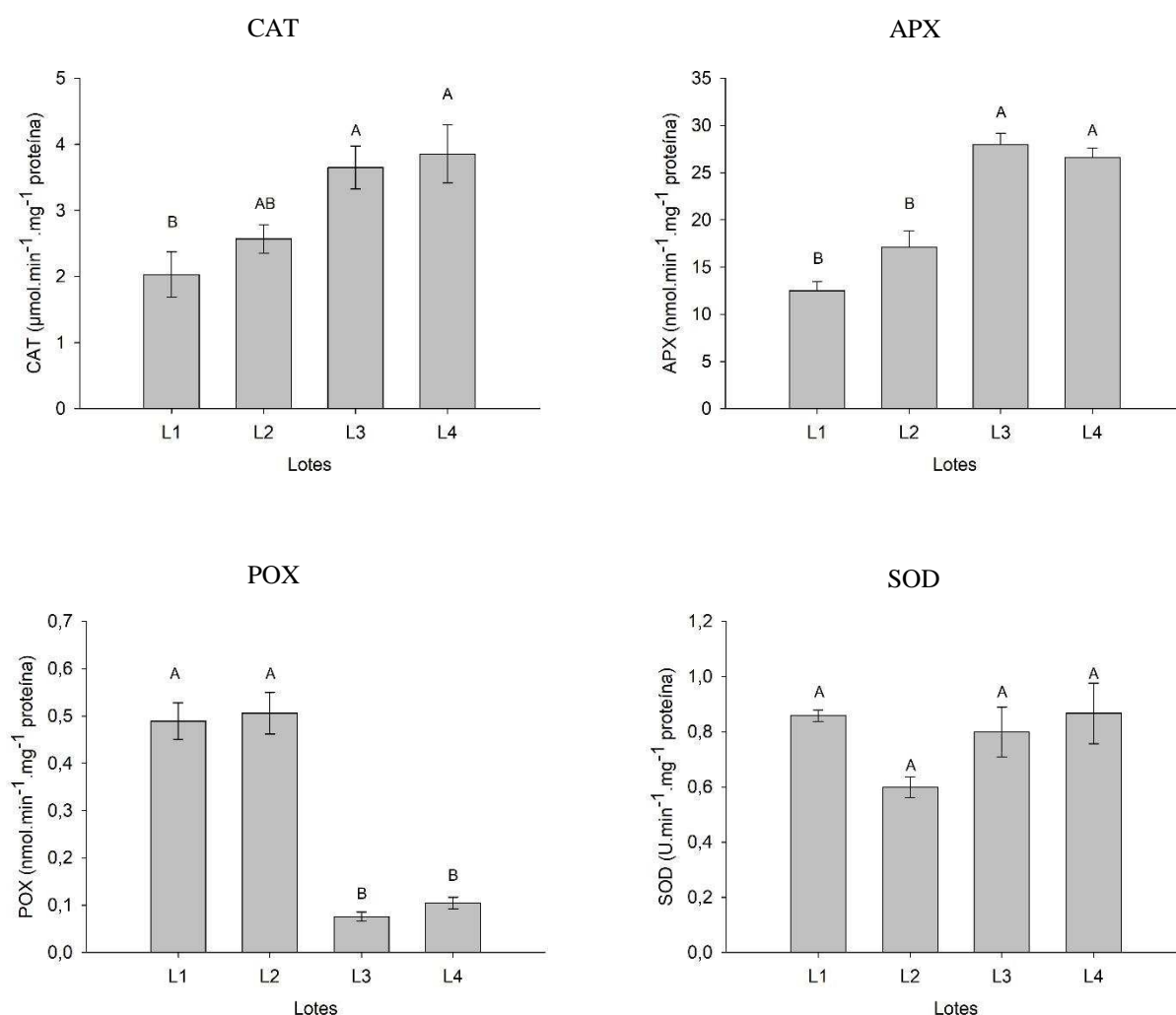
Pela análise de correlação (Figura 17), verifica-se que com 5 e 8 dias não houve correlação significativa entre CR e os testes de caracterização inicial da qualidade fisiológica dos lotes. Já com 4 dias correlações significativas foram observadas entre a variável CR e o índice de emergência, bem como com o teste de frio. Também com 4 dias já houve correlação significativa entre as variáveis IC e IVC com a emergência, com o IVE e com o teste de frio. Observa-se ainda que para a variável CPA não houve correlação significativa com os demais testes em nenhum dos dias estudados. Estes resultados podem ser explicados pelo crescimento lento da parte aérea das plântulas de grão-de-bico que não tinham atingido aos 5 dias valores acima de 1,0 cm/plântula. O IU também não apresentou correlação significativa com nenhum dos outros testes realizados nesse trabalho.



