Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Utilização de técnicas de análise de imagens para avaliação da morfologia interna
de sementes de soja e milho

Lucas Sousa Capelaro

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2017

Lucas Sousa Capelaro
Engenheiro Agrônomo

Utilização de técnicas de análise de imagens para avaliação da morfologia interna de
sementes de soja e milho

Orientador:
Prof. Dr. **SILVIO MOURE CICERO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Capelaro, Lucas Sousa

Utilização de técnicas de análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes de soja e milho / Lucas Sousa Capelaro. - - Piracicaba, 2017.

61 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Morfologia interna 2. Raios X 3. Micro-TC 4. IRM 5. Soja 6. Milho I. Título

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida, aos meus pais, Ademir Luiz Capelaro e Ana Luisa Elste Sousa Capelaro, pelos ensinamentos, apoio, paciência, carinho e amor que me ofereceram. Tudo que sou hoje devo a vocês. Muito obrigado. À minha irmã, Julia Capelaro, pela amizade, carinho e relação de cumplicidade.

À minha namorada, Bruna Garbatti Factor, pela amizade, carinho, amor, paciência e pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

À toda minha família e amigos, que sempre foram parte especial em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao professor Silvio Moure Cícero, pela dedicada orientação, paciência e inúmeros conhecimentos transmitidos, fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Muito obrigado pela confiança.

À Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Eng. Agrônomo Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior, pelos ensinamentos, paciência, amizade e pela grande contribuição na condução do trabalho.

À equipe do Laboratório de Técnicas Nucleares da Embrapa Instrumentação, em especial ao Dr. Paulo Renato Orlandi Lasso, pelas análises de microtomografia computadorizada de raios X.

À equipe do Centro de Imagens e Espectroscopia in vivo por Ressonância Magnética (CIERMag), do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), em especial ao Msc. Agide Marassi, pelas análises de ressonância magnética.

À Eng. Agrônoma Msc. Helena M. C. P. Chamma, paciência, ensinamentos e apoio nas análises no Laboratório de Análise de Sementes.

Aos funcionários do departamento, principalmente Adilson, Davi, Hodair, João, Cacá e Luciane.

À empresa Pioneer Sementes e a Embrapa Soja, pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã, por todo apoio, amor e carinho. Muito obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha namorada, Bruna Garbatti Factor, por todo apoio durante essa e todas as etapas da minha vida. Sem você tudo seria mais difícil. Muito obrigado por estar sempre ao meu lado.

A todos os alunos de mestrado e doutorado da área de tecnologia de sementes.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DAS SEMENTES DE SOJA E DE MILHO	11
2.2. PRINCÍPIOS DAS TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE IMAGENS DAS SEMENTES.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. RAIOS X	28
3.2. MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE RAIOS X (MICRO-TC)	28
3.3. IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (IRM)	29
3.4. AVALIAÇÃO DOS DANOS PRESENTES NAS SEMENTES.....	30
3.5. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES	31
3.6. ANÁLISE DAS IMAGENS	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. SEMENTES DE SOJA	33
4.2. SEMENTES DE MILHO	41
5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	57

RESUMO

Utilização de técnicas de análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes de soja e milho

Os testes utilizados rotineiramente na avaliação de danos mecânicos, danos causados por insetos e danos por deterioração de tecidos em sementes de soja e de milho são destrutivos, impossibilitando a associação dos resultados obtidos com os testes fisiológicos (germinação e vigor). Dessa forma, a avaliação da qualidade de sementes por meio de análise de imagens tem despertado interesse da pesquisa, devido ao fato de serem técnicas rápidas e não destrutivas, permitindo tal associação. Dentre as técnicas de análise de imagens existentes, as técnicas de microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC) e imagem por ressonância magnética (IRM) tem se mostrado promissoras na pesquisa com sementes, por gerarem imagens tridimensionais, que permitem verificar, com precisão, a localização dos danos internos nas sementes. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar as técnicas de micro-TC e IRM para avaliar danos internos em sementes de milho e de soja, verificar suas relações com a germinação e compará-las a técnica de raios X, que vem sendo utilizada na pesquisa com sementes. Para tanto foram selecionadas previamente, 32 sementes de soja e 30 sementes de milho, que foram submetidas aos testes de raios X, micro-TC e IRM, para obtenção das imagens e, posteriormente, ao teste de germinação, para associar os resultados obtidos com o desempenho das sementes. Pode-se concluir para as sementes de soja que as três técnicas se mostraram eficientes na detecção de danos nas sementes. Por outro lado, para as sementes de milho, pode-se haver necessidade de utilização das técnicas de micro-TC e IRM para avaliar, com maior precisão, a morfologia interna das sementes.

Palavras-chave: Morfologia interna; Raios X; Micro-TC; IRM; Soja; Milho

ABSTRACT

Use of image analysis techniques to evaluate the internal morphology of soybean and corn seeds

The current tests used in the evaluation of mechanical, insect, and tissue damage in soybean and corn seeds are destructive, making it impossible to associate those with the results obtained with physiological tests (germination and vigor). Therefore, evaluation of the seed quality by imaging analysis techniques aroused interest in seed research for being fast and non-destructive techniques, allowing association with physiological tests. X-ray computerized microtomography (micro-CT) and magnetic resonance imaging (MRI) seem promising techniques due to the fact they generate three-dimensional images allowing more accurate evaluation of the seed's internal morphology. The objective of this study was to use the micro-CT and MRI techniques to evaluate internal morphology of soybean and corn seeds, correlate their relationship with the physiological test (germination test) and to compare them with the X-ray technique, which has been used in seed research. For that 32 soybean seeds and 30 corn seeds were selected. Seeds were tested with X-ray, micro-CT, MRI, to obtain the images. Then germination test was conducted to associate the results obtained with the performance of the seeds. Overall, the three techniques were efficient in detecting damage in soybean seeds. On the other hand for corn, it may be necessary to use the micro-CT and MRI techniques to evaluate more accurately the internal morphology of the seeds.

Keywords: Internal morphology; X-ray; Micro-CT; MRI; Soybean; Corn

1. INTRODUÇÃO

As culturas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e milho (*Zea mays* L.) possuem grande destaque na agricultura do Brasil, sendo as duas principais espécies em termos de área cultivada e na produção de grãos. As duas culturas juntas foram responsáveis, na safra 2015/16, pela produção de 162 milhões de toneladas, sendo a soja por 95,434 milhões de toneladas e a cultura do milho por 66,571 milhões de toneladas (CONAB, 2017). Essa produção corresponde a cerca de 87% do total de grãos produzidos pela agricultura brasileira, ratificando a importância das mesmas no cenário agrícola e econômico do Brasil. Já na safra de 2016/17 o total produzido por essas duas culturas foi de 211.892,3 milhões de toneladas, correspondendo a 89% da produção brasileira de grãos (CONAB, 2017). O valor produzido na safra 2016/17 é maior do que a produção total de todos os grãos da safra de 2015/16 reafirmando, assim, a importância das duas culturas no cenário agrícola nacional.

Por conta dessa importância no cenário brasileiro, uma série de medidas devem ser adotadas afim de garantir produtividades satisfatórias para os produtores. Essas medidas, também conhecidas como práticas agrícolas, interferem diretamente no estabelecimento e no desenvolvimento da cultura no campo e, conseqüentemente, na produção final obtida. O primeiro passo para obtenção de altas produtividades é o estabelecimento adequado das plantas no campo, onde o mesmo é afetado pela velocidade de semeadura, pela profundidade de semeadura e, principalmente, pela qualidade das sementes. Assim, a utilização de sementes de alta qualidade é essencial para assegurar o estabelecimento adequado das plantas no campo, já que o uso de sementes de alta qualidade assegura uniformidade de germinação e emergência de plântulas sob ampla variação de ambiente (MARCOS-FILHO, 2015). O uso de sementes com baixa qualidade pode ocasionar falhas no estande de plantas no campo e, conseqüentemente, afetar a produção final.

A qualidade das sementes é composta por quatro atributos, sendo eles os atributos genético, físico, fisiológico e sanitário (MARCOS-FILHO, 2015). Entre os atributos, o fisiológico é composto pela germinação e vigor, onde o mesmo está relacionado com o desempenho da semente sob amplas condições de ambiente. Entre os métodos à disposição para avaliar o potencial fisiológico das sementes temos o teste de germinação, utilizado para quantificar o potencial máximo de germinação dos lotes de sementes (BRASIL, 2009). Por ser executado em

condições controladas, os resultados em campo podem não ser condizentes com os obtidos em laboratório. Por conta disso, os testes de vigor surgiram para quantificar o processo de deterioração em lotes de sementes com potencial germinativo semelhante, podendo avaliar a capacidade de armazenamento de lotes de sementes e, ou desempenho de sementes sob condições desfavoráveis de ambiente.

A utilização de técnicas de análise de imagens para avaliação do potencial fisiológico das sementes, por meio da sua morfologia interna, tem sido empregada a partir do final da década de 1990, por meio do teste de raios X, viabilizando um grande avanço na avaliação de danos mecânicos em sementes, permitindo associar os danos internos com germinação e vigor (CICERO et al., 1998; CICERO; BANZATO JUNIOR, 2003). Recentemente, técnicas de análise de imagens como a microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC) e a imagem por ressonância magnética (IRM) passaram a ser utilizadas na pesquisa em tecnologia de sementes, sendo que os procedimentos para sua utilização na avaliação da morfologia interna e na identificação de danos mecânicos em sementes de soja e de milho foram definidos por Gomes-Junior et al. (2014) e Marassi (2015). Entretanto, ainda não foram realizadas pesquisas que comprovem a eficiência dessas técnicas na avaliação de diferentes tipos de danos no interior de sementes (danos mecânicos, deterioração de tecidos e danos causados por insetos).

Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar as técnicas de análise de imagens de raios X, micro-TC e IRM para avaliar danos internos em sementes de milho e de soja e verificar suas relações com o potencial fisiológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fatores que afetam a qualidade das sementes de soja e de milho

A qualidade das sementes é fundamental no desempenho das mesmas, definindo o seu valor de semeadura ou, também, seu potencial de desempenho (POPINIGIS, 1977). Segundo Marcos-Filho (2015) a qualidade da semente é composta pelos atributos físico, fisiológico, genético e sanitário, onde esses atributos estão interligados, sendo que efeitos negativos em um podem afetar os outros e, consequentemente, a qualidade da semente.

Os danos mecânicos são um dos principais fatores que afetam a qualidade das sementes, sendo a colheita mecânica e o beneficiamento os principais responsáveis por este tipo de ocorrência, podendo acarretar redução na germinação da ordem de 10% durante a colheita e elevação deste índice para 20%, ou mesmo para 30% quando o beneficiamento é realizado inadequadamente (COPELAND, 1972). Os danos mecânicos podem ser classificados em danos com efeito imediato, onde tem-se perda imediata da germinação da semente e danos mecânicos com efeito latente, sob os quais a germinação pode não ser imediatamente atingida, mas o vigor, o potencial de armazenamento e o desempenho da semente no campo são reduzidos (FRANÇA-NETO; HENNING, 1984).

