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

**Avaliação da morfologia interna de sementes de citrumelo ‘Swingle’
por meio de raios X**

Natália Arruda

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2016**

Natália Arruda
Engenheiro Agrônomo

Avaliação da morfologia interna de sementes de citrumelo ‘Swingle’ por meio de raios X

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

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2016**

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

Arruda, Natália

Avaliação da morfologia interna de sementes de citrumelo 'Swingle' por meio de raios X/ Natália Arruda. - - Piracicaba, 2016.

76 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Estrutura 2. Poliembrião 3. Imagens radiografadas 4. *ImageJ* 5. Espaço livre I. Título

Dedico

Aos Meus Pais,

Walmir e Lúcia

*Por toda dedicação, amor e carinho e
por serem meu porto seguro e a razão do meu viver*

Aos meus irmãos,

Isadora e Vitor

*Pela amizade, companherismo e apoio nos momentos difíceis da minha vida e
por serem a razão da minha alegria*

Aos meus familiares,

*em especial meus avós paternos, Luiz e Benedicta,
meus avós maternos, Milton e Patrocínia.*

Aos meus cunhados,

Maurício e Daiane

Ao meu sobrinho,

Lucas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me concedido a graça pelo dom da vida, da sabedoria e do entendimento e principalmente o dom da paciência. Todas as coisas serão realizadas no tempo de Deus! Durante os 4 anos do curso de doutorado, não foi nada fácil chegar até aqui, teve vários obstáculos, porém “TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE”.

À intercessão da Virgem Maria, ela que escutou todas as minhas preces e levou para seu filho amado Jesus Cristo, tudo por Jesus nada sem Maria.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realizar meu grande sonho em fazer Pós-Graduação.

Ao professor Dr. Silvio Moure Cicero, pela dedicada orientação, confiança, amizade, conhecimentos transmitidos e exemplo profissional, sempre justo e dedicado em todas as atividades que realiza.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a CAPES, pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À empresa Citrosuco Fazenda Maringá-Viveiros, pela cessão das sementes para a realização desta pesquisa, em especial ao Márcio Beletti pelo grande apoio na obtenção das sementes.

Ao professor Dr. Angelo Jacomino e ao técnico Dr. Marcos José Trevisan pela disponibilidade de armazenar os sete lotes de sementes na camara fria do Laboratório de Pós-colheita.

Aos professores do curso de Agronomia da UNESP – Ilha Solteira, em especial ao Prof. Dr. Marco Eustáquio de Sá e Prof. Dr. Gisele H. Vazquez, pelos conhecimentos transmitidos, ótimo relacionamento e pela minha formação acadêmica;

Aos professores Dr. Julio Marcos Filho, Dr^a Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre e Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior (Chiquinho), pelos ensinamentos, pela amizade e pelo exemplo profissional.

À Helena M. C. P. Chamma, pela amizade, apoio, incentivo. Você é a nossa mãezinha sempre cuidando com muito carinho de todos que passam pelo Laboratório de Análise de Sementes.

Aos funcionários do laboratório de Análise de Sementes, Adilson, David, Hodair e João e aos secretários Luiz Carlos e Luciane, pela amizade e serviços prestados durante o curso.

Aos Funcionários da Biblioteca Central da ESALQ, pelo atendimento e atenção dispensada.

Aos antigos e novos amigos do laboratório de Análise de Sementes Cris, Vitinho, Vanessa, Rô, Si, Clíssia, Chiquinho, Marcão, Marcio, Renê, Jú, Nayara, Cibele, Mário, Larissa, Marcela, Sibelle, Maicon, Haynna, Crislaine, Luiz Felipe, Céssia, Carina, Ana, Plínio, Fábio, Rayssa e Mayara pela amizade, paciência e companheirismo. Em especial a, Denis (Pinga), Rê, Paty, Carty e a Dani, obrigada por todos os momentos de alegrias e tristezas, vocês sempre estavam do meu lado e ainda prevalece a amizade mesmo que distante.

Às minhas amigas-irmãs Tati e Mari, que foram presentes de Deus na minha vida em Piracicaba, minhas confidentes, conselheiras. Aprendi tanto com vocês nesses quatro anos de convivência, que Deus continue abençoando e iluminando cada uma de vocês.

À minha irmãzinha, Dani, que foi verdadeira providência de Deus em minha vida, um verdadeiro anjo, uma das pessoas mais determinadas e um verdadeiro exemplo do dom da fortaleza, muito obrigada pela amizade, que vem de longa data desde Ilha Solteira e continua mesmo que distante.

Ao meu grande amigo Denis (Pinga), que sempre ficou do meu lado em todos os momentos mais difíceis do mestrado e doutorado. Muito obrigada por todos os conselhos e broncas que foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho desde Ilha Solteira e que a nossa amizade nunca se acabe.

Aos amigos companheiros de moradia (Pensão Dona Toshie e Pensão das Irmãs) e as irmãs da pensão Cenáculo Nossa Senhora de Lourdes, pelo carinho, amizade e incentivo. Obrigada por serem minha família aqui em Piracicaba.

Aos amigos do GOU (Grupo de Oração Universitário), em especial, Tati, Mari, Deia, Ana, Irineu, Ariane, Márcio, Vanessa, Rebecca, Barbara e Patrícia, pessoas iluminadas por Deus, obrigada pelas partilhas, alegrias e troca de experiências.

Aos amigos da Pós-graduação da ESALQ, em especial, Tati loira, Fabrícia, Sandrinha, Léo, Conan, Marcinha, Juliana, Walquiria, Jéssica, Irineu, Flavinha, por todos os momentos, intervalos de aulas, estudos, desesperos, orações e descontrações. Muito obrigada pela amizade e companheirismo.

Às minhas amigas de Botucatu, Carlinha, Grazy, Gi, Mirela, Mayra e Manu, obrigada pela amizade de tantos anos.

Às minhas amigas-irmãs de Ilha Solteira, Erika e Isabela (Fela) “A amizade sincera nunca é esquecida, apenas cristalizada, para um momento qualquer, e quando é reencontrada é de novo reacendida e vivida plenamente”,

Aos meus amigos de Ilha Solteira, em especial a XXX Turma de Agronomia, Mariana, Lílian, Fabiana e Helena pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

À minha família, meus irmãos, meus avós, tios, cunhados, pelo amor, apoio e dedicação, que me possibilitaram cumprir mais uma etapa.

Aos meus amados pais digo muito obrigada, não há palavra que expresse minha gratidão e orgulho. Como agradecer a tantas renúncias, dedicação, conselhos, lições e as lágrimas derramadas. Vocês sempre serão meu porto seguro, meu exemplo de vida.

MUITO OBRIGADA!

*“E **Maria** disse:*

*Minha alma glorifica ao Senhor,
meu espírito exulta de alegria em **Deus**, meu **Salvador**,
porque olhou para sua pobre serva.*

*Por isto, desde agora, me proclamarão bem-aventurada todas as gerações,
porque realizou em mim maravilhas, aquele que é poderoso e cujo nome é **Santo**.*

Sua misericórdia se estende, de geração em geração, sobre os que o temem.

Manifestou o poder do seu braço: desconcertou os corações dos soberbos.

Derrubou do trono os poderosos e exaltou os humildes.

Saciou de bens os indigentes e despediu de mãos vazias os ricos.

Acolheu a Israel, seu servo, lembrado da sua misericórdia,

conforme prometera a nossos pais,

em favor de Abraão e sua posteridade, para sempre.”

(Lucas 1, 46-55)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. EXPERIMENTO I: AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA INTERNA DAS SEMENTES POR MEIO DO TESTE DE RAIOS X.	21
3.2. EXPERIMENTO II: AVALIAÇÃO DA POLIEMBRIONIA DAS SEMENTES POR MEIO DO TESTE DE RAIOS X	23
3.3. EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES COM OS TESTES TRADICIONAIS DE VIGOR E AVALIAÇÃO DO ESPAÇO LIVRE DA CAVIDADE INTERNA DAS SEMENTES POR MEIO DO <i>SOFTWARE IMAGEJ</i>	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. EXPERIMENTO I: AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA INTERNA DE SEMENTES DE CITRUMELO ‘SWINGLE’ POR MEIO DO TESTE DE RAIOS X	33
4.2. EXPERIMENTO II: AVALIAÇÃO DA POLIEMBRIONIA DE SEMENTES DE CITRUMELO ‘SWINGLE’ POR MEIO DO TESTE DE RAIOS X.....	41
4.3. EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES POR MEIO DOS TESTES DE VIGOR TRADICIONAIS E AVALIAÇÃO DO ESPAÇO LIVRE DA CAVIDADE INTERNA DAS SEMENTES POR MEIO DO <i>SOFTWARE IMAGEJ</i>	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

RESUMO

Avaliação da morfologia interna de sementes de citrumelo 'Swingle' por meio de raios X

O teste de raios X é um teste rápido, simples, não destrutivo e de alta precisão, que possibilita examinar com detalhes, a morfologia interna da semente, identificar áreas danificadas, sua localização e tipos de danos. Uma das abordagens atuais da pesquisa sobre análise de imagens de sementes radiografadas é verificar até que ponto a relação entre o grau de desenvolvimento embrionário e o espaço disponível na cavidade interna da semente está associada ao desempenho da semente. Na literatura há diversos trabalhos com resultados promissores para diferentes espécies; porém, para sementes de citros são escassas estas informações. Neste sentido, os objetivos desta pesquisa foram: a) avaliar a eficiência do teste de raios X em relacionar a morfologia interna das sementes com a germinação das sementes de citrumelo 'Swingle'; b) verificar a possibilidade de utilização do teste de raios X para avaliar a poliembrião das sementes de citrumelo 'Swingle'; c) verificar se há relação do espaço livre na cavidade interna com o desempenho das sementes de citrumelo 'Swingle'. Foram utilizados sete lotes de sementes tratadas de citrumelo 'Swingle'. A pesquisa foi dividida em três experimentos: experimento I - avaliação da morfologia interna das sementes de por meio de raios X; experimento II - avaliação da poliembrião das sementes por meio do teste de raios X; experimento III - avaliação do potencial fisiológico das sementes por meio dos testes tradicionais de vigor e avaliação do espaço livre da cavidade interna das sementes por meio do *software ImageJ*. O primeiro e o segundo experimento foram conduzidos em uma época de avaliação, porém, o terceiro experimento foi conduzido em duas épocas, espaçada em oito meses de armazenamento (0 e 8 meses), durante esse período as sementes foram armazenadas em câmara fria com a temperatura de 5°C e umidade relativa do ar de 75 %. O teste de raios X foi realizado nos três experimentos e relacionado com a germinação, porém no experimento II foi relacionado também com o método direto (contagem dos embriões) e no experimento III as imagens radiográficas foram analisadas por meio do *software ImageJ* para determinar o espaço livre das sementes. Para determinar o potencial fisiológico, os lotes de sementes foram submetidos a testes de germinação e de vigor (primeira contagem de germinação, velocidade de germinação, tempo médio de germinação, emergência de plântulas em areia, comprimento e massa de matéria seca da parte aérea e raiz de plântulas), foi avaliado também número médio de plântulas por sementes e a taxa de poliembrião de cada lote. Verificou-se que a análise de imagens de raios X permite indentificar danos internos na semente com efeitos negativos na germinação; é um método eficiente para avaliar a poliembrião das sementes; e a alta porcentagem de sementes com espaço livre interno superior a 22,1% prejudica o potencial germinativo de sementes de citrumelo 'Swingle'.