**Figura 17:** Coeficientes de correlação simples de Pearson ( $r$ ) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e as variáveis obtidas na análise computadorizada de plântulas realizada em sementes de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

#### 4.2.5. Ensaio IV – Atividade enzimática

Com relação à atividade das enzimas antioxidantes (Figura 18), de modo geral, houve maior atividade da CAT nas sementes dos lotes 3 e 4 e menor no lote 1, com o lote 2 não diferindo significativamente dos demais. Resultados semelhantes foram obtidos para a APX com maior atividade nas sementes dos lotes 3 e 4 em relação aos lotes 1 e 2. O lote 2 foi identificado como de menor potencial fisiológico na maioria dos testes de avaliação da qualidade fisiológica empregados (Tabelas 6, 8, 9 e 10).



**Figura 18:** Atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) superóxido dismutase (SOD) em sementes de quatro lotes de grão-de-bico cv. Cícero.

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Barras: desvio padrão.

Já a atividade da POX foi maior para as sementes dos lotes 1 e 2 e menor para os lotes 3 e 4, exibindo um comportamento totalmente contrário ao observado para a CAT e APX. Confrontando estes resultados com os dos demais testes de avaliação da qualidade (Tabelas 6, 8, 9 e 10), observa-se que a atividade desta enzima não esteve associada ao vigor das sementes dos diferentes lotes, o que pode ser também confirmado pelos resultados da análise de correlação (Figura 19). Já para a atividade da SOD não houve diferença significativa entre os lotes. Yin et al. (2015) não observaram alterações nas atividades da SOD e CAT em sementes de colza submetidas ao envelhecimento artificial quando comparadas às sementes não envelhecidas. Por outro lado, a atividade da SOD decresceu devido à deterioração em sementes de girassol (BAILLY et al., 1996) e soja (XIN et al., 2014), e os resultados foram associados à perda de vigor. De maneira semelhante, Sharma et al. (2018) observaram que a atividade da

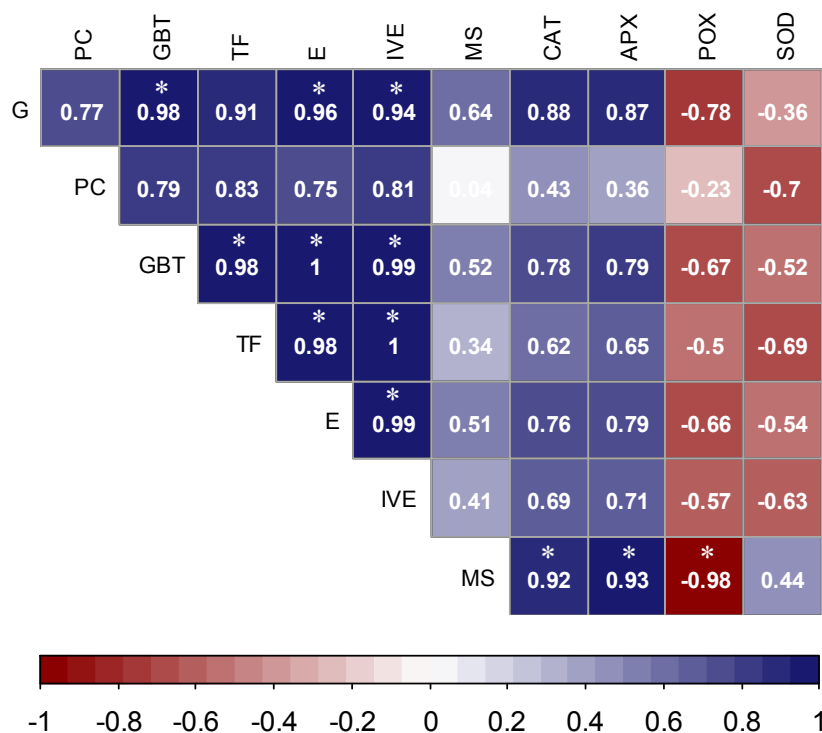
SOD e CAT diminuiu significativamente em sementes de feijão-mungo submetidas à deterioração.

Assim, de modo geral, para os lotes da cultivar Cícero, assim como também verificado para a cultivar BRS Aleppo (Figura 10), a determinação da atividade das enzimas SOD e POX não permitiu uma separação adequada dos lotes em níveis de qualidade fisiológica, não fornecendo resultados coerentes com os dos demais testes utilizados. Por outro lado, a atividade da CAT e APX mostrou-se relacionada ao potencial fisiológico dos lotes, o que também foi constatado para as sementes da cultivar BRS Aleppo.