Durante a colheita mecânica das sementes, as mesmas se comportam como corpos estáticos dentro das colhedoras, as quais se chocam contra os cilindros de trilha ou debulha, ocasionando os danos mecânicos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Para as sementes de milho, é possível colher as espigas, reduzindo a chance das sementes receberem danos mecânicos durante a colheita, já que as espigas permanecerão intactas. No beneficiamento das sementes as etapas em que os danos mecânicos ocorrem com maior intensidade são as de recebimento das sementes, onde as mesmas se chocam contra superfícies duras e na movimentação dentro da UBS, onde os danos ocorrem principalmente nos elevadores (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Particularmente no caso das sementes de milho, onde são colhidas as espigas, as mesmas necessitam ser secadas após a colheita para serem debulhadas de maneira adequada, já que as sementes são colhidas com umidade em torno de 30 a 40%. Para serem secas de maneira uniforme e eficiente, é necessário retirar a palha das espigas. A despalha das espigas é uma etapa que,

além de gerar perdas quando feita mecanicamente, pode causar sérios danos, principalmente devido ao elevado teor de água que as sementes se encontram no momento da operação. Danos provenientes da despalha mecânica têm sido relevantes na redução da qualidade das sementes, por provocar danos mecânicos com efeito latente (ANDRADE; BORBA, 1993). A debulha das sementes de milho também apresenta-se como uma operação sujeita a danos mecânicos, por utilizar cilindros debulhadores para retirada das sementes das espigas. A possibilidade de incidência de danos aumenta conforme aumenta-se a velocidade de rotação do cilindro (BORBA et al., 1994).

Em relação à sensibilidade das sementes ao dano mecânico, as sementes de soja apresentam maior sensibilidade do que as sementes de milho, uma vez que as partes vitais do eixo embrionário estão situadas sob um tegumento pouco espesso, que lhe oferece baixa proteção (FRANÇA-NETO; HENNING, 1984). As sementes de milho apresentam pericarpo, endosperma e escutelo, que conferem proteção ao eixo embrionário, aumentando assim sua resistência aos danos mecânicos (MARCOS-FILHO, 2015).

Danos por umidade são bem comuns, principalmente em regiões tropicais, onde o clima quente e úmido presente nessas regiões é propício para o desenvolvimento deste tipo de dano. A deterioração por umidade resulta da exposição das sementes a ciclos alternados de condições ambientais úmidas e secas na fase final de maturação, antes da colheita (KRZYZANOWSKI, 2004). Esse tipo de dano afeta diretamente a qualidade de sementes e, no caso da soja, é um dos principais fatores para redução da qualidade das sementes, pois as sementes de soja, devido às suas características morfológicas e químicas, destacam-se por serem bastante sensíveis à ação de fatores do ambiente (MARCOS-FILHO, 1979). As sementes de soja necessitam permanecer “armazendas” no campo após o ponto de maturidade fisiológica, até atingirem o teor de água adequado para realização da colheita e durante esse período, as condições climáticas podem não ser favoráveis (FRANÇA-NETO; HENNING, 1984). Ao serem expostas a ciclos alternados de umedecimento e secagem, as sementes passam por alterações físicas, ocasionadas pelas sucessivas expansões e contrações do volume das sementes, que ocasionam a formação de rugas nos cotilédones, na região oposta ao hilo, devido à ausência da camada tegumentar composta por células em forma de “ampulheta” da hipoderme, de modo que as expansões e contrações não são atenuadas

(MARCOS-FILHO, 2015). Esse ciclo de umedecimento e secagem também podem favorecer a ruptura do tegumento e dos tecidos embrionários, comprometendo o controle de permeabilidade das membranas e, posteriormente, a germinação das sementes.

Já as sementes de milho sofrem menos com danos por umidade pelo fato de serem colhidas nas espigas, quando o teor de água nas sementes é elevado, variando entre 30 a 40% (MARTIN et al., 2007) e, também, por conta de sua morfologia. As altas temperaturas associadas ao clima úmido podem favorecer a incidência de doenças nos campos de produção de sementes de milho, favorecendo a deterioração das mesmas. A infecção das sementes por fungos como *Fusarium moniliforme* e *Diplodia maydis*, no campo de produção, ocorre sob grau de umidade em torno de 35 a 40%, enquanto para os fungos *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*, os teores de água mais apropriados estão bem abaixo desses valores (PINTO, 1998), atacando as sementes durante seu armazenamento, principalmente quando as mesmas apresentam teores de água considerados inadequados para sua conservação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Assim como as sementes de milho, as sementes de soja também são suscetíveis a doenças que podem provocar deterioração das mesmas, sendo a mancha púrpura, causada pelo fungo *Cercospora kikuchii*, e antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*, as mais importantes (GODOY et al., 2014). A deterioração das sementes pode ser definida como um processo gradual, irreversível e inevitável, podendo ser apenas retardada. Manifesta-se através de alterações químicas e fisiológicas, sendo a perda da capacidade de germinação a sua etapa final (TOLEDO; MARCOS-FILHO, 1977). Em outras palavras, pode-se dizer que a deterioração é um processo degenerativo contínuo, que envolve uma sequência de eventos bioquímicos e fisiológicos, levando a uma progressiva queda na qualidade de sementes e culminando na perda de viabilidade (ELLIS, 1992).

Outro importante tipo de dano presente nas sementes de soja e milho são os danos ocasionados por pragas, sendo elas de campo ou armazenamento. Pode-se dizer que as sementes de soja são mais sujeitas a danos de pragas de campo e que as sementes de milho são mais sujeitas aos danos provocados pelas pragas de armazenamento. As espécies de percevejo *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildini* e *Euschistus heros* podem causar sérios danos às sementes de soja (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998; PANIZZI et al., 2012). No ato de se alimentar, os

percevejos, através do seu aparelho bucal do tipo sugador, inoculam o interior das sementes com as leveduras *Nematospora coryli*, que irão colonizar os tecidos das sementes e, conseqüentemente, consumir as substâncias de reserva das mesmas, acelerando o processo deteriorativo e resultando em severas reduções do potencial fisiológico da semente e, finalmente, de sua viabilidade (PANIZZI et al., 2012). No caso das sementes de milho, os insetos-pragas que atacam as sementes no campo são as lagartas *Helicoverpa zea* e *Spodoptera frugiperda* (RODRIGUES MATRANGOLO; CRUZ; CASTRO DELLA LÚCIA, 1997), onde as mesmas irão provocar danos nas sementes por conta do seu tipo de aparato bucal. Já as pragas de armazenamento que provocam danos nas sementes de milho podem ser classificadas em primárias, onde perfuram as sementes e alimentam-se do seu interior, podendo ou não se desenvolverem no interior da semente e possibilitando a instalação de outros agentes de deterioração. Exemplos de pragas primárias de milho são *Sitophilus oryza*, *Sitophilus zeamais* e *Sitotroga cerearella*. As pragas secundárias não conseguem atacar as sementes saudáveis, pois requerem que as mesmas estejam danificadas ou quebradas para se alimentarem. Essas pragas ocorrem na massa de sementes quando estas estão trincadas, quebradas ou mesmo danificadas por pragas primárias. Além disso, possuem alta taxa de multiplicação, provocando prejuízos elevados. A praga *Oryzaephilus surinamensis* é um exemplo de praga secundária que ataca sementes de milho. No caso da soja, pode-se citar como exemplos de pragas de armazenamento primárias e secundárias as espécies *Lasioderma serricorne* e *Oryzaephilus surinamensis*, respectivamente (LORINI et al., 2015).

A avaliação dos danos mecânicos em sementes de soja tem sido feita com testes que utilizam hipoclorito de sódio (NaOCl); para sementes de milho tem sido utilizados corantes a base de verde-rápido, solução de amaranço e de iodo. O teste de tetrazólio também tem sido utilizado para avaliar danos mecânicos em sementes de soja (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998). Os testes que utilizam hipoclorito de sódio e os testes a base de corantes permitem apenas a constatação de danos mecânicos localizados externamente nas sementes. Por outro lado, o teste de tetrazólio permite identificação de danos mecânicos localizados internamente, além de possibilitar a avaliação de danos causados por insetos, por deterioração de tecidos e danos por umidade em sementes de soja (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; COSTA, 1998).

Ultimamente, técnicas de análise de imagens têm sido utilizadas nas ciências agrárias, sendo empregadas na tecnologia de sementes com o objetivo de estudar a morfologia interna da semente. As técnicas de análise de imagens em sementes tem ganhado espaço na pesquisa devido ao fato de serem técnicas rápidas e não destrutivas, permitindo associar as imagens obtidas com testes de germinação ou de vigor.

Neste cenário, a técnica de raios X é amplamente difundida e consolidada para estudos de sementes. Por meio da imagem de raios X é possível visualizar as partes da semente, identificando possíveis alterações, no embrião e nos tecidos de reserva. A viabilidade das sementes submetidas ao comprimento de onda dos raios X não é comprometida devido às baixas intensidades utilizadas (BINO; AARTSE; VAN DER BURG, 1993; ISTA, 2017). Desse modo as sementes radiografadas podem ser utilizadas em testes fisiológicos (germinação e vigor) para comparação entre as imagens obtidas e o resultado do teste. O método de análise de imagens por raios X tem sido considerado limitado, pois as imagens geradas são bidimensionais (2D), não possibilitando a avaliação exata da profundidade dos danos e, conseqüentemente, deixando a dúvida se os mesmos estão atingindo regiões críticas da semente. Dessa forma, existem situações em que as imagens radiográficas de sementes indicavam injúrias em seu eixo embrionário, mas a mesmas originavam plântulas normais.

A utilização da técnica de obtenção de imagens por meio de raios X para avaliação da morfologia interna de sementes iniciou-se a partir da década de 1950 (SIMAK; GUSTAFSSON, 1953). A partir da década de 1990 houve um grande avanço na avaliação de danos e anormalidades em sementes por meio de raios X, permitindo associa-los com germinação e vigor (BINO; AARTSE; VAN DER BURG, 1993; CICERO et al., 1998; CICERO; LUIZ; JUNIOR, 2003).

Embora o teste de raios X apresente algumas limitações, Cicero et al. (1998), por meio da análise de imagens por raios X para avaliação de injúrias mecânicas em sementes de milho, concluíram que a análise de imagens radiográficas permite avaliar danos mecânicos localizados internamente nas sementes diretamente relacionados com anormalidades de plântulas ou com a morte das sementes. A partir da pesquisa de Cicero et al. (1998), a técnica de análise de imagens por raios X passou a ser empregada no Brasil, com eficiência, para avaliação de danos mecânicos em sementes de outras espécies como a soja

(OBANDO-FLOR et al., 2004; PINTO et al., 2009), o feijão (FORTI et al., 2008; MONDO et al., 2009) e o milho-doce (GOMES JUNIOR; CICERO, 2012). Segundo Pinto et al. (2007), além da utilização da radiografia para análise de danos mecânicos, o uso de raios X para avaliação de danos causados por deterioração de tecidos é um método eficaz. Forti et al. (2008) destacaram a utilização de imagens radiográficas para identificação de danos causados por percevejos em sementes de feijão e sua relação com prejuízos causados à germinação das sementes.