Palavras-chave: 1. Estrutura 2. Poliembrião 3. Análise de imagens 4. *ImageJ* 5. Espaço livre.

ABSTRACT

Evaluation of the internal morphology of 'Swingle' citrumelo seeds by of X-ray

X-ray test is a fast, simple, non-destructive, high-precision test that allows you to examine in detail the internal morphology of the seed, identify damaged areas, their location and types of damage. One of the current approaches to X-ray seed imaging research is to ascertain the extent to which the relationship between the degree of embryonic development and the available space in the internal cavity of the seeds is associated with seed performance. In the literature there are several works with promising results for different species; however, this information is scarce for citrus seeds. In this sense, the objectives of this research were: a) to evaluate the efficiency of the X-ray test in relation to the internal morphology of the seeds with the germination of 'Swingle' citrumelo seeds; b) to verify the possibility of using the X-ray test to evaluate the polyembryony of the 'Swingle' citrumelo seeds; c) to verify if there is a relation of free space in the internal cavity with the performance of 'Swingle' citrumelo seeds. Seven lots of treated 'Swingle' citrumelo seeds were used, the research was divided into three experiments: experiment I - evaluation of the internal morphology of seeds by X-ray; experiment II - evaluation of seed polyembryony by X-ray test; experiment III - evaluation of the physiological potential of the seeds by traditional tests of vigor and evaluation of the free space of the internal cavity of the seeds by of ImageJ software. The first and second experiments were conducted at a time of evaluation, but the third experiment was conducted in two seasons, spaced in eight months of storage (0 and 8 months), during which time the seeds were stored cold chamber with temperature of 5 °C and relative humidity of 75 %. The X-ray test was performed in the three experiments and related to germination, but in experiment II it was also related to the direct method (counting of the embryos) and in experiment III the radiographic images were analyzed by of the *ImageJ software* to determine the space of the seeds. In order to determine the physiological potential, seed lots were submitted to germination and vigor tests (first germination count, speed of germination, mean time germination, emergence of seedlings in sand, length and dry mass of aerial part and root of seedlings), we also evaluated the average number of seedlings per seed and the polyembryony rate of each lot. It was verified that X-ray image analysis allows identification of internal damage in the seed with negative effects on germination; is an efficient method to evaluate the polyembryony of the seeds; and the high percentage of seeds with internal free space greater than 22.1% impairs the germination potential of 'Swingle' citrumelo seeds.

Keywords: 1. Structure 2. Polyembryony 3. Image analysis 4. *ImageJ* 5. Free space

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja doce e o maior exportador de suco de laranja, sendo o Estado de São Paulo responsável por 74% da produção nacional. O cultivar mais plantado na citricultura brasileira é a laranja 'Pera' e corresponde a 35,7% das árvores cítricas; a predominância deste cultivar e a baixa diversificação de porta-enxertos vêm aumentando a incidência de várias doenças, como por exemplo, a tristeza do citros, a clorose variegada do citros, a morte súbita dos citros e o huanglongbing (HLB), provocando grandes danos de ordem econômica, principalmente, para a citricultura paulista. O porta-enxerto que está sendo muito utilizado para a diversificação dos pomares atualmente no Estado de São Paulo é o citrumelo 'Swingle'.

Os porta-enxertos são obtidos por meio de sementes, poliembriônicas; além de embrião zigótico, há formação de embriões nucelares. Os embriões nucelares são de origem do tecido materno; em porta-enxertos, as plântulas nucelares são de suma importância, pois são idênticas à planta mãe, conseqüentemente, livres de doenças. Além disso, as sementes do porta-enxerto citrumelo 'Swingle' têm baixa e lenta germinação e alguns pesquisadores consideram estas sementes como recalcitrantes; devido a este comportamento os viveiristas tem muita dificuldade em armazenar estas sementes, sendo necessário realizar a semeadura logo após sua extração dos frutos. Desta forma, é fundamental o aprimoramento na técnica de avaliação da qualidade de sementes, principalmente relacionado ao potencial fisiológico, para então obter informações consistentes no teste de germinação.

Além de avaliar o potencial fisiológico das sementes, é necessário avaliar a qualidade do porta-enxerto e uma das características desejadas é alta taxa de poliembrionia. Para quantificar a poliembrionia existem dois métodos, o direto e o indireto. O método direto é a contagem manual dos embriões de cada semente; é mais preciso, porém muito trabalhoso e oneroso. No método indireto, a contagem dos embriões é por meio do teste de germinação, que é um método demorado, é necessário 30 a 60 dias para obter o resultado e não expressa a real poliembrionia da espécie em estudo.

A utilização de métodos rápidos e precisos para a avaliação de características físicas das sementes, como o teste de raios X, o qual consiste na análise radiográfica da morfologia interna das sementes de maneira bem detalhada; por se tratar de método não destrutivo, as sementes em análise podem ser destinadas à realização de testes fisiológicos, possibilitando associar a morfologia interna com a germinação e o vigor das sementes.

As variações no grau de desenvolvimento do embrião provavelmente estão associadas ao desempenho das sementes. Assim, esta característica tem sido avaliada por meio de sementes radiografadas; no entanto, a precisão dessas avaliações é relativamente limitada, pois sua interpretação é baseada em estimativas visuais. Por outro lado, atualmente, dois *softwares* têm se destacado como técnica para avaliação das imagens, o *Tomato Analyser* e o *Image-Pro® Plus*, além destes existe um novo *software*, o *ImageJ*, que possui a mesma finalidade. No entanto, o processo de utilização desse sistema ainda se encontra em fase inicial, sendo necessária condução de trabalhos para obtenção de informações adicionais e consequentemente, resultados mais consistentes.

Deste modo, os objetivos desta pesquisa foram avaliar a eficiência do teste de raios X em relacionar a morfologia interna das sementes com a germinação, verificar a possibilidade de utilização do teste de raios X para avaliar a poliembrionia dos lotes de sementes e verificar se há relação do espaço livre na cavidade interna com o desempenho das sementes de citrumelo ‘Swingle’.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A citricultura brasileira está altamente concentrada na produção de laranjas doces; o país tem uma boa eficiência na cadeia citrícola desde mudas e viveiros certificados, plantio e cultivo da laranja, produção do suco de laranja até a distribuição internacional em sistemas integrados a granel. A produção brasileira de laranja doce concentra-se no Estado de São Paulo, sua produção detém 74% da produção nacional (IBGE, 2015).

A muda é um dos insumos mais importantes para a formação de um pomar de citros, tendo-se em vista o caráter perene da cultura. A importância da muda está no fato de que o potencial máximo de produtividade e de qualidade das frutas será revelado seis a oito anos após o plantio e a longevidade do pomar só será conhecida em um intervalo ainda maior (Teófilo Sobrinho, 1991).

Com objetivo de melhorar qualidade das mudas cítricas utilizadas no Estado de São Paulo, a Secretaria de Agricultura instituiu o “Programa de Certificação de mudas Cítricas do Estado de São Paulo”, que determina o uso de ambiente fechado ou telado, onde as mudas devem ser produzidas em recipientes, com substrato e água desinfetados e materiais vegetais indexados para viroses e para a clorose variegada do citros (Panzani et al., 1994). A disponibilidade de sementes e borbulhas, tanto em termos qualitativos quanto em termos quantitativos, é fundamental para a viabilização de toda a cadeia de produção de mudas cítricas, conferindo maleabilidade e continuidade ao processo. De acordo com este Programa, após 1 de julho de 2000, as sementeiras para a produção de porta-enxertos de citros somente devem ser instaladas em ambiente telado, à prova de afídeos.

O porta-enxerto induz à copa alterações no crescimento, tamanho, precocidade de produção, maturação dos frutos, coloração da casca e do suco, permanência dos frutos na planta e a sua conservação após a colheita, fertilidade do pólen, absorção, síntese e utilização de nutrientes, transpiração e composição química das folhas, tolerância à salinidade, deficiência hídrica, ao frio, a doenças e pragas. O uso do porta-enxerto permite superar fatores abióticos e bióticos e obter ganhos de produtividade, mas é também responsável por grandes adversidades da

citricultura, como a gomose, tristeza, declínio e morte súbita dos citros (Pompeu Junior, 2005).

Em 1956, Sylvio Moreira, no Congresso de Citricultura do Mediterrâneo, em Tel Aviv, fez uma recomendação fundamental para o estudo de porta-enxertos: “para se conhecer o comportamento real de uma variedade-copa em determinado porta-enxerto, os ensaios deverão ser formados somente com porta-enxertos originados de sementes e enxertadas com clones nucelares ou sadios” (Pompeu Junior, 2005).

As sementes de citros em vários trabalhos são consideradas como recalcitrantes, muito sensíveis à desidratação. Isto foi verificado no trabalho realizado por Roberts (1973), o qual verificou que as sementes de *Citrus limon* apresentavam queda da viabilidade com o progresso da desidratação. Por outro lado, King et al. (1981) observaram que sementes com 5% de água e armazenadas a temperaturas abaixo de 5°C mantêm melhor o poder germinativo. De acordo com Marcos-Filho (2015) a presença do tegumento provoca o atraso significativo da germinação, criando a falsa impressão de recalcitrância ou de baixa tolerância de à dessecação, pois a remoção do tegumento eliminava o problema (Zucareli et al., 2009); além da lenta germinação devido ao tegumento, o porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’, tem a característica de viviparidade e suas sementes devem ser extraídas antes dos frutos ficarem maduros, caso isso não ocorra elas germinam dentro dos frutos (Carvalho et al., 2005). Segundo Barbedo e Bilia (1998) duas características essenciais de sementes recalcitrantes são viviparidade e intolerância a dessecação.

A germinação das sementes de citros não é influenciada pela luz. O tempo de germinação, para a maioria dos cultivares, pode variar de 14 a 30 dias, dentro da faixa ótima de 30 a 35°C, e até 80 dias na faixa de 15 a 20°C (Davies e Albrigo, 1994; Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996). Usberti e Felipe (1980) verificaram que as melhores temperaturas para germinação de sementes do limão ‘Cravo’ encontram-se entre 25°C e 35°C.

A multiplicação de plantas por sementes foi inicialmente utilizada como método de obtenção de novas plantas, mas, por ocasionar variações decorrentes das recombinações gênicas e longo período juvenil, tem atualmente uso restrito. Além de ser a forma mais comum de propagação do porta-enxerto, as sementes são muito importantes em vista da característica poliembrionia nucelar (Carvalho et al., 2005).

A propagação (multiplicação assexuada) ocorre de forma generalizada em citros pela formação de dois ou mais embriões adventícios a partir de divisões mitóticas sucessivas de células da nucela, que é um tecido vegetal materno presente no óvulo maduro, resultando em sementes poliembriônicas. Como a nucela é parte exclusivamente materna, os embriões nucelares possuem a mesma carga genética da planta que a origina, possibilitando, assim, a produção de plantas idênticas e livres de doenças, uma vez que não há formação de vasos condutores suficientes para a translocação dos patógenos para os embriões. Foi por meio das sementes que, a partir do final da década de trintas, realizou-se a “limpeza” de várias viroses existentes nos citros no Estado de São Paulo, com obtenção dos clones nucelares sadios, que utilizados comercialmente a partir de 1955, possibilitaram a recuperação da citricultura brasileira (Moreira e Salibe, 1965; Greve et al., 1991).