Em síntese, pode-se inferir que as sementes do lote apontado como o de menor potencial fisiológico (lote 1) nos testes de vigor utilizados (Tabela 6) tiveram menor atividade das enzimas CAT e APX, indicando redução na atividade antioxidante das células. Por outro lado, para a POX e SOD, pelos resultados obtidos não foi possível relacionar sua atividade com o nível de potencial fisiológico deste lote em relação aos demais. Sabe-se que a atuação eficiente do sistema de defesa antioxidante está diretamente relacionada ao sucesso no processo de germinação das sementes (GOMES; GARCIA, 2013). Assim, a capacidade das células de manterem alta atividade das enzimas SOD, CAT e APX é fundamental para a manutenção do equilíbrio entre a produção e a remoção intracelular de EROs.

Deste modo, a determinação da atividade de enzimas antioxidantes pode se constituir em ferramenta interessante para a avaliação do nível de deterioração das sementes de diferentes lotes, permitindo a sua classificação quanto ao vigor. Bandeira et al. (2014) verificaram que a atividade de enzimas como a SOD, CAT e APX foi mais sensível do que os testes de germinação, primeira contagem e crescimento de plântulas para a diferenciação de lotes de soja quanto ao potencial fisiológico. A avaliação das enzimas SOD, CAT e APX também foi uma alternativa eficiente para a diferenciar lotes de sementes de milho com pequenas diferenças no vigor (BORBA et al., 2014).

Pela Figura 19, observa-se que houve correlação positiva e significativa apenas entre a massa seca de plântulas e a atividade das enzimas antioxidantes CAT e APX. No entanto, observa-se classificação semelhante dos lotes em níveis de vigor entre os demais testes de qualidade fisiológicas e essas enzimas. Sendo que, menor atividade foi verificada para o lote de pior potencial fisiológico. Assim como para a cultivar BRS Aleppo, não houve diferença significativa entre os testes de qualidade fisiológica e a atividade das enzimas POX e SOD.



**Figura 19:** Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) estimados entre as variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), germinação a baixa temperatura (GBT), teste de frio (TF), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e a atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) e superóxido dismutase (SOD) determinadas em cinco lotes de sementes de grão-de-bico, cv. Cícero. \* = significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na presente pesquisa mostram que, de maneira geral, os testes de envelhecimento acelerado e condutividade elétrica, a análise computadorizada de plântulas e as determinações da atividade de enzimas antioxidantes, possibilitaram detectar diferenças na qualidade fisiológica dos lotes de grão-de-bico analisados, sendo que esse fato foi observado para as duas cultivares estudadas.

O envelhecimento acelerado realizado com 76% UR proporcionou uma relação mais estreita com os demais testes que avaliam a qualidade fisiológica das sementes. Tanto para a cultivar BRS Aleppo como para a cv. Cícero, os períodos de 36 e 48 horas com o uso de solução saturada de NaCl (76% UR) apresentaram resultados correlacionados com os de germinação a baixa temperatura, teste de frio, índice de velocidade de emergência e com a emergência de plântulas. Contudo, o período de 48 horas, pode ser considerado o mais adequado devido à praticidade de realização do teste em horário comercial.

Deve-se destacar também, que no teste de envelhecimento acelerado tradicional (100% UR) houve maior incidência de microrganismos, sobretudo nos períodos de 48 e 72 horas, em relação ao envelhecimento com solução saturada de NaCl (76%), sendo que essa incidência foi ainda maior nas sementes da cv. Cícero.

No teste de condutividade elétrica, para ambas cultivares, o volume de 150 mL, já com 8 horas de embebição, foi eficiente na classificação dos lotes quanto ao vigor. No entanto, o período de 24 horas proporcionou maiores valores de condutividade elétrica, o que é desejável, pois possibilita uma separação mais nítida entre os lotes. Salienta-se que nessa pesquisa, maiores valores de condutividade foram obtidos nos maiores períodos de embebição e nos menores volumes de imersão das sementes. Logo, no volume de 250 mL houve maior diluição dos lixiviados e, conseqüentemente, menor valor de condutividade, para os mesmos períodos de embebição, foi obtido em comparação com os outros volumes.

Ainda no teste de condutividade elétrica, os volumes de 75 e 100 mL no período de 24 horas também permitiram a separação dos lotes de sementes da cv. BRS Aleppo em diferentes níveis de vigor. Todavia, esses volumes não foram eficientes para a cv. Cícero, uma vez que não refletiram a estratificação dos lotes de forma semelhante aos outros testes de avaliação do potencial fisiológico empregados nessa pesquisa. Vale lembrar que para cv. BRS Aleppo, apesar do volume de 75 mL ter sido eficiente, houve dificuldade na realização das leituras de condutividade devido ao volume insuficiente de solução após a embebição das sementes. Para cv. Cícero, cujas sementes são consideravelmente maiores que da cv. BRS Aleppo, a dificuldade de se realizar a leitura da condutividade foi observada no volume de 75 mL, como também em 100 mL.