Já as técnicas de microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC) e imagem por ressonância magnética (IRM) tem mostrado grande potencial para aplicação na pesquisa de sementes, pois permitem obtenção de imagens tridimensionais do objeto estudado, possibilitando verificar, com exatidão, a localização dos danos presentes na sementes. Aliado a isso, ambas as técnicas também são consideradas não destrutivas, permitindo comparar os resultados obtidos nos testes de germinação ou de vigor com as imagens geradas pelas técnicas.

No caso da microtomografia computadorizada de raios X, a mesma é amplamente utilizada no estudo da composição química de materiais (JUSSIANI; JOSÉ DOS REIS; APPOLONI, 2016), no estudo de materiais rochosos (HANNA; KETCHAM, 2017; MANOEL et al., 2011) e com estudos de pequenos animais (LI et al., 2008; SCHAMBACH et al., 2010). Recentemente a micro-TC foi utilizada na área de ciências agrárias para avaliar propriedades microestruturais em grãos de café (PITTIA et al., 2011) e para avaliar enxertia em ramos de videira (MILIEN et al., 2012). Além disso, Gomes-Junior et al. (2014) determinaram os procedimentos necessários para obtenção de imagens de sementes de soja e milho através da micro-TC, destacando o seu potencial na avaliação da morfologia interna das sementes em associação com o potencial fisiológico das mesmas.

Em relação à imagem por ressonância magnética, a técnica tem sido utilizada nas ciências agrárias em estudos de mobilidade de água no endosperma de mutante de cevada (FAST SEEFELDT et al., 2007), obtenção de imagens de lipídios presentes em tecidos de plantas e de sementes (BORISJUK; ROLLETSCHEK; NEUBERGER, 2013) e detecção da presença de fungos em sementes de trigo (KÖCKENBERGER et al., 2004). Além disso a técnica foi utilizada na agricultura em pesquisas com o intuito de observar o tecido de frutos de manga em estágio avançado de deterioração (BISCEGLI; FRANCO, R. W. DE A. TANNUS;

COLNAGO, 2000), injúrias mecânicas em frutos de goiaba (MATTIUZ; BISCEGLI; DURIGAN, 2002) e frutos de banana durante o amadurecimento (RIBEIRO et al., 2010). Em relação à análise da morfologia interna de sementes, a metodologia para obtenção de imagens por meio da técnica de ressonância magnética foi proposta por Marassi (2015), mostrando-se como técnica promissora para avaliação da qualidade das sementes.

Os princípios das técnicas de raios X, microtomografia computadorizada de raios X e de imagem por ressonância magnética serão apresentadas no tópico abaixo.

2.2. Princípios das técnicas para obtenção de imagens das sementes

2.2.1. Raios X

A técnica de raios X consiste em bombardear um material metálico alvo com alto número atômico, onde geralmente se usa o tungstênio, por meio da aceleração de elétrons altamente energizados, onde os mesmos são acelerados devido à diferença de potencial V entre os eletrodos (cátodo e ânodo), produzidos através de um filamento aquecido presente no “tubo” de raios X (HANNA; KETCHAM, 2017; OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Através desse bombardeamento de elétrons é produzida a radiação X, caracterizada como uma radiação eletromagnética de alta frequência, comprimento de onda curto e alto poder de penetração nos objetos (MANOEL et al., 2011). A voltagem do tubo de raios X representa o potencial elétrico (potencial V) aplicado nos eletrodos que irá acelerar os elétrons até a sua máxima energia (HANNA; KETCHAM, 2017). No caso dos equipamentos utilizados para obtenção de imagens de sementes, a voltagem que normalmente utiliza-se é de 20 a 30 kV.

Os raios X possuem comprimento de onda entre 0,01 a 10 nm e, por conta disso, podem interagir com os objetos a nível atômico (AICHINGER et al., 2012; HANNA; KETCHAM, 2017). A parcela mínima de qualquer tipo de radiação eletromagnética é denominada de fóton e, portanto, o conjunto de fótons gerados através do bombardeamento de elétrons com alta energia cinética corresponde ao feixe de raios X (MANOEL et al., 2011). Os fótons emitidos pelo tubo de raios X são

direcionados para o objeto a ser analisado através de um dispositivo de limitação do feixe (AICHINGER et al., 2012).

As características dos raios X estão vinculadas à quantidade e qualidade do feixe de fótons. A quantidade relaciona-se com o número de fótons presentes em um feixe, já a qualidade refere-se a energia presente nos fótons e está relacionada com a sua capacidade de penetração nos objetos (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Assim, a intensidade do feixe de fótons é função da sua qualidade e quantidade. Para entender como a geração das imagens de raios X ocorre é necessário conceituar o termo atenuação. A atenuação consiste na perda gradual de intensidade do feixe de raios X após atravessarem um determinado material (HANNA; KETCHAM, 2017; OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Em outras palavras, a atenuação está associada a redução da intensidade do feixe de raios X, conforme ele atravessa um determinado material (MANOEL et al., 2011). A redução da intensidade é medida por um detector presente no equipamento e é expressa por:

$$I = I^0 \cdot e^{-\mu \cdot x}$$

Onde I é a intensidade medida antes da passagem pelo material analisado, I^0 é a intensidade medida após a passagem pelo material analisado, μ é o coeficiente de atenuação linear e x é a espessura elemento atenuador. Quando os raios X passam pelo objeto a ser analisado, eles são atenuados em intensidades particulares, dependendo das diferenças entre os coeficientes de atenuação linear dos tecidos da amostra (MANOEL et al., 2011; OKUNO; YOSHIMURA, 2010). A densidade dos tecidos e o número atômico dos elementos/composição química que compõem o tecido da amostra são os principais fatores que determinam o grau de absorção dos raios X. Assim, o uso da técnica de raios X para obtenção de imagens internas de objetos baseia-se na absorção diferenciada dos seus fótons por diferentes tecidos do objeto em estudo. O feixe de raios X ao atravessar tecidos mais absorvedores tem menor intensidade ao atingir o filme radiográfico quando comparado ao feixe de fótons que atravessou tecidos menos absorvedores, gerando o contraste observado na imagem produzida no filme radiográfico (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Assim, segundo AICHINGER et al. (2012), os princípios básicos da radiografia são:

- produção dos raios X (i);
- filtragem (ii);
- transmissão do objeto (iii);
- redução da dispersão (iv);
- detecção dos fótons (v);
- reconstrução e processamento das imagens (vi).

A técnica de raios X, apesar de ser amplamente utilizada, tanto na área da saúde como em estudos no ramo das ciências agrárias, apresenta como limitação a geração de imagens bidimensionais (2D); a bidimensionalização das imagens ocorre devido ao fato de todos os planos serem sobrepostos durante a atenuação e formação da imagem.

2.2.2. Microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC)

Assim como a técnica de raios X, a micro-TC permite a obtenção de imagens de objetos de forma não destrutiva (LASSO; VAZ; NAIME, 2008) e utiliza-se dos mesmos princípios da tomografia computadorizada de raios X (TC), com a obtenção de imagens em alta resolução, com resoluções mínimas de 50 microns (STOCK, 2008), favorecendo a visualização de estruturas de materiais pequenos. A microtomografia computadorizada de raios X possui os mesmos princípios de geração de radiação observados na técnica de raios X, fundamentando-se na atenuação de feixes de raios X que, ao atravessar um objeto em análise em diversos ângulos, possibilita a reconstrução da sua estrutura interna (AICHINGER et al., 2012). Dessa forma, os princípios de atenuação observados nos raios X, fundamentais para a formação e geração das imagens, também são aplicados na microtomografia computadorizada de raios X (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Em outras palavras podemos dizer que a micro-TC é baseada na capacidade dos materiais absorverem a radiação, de forma individualizada, conforme sua densidade e composição química (SILVA et al., 1997).

Apesar de possuírem os mesmos princípios básicos de obtenção das imagens, a microtomografia computadorizada de raios X apresenta uma grande vantagem em relação a técnica de raios X: a obtenção de imagens tridimensionais

(3D) (HANNA; KETCHAM, 2017; MANOEL et al., 2011), o que permite observar a localização exata de danos nos tecidos dos materiais em estudo. Para entender como é realizada a obtenção de imagens em três dimensões, primeiramente é necessário conhecer os componentes básicos de um microtomógrafo de raios X e compreender os fundamentos da técnica. O microtomógrafo é composto basicamente por um tubo de raios X, onde será gerada a radiação responsável pela geração das imagens e por um sistema de detecção, que converte os fótons de raios X incidentes em cargas elétricas coletáveis e digitaliza-os depois por um sistema de rotação (LI et al., 2008).

O sistema de detecção dos raios X utilizados atualmente nos microtomógrafos computadorizados consiste em um dispositivo acoplado de carga ou *Charge coupled device* (CCD) acoplado a uma tela de fósforo através de uma lente óptica ou uma fibra óptica. O CCD consiste em um sensor semicondutor para captação de imagens formado por um circuito integrado que contém uma matriz de capacitores acoplados, que também opera na região de comprimento de ondas dos raios X (ZHAO; SAKURAI, 2017). A aquisição de imagens em três dimensões se dá através da movimentação do sistema de tubo de raios X – detector de raios X, denominado de pórtico rotativo ou *rotational gantry* ou da rotação do objeto dentro do microtomógrafo, conhecido como cama rotativa ou *rotational bed* (Figura 1) (LI et al., 2008). No caso das sementes, a aquisição das imagens tridimensionais se dá por meio da rotação do suporte das sementes dentro do microtomógrafo, ou seja, a geometria do escaneamento utilizada é a de cama rotativa (LASSO; VAZ; NAIME, 2008).

Figura 1. Geometria do escaneamento. (a) cama rotativa; (b) pórtico rotativo. Fonte: LI et al., 2008

Para a geração de imagens 3D, o feixe de raios X é atenuado, pelos tecidos, ao longo de seu percurso e a radiação transmitida é detectada. Para gerar uma projeção, a geometria do escaneamento obedece um movimento linear e no caso das sementes, as mesmas são submetidas a um movimento de rotação. Este procedimento é repetido em, no mínimo, 180 projeções, onde as mesmas são recebidas com um incremento rotacional de 1° (AICHINGER et al., 2012). Após a obtenção de uma série de projeções, as mesmas são reconstruídas através de algoritmos de reconstruções por *softwares* específicos, onde os mesmos devem ser instalados em sistemas computacionais potentes e de alta velocidade. Isso se deve pela produção de equações individuais para o coeficiente de atenuação linear de cada elemento e em cada projeção obtida pelo microtomógrafo (MANOEL et al., 2011). O algoritmo de reconstrução mais utilizado pelos *softwares* é o *filtered back-projection* (FBP), onde os dados são primeiramente envolvidos por um filtro e as projeções são agrupadas em uma matriz por conta das suas respectivas posições angulares para construir gradualmente uma imagem de atenuação de raios X. Os sistemas atuais de microtomografia utilizam geralmente o algoritmo *Feldkamp-Davis-*

Kress (FDK), uma extensão da FBP que explica a dispersão 3D dos raios X de uma fonte pontual para um detector 2D (HANNA; KETCHAM, 2017).