Na horticultura, a poliembrionia é vantajosa no sistema de produção de porta-enxertos, para qual a uniformidade genética e facilidade de condução no viveiro são desejáveis. De modo geral, resultados de avaliação de poliembrionia apresentam-se altamente variáveis, provavelmente associados às condições como compatibilidade genética e da taxa de fecundação, do estado nutricional da planta, do fotoperíodo, da temperatura e do vigor genético do embrião zigótico (Machado et al., 2005).

A taxa de poliembrionia é caráter de grande importância na escolha de um porta-enxerto comercial, a qual, quanto mais elevada, aumentam as chances de um porta-enxerto, quando propagado por semente, formar “cavalinhos” de origem nucelar semelhantes à cultivar-mãe (Moreira et al., 2010).

A poliembrionia pode ser avaliada contando-se o número de plântulas após a germinação ou obtendo-se o número de embriões na semente. Embora mais trabalhosa, a contagem direta do número de embriões apresenta resultados mais consistentes e reprodutíveis (Moreira et al., 1947).

A utilização de sementes de alta qualidade pode influenciar a emergência e o estabelecimento das plântulas no campo, além de interferir no desenvolvimento e rendimento da cultura (Schuch e Lin, 1982; Bewley e Black, 1994). O vigor por sua vez está diretamente associado ao estabelecimento da cultura, afetando,

principalmente o estande. Entretanto, o seu efeito pode persistir, afetando o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade da mesma (Schuch e Lin, 1982).

Atualmente, vários testes têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar a qualidade de sementes, incluindo novas tecnologias que utilizam sistemas computadorizados, os quais têm possibilitado resultados eficientes na avaliação da qualidade fisiológica de sementes, permitindo as análises de plântulas e da estrutura interna da semente, conferindo maior confiabilidade ao processo de análise e parâmetros objetivos na classificação (Dell'Áquila, 2007a). A principal vantagem da informatização das análises consiste na eliminação do erro humano durante as avaliações, permitindo alta confiabilidade dos dados para fins de comparação.

O teste de raios X foi proposto por Simak e Gustafsson (1953) com o intuito de avaliar a qualidade de sementes de algumas coníferas. Este consiste na análise radiográfica da estrutura interna das sementes, por meio de sua exposição a uma fonte de baixa energia de raios X e um filme fotossensível. Ao atravessarem as sementes e atingirem o filme, os raios permitem a formação de uma imagem caracterizada por diferentes tonalidades de cinza. O princípio da técnica é definido pela absorção de raios X em diferentes quantidades pelos tecidos das sementes, em função de sua estrutura, composição e densidade, além do tempo de exposição à radiação (ISTA, 2004).

O teste de raios X é rápido e está padronizado pelas Regras Internacionais para Análise de Sementes (ISTA, 1996) e foi incluído nas Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009). Segundo Oliveira et al. (2003) essa técnica vem sendo aprimorada e já foi comprovada sua eficiência na identificação de muitas características invisíveis a olho nu das sementes de várias espécies, como nível de maturidade dos embriões de pinus silvestris (Sahlen et al., 1995), de sementes dessa espécie não germinadas ao final do teste (Simak et al., 1989), embriões mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Bino et al., 1993), fração de sementes puras de aveia (Craviotto et al., 2002), entre outros. Tem sido utilizado para a identificação de sementes cheias, vazias, danificadas morfológicamente e para caracterizar e detectar danos internos em sementes (Cicero et al., 1998).

O teste de raios X é um procedimento que permite avaliar a estrutura e o estágio de desenvolvimento de embriões de sementes (Nassif e Cicero, 2006). As informações sobre a ocorrência de sementes defeituosas e vazias é altamente desejada, já que essas sementes influenciam os resultados de germinação de um

lote (Craviotto et al., 2002; Dias et al., 2014). Pesquisa realizada por Machado (2002) indicou que o descarte de sementes de aroeira branca com danos e anormalidades, detectados por raios X, interfere positivamente na germinação de sementes.

O teste de raios X é útil quando realizado durante os vários processos que as sementes são submetidas como, por exemplo, no beneficiamento, quando podem ser fisicamente alteradas e os danos não serem visíveis ao olho humano (Pupim et al., 2008). Resultados satisfatórios com o uso do teste de raios X são relatados em pesquisas com várias espécies: a identificação de danos internos nas sementes foi realizada com eficiência em milho (Cicero et al., 1998, Carvalho et al., 1999; Cicero e Banzatto Junior, 2003), soja (Pinto et al., 2009), pimenta (Dell'Áquila, 2007b), acerola (Nassif e Cicero, 2006), embaúba (Pupim et al., 2008), cedro (Masseto et al., 2008), ipê (Oliveira et al., 2004), canafístula (Oliveira et al., 2003), sucupira preta (Albuquerque e Guimarães, 2008), melancia (Silva et al., 2007a), abóbora (Silva et al., 2007b), feijão (Mondo et al., 2009, Gomes-Junior et al., 2014), girassol (Rocha et al., 2014), arroz (Silva et al., 2014) e crotalária (Arruda et al., 2016).

Embora os raios X sejam potencialmente nocivos às sementes, a baixa dose absorvida durante o teste não lhes causa mutações genéticas e não afeta a sua germinação (Swaminathan e Kamra, 1961). Além disso, trata-se de um teste que não requer tratamento prévio das sementes, o que confere vantagens por ser um método não destrutivo, rápido e de simples execução.

Uma das variações morfológicas provavelmente associadas ao desempenho da semente é o tamanho do embrião, ou melhor, o grau de desenvolvimento embrionário em relação ao espaço disponível na cavidade interna da semente (Marcos-Filho et al., 2010). De acordo com Liu et al. (1993), “espaço livre” é uma expressão utilizada para descrever a ocorrência de áreas vazias entre o embrião e o endosperma ou entre o conteúdo da semente e o tegumento; este parâmetro foi determinado, pela primeira vez, em sementes de tomate, para identificar suas relações com a germinação. Algumas pesquisas têm fornecido informações interessantes a esse respeito, como por exemplo, a ausência de germinação de sementes de aroeira-branca, dependendo da proporção entre crescimento do embrião e da cavidade embrionária (Machado e Cicero, 2003), a existência de relação entre o estágio de formação de sementes de embaúba e a porcentagem de

germinação (Pupim et al., 2008), a baixa germinação de sementes de mamona com o preenchimento da cavidade interna inferior a 50% (Carvalho et al., 2010), a obtenção de plântulas anormais ou sementes não germinadas a partir da redução (entre 50 e 75%) da ocupação da cavidade interna de sementes de pimentão pelo embrião e endosperma (Gagliardi e Marcos-Filho, 2011). No entanto, os métodos de avaliação dessas relações têm sido efetuados por meio de estimativas visuais, com precisão relativamente limitada.

Diante desse cenário, a pesquisa tem se voltado para automatização das variações no grau de desenvolvimento do embrião identificadas por meio de radiografias, utilizando-se o *software* denominado *Image-Pro® Plus*, Dell'Aquila (2007b) demonstrou que o espaço livre pode ser um indicador do potencial de germinação, visto que sementes radiografadas de pimentão, com espaço livre entre o embrião e o endosperma superior a 2,7%, apresentaram redução progressiva na formação de plântulas normais.

Por outro lado, trabalhando com o mesmo *software*, Silva et al, (2012) verificaram que a presença de maior área ocupada pelo embrião e endosperma não favoreceu a germinação de sementes de berinjela. Resultados semelhantes foram obtidos para sementes de tomate, onde o aumento do espaço livre na cavidade interna de sementes, não necessariamente resultou em redução da germinação (Silva et al., 2013a).

Outro *software* que tem sido utilizado é o *Tomato Analyzer*, desenvolvido por pesquisadores da Ohio State University para avaliação semiautomática de características fenotípicas de frutos de tomate. O *software* permite substituir avaliações de atributos morfológicos efetuadas mediante mensurações manuais ou estimativas subjetivas (Brewer et al., 2006, 2007), acelerando a análise fenotípica e obtendo informações com alto grau de consistência e repetibilidade. Para verificar a possibilidade de utilização do *Tomato Analyzer* para determinações em sementes, alguns pesquisadores têm conduzido estudos envolvendo a análise de imagens de sementes radiografadas de algodão, pepino, abóbora e melancia, demonstrando a sensibilidade do *software* para a avaliação do grau de desenvolvimento embrionário das sementes (Marcos-Filho et al., 2010).

Outro *software* que está sendo utilizado para avaliar as características físicas das sementes e o grau de desenvolvimento do embrião é o *ImageJ*. O *ImageJ* é um *software* para processamento e análise de imagens, desenvolvido por

Wayne Rasband no *National Institute of Mental Health*, USA, em linguagem Java. Com este *software* é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits. Permite o processamento de diversos formatos de imagem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS. Suporta a técnica de empilhamento de imagens, isto é, uma série de imagens que compartilham uma única janela para animações. Além disso, a leitura de um arquivo de imagem pode ser feita paralelamente a outras operações. A janela contendo os resultados (área, perímetro, nível de escala de cinza médio, etc) permite que estes sejam exportados para um arquivo, como por exemplo, no formato XLS (Microsoft Excel). No *ImageJ*, o cálculo das áreas é feito pela contagem de pixels das regiões selecionadas (Rasband, 2011). Este *software* anteriormente era utilizado para mensurar área foliar (Souza Neto, 2009), porém as análises por este *software* estão sendo adaptadas para sementes; Silva et al. (2013b) avaliaram o espaço livre da cavidade interna de sementes *Acca sellowiana* por meio do *software ImageJ* e concluíram que o *software* é eficiente para mensurar esta característica.

Na literatura existem poucos trabalhos científicos envolvendo análise de imagens na avaliação da morfologia interna de sementes de citros, sendo de grande importância o estudo desta técnica para a determinação de características físicas possivelmente relacionados com o desempenho das sementes, trazendo importantes informações para a evolução do conhecimento dirigido para o controle de qualidade de sementes principalmente para sementes citrumelo 'Swingle' que tem baixa e lenta germinação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nos laboratórios de Análise de Imagens e de Análise de Sementes, ambos pertencentes ao Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo. Foram utilizados sete lotes de sementes do porta-enxerto do híbrido citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. da safra outubro de 2014. As sementes foram produzidas em Gavião Peixoto, SP, onde foram extraídas mecanicamente dos frutos maduros e tratadas com o fungicida Captan 500 PM (100g i.a./100kg de sementes).

A pesquisa foi dividida em três experimentos: experimento I - avaliação da morfologia interna das sementes de por meio de raios X; experimento II - avaliação da poliembrionia das sementes por meio de raios X; experimento III - avaliação do potencial fisiológico das sementes por meio dos testes tradicionais de vigor e avaliação do espaço livre da cavidade interna das sementes por meio do *software ImageJ*. O primeiro e o segundo experimento foram realizados em uma época de avaliação, e o terceiro experimento foi realizado em duas épocas, espaçada em oito meses de armazenamento (0 e 8 meses).

3.1. Experimento I: avaliação da morfologia interna das sementes por meio do teste de raios X

Neste experimento foram utilizadas sementes provenientes de sete lotes do material em estudo.