A análise computadorizada de plântulas por meio do processamento de imagens no software SAPL<sup>®</sup>, nas duas cultivares estudadas, possibilitou a classificação eficaz dos lotes em níveis de vigor já com 4 dias após a semeadura para as variáveis comprimento da radícula, comprimento total e índice de vigor corrigido. No 4º dia, também foi possível classificar, em níveis de vigor, os lotes da cv. Cícero, em relação ao índice de crescimento. Por outro lado, para a cv. BRS Aleppo esse índice apenas foi eficaz com 5 e 8 dias. Somente houve correlação entre o comprimento da parte aérea para a cv. BRS Aleppo no 8º dia de semeadura, no entanto, para cv. Cícero, não foi observada correlações com essa variável. Já em relação ao índice de uniformidade, não houve uma distinção eficiente dos lotes quanto ao potencial fisiológico para ambas cultivares.

Ao se determinar a atividade de enzimas do sistema antioxidante, constatou-se que a atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) apresentou relação com

o vigor das sementes, sendo que para a cv. BRS Aleppo houve alta correlação positiva e significativa com a maioria dos testes empregados. Embora essas enzimas tenham apresentado correlação somente com a massa seca de plântulas, para cv. Cícero, nota-se que houve um padrão semelhante na estratificação dos lotes em relação aos testes de caracterização inicial da qualidade dos lotes, em que, menor atividade enzimática foi observada para o lote de menor vigor.

Somente para as sementes da cv. BRS Aleppo foram observados resultados coerentes entre a atividade da enzima peroxidase (POX) e aqueles obtidos na maioria dos testes de qualidade fisiológica realizados. Para ambas cultivares, os resultados obtidos para a superóxido dismutase (SOD) não possibilitaram a distinção dos lotes em níveis de vigor. Assim, percebe-se a necessidade de estudos adicionais que avaliem o comportamento dessas duas enzimas em sementes de grão-de-bico e sua relação com o potencial fisiológico das sementes.

## **6. CONCLUSÕES**

Os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e o comprimento de plântula pelo SAPL<sup>®</sup> foram eficientes para classificar os lotes de grão-de-bico em níveis de vigor;

Para o teste de envelhecimento acelerado, recomenda-se a utilização de 41°C por 48 horas com solução de NaCl saturada (76% UR);

O teste de condutividade elétrica deve ser conduzido com 50 sementes imersas em 150 mL de água, a 25 °C, por 24 horas;

O comprimento total das plântulas, da raiz primária e os índices de vigor determinados aos 4 dias após a semeadura pelo SAPL<sup>®</sup> permitiram separar os lotes quanto ao vigor;

A maior atividade das enzimas CAT e APX pode ser relacionada ao potencial fisiológico das sementes, o que não ocorreu para SOD e POX.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.A.S.; CARVALHO, M.L.M.; PINTO, C.A.G.; KATAOKA, V.Y.; SILVA, T.T.A. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v.35, n.2, p.240-247, 2013.
- ALVARENGA, R.O.; MARCOS-FILHO, J.; TIMÓTEO, T.S. Assessment of the physiological potential of super sweet corn seeds. Revista **Brasileira de Sementes**, v.35, n.3, p.340-346, 2013.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.
- ARAUJO, R.F.; ZONTA, J.B.; ARAUJO, E.F.; HEBERLE E.; ZONTA, F.M.G. Teste de condutividade elétrica para sementes de feijão-mungo-verde. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n.1, p.123-130, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS (AOSA), ed. **Seed Vigor testing handbook**. 88p. 1983 (Contribution n° 32 to the Handbook on Seed Testing).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS (AOSA), ed. **Seed Vigor testing handbook**. Ithaca, N. Y., 2009 (Contribution n° 32 to the Handbook on Seed Testing).
- ATAIDE, G. M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogine nitens* Tull. Durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropécuaría Tropical**, Goiânia, v.42, n.1, p.71-76, 2012.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.
- BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; COME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 1, p. 104–110, 1996.
- BANDEIRA, J.M.; MARINI, P.; BORBA, I.C.G.; MARTINS, A.B.N.; AMARANTE, L.; MORAES, D.M. Antioxidative metabolism: a tool to detect small differences in the vigor of soybean seeds. **Iheringia**, Série Botânica, v.69, n.2, p.285-292, 2014.
- BARBOSA, R.M.; VIEIRA, B.G.T.L.; GOMES JUNIOR, F.G.; VIEIRA, R.D. Image analysis and peanut seeds performance during the production process. **Científica**, v. 44, n. 3, p. 412-420, 2016.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- BERTOLIN, D.C.; SÁ, M.E.; MOREIRA, E.R.; Parâmetros do teste de envelhecimento acelerado para determinação do vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.35, n.1, p.104-112, 2011.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York, Plenum Press. 1994. 445p.