Os artefatos de interferência são problemas comuns encontrados na reconstrução das imagens obtidas por micro-TC, mesmo com o aperfeiçoamento dos equipamentos. O artefatos tem origem no sistema de detecção, no processamento computacional do pixels, no mau alinhamento do sistema tubo-detector (MANOEL et al., 2011) e na interação do feixe de raios X com o material (HANNA; KETCHAM, 2017). O sistema de detecção pode ocasionar os artefatos de anéis e em listas, quando os mesmos não forem calibrados com precisão e, ou não forem equivalentes. Assim a projeção para cada anel de dados seria diferente, gerando anéis múltiplos. O mau alinhamento do sistema tubo-detector poderá causar erro no posicionamento dos vetores calculados, gerando os artefatos de borramento das bordas. Erros no processamento computacional dos pixels poderão ocasionar erros na resolução da densidade final dos materiais a serem analisados (MANOEL et al., 2011). A interação do feixe de raios X com o material é conhecida como *beam hardening* e acontece quando os raios X de baixa energia são filtrados preferencialmente à medida que passam por um objeto, assim, "endurecendo" o feixe e aumentando sua energia média (MEGANCK et al., 2009). Os artefatos podem ser corrigidos durante o processo de aquisição da imagem, durante a reconstrução da imagem, por meio dos *softwares* de reconstrução, ou como correções empíricas (KYRIAKOU; PRELL; KALENDER, 2009; MEGANCK et al., 2009; SIJBERS; POSTNOV, 2004).

2.2.3. Imagem por ressonância magnética (IRM)

Para a interpretação correta das imagens obtidas através da ressonância magnética, primeiramente é necessário elucidar conceitos de fisiologia de sementes, principalmente os que dizem respeito ao processo de hidratação das sementes. O processo de absorção de água do substrato pela semente se dá por difusão e capilaridade, movendo-se de uma região de maior para a de menor potencial (WOODSTOCK, 1988).

O processo de captação de água pelas sementes ocorre de forma gradual, com o umedecimento inicial dos tecidos que se encontram mais próximos da camada superficial das sementes. Dessa forma, quando o processo de hidratação

avança em direção ao interior das sementes, é formada o que denominamos de “frente de hidratação” (MARCOS-FILHO, 2015). Ainda segundo Marcos-Filho (2015), ao mesmo tempo em que a “frente de hidratação” se desloca para tecidos mais secos, tecidos já umedecidos aumentam o seu teor de água, elevando assim o potencial hídrico das sementes em hidratação. Dessa forma, casos como o da Figura 2, devem ser interpretados como hidratação das sementes e não como uma anomalia fisiológica presente nos tecidos das mesmas. Os tecidos mais escuros presentes na imagem devem ser interpretados como tecidos não hidratados e, portanto, apresentaram coloração mais escura quando comparados aos tecidos hidratados. A região desidratada apresenta forma homogênea, caracterizando o movimento da água dos tecidos mais próximos da superfície para os tecidos mais internos.

Figura 2. Imagem por ressonância magnética caracterizando o fenômeno de "frente de hidratação".

Assim como as técnicas citadas anteriormente, a imagem por ressonância magnética também é um método não destrutivo, seguro e que permite a identificação de detalhes anatômicos, estruturais e fisiológicos no interior dos materiais. Como acontece na microtomografia computadorizada de raios X, a ressonância magnética é capaz de gerar imagens tridimensionais. A técnica de IRM gera imagens que diferenciam claramente cada tipo de tecido quando seus estados fisiológicos diferem entre si, mesmo que estes tecidos tenham a mesma densidade (MATEUS, 1995).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma propriedade física presente em núcleos de certos elementos químicos que, ao serem expostos a um forte campo

magnético e excitados por radiofrequência, emitem um sinal, que pode ser captado através de uma antena (bobina) e transformado em imagem por meio de um modelo matemático (HAGE; IWASAKI, 2009; MAZZOLA, 2009). Entre os átomos que estão presente na composição dos tecidos de seres vivos, tanto animal quanto vegetal, o hidrogênio é o que está em maior abundância. Este fator, aliado ao fato do hidrogênio apresentar características diferentes de RMN quando presente em tecidos com atividades fisiológicas distintas e ao fato do hidrogênio apresentar maior sensibilidade a RMN, devido ao maior momento magnético do seu próton, é que fazem com que o hidrogênio seja utilizado para a geração de imagens por ressonância magnética (BORISJUK; ROLLETSCHEK; NEUBERGER, 2013; BUSHBERG et al., 2012; MAZZOLA, 2009).

Os prótons, partículas subatômicas com carga elétrica positiva, possuem duas propriedades: o *spin* ou momento angular e o momento magnético. O *spin* consiste no movimento do próton sobre o seu eixo e o momento magnético consiste no comportamento do próton como um ímã (MAZZOLA, 2009). Por conta do seu momento magnético, o próton ao realizar o movimento de *spin*, irá gerar um campo magnético em volta de si mesmo, se comportando como um pequeno magneto ou dipolo magnético (BUSHBERG et al., 2012). O *spin* dos prótons é a fonte do sinal de ressonância magnética, já que um próton em *spin* sempre se comporta como um magneto (HENDRIX, 2003).

Os prótons de hidrogênio presentes nos materiais, em condição ambiente, possuem orientação aleatória, ou seja, os seus vetores magnéticos apontam em todas as direções e, dessa forma, se cancelam, inviabilizando a produção do momento magnético (HAGE; IWASAKI, 2009). Porém, ao posicionar o material em um equipamento externo gerador de um forte campo magnético (B_0), os spins dos prótons de hidrogênio se alinham na direção do campo magnético externo, onde os mesmos poderão se posicionar no sentido do campo magnético ou no sentido contrário. Uma quantidade maior dos prótons, que estão em estado de energia menor, irão se alinhar no sentido do campo magnético externo, ao passo que uma quantidade menor de prótons, em estado de maior energia, irão se posicionar em sentido contrário ao campo magnético. Essa diferença entre o alinhamento dos prótons irá criar a magnetização resultante, peça fundamental e que torna viável a ressonância magnética nuclear (MAZZOLA, 2009).

Associado ao movimento de *spin* dos prótons de hidrogênio, existe um segundo movimento, no qual os prótons estão circundando o eixo do campo magnético externo (eixo longitudinal Z). Este movimento é denominado de precessão e é o mesmo que torna capaz detectar o sinal dos prótons de H^+ na ressonância magnética (HENDRIX, 2003). O movimento de precessão ocorre a uma frequência específica, denominada de frequência de *Larmor*:

$$\omega = \gamma \cdot B_0$$

Onde ω é a frequência de *Larmor*; γ é constante giromagnética, que no caso do hidrogênio é de 42,58 MHz/T; B_0 é o campo magnético externo. Deve-se ressaltar que qualquer alteração no campo magnético irá modificar a frequência de precessão dos prótons. Para que o sinal dos prótons seja captado pela bobina é necessário que haja alteração no campo magnético. Dessa forma, um pulso de radiofrequência, aplicado perpendicularmente ao eixo do campo magnético externo (90°) é emitido pela bobina de corpo e o sinal é detectado pela bobina de local (KÖCKENBERGER et al., 2004) e, no caso das sementes, o sinal pode ser captado pelas bobinas desenvolvidas por Marassi (2015). A aplicação do pulso de radiofrequência faz com que a magnetização seja desviada para o plano transversal, induzindo uma tensão elétrica na bobina (sinal da RM), que será utilizada para a formação das imagens. Segundo Mazzolla (2009), o pulso de radiofrequência causa dois importantes efeitos:

- i. transfere a energia para o vetor de magnetização, deslocando-o para o plano transversal;
- ii. faz com que os núcleos de hidrogênio precessem, momentaneamente, no plano transversal.

A formação da imagem só é possível através da codificação do sinal através de gradientes do campo magnético, realizando a superposição de gradientes de campos magnéticos lineares no campo magnético estático principal (KÖCKENBERGER et al., 2004). Os gradientes utilizados para codificação do sinal são os gradientes de seleção de corte, gradiente de codificação de fase e gradiente de codificação de frequência. No caso do gradiente de seleção de corte, em cada

posição (denominada por Z), a intensidade do campo será igual à intensidade do campo inicial (B_0) com a soma da intensidade do gradiente aplicado em determinada direção do eixo Z. Nos gradientes de codificação de sinal e frequência, o gradiente é aplicado nos eixos X e Y (BUSHBERG et al., 2012).

Em relação ao gradiente de codificação de fase, a ativação do mesmo resulta numa alteração de fase dos *spins*. Já o gradiente de frequência é ativado no momento de leitura do sinal, o que o torna conhecido como gradiente de leitura. Como existe uma variação de frequência de campo provocada pelo gradiente em determinada direção, cada porção de tecido terá uma frequência de precessão diferente. É assim através da frequência de precessão que é localizado espacialmente o sinal que é recolhido.

Por atuarem em direções diferentes, os gradientes de seleção de corte, codificação do sinal e codificação da frequência formam um sistema de matriz, denominado de espaço K (MAZZOLA, 2009). Ainda segundo Mazzola (2009), cada ponto que compõe a matriz corresponde a uma intensidade de sinal (tom de cinza) e a uma posição no tempo, representando a amplitude do sinal recebido pela bobina em determinado instante. A partir dos dados do espaço K, obtém-se a imagem de ressonância magnética, através da aplicação de um algoritmo matemático nos dados do mesmo (HENDRIX, 2003).

Assim, resumidamente, podemos dizer que a imagem por ressonância magnética é uma técnica que, diferente das demais, resulta da interação dos prótons de hidrogênio presentes no material a ser analisado com o campo magnético gerado pelo equipamento (KÖCKENBERGER, 2001; MAZZOLA, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos laboratórios de Análise de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo. Além da realização do experimento na Esalq, outras etapas experimentais foram realizadas na Embrapa Instrumentação e no Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética (CIERMag), do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP), ambos em São Carlos, São Paulo.