3.1.1. Grau de umidade

Determinado antes da instalação dos testes de raios X e de germinação, pelo método da estufa a 105 °C (± 3), durante 24 horas (Brasil, 2009), em duas subamostras de 5 g. Os resultados foram expressos em percentagem média (base úmida) por lote.

3.1.2. Teste de raios X

Realizado em 16 repetições de 12 sementes, e uma repetição de 8 sementes, por lote, totalizando 200 sementes. As sementes foram dispostas em uma folha de acetato transparente, com dimensões de 210 x 297 mm, colocando-se uma fita adesiva dupla-face transparente para fixar as sementes em posição adequada (todas as sementes foram posicionadas com o eixo embrionário voltado para baixo). As sementes foram numeradas de acordo com a posição ocupada na folha de acetato de maneira que pudessem ser identificadas nas avaliações posteriores. Em seguida, a folha de acetato com as sementes foi colocada no interior de um equipamento digital de raios X, Faxitron[®] modelo MX-20 DC-12, com ajuste automático do tempo de exposição e da intensidade de raios X, acoplado a um computador. As sementes foram posicionadas a uma distância de 28,6 cm da fonte de emissão de radiação. As imagens geradas foram salvas no disco rígido do computador para posterior análise. As sementes já radiografadas foram retiradas da folha de acetato e transferidas para uma bandeja de plástico com células individuais, numerando-se na mesma ordem em que estavam na folha de acetato. Posteriormente, as sementes foram submetidas ao teste de germinação.

3.1.3. Teste de germinação

Realizado em papel toalha umedecido com água em uma proporção, em massa, de 1:2,5 (papel e água). As sementes, previamente numeradas (identificadas), foram distribuídas sobre duas folhas de papel-toalha (no terço superior do substrato, para permitir o desenvolvimento das plântulas de maneira individualizada), cobertas com outra folha. Os rolos foram mantidos em germinador a 25 °C e a avaliação foi realizada no quinquagésimo sexto dia após a semeadura, de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Em seguida as plântulas normais, as plântulas anormais e as sementes mortas foram fotografadas por meio de uma câmera digital e as imagens foram salvas em disco rígido do computador para posterior análise.

Os danos observados na análise radiográfica das sementes foram a presença de tecidos deteriorados e má formação do embrião; estes foram classificadas em três categorias de acordo aos critérios contidos na Tabela 1, seguindo a classificação proposta por Silva et al. (2014) para sementes de arroz e adaptada para sementes de citrumelo 'Swingle'.

Tabela 1. Critérios estabelecidos para classificar as categorias (C) de danos observados na morfologia interna em imagens radiográficas de sementes de citrumelo 'Swingle'

C	Descrição das categorias
1	Sem alterações
2	Com pequenas alterações (sementes com <50% de tecidos deteriorados ou embrião malformado).
3	Com grandes alterações (sementes com >50% de tecidos deteriorados ou embrião malformado).

3.1.4. Análise dos resultados

Os resultados provenientes da análise de imagens não foram analisados estatisticamente. O número de sementes classificadas dentro de cada categoria e o total de plântulas normais foi calculado em percentuais. A interpretação dos resultados de raios X foi confrontada com as imagens fotográficas das plântulas provenientes do teste de germinação.

3.2. Experimento II: avaliação da poliembrionia das sementes por meio do teste de raios X

Foram utilizados sete lotes de sementes sendo a avaliação da poliembrionia de cada lote realizada em duas etapas. A primeira etapa foi destinada à análise do número de embriões por meio do teste de raios X, comparando-se com número de embriões por meio do método direto, ou seja, contagem manual dos embriões. A segunda etapa para a determinação da poliembrionia, a contagem dos embriões também foi realizada por meio do teste raios X e comparando-se com número de embriões determinado por meio do método indireto, ou seja, foi realizado o teste de germinação e a contagem das plântulas em cada semente. Os testes estão descritos a seguir.

3.2.1. Método do teste de raios X

Realizado do mesmo modo descrito no item 3.1.2., porém as 200 sementes foram radiografadas em duas posições (Figura 1), para maior precisão dos resultados nas contagens dos embriões. O teste de raios X foi realizado nas sementes para o método direto e indireto.

Figura 1. Imagens radiografadas de sementes de citrumelo 'Swingle' em duas posições (1 e 2), com um embrião (A) e dois embriões (B).

Após realizar a avaliação de cada imagem radiografada, foi calculada a distribuição de frequência dos embriões, número médio de embriões por semente e a taxa de poliembria. A distribuição de frequência dos embriões foi determinada pela seguinte equação: $DF = (\text{número de sementes com um ou mais embriões}) / (\text{número total de sementes})^{-1} (100)$, com isto determinou-se a porcentagem de sementes com um ou mais embriões. O número médio de embriões por semente foi obtido pela equação: $\text{Embriões por semente} = (\text{número total de embriões}) / (\text{número total de sementes})^{-1}$ para cada lote. A taxa de poliembria foi obtida pela expressão: $\text{Pol} = (\text{número de sementes com mais de um embrião}) / (\text{número total de sementes})^{-1} (100)$ para cada lote.

3.2.2. Método direto

Após realizar o teste de raios X, as sementes foram colocadas em uma bandeja de plástico individualizada com alvéolos. As células individualizadas da bandeja foram preenchidas com água e as bandejas foram colocadas no germinador a 30 °C/24h, para evitar danos às sementes ou perda de algum cotilédono (Figura 2). Após esse procedimento, retirou-se o tegumento de cada semente e realizou-se a contagem dos cotilédones, sendo assim possível determinar a distribuição dos embriões (%), número de embriões por semente e a porcentagem de poliembria para cada lote.

Figura 2. Imagens do procedimento realizado para a contagem dos embriões de cada semente. Bandeja plástica com células individualizadas preenchidas com água (A), semente sem uma parte do tegumento após 24h no germinador à 30 °C (B) e contagem dos cotilédones para determinar o número de embriões por semente (C).

3.2.3. Método indireto

Após realizar o teste de raios X, as sementes foram destinadas ao teste de germinação, sendo o mesmo procedimento descrito no item 3.1.3; porém, nesse método foi avaliado apenas as sementes com plântulas normais ou anormais, para a determinação da distribuição da frequência de plântulas (%), número médio de plântulas por semente e porcentagem poliembrionia para cada lote.

Para avaliar a eficiência do teste de raios X, o número de embriões de cada semente determinado pelo método direto e indireto, foi confrontado com os resultados obtidos pelo teste de raios X de cada semente. Desta forma, foi possível determinar a porcentagem de sementes em que o número de embriões por semente, coincidiu ou não, com os respectivos métodos.

3.2.5. Análise dos resultados

Os resultados provenientes da análise de imagens não foram analisados estatisticamente. A interpretação dos resultados de raios X foi confrontada com o número de embriões observados no método direto (contagem de embriões) e com as imagens fotográficas das plântulas normais ou anormais provenientes do teste de germinação (método indireto).

3.3. Experimento III: avaliação do potencial fisiológico das sementes com os testes tradicionais de vigor e avaliação do espaço livre da cavidade interna das sementes por meio do *software ImageJ*

Neste experimento foram utilizadas sementes provenientes de sete lotes do material em estudo e foi conduzido em duas épocas de avaliação, espaçadas em oito meses de armazenamento (0 e 8 meses). As sementes foram armazenadas em câmara fria com a temperatura de 5°C e umidade relativa do ar de 75 %. Antes de iniciar as análises do potencial fisiológico das sementes, para cada época foi determinado o grau de umidade (item 3.1.1).

3.3.1. Avaliação do potencial fisiológico das sementes

3.3.1.1. Teste de germinação, velocidade de germinação e tempo médio de germinação

Antes de realizar o teste de germinação as sementes foram radiografadas do mesmo modo descrito do item 3.1.2. O teste de germinação foi realizado com oito repetições de 25 sementes por lote, em papel toalha umedecido com água em uma proporção, em massa, de 1:2,5 (papel e água). Os rolos foram mantidos em germinador a 25°C e as avaliações realizadas no trigésimo quinto e quinquagésimo sexto dia após a semeadura. A avaliação de plântulas normais, anormais e sementes mortas foram de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Semanalmente foi registrado o número de plântulas normais até quinquagésimo sexto dia após a semeadura, totalizando oito contagens (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias). O índice de velocidade de germinação foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962),

$$IVG = \frac{N1}{D1} + \frac{N2}{D2} + \dots + \frac{Nn}{Dn}$$

onde:

IVG: índice de velocidade de germinação;

N1, N2,..., Nn = número de plântulas normais na primeira, segunda, até a última contagem, respectivamente;

D1, D2,..., Dn = número de dias desde a primeira, segunda, até a última contagem.

Foi, também, calculado o tempo médio de germinação de acordo com a fórmula proposta por Labouriau (1983),

$$TMG = \frac{\sum (n_i t_i)}{\sum n_i}$$

onde:

TMG = tempo médio de germinação (dias),

n_i = número de sementes germinadas no intervalo entre cada contagem,

t_i = tempo decorrido entre o início da germinação e a i-ésima contagem.

3.3.1.2. Primeira contagem de germinação

Os resultados representaram as porcentagens de plântulas normais computadas no trigésimo quinto dia após a instalação do teste de germinação (item 3.3.1.1).

3.3.1.3. Emergência de plântulas em areia

O teste de emergência de plântulas em areia foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por lote, distribuídas na superfície de uma camada de 5 cm de areia colocada em caixas de plástico (32 cm × 28 cm × 10 cm). Após a semeadura, a cobertura foi efetuada com uma camada de 2 cm de areia; o umedecimento do substrato foi efetuado com quantidade de água correspondente a 60% da capacidade de retenção do substrato. As caixas foram expostas a temperatura ambiente. Aos 120 dias após a semeadura o teste foi concluído, computando-se a porcentagem média de emergência de plântulas para cada lote.

3.3.1.4. Número médio de plântulas por semente e a taxa de poliembrionia

Foi realizada aos 120 dias após a semeadura do teste de emergência de plântulas em areia; foi calculado o número médio de plântulas por semente pela

relação entre o número total de plântulas e o número total de sementes germinadas. Para determinar a taxa de poliembrião foi utilizada a seguinte fórmula: $Pol = (\text{número de sementes com duas ou mais plântulas}) / (\text{número total de sementes germinadas})^{-1} (100)$; o resultado foi expresso em porcentagem para cada lote.

3.3.1.5. Comprimento da parte aérea e da raiz de plântulas

Foram utilizadas dez plântulas do teste de emergência (item 3.3.1.3), por repetição, com características morfológicas semelhantes (Figura 3), foram retirados os cotilédones e o tegumento de cada plântula e em sementes com mais de uma plântula foi selecionada apenas uma delas, a maior. A parte aérea e a raiz foram mensuradas com uma régua graduada em milímetros (mm) e o resultado foi expresso em centímetros (cm).

Figura 3. Imagens de plântulas de citrumelo ‘Swingle’ com 120 dias após a semeadura. Características morfológicas das plântulas que foram selecionadas (A) e não selecionadas (B e C) para as análises de massa de matéria seca e comprimento de plântulas. Plântula indicando o local (pontilhado) onde foi dividida em parte aérea e raiz (D).