BINOTTI, F.F.S.; HAGA, K.I.; CARDOSO, E.D.; ALVES, C.Z.; SÁ, M.E.; ARF, O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Scientiarum**, v.30, n.2, p.247-254, 2008.

BORBA, I.C.G.; BANDEIRA, J.M.; MARINI, P.; MARTINS, A.B.N.; MORAES, D.M. Metabolismo antioxidativo para separação de lotes de sementes de diferentes graus de homogeneidade. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 1, p. 20-26, 2014.

BORGES, E.E.L.; FLORES, A.V.; ATAÍDE, G.M.; MATOS, A.C.B. Alterações fisiológicas e atividade enzimática em sementes armazenadas de *Melanoxylon brauna schott*. **Cerne**, v.21, n.1, p.75-81, 2015.

BRASIL. Sistema de Consulta à Legislação - SISLEGIS. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **PORTARIA Nº 111**, set. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 365p.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUNES, A.P.; ARAÚJO, A.D.; DIAS, L.K.; VILLELA, F.A.; AUMONDE, T.Z. Seedling length in wheat determined by image processing using mathematical tools. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 374-379, 2016.

CALDEIRA, C.M.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, J.A.; COELHO, S.V.B.; KATAOKA, V.Y. Vigor de sementes de girassol pela análise computadorizada de plântulas. **Científica**, Jaboticabal, v.42, n.4, p.346-353, 2014.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588 p.

CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F.G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 2, p. 167-172, 2018.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods Enzymology**, v.2, p. 764-775, 1955.

CHENG, H.-Y.; SONG, S.-Q. Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensitivity of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 12, p. 1549-1556, 2008.

CHIQUITO, A. A. et al. Assessment of physiological potential of cucumber seeds using the software Seedling Vigor Imaging System<sup>®</sup> (SVIS<sup>®</sup>). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 255-263, 2012.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G.; PEREIRA, B. L. C.; GONÇALVES, J. F. C. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n.1, p.83-91, 2010.

CUNHA, P.T. Alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em sementes de lentilha em diferentes estádios de maturação e submetidas ao armazenamento. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viços, Viçosa, 2018.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science e Technology**, v.1, n.2, p.427-452, 1973.

DEMIDCHIK, Vadim. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DEUNER, C.; MAIA, M. S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A. S.; MENEGHELLO, G. E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n.4, p. 711- 720, 2011.

DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M. Teste de germinação a baixa temperatura. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França-Neto, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, cap. 8, 1999.

DIAS, D.C.F.S., MARCOS-FILHO, J. Teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja. **Scientia Agricola**, v.53, n.1, p.31-42, 1996.

DIAS, L.B.X.; QUEIROZ, P.A.M.; FERREIRA, L.B.S.; SANTOS, W.V.; FREITAS, M.A.M.; SILVA, P.P.; NASCIMENTO, W.M.; LEÃO-ARAÚJO, E.F. Teste de condutividade elétrica e embebição de sementes de grão-de-bico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.14, n.2, e5641, 2019.

DONÀ, M.; BALESTRAZZI, A.; MONDONI, A.; ROSSI, G.; VENTURA, L.; BUTTAFAVA, A.; MACOVEIL, A.; SABATINI, M.E.; VALASSIL, A.; CARBONER, D. DNA profiling, telomere analysis and antioxidant properties as tools for monitoring ex situ seed longevity. **Annals of Botany**, v.111, p. 987–998, 2013.

DOURADO, W.S.; BELO, A.P.M.; MATOSO, A.O.; SILVA H.D.; SILVA G.D.; SOUZA E.R.B. Envelhecimento acelerado com soluções salinas para avaliação do vigor de sementes de feijão caupi. **Enciclopédia biosfera**, centro científico conhecer - Goiânia, v.9, n.17, p.1274, 2013.

EDMOND, J.B.; DRAPALA, W.J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**, Alexandria, n. 71, p. 428-434, 1958.

EMBRAPA. **BRS Aleppo**: Grão de Bico. Maior tolerância a fungos de solo. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes///publicacao/brs-aleppo-grao-de-bico-maior-tolerancia-a-fungos-de-solo>>. Acesso em: 17 março. 2019.