A partir de um lote de sementes de soja, cultivar M6410 IPRO, fornecidas pela Embrapa Soja, 32 sementes de soja foram escolhidas. Também a partir de um lote de sementes de milho, híbrido BG7061H, fornecidas pela empresa Pioneer Sementes, foram selecionadas 30 sementes de milho. As sementes foram previamente selecionadas visualmente com o auxílio de uma lupa, sendo selecionadas sementes que não apresentavam danos externos e sementes com diferentes intensidades de danos externos. Após esta etapa, as sementes foram identificadas individualmente e submetidas às análises de raios X, microtomografia computadorizada de raios X e de ressonância magnética. Após a obtenção das imagens, realizou-se o teste de germinação das sementes (BRASIL, 2009). As plântulas normais, anormais e sementes não germinadas (mortas) foram confrontadas com suas respectivas imagens de raios X, de micro-TC e de ressonância magnética.

Após a obtenção das imagens e do resultado dos testes de germinação, realizou-se uma nova seleção de sementes, com base nos dados fornecidos pelas mesmas, com o intuito de destacar os principais danos presentes nas sementes e relacioná-los com os resultados observados nas imagens de raios X, de microtomografia computadorizada de raios X e de ressonância magnética. O menor número de sementes apresentadas neste trabalho possibilitou discutir detalhadamente os resultados e os princípios de cada técnica. Sendo assim, foram utilizadas, no final, imagens de 8 sementes de milho e imagens de 6 sementes de soja.

3.1. Raios X

Para obtenção das imagens radiográficas das sementes foi utilizado o equipamento digital Faxitron, modelo MX-20 DC12, acoplado a um computador Core 2 Duo (3.16 GHz, 2 GB de memória RAM, Hard Disk de 160 GB) e monitor MultiSync (LCD1990SX de 17 polegadas), localizado no Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal da Esalq/USP, em Piracicaba, SP. A tensão do tubo de raios X foi ajustada manualmente, adotando-se 23 kV e o tempo de aquisição das imagens foi ajustado automaticamente.

As sementes, identificadas individualmente, foram fixadas sobre uma folha de acetato transparente (210 x 297 mm) utilizando fita adesiva dupla face, para evitar a movimentação das sementes na folha. As imagens obtidas foram salvas e utilizadas posteriormente para comparação com as outras técnicas de análise de imagens.

3.2. Microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC)

Para a obtenção das imagens utilizou-se o microtomógrafo de raios X, marca SkyScan, modelo 1172, do Laboratório de Técnicas Nucleares da Embrapa Instrumentação Agropecuária/CNPDI, em São Carlos/SP, com as seguintes características técnicas:

- a) tubo de raios X: tensão de 100 kV e corrente de 100 μ A;
- b) câmera digital R-X 12-bit;
- c) três posições automáticas de filtro para seleção de energia;
- d) tamanho pixel detector < 0,8 μ m;
- e) detalhes de detecção < 1 μ m;
- f) resolução espacial de 5 μ m;
- g) comprimento máximo do objeto = 100 cm; e diâmetro máximo = 7 cm

O posicionamento da semente no interior do microtomógrafo foi feito por meio da utilização de um suporte de latão, onde as mesmas foram fixadas nas posições adequadas: as sementes de soja fixadas com a região do hilo voltada para

baixo e as de milho com a região do embrião voltada para cima (GOMES-JUNIOR et al., 2014).

As imagens tomográficas das seções transversais de cada semente foram obtidas em duas etapas: (i) aquisição das imagens e (ii) reconstrução das imagens das seções transversais da semente, a partir das imagens das projeções angulares. Por conta do menor tempo de aquisição da imagem (71 minutos) e resolução adequada para visualização da estrutura interna das sementes, a resolução adotada foi de 2000 x 1048 pixels (modo 2k). Os parâmetros para aquisição das imagens utilizados foram:

- a) ângulo total de rotação: 180 graus;
- b) passo angular: 0,2 graus;
- c) quantidade de quadros (frames): 5.

No caso do processamento e reconstrução das imagens, foi utilizado o *software* de reconstrução NRecon. Os parâmetros definidos e utilizados na reconstrução das imagens das sementes foram:

- a) correção de artefato de anel: 20;
- b) filtros para redução de ruídos (*smoothing*): 2;
- c) correção de *beam hardening*: 70% para sementes de soja e 60% para sementes de milho.

3.3. Imagem por Ressonância Magnética (IRM)

Para obtenção das imagens foi necessário hidratar as sementes já que, como descrito na revisão bibliográfica, a obtenção das imagens é feita por meio do sinal captado do hidrogênio, presente nas moléculas de água e de outros componentes. Portanto as sementes de milho foram hidratadas por 5 horas, enquanto as sementes de soja foram hidratadas por 3 horas. As imagens foram obtidas por meio de sequências de pulsos com tempos ao eco bastante curtos (*Ultrashort echo time*) utilizando o equipamento Varian®, modelo Inova, com campo magnético de 2T, que opera na frequência de 85 MHz para núcleos de hidrogênio, do Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética – CIERMag do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP), em São Carlos, SP.

Para a aquisição das imagens por ressonância magnética utilizou-se bobinas do tipo solenoides, projetadas e desenvolvidas no CIERMag/IFSC/USP especificamente para sementes de milho e soja (MARASSI, 2015). As bobinas foram projetadas para que melhor atendessem as dimensões das sementes, diminuindo a distância entre a bobina e a semente, um menor tempo de aquisição da imagem, um ganho na relação sinal e ruído (RSR) e uma melhoria na qualidade das imagens obtidas (MARASSI, 2015). As imagens obtidas foram salvas e utilizadas posteriormente para comparação com as outras técnicas de análise de imagens.

A aquisição das imagens por ressonância magnética foi realizada por meio dos seguintes parâmetros:

- a) tempo ao eco: 3,3 ms;
- b) tempo de repetição: 100 ms;
- c) número de médias estabelecidas: 8;
- d) *field of view* (campo de visão): 12x12x8 mm³

Além desses parâmetros, o tempo de aquisição de cada imagem foi de 20 minutos. A matriz utilizada foi 96 x 96 x 16 e a resolução do equipamento de 125 x 125 x 500 µm³.

3.4. Avaliação dos danos presentes nas sementes

As injúrias observadas nas imagens obtidas por raios X, micro-TC e IRM das sementes foram atribuídas notas seguindo a classificação feita para sementes de milho por Cicero et al. (1998) e modificado para soja por Obando-Flor et al. (2004), apresentadas nas Tabelas 1 e 2. Dessa forma, as possíveis notações foram 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 3.3, 3.1, 3.2 e 3.3, correspondendo o primeiro e o segundo número de cada notação, ao embrião e ao endosperma, respectivamente, para sementes de milho e eixo embrionário e cotilédones para as sementes de soja.

Tabela 1. Critérios utilizados para a caracterização das notas (a,b) em função das injúrias observadas no eixo embrionário e nos cotilédones da semente de soja ‘M6410 IPRO’ Monsoy® por meio das imagens de raios X.

Nota	Eixo embrionário (a)	Cotilédones (b)
1	Ausência de Injúrias	Ausência de Injúrias
2	Injúrias não severas	Injúrias não severas
3	Injúrias severas	Injúrias severas

Tabela 2. Critérios utilizados para a caracterização das notas (a,b) em função das injúrias observadas no embrião e no endosperma da semente de milho ‘BG7061H’ Bio Gene® por meio das imagens de raios X.

Nota	Embrião (a)	Endosperma (b)
1	Ausência de Injúrias	Ausência de Injúrias
2	Injúrias no escutelo em local diferente da região central (injúrias não severas)	Pequenas injúrias que não provoquem perda de parte do endosperma (injúrias não severas)
3	Injúrias na plúmula, no coleóptilo, na região central do escutelo, na radícula ou na região das raízes seminais (injúrias severas)	Injúrias resultantes na perda de parte do endosperma (injúrias severas)

3.5. Germinação das sementes

Para realização do teste de germinação, as sementes foram distribuídas sobre papel toalha para germinação, previamente umedecidos com água na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel (Brasil, 2009). As sementes, identificadas individualmente, foram distribuídas no terço superior do papel para permitir o desenvolvimento individualizado das plântulas. Os rolos foram mantidos em germinador, a 25°C. A avaliação foi efetuada no sétimo dia após a instalação do teste.

As plântulas normais, anormais ou sementes não germinadas (mortas) foram fotografadas por uma câmera fotográfica digital acoplada a um computador. Anteriormente à instalação dos testes de germinação imagens das sementes de soja e milho (face ventral e dorsal) foram obtidas com o intuito de registrar a condição externa das sementes utilizadas. As imagens obtidas foram identificadas e salvas no

disco rígido do computador e, posteriormente, comparadas com as imagens obtidas por raios X, micro-TC e ressonância magnética.

3.6. Análise das imagens

A análise das imagens obtidas foi realizada mediante o confronto das imagens de raios X, de micro-TC e de ressonância magnética com as respectivas plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas (mortas).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de soja e de milho utilizadas na pesquisa apresentavam teor de água de 9,1 % e 9,6 %, respectivamente. Os referidos valores foram adequados para a obtenção das imagens de raios X e de microtomografia de raios X. Por outro lado, para obtenção das imagens por ressonância magnética foi necessário aumentar o teor de água das sementes para 16 a 17%; tal procedimento foi necessário para possibilitar a melhoria da relação sinal/ruído.

4.1. Sementes de soja

Na Tabela 3, encontram-se os valores referentes à intensidade de danos presentes nas 32 sementes, detectados pelos testes de raios X, de microtomografia computadorizada de raios X e de imagem por ressonância magnética. Para grande parte das sementes, observou-se presença de danos, sejam eles não severos ou severos (notas 2 e 3, respectivamente), principalmente nos cotilédones das sementes. No eixo embrionário a presença de danos foi baixa e, quando presentes, foram classificadas como severas (nota 3).

Por meio da análise visual da semente de soja número 8, verificou-se que a mesma apresentava aspecto esverdeado, decorrente da degradação parcial da clorofila presente na semente; como se sabe, sementes esverdeadas de soja são de baixa qualidade. Além disso, na análise visual da referida semente constatou-se a presença de danos por umidade. Ao se obter a imagem radiográfica da semente (Figura 3a), observou-se o enrugamento dos cotilédones, efeito do dano por umidade, por toda a extensão da região oposta ao hilo e também na região do eixo embrionário (setas), sendo atribuída classificação de dano severo para ambos (nota 3). A mesma situação foi observada na imagem obtida na microtomografia computadorizada de raios X (Figura 3b), onde também detectou-se o dano por umidade presente por toda a extensão da região oposta ao hilo, além da presença de danos sobre o eixo embrionário. Os resultados obtidos para imagens de raios X confirmam os resultados de pesquisa com sementes de soja, relacionando a presença de danos por umidade e reflexos negativos para a germinação das sementes (FORTI; CICERO; PINTO, 2009; PINTO; CICERO; FORTI, 2007).

Em relação às imagens por ressonância magnética da semente 8 (Figura 3c), não foi possível observar, com nitidez, o dano por umidade, caracterizado pelo enrugamento dos cotilédones na região oposta ao hilo, mas foi visualizado deterioração de tecidos dos cotilédones da semente (setas).