3.3.1.6. Massas de matéria seca da parte aérea e da raiz de plântulas

Para determinar as massas, foram utilizadas as mesmas plântulas do item anterior (3.3.1.5.). As plantas foram submetidas à secagem em estufa com

circulação de ar, durante 72 h a 64°C. As massas foram obtidas em uma balança digital com três casas decimais e o resultado foi expresso em gramas/plântula.

3.3.2. Avaliação do espaço livre da cavidade interna das sementes por meio do *software ImageJ*

Para esta avaliação, o teste de raios X foi conduzido de acordo com o mesmo procedimento descrito no item 3.1.2. Posteriormente, as imagens radiográficas foram analisadas com utilização do *software ImageJ*. Nas análises realizadas por meio do *ImageJ*, o embrião foi demarcado com a cor vermelha e essa demarcação pode ser ajustada por toda a semente (Figura 4). A partir da demarcação do embrião ou da semente, o *software* gera, automaticamente, os valores correspondentes à área do embrião (AE) e à área da semente (AS). Para determinar o espaço livre (EL) foi utilizada a seguinte formula: $EL = (AS - AE) (AS)^{-1} (100)$. Os resultados obtidos do espaço livre foram expressos em porcentagem.

Figura 4. Imagens radiográficas de sementes de citrumelo ‘Swingle’ (A), analisadas por meio do *software ImageJ*, demarcação com a cor vermelha do embrião (B) e da semente (C).

Posteriormente, as sementes examinadas por meio do *software*, foram classificadas em quatro categorias, discriminadas a seguir, de acordo com os parâmetros (x), definidas com base na média (M) e no desvio padrão (dp) dos valores obtidos para todos os lotes (Tabela 2).

- Categoria 1: sementes com valor do parâmetro inferior ao valor obtido pela subtração $M - dp$ ($x < M - dp$).
- Categoria 2: sementes em que o valor do parâmetro situou-se no intervalo entre $M - dp$ e M ($M - dp < x$).

- Categoria 3: sementes em que o valor do parâmetro situou-se no intervalo entre M e M+dp ($x < M+dp$).

- Categoria 4: sementes com o valor do parâmetro é superior ao valor obtido pela soma M+dp ($x > M+dp$).

O critério utilizado foi estabelecido com base em resultados obtidos na primeira época de avaliação, onde o uso de quatro categorias permitiu uma melhor distribuição das sementes em cada classe.

Tabela 2. Valores médios (M) do espaço livre (%) de sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle', avaliado por meio do *software ImageJ*, e desvio padrão (dp), utilizados para definição das categorias.

Lote	Média (M)	Desvio Padrão (dp)	Categorias			
			1	2	3	4
1	15,7	5,6				
2	15,7	8,1	< 8,7	8,7 a 15,4	15,5 a 22,1	> 22,1
3	14,5	6,0				
4	15,4	6,5				
5	16,4	6,9				
6	15,6	7,7				
7	14,3	6,1				
Média	15,4	6,7				

Após o teste de raios X, as 200 sementes de cada lote foram colocadas para germinar, sendo distribuídas em repetições de 12 sementes, no terço superior do papel-toalha, mantendo-se as mesmas posições em que as sementes foram radiografadas, para possibilitar sua identificação correta. Após 56 dias no germinador a 25 °C, as plântulas (normais e anormais) e sementes não germinadas foram fotografadas utilizando câmera digital acoplada ao computador.

3.3.3. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados pelo delineamento inteiramente casualizado com o esquema fatorial 7 x 2, sendo 7 lotes de sementes e duas épocas de avaliação (0 e 8 meses de armazenamento). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os resultados dos testes que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância foram transformados de acordo com a opção recomendada pelo *software SAS*[®] (SAS Institute, 2000). Embora os resultados tenham sido transformados para a execução da análise estatística, foram

apresentadas as médias dos resultados originais. Na classificação das sementes quanto ao espaço livre, os dados não foram submetidos à análise estatística, sendo apresentados e discutidos os valores percentuais de sementes dentro de cada categoria.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I: avaliação da morfologia interna de sementes de citrumelo 'Swingle' por meio do teste de raios X

O grau de umidade das sementes variou de 28,7 a 29,9 % (Tabela 3). De acordo com Simak (1991), o grau de umidade das sementes influencia a densidade ótica, ou seja, quanto menor a umidade, maior a densidade ótica, o que possibilita maior diferenciação das partes internas das sementes visualizadas nas radiografias. Dessa forma, o alto grau de umidade das sementes influenciou um pouco na nitidez de visualização, como a distinção entre eixo embrionário e cotilédones; porém, foi possível observar alterações morfológicas internas por meio das radiografias (Figura 5).

Tabela 3. Resultados do grau de umidade (%) dos sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle'

Lote	GU (%)
1	29,1
2	29,9
3	29,6
4	28,7
5	29,2
6	29,3
7	29,7

Em estudos realizados com análise de raios X em sementes florestais da espécie *Lauraceae* (Carvalho et al, 2009) e *Euterpe edulis* Martius (Cursi e Cicero, 2014), também foi difícil visualizar a estrutura das sementes com teor de água superior a 30%, mas foi possível verificar as alterações morfológicas e danos internos. É importante ressaltar que cada espécie possui características próprias de densidade e composição química, fatores que interferem significativamente na visualização das partes das sementes radiografadas.

Figura 5. Identificação das partes da semente de citrumelo ‘Swingle’: tegumento (tg), eixo embrionário (ex) e cotilédone (cot) (A); não foi possível identificar o eixo embrionário da semente (B).

Na análise das imagens radiográficas (Figura 6), observou-se que em algumas sementes não foi possível de identificar o eixo embrionário (Figura 6d); portanto, as análises das imagens foram divididas em três categorias relacionadas aos danos observados na morfologia interna das sementes radiografadas (Tabela 1). Independentemente da quantidade de embriões, a morfologia interna das sementes foi avaliada como toda, ou seja, se o cotilédone de um embrião teve uma deformação maior que 50% da morfologia interna da semente, esta semente correspondem à categoria C3 (Figura 6i).

Figura 6. Imagens de sementes radiografadas de citrumelo ‘Swingle’ em cada categoria (C1, C2 e C3). Sementes com ausência de danos (a; b; c; d). Sementes malformadas com pequena alteração no cotilédone (e; f) e tecido deteriorado (g; h). Sementes malformadas com grande alteração nos cotilédones (i), tecido deteriorado (j; k; l).

Os resultados do teste de raios X para os sete lotes de sementes podem ser observados na Tabela 4. De acordo com análise da morfologia das sementes verificou-se, que todos os lotes apresentaram alta porcentagem de sementes na categoria C1, mais de 60% das sementes, e estas sementes originaram em pelo menos 70% de plântulas normais, com destaque para o lote 2 que apresentou 82% das sementes na categoria C1 e 85% das sementes originaram plântulas normais. Por outro lado, os lotes 4 e 6 apresentaram menor porcentagem de plântulas normais nesta categoria (70%), sendo que 30% resultaram em plântulas anormais ou sementes não germinadas. Conforme Van der Burg et al. (1994), algumas sementes que apresentam aspecto normal no teste de raios X, podem ter problemas

na germinação, possivelmente devido a infecções por microrganismos ou por estarem fisiologicamente comprometidas.

Tabela 4. Porcentagem de sementes (S) e de plântulas normais (PN) em cada categoria de morfologia interna (C), e a porcentagem de germinação (G) dos sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle'.

Lote	C *	S	PN	G
			%	
1	1	76	79	63
	2	22	14	
	3	2	0	
2	1	82	85	72
	2	14	16	
	3	4	11	
3	1	75	73	59
	2	21	18	
	3	4	0	
4	1	68	70	52
	2	28	16	
	3	4	0	
5	1	61	75	51
	2	34	15	
	3	5	0	
6	1	66	70	55
	2	30	30	
	3	4	0	
7	1	69	77	62
	2	28	29	
	3	3	20	

* As categorias 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, a ausência de dano, dano não severo (alteração < 50% na morfologia interna das sementes) e dano severo (alteração > 50% na morfologia interna das sementes).

Para a categoria C2, a porcentagem de sementes variou entre 14 a 34%, lotes 2 e 5 respectivamente; nesta categoria houve pequena alteração na morfologia interna, porém foi o suficiente para reduzir a porcentagem de plântulas normais, pois apenas 14 a 30% das sementes originaram plântulas normais.

Para a categoria C3 verifica-se baixa porcentagem de sementes em todos os lotes (2 a 5%), porém todas as sementes que foram classificadas nesta categoria resultaram em sementes mortas, com exceção dos lotes 2 e 7 em que estas sementes originaram 11 e 20% de plântulas normais, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o lote 5 apresentou a menor quantidade de sementes na categoria C1 (61%) e foi o lote que apresentou a

maior quantidade de sementes nas categorias C2 e C3, além disso, observou-se que foi o lote que obteve o pior desempenho entre os lotes, pois sua germinação foi de 51%. Por outro lado, o lote 2 apresentou alta porcentagem de sementes na categoria C1 (82%) e baixa porcentagem na categoria C2 e foi observado que este lote teve comportamento superior aos demais lotes.

Segundo Passos et.al (2006), no que diz respeito à taxa de germinação, apesar das variações constatadas entre as espécies analisadas de porta-enxertos de citros, ficou evidente que o período de germinação está entre 45 e 60 dias após a semeadura. A técnica de radiografia não detecta todos os problemas de qualidade da semente, mas permite, na maioria dos casos, avaliar de forma rápida e não destrutiva, a morfologia interna, fornecendo informações úteis e essenciais para a pesquisa e controle de qualidade de sementes (Carvalho e Oliveira, 2006).

Na Tabela 5 são apresentados os principais tipos de danos observados de um total de 1400 sementes avaliadas, envolvendo os sete lotes de sementes dessa pesquisa.

Tabela 5. Descrição e percentual de ocorrência dos principais tipos de danos observados em sementes de citrumelo ‘Swingle’, avaliadas por meio do teste de raios X.

Descrição dos Danos	Ocorrência ⁽¹⁾		Exemplos
	C2 ⁽²⁾ (%)	C3 ⁽³⁾ (%)	
Tecidos deteriorados (TD)	7,7	1,5	Figuras 7a, 8a e 9a
Embrião malformado (EMF)	16,4	0,6	Figuras 10a, 11a e 12a
TD + EMF	0,9	1,6	Figura 13a
Total	25,4	3,7	

¹Percentual em relação ao total de 1400 sementes avaliadas por meio do teste de raios X.

²Dano não severo (alteração < 50% na morfologia interna da semente).

³Dano severo (alteração > 50% na morfologia interna da semente).

De acordo com a Tabela 5, os danos classificados na categoria C2 apresentam 25,4% das sementes analisadas, já os danos classificados na categoria C3 ocorreram em 3,7% das sementes, ou seja, 29,1% das sementes apresentaram algum tipo de dano. Entre as sementes analisadas, aquelas que foram classificadas na categoria C2, apresentando o embrião malformado, foram as de maior ocorrência, com 16,4%, em seguida o dano por tecidos deteriorados, com 7,7%. Por outro lado, em sementes em que ocorreram os dois tipos de danos, a porcentagem foi menor (0,9%).

Na Figura 7a pode-se observar dano causado por tecido deteriorado em menos de 50% da semente, localizado na sua parte superior e, neste caso originou-se plântula normal (Figura 7b). Por outro lado, com o mesmo tipo de dano, localizado na sua parte inferior (Figura 8a), a plântula originada foi anormal (Figura 8b). Na Figura 9a observa-se a má formação do embrião e danos causados por tecidos deteriorados, resultando em semente morta (Figura 9b).