FESSEL, S. A.; SILVA, L. J. R. da; GALLI, J. A.; SADER, R. Using saturated salt solution for the accelerated aging of broccoli seeds (*Brassica oleracea* L. var. *itálica* Plenck). **Científica**, Jaboticabal, v.33, n.1, p.27-34, 2005.

FAO, 2017. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org>.>Acesso em: 27 de outubro de 2018.

FREITAS, R.A.; NASCIMENTO, W.M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.59-63, 2006.

FREITAS, R.M.O.; NOGUEIRA, N.W.; TORRES, S.B; LEITE, T.S. Accelerated aging of arugula seeds. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.13, n.4, e5585, 2018.

GAUR, P. et al. Chickpea seed production manual. **Communication**, p. 22, 2010.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 315-318, 1977.

GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; MISHRA, P.; SABAT, S. C.; TUTEJA, N. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 10375–10394, 2015.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, v.68, n.3, p.351-357, 2013.

GOMES JUNIOR, F.G.; CHAMMA, H.M.C.P.; CICERO, S.M. Automated image analysis of seedlings for vigor evaluation of common bean seeds. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 36, n. 2, p. 195200, 2014.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HAIG, D.; WESTOBY, M. Seed size, pollination casts and angiosperm success. **Evolutionary Ecology**, v.5, p.231-247, 1991.

HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1987.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v. 3, n. 3, p. 141 153, 1993.

HOSKEM, B. C. S. et al. Productivity and quality of chickpea seeds in Northern Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 261–268, 2017.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging teste for small seeded crops. **Seed Science and Technology**, v.25, n.1, p.123-131, 1996.

KAPOOR, N.; ARYA, A.; SIDDIQUI, M.A.; AMIR, A.; KUMAR, H. Seed deterioration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under accelerated ageing. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.3, p.158-162, 2010.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.

KHAJEH-HOSSEINI, M.; REZAZADEH, M. The electrical conductivity of soak-water of chickpea seeds provides a quick test indicative of field emergence. **Seed Science and Technology**. v. 39, p.692-696, 2011.

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J.M.; CORBINEAU, F. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v.181, p.309–315, 2011.

KIBINZA, S.; VINEL, D.; CÔME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, F. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging, **Physiologia Plantarum**. v.128, p.496– 506, 2006.

KIKUTI, A.L.P.; MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor em sementes de alface. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.1, p.44-50, 2012.

KUMAR, S. P.J.; PRASAD, S. R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, p. 663–668. 2015.

LIMA, D. M. et al. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, Campinas, Nepa Unicamp, 2011. Disponível em: <[http://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf)>

LOEFFLER, T.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**., Springfield, v.12, n.1, p.37-53, 1988.

LOPES, M.M; BARBOSA, R.M.; VIEIRA, R.D. Methods for evaluating the physiological potential of Scarlet eggplant. **Seed Science and Technology**, v.40, n.1, p.86-94, 2012.

LOPES, M.M.; SILVA, C.B.; VIEIRA, R.D. Physiological potential of eggplant seeds. **Journal of Seed Science**, v.35, n.2, p.225-230, 2013.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-and in selection and evaluation for seeding emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MACHADO, C. G.; MARTINS, C.C.; SANTANA, D.G.; CRUZ, S.C.S.; OLIVEIRA, S.S.C. Adequação do teste de condutividade elétrica para sementes de *Pisum sativum* subsp. Arvense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.988-995, 2011.

MARCHI, J. L.; CICERO, S. M. Use of the software Seed Vigor Imaging System (SVIS<sup>®</sup>) for assessing vigor of carrot seeds. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 6, p. 469-473, 2017.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015, 659p (a).

MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v.72, n.4, p.363-374, 2015 (b).

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França-Neto, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. Cap.3, p1-24, 1999.

MARCOS-FILHO, J.; SILVA, W.R.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; CHAMMA, H.M.C.P. Estudo comparativo de métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.12, p. 1805-1815, 1990.

MARCOS-FILHO, J.; KIKUTI, A.L.P.; LIMA, L.B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.102-112, 2009.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.27, n.1, p.177-237, 1999.

MCDONALD, M.B. A review and evaluation of seed vigor tests. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts, v.65, p.109-139, 1975.

MEDEIROS, A.D. Fenotipagem de sementes com uso de radiação eletromagnética não-visível e sua relação com a qualidade fisiológica. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.78, 2019.

MEDEIROS, A.D.; PEREIRA, M.D. SAPL<sup>®</sup>: a free software for determining the physiological potential in soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 48, n. 3, p. 222-228, 2018.