Por fim, ao final do teste de germinação da semente 8, observou-se que a semente deu origem a uma plântula anormal (Figura 3d), apresentando crescimento reduzido da raiz primária e não houve crescimento da sua parte aérea. Sendo assim, a ocorrência de dano por umidade severo na semente 18 esteve associada aos efeitos negativos na germinação da mesma.

Em relação às técnicas de análise de imagens, pode-se afirmar que a técnica de raios X se mostrou tão eficiente quanto à técnica de micro-TC. Por outro lado, apesar da técnica de IRM não proporcionar a visualização nítida do dano por umidade, foi possível observar danos por deterioração dos tecidos, os quais não foram detectados pelas outras duas técnicas utilizadas.

Figura 3. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b) e de IRM (c) da semente de soja número 8 e respectiva plântula anormal (d).

Tabela 3. Notas atribuídas aos níveis de danos observados no eixo embrionário e nos cotilédones das sementes de soja por meio de imagens de raios X, de microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC) e imagem por ressonância magnética (IRM).

Semente	Raios X		Micro-TC		IRM	
	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones	Eixo	Cotilédones
1	1*	1	1	1	1	2
2	1	2	1	2	1	3
3	1	2	1	2	1	2
4	1	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	3
6	1	1	1	1	1	1
7	1	3	1	3	1	3
8	3	3	3	3	1	2
9	1	3	1	3	1	3
10	1	3	1	3	1	3
11	1	2	1	2	1	1
12	1	3	1	3	1	3
13	1	2	1	2	1	2
14	1	2	1	2	1	2
15	3	3	3	3	3	3
16	1	2	1	2	1	2
17	1	3	1	3	1	3
18	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	3
20	3	3	3	3	3	3
21	1	1	1	1	1	3
22	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	2	1	3
24	1	1	1	1	1	2
25	1	2	1	2	1	2
26	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	3
28	1	2	1	2	1	2
29	1	2	3	2	2	3
30	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1

*: 1 = dano não observado; 2 = dano não severo; 3 = dano severo.

Ao analisar a imagem radiográfica da semente 14 (Figura 4a), observa-se que o dano causado por percevejo estava localizado na região dos cotilédones bem afastado do eixo embrionário e, por conta disso, o mesmo foi avaliado como dano não severo (nota 2), já que sua presença não prejudicaria a translocação das reservas para o eixo embrionário. Ao verificar as imagens obtidas por micro-TC é possível observar que no plano transaxial na seção em que se encontra o eixo embrionário (Figura 4b) não há incidência do dano causado por percevejo.

Analisando o plano coronal da semente (Figura 4c), verifica-se a presença do referido dano no cotilédone esquerdo, na região oposta ao eixo embrionário.

Na imagem obtida por meio da ressonância magnética na semente 14 é possível observar a lesão ocasionada pelo percevejo nos cotilédones (Figura 4d). O dano nos cotilédones localizado na região oposta ao eixo embrionário não se refletiu em efeitos negativos no processo de germinação da semente, resultando em uma plântula normal (Figura 4e).

Como se pode observar, no caso da semente de soja número 14, as três técnicas de análise de imagens foram eficientes na avaliação do dano causado por percevejo.

Figura 4. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c) e de IRM (d) da semente de soja número 14 e respectiva plântula normal (e).

Por meio da obtenção de imagens de raios X da semente de soja número 15 (Figura 5a) foi possível observar a presença de danos severos presentes tanto no eixo embrionário como nos cotilédones (nota 3), decorrentes de impactos mecânicos e de ataques de percevejos. O dano mecânico observado no eixo embrionário está localizado na base da plúmula, desconectando-a do eixo hipocótilo-radícula. No caso dos danos ocasionados por percevejos, os mesmos encontram-se distribuídos

por toda a extensão dos cotilédones. Quando se analisa as imagens obtidas por micro-TC (Figura 5b) observa-se com maior nitidez o dano mecânico na base da plúmula e os danos causados por percevejos nos cotilédones. O mesmo acontece nas imagens de ressonância magnética (Figura 5c), onde os danos por percevejo estão distribuídos por toda extensão dos cotilédones e o dano mecânico presente na base da plúmula.

O dano mecânico localizado na base da plúmula e os danos causados por percevejos foram severos e ocasionaram a morte da semente 15 (Figura 5d). Resultados similares, utilizando-se raios X, foram observados em soja por Pinto et al. (2009) e também, em feijão por Forti; Cicero; Pinto (2008).

Tal como ocorrido para a semente de soja número 14, também na semente número 15 pode-se considerar que as três técnicas foram eficientes na avaliação dos danos mecânicos e causados por percevejos, resultando na morte da semente número 15.

Figura 5. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b) e de IRM (c) da semente de soja número 15 e a respectiva semente morta (d).

Ao se analisar a imagem radiográfica da semente 20 (Figura 6a), observa-se a presença de danos mecânicos no eixo embrionário e nos cotilédones da semente, sendo classificados como severos (nota 3). Em relação ao dano presente no eixo embrionário, verifica-se que o mesmo atingiu o hipocótilo, desconectando a porção hipocótilo-radícula da porção hipocótilo-plúmula. Já as injúrias mecânicas observadas nos cotilédones estão presentes próximo à região vascular da semente, o que pode levar a menor translocação de substâncias de reserva dos cotilédones para o eixo embrionário. Por meio das imagens de microtomografia computadorizada de raios X (Figuras 6b e 6c) é possível observar os danos mecânicos severos (nota 3) no hipocótilo e nos cotilédones. Ao verificar o plano coronal da semente é possível observar, de fato, que os danos mecânicos estão presentes em ambos os cotilédones.

A mesma situação foi observada na imagem por ressonância magnética da semente 20 (Figura 6d), onde verifica-se os danos mecânicos severos no hipocótilo e os danos mecânicos presentes nos cotilédones. Os danos mecânicos localizados no hipocótilo e nos cotilédones foram severos e ocasionaram a morte da semente (Figura 6e). Tal como ocorrido nos casos anteriores, as três técnicas utilizadas foram eficientes na avaliação dos danos observados na semente número 20; entretanto, é importante destacar que na micro-TC os danos podem ser observado com maior nitidez em toda a extensão da semente.

Figura 6. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c) e de IRM (d) da semente de soja número 20 e a respectiva semente morta (e).

Ao se analisar visualmente a área externa da semente 24 (Figura 7a) foi possível observar a presença da doença mancha púrpura (seta), causada pelo fungo *Cercospora kikuchii*, o qual reduz a qualidade da semente (KIMATI et al., 2006) . Por meio da imagem obtida por raios X (Figura 7b) não foi possível indentificar injúrias presentes no interior da semente (nota 1). Ao se analisar a imagem obtida por microtomografia computadorizada de raios X (Figura 7c), também não possível indentificar injúrias internas na semente (nota 1).

Em relação às imagens obtidas por ressonância magnética da semente 24 (Figura 7d e 7e), é possível observar manchas escuras (setas) na região dos cotilédones sendo, provavelmente, relacionadas à deterioração dos tecidos causada pelo fungo *Cercospora kikuchii* (nota 2). Dessa forma, pode-se concluir que o ataque do fungo sobre a semente de soja reduziu a sua qualidade e impediu o seu desenvolvimento normal, já que a mesma deu origem a uma plântula anormal (Figura 7f).

No caso da semente de soja número 24, apenas a imagem por ressonância magnética foi capaz de detectar o dano por deterioração de tecidos, o qual resultou na ocorrência de uma plântula anormal.

Figura 7. Imagem externa da semente (a) e imagens radiográfica (b), de micro-TC (c) e de IRM (d,e) da semente de soja número 24 e a respectiva plântula anormal (f).

Ao realizar uma análise visual externa da semente 31 verificou-se a ausência de qualquer tipo de injúria sobre a semente. A imagem radiográfica da semente 31 (Figura 8a) não apresentou qualquer tipo de dano na estrutura da semente. Ao se analisar a imagem de microtomografia computadorizada de raios X (Figura 8b), também não foi observado injúrias presentes na semente. O mesmo padrão continua na imagem por ressonância magnética (Figura 8c), onde não foi indentificado nenhum tipo de injúrias nos cotilédones e no eixo embrionário. Sendo assim, por estar em condições físicas, sanitárias e fisiológicas adequadas, a semente deu origem a uma plântula normal (Figura 8d).

Figura 8. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b) e de IRM (c) da semente de soja número 31 e a respectiva plântula normal (d).

Por meio da análise das imagens das sementes de soja obtidas pelas diferentes técnicas, pode-se afirmar que, na maioria dos casos, para identificação de danos presentes na sementes, a técnica de raios X se mostrou tão eficiente quanto as técnicas de microtomografia computadorizada de raios X e de imagem por ressonância magnética para identificação de danos presentes na semente e a sua relação com o desempenho das mesmas. Desse modo, pode-se afirmar que a

técnica de raios X pode ser usada, com eficiência, para avaliação da morfologia interna das sementes de soja e a sua relação com o potencial fisiológico das sementes, já que o tempo de aquisição é relativamente menor e a acessibilidade ao equipamento é mais fácil, quando comparada com as técnicas de microtomografia computadorizada de raios X e imagem por ressonância magnética.

4.2. Sementes de milho

Na Tabela 4, encontram-se os valores referentes à intensidade de danos presentes nas 30 sementes selecionadas, detectados pelos testes de raios X, de microtomografia computadorizada de raios X e de imagem por ressonância magnética. Observou-se diferenças nas notas, principalmente quando comparou-se as notas dadas as imagens radiográficas com as imagens obtidas por meio das técnicas de micro-TC e IRM. Esse fato se deve por conta da diferença na forma de aquisição das imagens, onde as imagens adquiridas por meio de raios X são bidimensionais (2D) e as imagens geradas por meio de micro-TC e IRM são tridimensionais (3D), permitindo observar a localização exata do dano presente na semente e por conta da morfologia da sementes de milho.

Na semente 3, através da imagem obtida por meio da técnica de raios X (Figura 9a), verificou-se a presença de uma trinca (dano mecânico) longitudinal, atingindo o endosperma e o embrião da semente, sendo classificado como um dano severo (nota 3). Ao analisar a imagem de micro-TC (Figura 9b) foi possível observar, além da trinca longitudinal, a presença de uma trinca horizontal no lado direito da semente (seta), onde as duas foram classificadas como não severas (nota 2). Em relação ao eixo embrionário, na imagem obtida por micro-TC fica nítido que o mesmo não sofreu qualquer tipo de dano (nota 1).

Assim como na imagem de micro-TC (Figura 9c), a imagem por ressonância magnética não apontou nenhum dano incidente sobre o eixo embrionário da semente 3. Porém, ao observar o endosperma da mesma, por conta do teor de água presente na semente, mesmo após o período de hidratação, não foi possível analisá-lo com nitidez, observando apenas um trinca no endosperma. Como os danos indidentes no endosperma da semente foram classificados como não severos e pela ausência de danos no eixo embrionário, visualizados pela micro-TC, a semente deu origem a uma plântula normal (Figura 9d).