Nas Figuras 10a e 11a, observaram-se danos de embrião malformado (EMF), ou seja, um dos cotilédones é malformado, correspondendo menos de 50% da semente, resultaram em plântulas normais ou plântulas anormais (Figuras 10b e 11b). Por outro lado, sementes com mais de 50% de deformação (Figura 12a), resultaram em semente morta (Figura 12b). Sementes com embrião malformado, classificadas na categoria C2, mais de 20% destas, resultaram em plântulas normais, como foi observado nos lotes 6 e 7 (Tabela 4).

Na categoria C2 as sementes que apresentaram tecidos deteriorados associados à má formação do embrião, resultaram em plântulas anormais ou sementes mortas (Figura 13a), porém esses danos tiveram a menor ocorrência nessa categoria, menos de 1%. No entanto, na categoria C3, foi observada a maior ocorrência (1,6%) de sementes que não germinaram (Figura 13b), com exceção dos lotes 2 e 7, que resultaram em 11 e 20% de plântulas normais, respectivamente (Tabela 4).

Figura 7. Imagem radiográfica de semente de citrumelo ‘Swingle’ (a), apresentando tecido deteriorado no cotilédone, originando plântula normal (b).

Figura 8. Imagem radiográfica de semente de citrumelo 'Swingle' (a), apresentando tecido deteriorado na parte inferior da semente, originando plântula anormal (b).

Figura 9. Imagem radiográfica de semente de citrumelo 'Swingle' (a), apresentando embrião malformado e tecido deteriorado no cotilédono, resultando em semente morta (b).

Figura 10. Imagem radiográfica de semente de citrumelo 'Swingle' (a), apresentando má formação do cotilédono, originando plântula normal (b).

Figura 11. Imagem radiográfica de semente de citrumelo 'Swingle' (a), apresentando má formação dos cotilédones, originando plântula anormal (b).

Figura 12. Imagem radiográfica de semente de citrumelo 'Swingle' (a), apresentando embrião malformado, resultando em semente morta (b).

Figura 13. Imagem radiográfica de semente de citrumelo 'Swingle' (a), apresentando cotilédones malformados e tecidos deteriorados, resultando em semente morta (b).

Na Figura 14, pode-se observar a porcentagem de cada tipo de dano ocorrido nas sementes de citrumelo 'Swingle'. Verifica-se que o embrião malformado correspondeu a 58% das ocorrências, o dano por tecidos deteriorados, a 33% e tecidos deteriorados associados à má formação a 9%.

Figura 14. Percentual de cada dano ocorrido nas sementes de citrumelo 'Swingle', tecido deteriorado (TD), embrião malformado (EMF) e tecidos deteriorados associados à má formação (TD+MF).

O teste de raios X apresentou eficiência na avaliação da morfologia interna das sementes de citrumelo 'Swingle' e pôde-se verificar a presença de embriões malformados e tecidos deteriorados; estes danos quando localizados na parte inferior da semente resultaram em plântulas anormais ou em sementes mortas.

Diante destes resultados, é possível inferir a importância desta técnica, constituindo-se em mais uma alternativa para a análise de sementes, podendo ser incorporada em programas de controle de qualidade de sementes.

4.2. Experimento II: avaliação da poliembrionia de sementes de citrumelo 'Swingle' por meio do teste de raios X

Não foi possível realizar a análise de algumas sementes pelo teste de raios X e pelo método direto, devido ao elevado grau de deterioração; portanto, estas sementes foram classificadas sementes mortas e retiradas para as próximas

avaliações (distribuição da frequência de embriões, número de embriões por semente e poliembria). Desta forma, o número de sementes apresentou variação em todos os testes analisados. No teste de raios X, o número de sementes variou de 177 a 198 (lotes 4 e 1, respectivamente), e no método direto variou de 156 a 194 para os lotes 4 e 1, respectivamente (Tabela 6).

Na Tabela 6 pode-se observar o número de sementes, número de embriões, a distribuição da frequência de embriões, número médio de embriões por sementes e a taxa de poliembria de cada lote. Estas análises foram realizadas para verificar a eficiência do teste de raios X. De modo geral, observa-se que os resultados obtidos no teste de raios X foram semelhantes aos obtidos no método direto, com valores um pouco superiores deste último método.

Tabela 6. Resultados de número de sementes (S), número de embriões (E), distribuição de frequência de embriões, número de embriões por sementes (E/S) e a taxa de poliembria (Pol) de sete lotes de sementes de citrumeiro 'Swingle' analisados por meio do teste de raios X e pelo método direto (contagem de embriões).

Teste de raios X									
Lote	Número		Distribuição da Frequência de Embriões (%)					E/S	Pol. %
	S	E	1	2	3	4	5		
1	198	356	38	45	16	1	0	1,8	62
2	190	333	43	40	15	2	0	1,8	57
3	185	361	38	36	20	5	1	2,0	62
4	177	359	30	42	24	3	1	2,0	70
5	187	362	29	51	17	3	0	1,9	71
6	191	329	44	41	14	1	0	1,7	56
7	190	326	47	37	12	3	1	1,7	53

Método Direto									
Lote	Número		Distribuição da Frequência de Embriões (%)					E/S	Pol. %
	S	E	1	2	3	4	5		
1	194	378	33	44	19	4	0	1,9	67
2	177	358	31	42	21	5	1	2,0	69
3	160	340	29	40	21	8	2	2,1	71
4	156	330	26	42	26	5	1	2,1	74
5	179	378	27	40	27	6	0	2,1	73
6	186	347	37	41	19	3	0	1,9	63
7	189	341	42	40	14	4	1	1,8	58

A distribuição de frequência de embriões apresentou porcentagens semelhantes de sementes com o mesmo número de embriões no teste de raios X e no método direto para a maioria dos lotes. No teste de raios X foi possível identificar e quantificar até 5 embriões em cada semente (lotes 3, 4 e 7) (Figura 15a). Pelo método direto, além dos lotes 3, 4 e 7 foi observado também sementes com 5 embriões no lote 2 (Figura 15b). Em relação aos resultados obtidos na distribuição de frequência de 1, 2, 3 e 4 embriões nos dois testes apresentaram comportamentos semelhantes.

O número médio de embriões por sementes de cada lote, determinado por meio do teste de raios X variou entre 1,7 (lotes 6 e 7) a 2,0 (lotes 3 e 4) embriões. Resultado semelhante foi observado no método direto, com número médio de embriões por semente entre 1,8 (lote 7) a 2,1 (lotes 3, 4 e 5).

Em relação à poliembrionia os resultados obtidos de cada lote por meio do teste de raios X ficaram entre 53 a 71% (lotes 7 e 5, respectivamente), no método direto os resultados da taxa de poliembrionia de cada lote ficaram entre 58 a 74% para os lotes 7 e 4, respectivamente. Assim, não foram observadas variações amplas quanto à determinação da poliembrionia entre esses dois métodos.

No teste de raios X e no método direto foram observados embriões com diferentes tamanhos e formatos, segundo Frost e Soost (1968), os embriões de citros apresentam cotilédones carnosos, que constituem a maior parte do embrião maduro. Na semente monoembriônica de citros, geralmente o embrião possui dois cotilédones com tamanho e formato praticamente iguais (Figura 16); porém, em sementes com dois embriões observou-se diferenças de tamanho entre os cotilédones (Figura 17). Além disso, sementes com mais de três embriões apresentaram cotilédones de forma irregular, comparando com as sementes monoembriônicas (Figura 18). Mendes da Glória et al (2001) também observaram estas variações morfológicas em embriões das sementes de laranja 'Valencia'; segundo esses autores estas variações distintas nos cotilédones são características de embriões nucelares e podem ser explicadas pela competição por espaço no interior da semente.

No método direto foi possível observar que alguns embriões eram rudimentares; estes embriões normalmente de menor tamanho e de pouca espessura e foram observados, principalmente, em sementes com mais de 3

embriões, os quais são difíceis de identificar por meio do teste de raios X. Em alguns casos, estes embriões podem ser confundidos como tecidos deteriorados, pois a coloração desses embriões na imagem radiográfica aparecem com tons de cinzas mais escuro em relação às regiões com tecidos mais densos e espessos da semente.

Figura 15. Imagens radiográficas de sementes de citrumelo ‘Swingle’ (a), com as delimitações de cada embrião (b) e os cinco embriões por meio do método direto (c).

Figura 16. Imagens radiográficas de semente monoembriônica de citrumelo ‘Swingle’ (a), com a delimitação do embrião (b) e o embrião por meio do método direto (c).

Figura 17. Imagens radiográficas de semente poliembriônica de citrumelo ‘Swingle’ (a), com as delimitações dos embriões (b) e os embriões por meio do método direto (c).

Figura 18. Imagens radiográficas de semente poliembriônica de citrumelo ‘Swingle’ (a), com as delimitações dos embriões (b) e os embriões de diferentes formas e tamanhos por meio do método direto (c).

Na Tabela 7 estão os resultados da distribuição da frequência dos embriões, número de embriões por semente, o número médio de plântulas e a taxa de poliembrião, analisados por meio do teste de raios X e pelo método indireto. De modo geral, os resultados obtidos por meio das imagens radiográficas foram superiores aos resultados obtidos pelo método indireto.

No teste de raios X o número de sementes analisadas variou de 187 a 197 (lotes 6 e 1, respectivamente); já no método indireto os valores ficaram entre 102 a 144, lotes 5 e 2, respectivamente. O número de sementes neste último método foi inferior aos outros testes realizados; isso ocorreu pelo fato do método indireto, estar sujeito a vários fatores (potencial fisiológico, temperatura, entre outros) que podem influenciar na germinação das sementes, além de serem computados apenas as sementes que originaram plântulas normais.

Tabela 7. Resultados de número de sementes (S), número de embriões (E), distribuição de frequência de embriões, número de embriões por semente (E/S) ou número médio de plântulas por semente (P/S) e a taxa de poliembrião (Pol) de sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle' analisados por meio do teste de raios X e pelo método indireto (teste de germinação).

Teste de raios X									
Lote	Número		Distribuição da Frequência de Embriões (%)					E/S	Pol. %
	S	E	1	2	3	4	5		
1	197	326	46	44	9	1	0	1,7	54
2	186	324	41	45	13	1	0	1,7	59
3	193	306	51	39	10	0	0	1,6	49
4	187	315	41	50	9	0	0	1,7	59
5	188	316	46	41	12	1	0	1,7	54
6	187	299	50	41	9	0	0	1,6	50
7	188	347	38	43	16	3	0	1,8	62

Método Indireto									
Lote	Número		Distribuição da Frequência de Plântulas (%)					P/S	Pol. %
	S	P	1	2	3	4	5		
1	126	159	77	21	0	2	0	1,3	23
2	144	182	76	22	2	0	0	1,3	24
3	118	130	89	10	1	0	0	1,1	11
4	104	119	86	14	0	0	0	1,1	14
5	102	109	93	7	0	0	0	1,1	7
6	110	122	89	11	0	0	0	1,1	11
7	123	145	83	16	1	0	0	1,2	17

No teste de raios X foi possível identificar e quantificar até 4 embriões em cada semente (lotes 1, 2 e 5), já no método indireto isto foi observado apenas no lote 1. É importante destacar que pelo método indireto foi observada alta porcentagem de sementes com apenas 1 plântula; os valores ficaram entre 76 a 93%, diferentemente dos resultados observados pelo teste de raios X (49 a 62%). Alta porcentagem de sementes com apenas uma plântula, no método indireto, interferiu diretamente no número médio de plântulas por semente, ficou entre 1,1 a 1,2, resultados inferiores do teste de raios X, com variação de 1,6 a 1,8. Além disso, a alta porcentagem de sementes com 1 plântula no método indireto interferiu também na porcentagem de poliembrião (7 a 24%), inferior ao observado pelo método de raios X (49 a 62%). Carvalho e Silva (2013) também verificaram que para

sementes de citrumelo 'Swingle' a porcentagem média de poliembria é de 18,84%.