MEDEIROS, A.D.; PEREIRA, M.D.; SILVA, J.A. Processamento digital de imagens na determinação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.13, n.3, e5540, 2018.

MERIAUX, B.; WAGNER, M.H; DUCOURNAU, S.; LADONE, F.; FOUGEREUX, J.A. Using sodium chloride saturated solution to standardize accelerated aging test for wheat seeds. **Seed Science and Technology**, v. 35, n.3, p.772-733, 2007.

MITLLER R.; BLUMWALD E. Estresse Abiótico. In: Taiz L.; Zeiger E.; Moller I. M.; Murphy A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 24, 2017.

MOURA, M.C.F.; LIMA, L.K.S.; SANTOS, C.C.; DUTRA, A.S. Teste da condutividade elétrica na avaliação fisiológica em sementes de *Vigna unguiculata*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n.4, p.714-721, 2017.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NASCIMENTO, W.M.; FREITAS R.A.; GOMES E.M.L.; SOARES A.S. Metodologia para o teste de envelhecimento acelerado em sementes de ervilha. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n.2, p.205-209, 2007.

NASCIMENTO. W.M; SILVA, P.P. Grão-de-bico: nova aposta do agronegócio brasileiro. **Revista Seed News**, v.23, n.3, p.18-22, 2019.

NASCIMENTO, W. M.; SILVA, P. P.; ARTIGA, O. P.; SUINAGA F. A. Grão-de-Bico. In: **Hortaliças Leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2016. p. 89–118.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França-Neto, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, cap. 2, 1999.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. May, p. 867–880, 1981.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v.9, n.11, p.534-540, 2004.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.

POWELL, A.A. Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for sowing. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v.10, n.2, p.81-100, 1986.

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; BOGDANOVIĆ, J.; MITROVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; RADOTIĆ, K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Sciences**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 209-216, 2007.

QASIM, G.; MALIK, A.U.; SARFRAZ, M.; ALIAS, M.A.; BUKHSH, H.A.; ISHAQUE, M. Relationship between laboratory seed quality tests, field emergence and yield of chickpea. **Crop & Environment**, v.1, n.1, p.31-34, 2010.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 796–805, 2008.

RAM, C.; KUMARI, P.; SINGH, O.; SARDANA, R.K. Relationship between seed vigour tests and field emergence in chickpea. **Seed Science and Technology**, v.17, p.169-173, 1989.

RAMOS, N.P.; FLOR, E.P.O.; MENDONÇA, E.A.F.; MINAMI, K. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.98-1003, 2004.

R CORE TEAM. **R Development Core TeamR: A Language and Environment for Statistical Computing**, 2018.

REIS, J.A.V. Sistema de análise de plântulas (SAPL) na determinação do vigor de sementes de Moringa oleífera Lam. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p. 21, 2017.

RODO, A.B.; MARCOS-FILHO, J. Accelerated aging and controlled deterioration for the determination of the physiological potential of onion seeds. **Scientia Agricola**, v.60, n.3, p.465-469, 2003.

RODO, A.B.; PANOBIANCO, M.; MARCOS-FILHO, J.; Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agricola**, v.75, n.2, p.289-292, 2000.

SAHU, B.; SAHU, A. K.; THOMAS, V.; NAITHANI, S. C. Reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidative enzymes in dehydrating Karanj (*Pongamia pinnata*) seeds during storage. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 383–390, 2017.

SAMARAH N.H.; ABU-YAHYA A. Effect of maturity stages of winter- and spring-sown chickpea (*Cicer arietinum* L.) on germination and vigour of the harvested seeds. **Seed Science and Technology**, v.36, n.1, p.177-190, 2008.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.110-119, 2004.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SHARMA, S. N.; MAHESHWARI, A.; SHARMA, C.; SHUKLA, N. Gene expression patterns regulating the seed metabolism in relation to deterioration/ageing of primed mung bean (*Vigna radiata* L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 2018, p. 40–49, 2018.

SILVA, L.J.; MEDEIROS, A.D.; OLIVEIRA, A.M.S. SeedCalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v.41, n.2, p.250-257, 2019.

SILVA, V.N.; CICERO, S.M. Análise de imagens de plântulas para avaliação do potencial fisiológico de sementes de berinjela. **Horticultura Brasileira**, v.32, n.2, p.145-151, 2014.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; PINTO, M. C.; GARA, L. A. Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 647- 1654, 2001.

TOMES, L.J.; TeKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Factors influencing the tray accelerated aging test for soybean seed. **Journal of Seed Technology**, v.12, n.1, p.24-35, 1988.

TORRES, P. C. Alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em sementes de lentilha em diferentes estádios de maturação e submetidas ao armazenamento. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. P. 44, 2018.