Desta forma, no presente caso, a técnica de micro-TC foi indispensável para avaliar, com precisão, o efeito dos danos mecânicos ocorridos no interior da semente, o que não ocorreu com a imagem de raios X.

Tabela 4. Notas atribuídas aos níveis de danos observados no embrião e no endosperma das sementes de milho através de imagens de raios X, de microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC) e imagem por ressonância magnética (IRM).

Semente	Raios X		Micro-TC		IRM	
	Embrião	Endosperma	Embrião	Endosperma	Embrião	Endosperma
1	3	2	1	2	1	1
2	3	2	1	2	1	1
3	3	2	1	2	1	2
4	3	3	1	3	1	3
5	3	3	1	2	1	2
6	3	2	1	1	1	2
7	3	3	1	2	2	2
8	3	2	2	2	2	2
9	3	3	2	3	2	3
10	3	3	1	3	1	3
11	3	3	3	3	3	3
12	3	2	1	2	1	2
13	3	2	2	2	2	2
14	3	3	3	3	2	3
15	2	3	1	2	1	2
16	3	2	3	2	3	2
17	3	3	3	3	3	3
18	3	3	1	3	1	3
19	3	3	2	3	2	3
20	3	3	3	3	3	3
21	1	2	1	2	1	2
22	1	2	1	1	1	1
23	1	2	1	2	1	2
24	3	3	3	2	3	2
25	3	2	2	2	2	2
26	3	3	3	3	3	3
27	3	2	1	2	1	2
28	2	2	1	1	1	1
29	3	2	1	2	1	2
30	1	1	1	1	1	1

*: 1 = dano não observado; 2 = dano não severo; 3 = dano severo.

Figura 9. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b) e de IRM (c) da semente de milho número 3 e a respectiva plântula normal (d).

Os danos mecânicos presentes no endosperma (setas) e danos por pragas de armazenamento na região do escutelo (área circulada) foram observados por meio da técnica de raios X aplicada na semente 7 (Figura 10a), sendo classificados como danos severos (nota 3). Os danos ficam mais nítidos ao observar as imagens geradas por meio da microtomografia computadorizada de raios X, onde na seção coronal da semente (Figura 10b) é possível verificar a presença de uma trinca por toda a extensão do endosperma chegando próxima ao escutelo (seta). Na seção sagital da semente (Figura 10c), observou-se um trinca longitudinal na região esquerda ao embrião (seta), além da presença de danos ocasionados por pragas de armazenamento na região inferior da semente próximo à base do escutelo e em alguns pontos do escutelo (área circulada). Mais danos mecânicos foram observados na seção transaxial das sementes (setas) (Figura 10d), além de danos que ocasionaram ruptura parcial da conexão entre embrião e endosperma (área circulada).

Por meio da imagem por ressonância magnética da semente é possível observar danos no embrião, como dano mecânico incidindo sobre uma pequena porção do escutelo (seta) (Figura 10e). Também foi possível verificar a galeria aberta pelas pragas de armazenamento, devido a diferença de densidade nos tecidos da

semente (área circulada) (Figura 10f). Por fim, devido aos danos presentes no endosperma, a transferência de substâncias de reserva foi debilitada, resultando assim em uma plântula anormal (Figura 10g), onde a raiz primária não se desenvolveu e a plúmula apresentou crescimento reduzido.

No caso da semente de milho número 7, pode-se afirmar que tanto a técnica de raios X como a de micro-TC foram eficientes na avaliação dos danos internos observados.

Figura 10. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c,d) e de IRM (e,f) da semente de milho número 7 e a respectiva plântula anormal (g).

A semente 8 foi escolhida para análise por apresentar ausência de parte do tecido endospermático, como pode ser observado por meio da imagem radiográfica da semente (Figura 11a). Também foi possível observar na imagem radiográfica injúrias mecânicas que atingiram o endosperma e o embrião (setas), sendo caracterizados como severos (nota 3). Na seção sagital da imagem de micro-TC (Figura 11b) é possível verificar a ausência de parte do endosperma, além de danos presentes no escutelo da semente (área circulada), sendo classificado como não

severos (nota 2). Na imagem da seção transaxial (Figura 11c) verifica-se a presença da trinca observada na imagem radiográfica (seta), mas também observa-se outra trinca presente no endosperma que não foi identificada por meio da utilização da técnica de raios X (seta). Por meio da imagem de ressonância magnética (Figura 11d) observa-se, com pouca nitidez, a ausência de parte do endosperma e danos no escutelo. A ruptura do tecido endospermático associado aos danos no escutelo, verificados na micro-TC, interferiu na translocação de nutrientes do endosperma para o eixo embrionário, afetando, principalmente, o desenvolvimento do sistema radicular, resultando em uma plântula anormal (Figura 11e).

Neste caso, as imagens de micro-TC proporcionaram melhor visualização dos danos mecânicos e ajudaram a esclarecer o fato da parte aérea não ter sido afetada e também o prejuízo causado ao sistema radicular, principalmente na raiz primária (ausente).

Figura 11. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c) e de IRM (d) da semente de milho 8 e a respectiva plântula anormal (e).

Na imagem radiográfica da semente 9 (Figura 12a) foi possível observar a ausência de parte do tecido endospermático da semente (área circulada), além de danos mecânicos incidindo no endosperma (setas), escutelo e na região do eixo embrionário. Analisando as imagens de micro-TC, observou-se na seção coronal danos mecânicos indicindo somente no endosperma (setas) (Figura 12b). Também foi possível observar por meio da micro-TC, na seção sagital da semente, a ausência de parte do endosperma da semente (área circulada), além da ausência de parte do tecido abaixo do embrião da semente (seta) (Figura 12c).

A imagem de ressonância magnética não permitiu a visualização dos danos com nitidez, sendo possível observar somente a ausência de parte do endosperma

(área circulada) (Figura 12d). A ruptura do tecido endospermático associada a presença de danos mecânicos no mesmo refletiu em uma quantidade menor de reservas para o crescimento do embrião mas, diferente da semente 8, resultou no desenvolvimento de plântula normal, com tamanho reduzido quando comparada com as outras plântulas normais obtidas nesta pesquisa (Figura 12e).

No caso da semente número 9, observa-se que as imagens de micro-TC foram importante para esclarecer o razão dos danos mecânicos não terem inviabilizado a germinação, ao contrário do que indicava a imagem de raios X.

Figura 12. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c) e de IRM (d) da semente de milho número 9 e a respectiva plântula normal (e).

Ao analisar a imagem radiográfica da semente 13 (Figura 13a) observa-se a perda de parte do endosperma na região inferior esquerda da semente (seta), além de uma trinca longitudinal que atingiu o endosperma e a plúmula (seta), sendo caracterizada como um dano severo (nota 3). Na imagem da seção coronal da semente (Figura 13b), obtida por meio da micromotografia computadorizada de raios X, observa-se com nitidez que a trinca atinge parte do endosperma (seta), mas a plúmula permanece intacta. Além disso, uma pequena cavidade abaixo do escutelo foi detectada (área circulada). Na seção sagital da semente (Figura 13c) fica claro que a região do eixo embrionário está intacta.

A mesma situação é verificada na imagem de ressonância magnética da semente 13 (Figura 13d), onde o embrião da semente permanece intacto e a

ausência de parte do tecido endospermático é observada (seta). Os danos presentes no endosperma, verificados com nitidez na imagem de micro-TC, foram avaliados como não severos (nota 2) e, por conta disso, permitiram o desenvolvimento normal das partes essenciais do embrião, que deram origem a uma plântula normal (Figura 13e).

Assim, no caso da semente da semente de número 13, novamente as imagens de micro-TC foram necessárias para esclarecer a ocorrência de plântula normal.

Figura 13. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c) e de IRM (d) da semente de milho número 13 e a respectiva plântula normal (e).

Por meio da imagem radiográfica da semente 14 (Figura 14a) foi possível observar a presença de trincas verticais e horizontais (setas) por toda a extensão do endosperma da semente, as quais também atingiram o embrião, sendo classificadas como severas (nota 3). Nas imagens de micro-TC é possível observar as trincas incidentes no endosperma da semente, mas também é possível observar outros tipos de danos na semente, como deterioração dos tecidos do eixo embrionário (seta) e a presença de cavidades na semente. Na imagem da seção coronal (Figura 14b) foi possível observar os danos mecânicos no endosperma (seta) e a

deterioração dos tecidos do eixo embrionário (área circulada). Na seção sagital foi possível observar a extensão do dano mecânico na região da semente onde é possível observar o embrião (Figura 14c). Na seção transaxial da semente (Figura 14d) também foi possível observar, com maior nitidez, as trincas no endosperma e sua extensão, além da cavidade presente no interior da semente.

As imagens obtidas por meio da ressonância magnética (Figuras 14e e 14f) permitiram a visualização dos danos mecânicos presentes na semente e da cavidade no interior da semente (setas), mas não permitiram a identificação dos danos no eixo embrionário. Por fim, observou-se ao final do teste de germinação, por conta dos danos severos no endosperma e por conta da deterioração dos tecidos do eixo embrionário, uma plântula anormal apresentando apenas raízes seminais (Figura 14g).

No caso da semente número 14, a imagem radiográfica seria suficiente para avaliar, com segurança, os efeitos dos danos mecânicos ocorridos internamente na semente.

Figura 14. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c,d) e de IRM (e,f) da semente de milho número 14 e a respectiva plântula anormal (g).

A imagem radiográfica da semente 20 (Figura 15a) mostrou uma série de injúrias na semente (setas), presentes no endosperma e também no embrião, além de um trinca longitudinal incidindo sobre o endosperma e o embrião da semente, sendo classificados como danos severos (nota 3). As imagens obtidas por meio da micro-TC (Figura 15b e 15c) permitiram a visualização com maior nitidez das injúrias (setas), estando presentes no endosperma, no escutelo e, também, no eixo embrionário da semente, mantendo a classificação de danos severos.

O mesmo padrão foi observado na imagem obtida por ressonância magnética da semente 20 (Figura 15d), onde as injúrias foram observadas no endosperma e no embrião da semente (setas). Por fim, ao final do teste de germinação, observou-se que as injúrias impediram o desenvolvimento das partes essenciais do embrião, resultando na morte da semente (Figura 15e).

No caso da semente número 20, também a imagem de raios X seria suficiente para avaliar, com segurança, as implicações dos danos observados no interior da semente.

Figura 15. Imagens radiográfica (a), de micro-TC (b,c) e de IRM (d) da semente de milho número 20 e a respectiva semente morta (e).