Trabalhos envolvendo o cultivo e a conversão de embriões nucleares em plantas em diferentes culturas (Wetzstein e Baker 1993; Nickle e Yeung 1994; Rodriguez e Wetzstein 1994; Padmanabhan et al. 1998; Passos et al. 1999; Fernando, 1999), têm sido relacionados à baixa taxa de conversão em plantas com as anormalidades presentes no meristema apical da radícula dos embriões. No caso de variedades poliembriônicas do gênero *Citrus*, a presença de embriões nucleares com problemas de desenvolvimento poderia explicar o baixo índice médio de formação de plântulas normais.

Nas Figuras 19 e 20 pode-se observar que o número de embriões identificados por meio das imagens radiográficas que coincidiram com o número de plântulas originado de cada semente. Na Figura 20a pode-se observar que foi identificado três embriões na imagen radiográfica e pelo método indireto originou três plântulas (Figura 20b). Nas Figuras 21 e 22 verifica-se que não houve coincidência entre o teste de raios X com o método indireto, pois na imagem radiográfica identificou três embriões (Figura 22a), entretanto esta semente originou duas plântulas (Figura 22b).

Figura 19. Imagens radiográficas de semente monoembriônica de citrumelo 'Swingle' (a), com a delimitação do embrião (b), originando uma plântula por meio do método indireto (c).

Figura 20. Imagens radiográficas de semente poliembriônica de citrumelo 'Swingle' (a), com as delimitações dos embriões (b), originando três plântulas por meio do método indireto (c).

Figura 21. Imagens radiográficas de semente poliembryônica de citrumelo ‘Swingle’ (a), com as delimitações dos embriões (b), originando uma plântula por meio do método indireto (c).

Figura 22. Imagens radiográficas de semente poliembryônica de citrumelo ‘Swingle’ (a), com as delimitações dos embriões (b), originando duas plântulas por meio do método indireto (c).

Na Figura 23 pode-se observar a porcentagem de sementes que coincidiu ou não o número de embriões por semente, observados no teste de raios X com o método direto e indireto, para os sete lotes de sementes e do total das sementes analisadas.

No método direto observou-se que, com exceção dos lotes 2 e 3, os demais lotes apresentaram valores superiores a 70% de coincidência com o teste de raios X. Vale ressaltar que para o lote 7 a taxa de coincidência foi de 83%. Para o método indireto os lotes apresentaram valores entre 50 a 58% de taxa de coincidência com o teste de raios X. No total de 1400 sementes analisadas, por meio do teste de raios X e confrontado com o método direto e o método indireto, no método direto a taxa de coincidência foi de 73%, e para método indireto foi de 54%.

Figura 23. Porcentagem de sementes que apresentou coincidência (S) e não coincidência (N) no número de embriões por semente analisados por meio do teste de raios X com o método direto (MD) e o método indireto (MI), para os sete lotes de sementes de citrumelo ‘Swingle’, para o total de 1400 sementes analisadas (TS).

No teste de raios X é difícil avaliar a quantidade exata de cotilédones, pois as imagens radiográficas são bidimensionais; mesmo assim, foi verificada alta porcentagem de coincidência com método direto. Portanto, este resultado é uma indicação de que essa tecnologia pode ser utilizada para a avaliação da poliembrião. No teste de raios X é possível determinar a quantidade de embriões

por semente, de modo mais rápido e sem destruir a semente, portanto é um método eficiente para avaliação da poliembrião.

4.3. Experimento III: avaliação do potencial fisiológico das sementes por meio dos testes de vigor tradicionais e avaliação do espaço livre da cavidade interna das sementes por meio do *software ImageJ*

4.3.1. Avaliação do potencial fisiológico das sementes

Nos resultados apresentados na Tabela 8, observa-se que, com exceção do tempo médio de germinação, as demais avaliações apresentaram diferença significativa entre os lotes. Na maioria dos testes conduzidos, o lote 2 foi que apresentou o melhor desempenho. Além disso, todos os lotes apresentaram redução no desempenho ao longo do armazenamento.

O grau de umidade dos lotes de sementes antes do armazenamento variou entre 28,7 a 29,9%; essa pequena variação proporciona maior segurança para os resultados, indicando que esse parâmetro não afetou o comportamento das sementes durante os testes realizados. Após 8 meses de armazenamento o grau de umidade variou entre 36,5 a 37,3 %, também foi uma pequena variação, porém comparando com o início do armazenamento houve aumento de 7 a 8% . Silva et al. (2011) observou resultado semelhante, pois em sementes de citrumele 'Swingle' armazenadas por 9 meses em camara fria (10°C), o grau de umidade teve um aumento de 6%. Bonome (2006) observou um aumento no grau de umidade para sementes de seringueira durante o armazenamento em embalagens impermeáveis; segundo o autor esse aumento foi devido ao tipo da embalagem associado ao alto grau de umidade em que as sementes foram armazenadas. Este fator contribui para o aumento da atividade metabólica das sementes e consequentemente, aumento na taxa respiratória, resultando em altas concentrações de CO₂ e condensação do vapor de água dentro da embalagem. Além disso, o alto grau de umidade das sementes contribuiu para a presença de patógenos, pois mesmo as sementes tratadas, após 8 meses de armazenamento apresentaram alta incidência de fungos.

A porcentagem de germinação das sementes variou entre 69 a 53%, para os lotes 2 e 4, respectivamente. Os lotes 1, 2 e 7 foram os lotes que apresentaram os melhores desempenhos, isto foi verificado para a primeira contagem de germinação, com exceção para o lote 7; já para velocidade de germinação somente o lote 2 apresentou o melhor desempenho, com o índice 2,0.

Na literatura as sementes de citrumelo 'Swingle' são consideradas recalcitrantes, baixa e lenta germinação (Carvalho et al., 2005), porém em vários trabalhos realizados com sementes citrumelo 'Swingle' observou-se que a porcentagem de germinação é superior ao que foi verificada nesta pesquisa, (Carvalho et al., 2002; Carvalho e Silva, 2013; Schafer et al., 2005; Dias et al., 2012). Os fatores que podem ter influenciado na porcentagem de germinação foram o grau de umidade inicial das sementes (Roberts, 1973; Von Pinho et al., 2005), a época da colheita dos frutos (Pompeu-Junior, 2005) e a condução do teste de germinação das semente com o tegumento (Carvalho, 2001).

Por outro lado, em pesquisa realizada por Zucareli et al. (2009) foi verificado que as sementes de citrumelo 'Swingle' toleram a dessecação até 16% de grau de umidade e semente sem tegumento favoreceu o processo germinativo das sementes. Para Silva e Carvalho (2007), as sementes de citrumelo 'Swingle' sem tegumento não interferiu na porcentagem total da germinação, porém influenciou na velocidade de germinação, favoreceu a formação de raízes enoveladas e a menor taxa de poliembrionia. O tegumento externo, sendo uma camada de tecido rígido (Queiroz-Voltan e Blumer, 2005), mantém a integridade da semente, evitando o crescimento da raiz primária em direções que favoreçam curvamentos e enovelamentos, e conseqüentemente favorecendo a maior taxa da poliembrionia.

Após 8 meses de armazenamento a porcentagem de germinação reduziu drasticamente para os lotes 5 e 6, de 54 e 56% para 0 e 3%, respectivamente. Já o lote 2 obteve o melhor desempenho, com 58% de germinação. Para primeira contagem e velocidade de germinação, também houve redução dos valores e apresentaram o mesmo ranqueamento dos lotes, sendo que o melhor e o pior desempenho para o lote 2 e 5, respectivamente (Tabela 8).

Quanto ao tempo médio de germinação, não houve diferença significativa entre os lotes no início do armazenamento e os valores ficaram por volta de 35 a 39 dias. Após 8 meses de armazenamento houve diferença significativa entre os lotes, sendo que os lotes 5 e 6 apresentaram os piores desempenhos; entretanto, no lote 5 não houve germinação, portanto o tempo médio de germinação foi nulo.

Tabela 8. Valores médios de grau de umidade, germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação dos sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle', no início e após 8 meses de armazenamento.

Avaliações	Lote						
	1	2	3	4	5	6	7
Grau de umidade (%)							
Início	29,1	29,9	29,6	28,7	29,2	29,3	29,7
8-meses	36,9	36,9	37,3	36,6	36,6	37,2	37,3
Germinação (%)							
Início	63 Aa*	69 Aa	56 Ab	53 Ab	54 Ab	56 Ab	62 Aa
8-meses	18 Bc	58 Ba	30 Bb	15 Bc	0 Bd	3 Bd	28 Bb
C.V. (%)	15,67						
Primeira contagem (%)							
Início	36 Aa	39 Aa	30 Ab	27 Ab	29 Ab	31 Ab	31 Ab
8-meses	8 Bb	31 Ba	12 Bb	4 Bc	0 Bc	3 Bc	16 Bb
C.V. (%)	22,13						
Velocidade de germinação							
Início	1,9 Ab	2,0 Aa	1,6 Ac	1,4 Ac	1,6 Ac	1,6 Ac	1,7 Ab
8-meses	0,5 Bc	1,5 Ba	0,8 Bb	0,4 Bd	- Be	0,1 Bd	0,7 Bb
C.V. (%)	14,55						
Tempo médio de germinação (dias)							
Início	35 Aa	35 Aa	38 Aa	39 Aa	36 Aa	35 Aa	36 Aa
8-meses	40 Aa	38 Aa	41 Aa	44 Ab	- Bc	49 Bb	37 Aa
C.V. (%)	14,64						

*Médias seguidas com a mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si por meio do teste de Scott-Knott, $p \leq 0,05$.

Como já foi mencionado, o alto teor de água das sementes favoreceu a presença de patógenos. Após 8 meses de armazenamento observou-se sementes com alta incidência de fungos. Koller et al. (1993) observou aumento da incidência de fungos, especialmente de *Penicillium* em sementes tratadas de *Poncirus trifoliata*, armazenadas em embalagens de polietileno com 35,5% de grau de umidade. O *Penicillium* spp. pode ocasionar a perda da capacidade germinativa e, durante o armazenamento, promover o aquecimento da massa de sementes com consequente aumento da taxa respiratória, provocando a deterioração mais rápida das sementes (Machado, 1988). A presença deste fungo foi um dos fatores que contribuiu para a deterioração das sementes durante o armazenamento.

Os resultados de emergência de plântulas em areia, número médio de plântulas por semente, taxa de poliembrionia, comprimento e massa de matéria seca

de plântulas da parte aérea e raiz estão apresentados na Tabela 9. Todos os lotes apresentaram redução no potencial fisiológico ao longo do armazenamento.