TORRES, S.B. Envelhecimento acelerado em sementes de pepino com e sem solução salina saturada. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.303-306, 2005.

TORRES, S.B.; MARCOS-FILHO, J. Accelerated aging of melon seeds. **Scientia Agricola**, v.60, n.1, p.77-82, 2003.

TRANCOSO, A.C.R. Alterações anatômicas, histoquímicas e fisiológicas durante a maturação de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p.35, 2018.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: Krzyzanowski, F. C.; Vieira, R. D.; França-Neto, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, Cap.4, 1999.

XIN, X.; TIAN, Q.; YIN, G.; CHEN, X.; ZHANG, J.; NG, S.; LU, X. Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 2, p. 140–147, 2014.

YAGUSHI, J. T.; COSTA, D.S.; FRANÇA-NETO, J.B. Saturated salt accelerated aging and computerized analysis of seedling images to evaluate soybean seed performance. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 213-221, 2014.

YIN, X.; HE, D.; GUPTA, R.; YANG, P. Physiological and proteomic analyses on artificially aged *Brassica napus* seed. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 2015, p. 1–11, 2015.

## 8. ANEXOS

**Anexo A.** Resumo da análise de variância dos dados de envelhecimento acelerado de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, utilizando-se duas soluções (água – 100% UR e NaCl – 76% UR) e quatro períodos de envelhecimento (24, 36, 48 e 72 horas), a 41°C.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F calculado
Lote (L)	4	35345,4000	8836,3500	410,5157*
Período (P)	3	19303,0750	6434,3583	298,9249*
Solução (S)	1	6890,6250	6890,6250	320,1220*
L x P	12	1976,8000	164,7333	7,6531*
L x S	4	2267,0000	566,7500	26,3298*
P x S	3	5095,4750	1698,4916	78,9079*
L x P x S	12	800,4000	66,7000	3,0987*
Resíduo	120	2583,0000	21,5250	
Total	159	74261,7750		
CV (%)			2,91	

\*Significativo a 5% de probabilidade.

**Anexo B.** Resumo da análise de variância dos dados de condutividade elétrica de cinco lotes de grão-de-bico, cv. BRS Aleppo, utilizando-se 50 sementes embebidas em quatro volumes (75, 100, 150 e 250 mL) de água durante quatro períodos (2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas), a 25°C.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F calculado
Volume (V)	3	45728,7668	15242,9223	5381,7859*
Período (P)	4	44176,2899	11044,0725	3899,3070*
Lote (L)	4	22135,6088	5533,9022	1953,8430*
V x P	12	3682,3766	306,8647	108,3441*
V x L	12	2493,6886	207,8074	73,3701*
P x L	16	2565,3362	160,3335	56,6086*
V x P x L	48	323,5372	6,7404	2,3798*
Resíduo	300	849,6950	2,8323	
Total	399	121955,2992		
CV (%)			6,66	

\*Significativo a 5% de probabilidade.

**Anexo C.** Resumo da análise de variância dos dados de envelhecimento acelerado de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero, utilizando-se duas soluções (água – 100% UR e NaCl – 76% UR) e quatro períodos de envelhecimento (24, 36, 48 e 72 horas), a 41° C.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F calculado
Lote (L)	3	7697,0337	2565,6779	135,8010*
Período (P)	3	14539,9837	4846,6612	256,5332*
Solução (S)	1	5392,4113	5392,41125	285,4197*
L x P	9	631,7513	70,1946	3,7154*
L x S	3	258,0337	86,0112	4,5526*
P x S	3	2675,8837	891,9612	47,2114*
L x P x S	9	468,0512	52,0057	2,7527*
Resíduo	96	1813,7200	18,8929	
Total	127	33476,8688		
CV (%)			3,41	

\*Significativo a 5% de probabilidade.

**Anexo D.** Resumo da análise de variância dos dados de condutividade elétrica de quatro lotes de grão-de-bico, cv. Cícero, utilizando-se 50 sementes embebidas em quatro volumes (75, 100, 150 e 250 mL) de água durante quatro períodos (2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas), a 25°C.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F calculado
Volume (V)	3	26973,3317	8991,1105	7404,1979*
Período (P)	4	33319,4921	8329,8730	6952,3131*
Lote (L)	3	2701,9036	900,6345	751,6913*
V x P	12	1707,8136	142,3178	118,7819*
V x L	9	407,6747	45,2972	37,8061*
P x L	12	174,2194	14,5183	12,1173*
V x P x L	36	160,9672	4,4713	3,7319*
Resíduo	240	287,5546	1,1981	
Total	319	65732,9569		
CV (%)			4,57	

\*Significativo a 5% de probabilidade.