Diferente das demais sementes de milho apresentadas, a semente 30 não apresentou nenhum tipo de injúria. A ausência de danos na semente pode ser observada por meio da imagem radiográfica da semente (Figura 16a). Na imagem obtida por meio de microtomografia computadorizada de raios X também constatou-se a ausência de danos no endosperma, no escutelo e no eixo embrionário da semente (Figura 16b). O mesmo padrão observado nas figuras 16a e 16b pode ser verificado na imagem obtida por meio de ressonância magnética (Figura 16c), onde foi constatado a ausência de danos estrutura da semente. Por não haver qualquer tipo de dano sobre a semente, a mesma pode completar o processo de germinação, dando origem a uma plântula normal (Figura 16d).

No caso da semente número 30, a imagem de raios X também seria suficiente para avaliar, com segurança, a morfologia interna da semente.

Figura 16. Imagens radiográficas (a), de micro-TC (b) e de IRM (c) da semente de milho 30 e a respectiva plântula normal (d).

De maneira geral, pode-se constatar que, em sementes de milho, pode haver necessidade de utilização da técnica de micro-TC para comprovação de eventuais danos internos estarem afetando as partes vitais que poderiam comprometer a germinação das sementes.

Por outro lado, pode-se afirmar que a técnica de IRM não permitiu a visualização, com nitidez adequada, dos danos presentes nas sementes de milho sendo necessários estudos mais aprofundados para o desenvolvimento de protocolos específicos de aquisição de imagem pela referida técnica.

5. CONCLUSÕES

Para sementes de soja, a técnica de raios X se mostrou tão eficiente quando as técnicas de microtomografia de raios X e imagem por ressonância magnética para avaliação da morfologia interna das sementes.

Por outro lado, para as sementes de milho, pode haver necessidade da utilização de técnicas envolvendo imagens tridimensionais, como a de microtomografia de raios X e imagem por ressonância magnética, para avaliar com maior precisão a morfologia interna das sementes.

REFERÊNCIAS

- AICHINGER, H. et al. Principles of X-Ray Imaging. In: **Radiation Exposure and Image Quality in X-Ray Diagnostic Radiology: Physical Principles and Clinical Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 3–7.
- ANDRADE, R. V. DE; BORBA, C. S. Fatores que afetam a qualidade das sementes. In: **Tecnologia para produção de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1993. p. 7–9.
- BINO, R. J.; AARTSE, J. W.; VAN DER BURG, W. J. Non-destructive X-ray analysis of Arabidopsis embryo mutants. **Seed Science Research**, v. 3, n. 3, 19 set. 1993.
- BISCEGLI, C. I. .; FRANCO, R. W. DE A. TANNUS, A. .; COLNAGO, L. A. Use of magnetic resonance and spectroscopy in tropical fruits: challenges and opportunities. In: RUVINEL, P. E. .; COLNAGO, L. A. (Eds.). . **Advances in agricultural tomography**. 1. ed. São Carlos: EMBRAPA Instrumentação Agrícola, 2000. p. 77–78.
- BORBA, C. S. et al. Efeito da debulha mecânica na qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 68–70, 1994.
- BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H.; NEUBERGER, T. Nuclear magnetic resonance imaging of lipid in living plants. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 465–487, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009.
- BUSHBERG, J. . et al. **The Essential Physics of Medical Imaging**. 3rd. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- CARVALHO, N. M. DE; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 5. ed. Jaboticabal: Funep, 2012.
- CICERO, S. M. et al. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 603–611, 1998.
- CICERO, S. M.; BANZATO JUNIOR, H. L. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 29–36, 2003.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas de grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em: 10 jul. 2017.
- COPELAND, L. O. How seed damage affects germination. **Crops & Soil Magazine**, v. 24, n. 9, p. 9–22, 1972.

ELLIS, R. H. Seed and seedling vigour in relation to crop growth and yield. **Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 249–255, 1992.

FAST SEEFELDT, H. et al. Water mobility in the endosperm of high beta-glucan barley mutants as studied by nuclear magnetic resonance imaging. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 25, n. 3, p. 425–432, 2007.

FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos e causados por percevejos em semente de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 121–130, 2008.

FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Avaliação da evolução de danos por “umidade” e redução do vigor em sementes de soja, cultivar TMG113-RR, durante o armazenamento, utilizando imagens de raios x e testes de potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 123–133, 2009.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. DA. O teste de tetrazólio em sementes de soja. **Documentos**, n. 116, p. 72, 1998.

FRANÇA-NETO, J. DE B.; HENNING, A. A. Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja. **Circular Técnica**, n. 9, p. 5–24, 1984.

GODOY, C. V. et al. Doenças da Soja. p. 32, 2014.

GOMES-JUNIOR, F. G. et al. **Procedimentos para avaliação da estrutura de sementes de soja e milho por Microtomografia computadorizada de Raios X**. Anais do SIAGRO: ciência, inovação e mercado 2014. **Anais...**São Carlos: 2014

GOMES JUNIOR, F. G.; CICERO, S. M. X-Ray analysis to assess mechanical damage in sweet corn seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 78–85, 2012.

HAGE, M. C. F. N. S.; IWASAKI, M. Imagem por ressonância magnética : princípios básicos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1287–1295, 2009.

HANNA, R. D.; KETCHAM, R. A. X-ray computed tomography of planetary materials: A primer and review of recent studies. **Chemie der Erde - Geochemistry**, p. 1–26, 2017.

HENDRIX, A. **Magnets, Spins, and Resonances - An introduction to the basics of Magnetic Resonance**. 1. ed. [s.l.] Siemens Medical Solutions, 2003.

INTERNATIONAL SEED TEST ASSOCIATION (ISTA). **International rules for testing seed**. Zurich: ISTA, 2017.

JUSSIANI, E. I.; JOSÉ DOS REIS, P.; APPOLONI, C. R. Determining chemical composition of materials through micro-CT images. **Micron**, v. 89, p. 9–15, 2016.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia Vol. 2**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2006.

KÖCKENBERGER, W. Functional imaging of plants by magnetic resonance experiments. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 7, p. 286–292, 2001.

KÖCKENBERGER, W. et al. High resolution NMR microscopy of plants and fungi. **Journal of Microscopy**, v. 214, n. 2, p. 182–189, 2004.

KRZYZANOWSKI, F. C. **Desafios tecnologicos para produção de sementes de soja na região tropical**. WORLD RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3. **Anais...**Foz do Iguaçu: EMPRABA Soja, 2004

KYRIAKOU, Y.; PRELL, D.; KALENDER, W. A. Ring artifact correction for high-resolution micro CT. **Physics in Medicine and Biology**, v. 54, n. 17, p. N385–N391, 2009.

LASSO, P. R. O.; VAZ, C. M. P.; NAIME, J. DE M. Recomendações para utilização do microtomógrafo de raios-X Sky Scan 1172 em ciências agrárias e biológicas. **Documentos**, n. 37, p. 22, 2008.

LI, H. et al. Micro-computed tomography for small animal imaging: Technological details. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 513–521, 2008.

LORINI, I. et al. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2015.

MANOEL, J. et al. A microtomografia computadorizada de raios x integrada à petrografia no estudo tridimensional de porosidade em rochas. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 41, n. 3, p. 498–508, 2011.

MARASSI, A. G. **Aplicação da imagem por Ressonância Magnética para avaliação de injúrias mecânicas e tecidos deteriorados em sementes**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

MARCOS-FILHO, J. **Qualidade fisiológica e maturação de sementes de soja (Glycine max (L.) Merrill)**. [s.l.] -Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1979.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015.

MARTIN, T. N. et al. Questões relevantes na produção de sementes de milho - primeira parte. **Uruguiana**, v. 14, n. 1, p. 119–138, 2007.

MATEUS, J. . **Desenvolvimento de um tomógrafo de ressonância magnética: integração e otimização**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 1995.

MATTIUZ, B.; BISCEGLI, C. I.; DURIGAN, J. F. Aplicações da tomografia de ressonância magnética nuclear como método não-destrutivo para avaliar os efeitos de injúrias mecânicas em goiabas “PALUMA” e “PEDRO SATO”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 641–643, 2002.

MAZZOLA, A. A. Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 117–129, 2009.

MEGANCK, J. A. et al. Beam hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by X-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure BMD. **Bone**, v. 45, n. 6, p. 1104–1116, 2009.

MILIEN, M. et al. Visualization of the 3D structure of the graft union of grapevine using X-ray tomography. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 130–140, 2012.

MONDO, V. H. V. et al. Avaliação de danos mecânicos em sementes de feijão por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 27–35, 2009.

OBANDO-FLOR, E. P. et al. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 68–76, 2004.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. M. Raios X. In: **Física das Radiações**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2010. p. 296.

PANIZZI, A. R. et al. Insetos que atacam vagens e grãos. In: **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. 1. ed. Londrina: EMBRAPA, 2012. p. 859.

PINTO, N. F. J. DE A. Patologia de sementes de milho. **Circular Técnica**, n. 29, p. 44, 1998.

PINTO, T. L. F. et al. An assessment of mechanical and stink bug damage in soybean seed using X-ray analysis test. **Seed Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 110–120, 2009.

PINTO, T. L. F.; CICERO, S. M.; FORTI, V. A. Avaliação da evolução de danos por umidade, em sementes de soja, utilizando a técnica da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 31–38, 2007.

PITTIA, P. et al. Evaluation of Microstructural Properties of Coffee Beans by Synchrotron X-Ray Microtomography: A Methodological Approach. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 222–231, 2011.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de Sementes**. Brasília: Agiplan, 1977.

RIBEIRO, F. Z. et al. Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in bananas during ripening: A new mechanism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 12, p. 2052–2057, 2010.

RODRIGUES MATRANGOLO, W. J.; CRUZ, I.; CASTRO DELLA LÚCIA, T. M. Insetos fitófagos presentes em estilos-estigma e espigas de milho e avaliação de dano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 773–779, 1997.

SCHAMBACH, S. J. et al. Application of micro-CT in small animal imaging. **Methods**, v. 50, p. 2–13, 2010.

SIJBERS, J.; POSTNOV, A. Reduction of ring artefacts in high resolution micro-CT reconstructions. **Physics in Medicine and Biology**, v. 49, n. 14, p. N247–N253, 2004.

SILVA, A. M. et al. Tomógrafo de resolução micrométrica para estudos de solos. **Boletim de Pesquisa**, v. 4, n. 97, p. 44, 1997.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, v. 39, n. 3–4, p. 458–468, 1953.

STOCK, S. R. Recent advances in X-ray microtomography applied to materials. **International Materials Review**, v. 53, n. 3, p. 129–181, 2008.

TOLEDO, F. F.; MARCOS-FILHO, J. **Manual das sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Ceres, 1977.

WOODSTOCK, L. W. Seed imbibition: a critical period for successful germination. **Journal of Seed Technology**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 1988.

ZHAO, W.; SAKURAI, K. X-ray fluorescence spectroscopy using CCD camera as large-area-size X-ray detector. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 63703, p. submitted, 2017.