No início do armazenamento verifica-se que houve diferença significativa entre os lotes, porém os lotes foram classificados de maneira diferente em cada avaliação. Na emergência de plântulas em areia o resultado ficou entre 73 a 46% (lote 2 e 4, respectivamente), os lotes 3 e 4 apresentaram os piores desempenhos. Quanto ao comprimento da parte aérea e raiz das plântulas observou-se o mesmo ranqueamento dos lotes de melhor e pior desempenho, sendo que os de piores desempenhos foram os lotes 5 e 6. Para a massa de matéria seca da parte aérea os lotes que apresentam os piores desempenhos foram 1, 2, 4 e 5, já para massa de matéria seca de raiz não houve diferença significativa entre os lotes e os valores ficaram em torno de 0,047 a 0,058 gramas por plântula (lotes 1 e 7, respectivamente).

A porcentagem de emergência de plântulas foi superior a porcentagem de germinação (Tabela 9); esta fato ocorreu, devido a temperatura do ambiente em que o teste foi realizado ter sido superior a 25°C; a temperatura mais elevada favoreceu seu desenvolvimento. Camp et al. (1933) relatou que a temperatura ótima do solo para a germinação de citros deve estar em torno de 31 a 35 °C.

O número médio de plântulas por sementes e a taxa de poliembrionia não foram analisadas estatisticamente. O número médio de plântulas variou de 1,2 a 1,3. A taxa de poliembrionia variou de 16 a 31%, estes resultados foram semelhantes aos de Carvalho e Silva (2013) para sementes de citrumelo 'Swingle' armazenadas por 10 meses em camara fria a 5 °C, com média de poliembrionia de 18,84%. Guerra et al. (2012) relataram que as sementes de citrumelo 'Swingle' apresentam número médio de plântulas por semente de 3,1 e a taxa de poliembrionia de 94%.

De modo geral, na literatura existem diversos resultados para o número médio de plântulas por sementes e a taxa da poliembrionia, estas variáveis são influenciadas por fatores ambientais, nutrição da planta, cultivar, forma de polinização e variedade polinizadora (Moreira et al., 2010).

Tabela 9. Valores médios de emergência de plântulas em areia, número médio de plântulas por sementes, taxa de poliembrionia, comprimento e massa de matéria seca da parte aérea e da raiz de plântulas de sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle', no início e após 8 meses de armazenamento.

Tabela 3. Emergência de plântulas e aspectos morfológicos de mudas de <i>Albizia lebbek</i> em função do tempo de armazenamento.							
Avaliações	Lote						
	1	2	3	4	5	6	7
Emergência de plântulas em areia (%)							
Início	67 Aa*	73 Aa	54 Ab	46 Ab	64 Aa	62 Aa	66 Aa
8-meses	14 Bc	63 Ba	37 Bb	16 Bc	2 Bd	3 Bd	28 Bb
C.V. (%)	15,32						
Número médio de plântulas por sementes							
Início	1,3	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2
8-meses	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	1,0	1,2
Poliembrionia (%)							
Início	25	20	21	25	16	31	19
8-meses	21	16	16	10	0	0	16
Comprimento da parte aérea (cm por plântula)							
Início	7,13 Aa	7,17 Aa	7,53 Aa	7,15 Aa	6,52 Ab	6,71 Ab	7,37 Aa
8-meses	6,24 Ab	7,86 Aa	6,84 Ab	6,80 Ab	4,80 Bb	6,35 Ab	6,61 Ab
C.V. (%)	10,25						
Comprimento da raiz (cm por plântula)							
Início	15,95 Aa	14,81 Aa	15,20 Aa	15,66 Aa	12,18 Ab	11,42 Ab	14,57 Aa
8-meses	12,37 Ba	13,07 Aa	12,67 Aa	12,00 Ba	11,50 Aa	13,89 Aa	14,82 Aa
C.V. (%)	16,06						
Massa de matéria seca da parte aérea (g por plântula)							
Início	0,095 Ab	0,103 Ab	0,114 Aa	0,107 Ab	0,096 Ab	0,128 Aa	0,127 Aa
8-meses	0,050 Bb	0,089 Aa	0,078 Ba	0,053 Bb	0,057 Bc	0,011 Bc	0,071 Ba
C.V. (%)	12,25						
Massa de matéria seca da raiz (g por plântula)							
Início	0,047 Aa	0,049 Aa	0,050 Aa	0,052 Aa	0,050 Aa	0,056 Aa	0,058 Aa
8-meses	0,019 Bb	0,036 Ba	0,029 Ba	0,021 Bb	0,003 Bc	0,015 Bb	0,030 Ba
C.V. (%)	20,31						

*Médias seguidas com a mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha para cada avaliação, não diferem entre si por meio do teste de Scott-Knott, $p \leq 0,05$.

Após 8 meses de armazenamento observou-se que houve diferença significativa entre os lotes em todas as avaliações, com exceção para comprimento da raiz. Além disso, os lotes apresentaram redução no desempenho ao longo do armazenamento para emergência de plântulas em areia, massa de matéria seca da parte aérea e da raiz. O lote 2 e 5 foram os lotes de melhor e pior desempenho, respectivamente, para a maioria das avaliações. Para o número médio de plântulas por sementes e a taxa da poliembrião houve também redução dos valores entre todos os lotes, porém a redução foi mais acentuada para os lotes 5 e 6.

Diante dos resultados obtidos das avaliações do potencial fisiológico das sementes, no início e após 8 meses de armazenamento, foi possível classificar os lotes de sementes de citrumelo 'Swingle', sendo que o lote 2 teve o comportamento superior e o lote 5 apresentou comportamento inferior que os demais lotes. O potencial fisiológico de sementes é compreendido como a soma da capacidade germinativa e do vigor. Portanto, o uso de testes de vigor possibilita a obtenção de informações mais consistentes sobre o potencial fisiológico dos lotes de sementes. É preciso considerar também que o vigor reflete a manifestação de um conjunto de características que determinam o potencial para a emergência rápida e uniforme de plântulas, o que dificulta a utilização de um único teste para classificar os lotes e avaliar de forma segura o potencial de desempenho de um lote após o armazenamento e, ou em campo (Barbosa et al., 2011).

4.3.2. Avaliação do espaço livre da cavidade interna das sementes por meio do software *ImageJ*

Análise das imagens radiografadas por meio do software *ImageJ* foi eficiente para mensurar o espaço livre da cavidade interna das sementes de citrumelo 'Swingle'. Desta maneira, foi possível a separação das sementes em quatro categorias, auxiliando no estudo em relacionar a morfologia interna das sementes com a germinação. Segundo Dell' Aquila (2007a), métodos computadorizados que utilizam alta velocidade de captura e processamento de imagens podem prover alto nível de eficiência para análises de qualidade de sementes.

Os resultados do espaço livre na cavidade interna das sementes de citrumelo 'Swingle' estão apresentados na Tabela 10. Observa-se que houve diferença significativa no início e após 8 meses de armazenamento entre os lotes.

No início do armazenamento o espaço livre interno das sementes variou de 14,4 a 16,4% em relação a área total das sementes, para o lote 7 e 5, respectivamente. Após 8 meses de armazenamento o espaço livre interno das sementes ficou em torno de 11,7 a 15,6%, para os lotes 1 e 6, respectivamente.

De modo geral, verifica-se que o espaço livre interno das sementes diminuiu ao longo do armazenamento; esse decréscimo foi mais acentuado para os lotes 1 e 2. Este fato pode estar relacionado com o grau de umidade das sementes, pois no início e após os 8 meses de armazenamento o grau de umidade médio dos lotes foram de 29,4 e 36,9%, respectivamente. Parmejini (2013), avaliando a tolerância à dessecação de sementes de pupunha, observou que sementes com alto teor de água apresentaram menor porcentagem do espaço livre na cavidade interna das sementes.

Tabela 10. Espaço livre (%) na cavidade interna de sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle', avaliado por meio do *software ImageJ*, no início e após 8 meses de armazenamento.

Espaço livre (%)	Lote						
	1	2	3	4	5	6	7
Início	15,7 Ba	15,6 Ba	14,5 Aa	15,4 Aa	16,4 Ab	15,2 Aa	14,4 Aa
8-meses	11,7 Aa	12,4 Aa	14,1 Ab	14,2 Ab	15,2 Ab	15,6 Ab	14,3 Ab
C.V. (%)	8,66						

*Médias seguidas com a mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha para cada avaliação, não diferem entre si por meio do teste de Scott-Knott, $p \leq 0,05$.

No início do armazenamento o lote 5 foi que apresentou maior espaço livre interno das sementes, relacionando o espaço livre com o potencial fisiológico das sementes, o lote 5 foi um dos lotes que obteve o pior desempenho na maioria das avaliações; isto foi observado também após 8 meses de armazenamento, quando a redução do potencial fisiológico foi mais acentuada. Por outro lado, os lotes 1 e 2 apresentaram o menor espaço livre após 8 meses de armazenamento e relacionando com o potencial fisiológico das sementes, o lote 2 foi um dos lotes que obteve o melhor desempenho na maioria das avaliações.

Na Figura 24, observa-se a porcentagem de sementes e de germinação de sementes de citrumelo 'Swingle' em cada categoria de espaço livre interno das sementes, avaliado por meio do *software ImageJ*, no início e após 8 meses de armazenamento.

Início do armazenamento

8 meses de armazenamento

Figura 24. Porcentagem de sementes e de germinação de sete lotes de sementes de citrumelo 'Swingle', em cada categoria de espaço livre na cavidade interna das sementes (C1 = < 8,7%; C2 = 8,7 a 15,4%; C3 = 15,4 a 22,1% e C4 = >22,1%), avaliado por meio do *software ImageJ*, no início e após 8 meses de armazenamento.

No início do armazenamento o espaço livre interno e a germinação ocorreram de forma diferenciada para os sete lotes avaliados. Todos os lotes apresentaram alta porcentagem de sementes classificadas na categoria C2 (espaço livre = 8,7 a 15,4%), a maioria dessas sementes originaram alta porcentagem de plântulas normais, com exceção do lote 5.

As sementes classificadas nas categorias C1 e C3, também originaram alta porcentagem de plântulas normais; por outro lado, sementes classificadas na categoria C4, espaço livre na cavidade interna da semente superior a 22,1%, apresentaram menor potencial germinativo das sementes. Em pesquisas realizadas, com outras espécies, também foi observado que sementes parcialmente formadas, com espaço livre interno, originaram plântulas anormais ou não germinaram, para sementes de embaúba (Pupim et al., 2008), aroreira (Machado e Cicero, 2003), pimentão (Gagliardi e Marcos-Filho, 2011). Dell'Aquila (2007b) constatou que sementes de pimentão com espaço livre interno superior a 2,7% originaram plântulas anormais ou não germinaram.

Ainda no início do armazenamento, o lote 2 foi que apresentou a maior porcentagem de sementes na categoria C1 e a partir dessas sementes originaram 81% de plântulas normais; como já foi mencionado, o potencial fisiológico deste lote foi superior na maioria das avaliações realizadas (Tabela 8 e 9). Por outro lado, os lotes 5 e 6 apresentaram maior porcentagem de sementes na categoria C4 e originaram baixa porcentagem de plântulas normais, 25 e 41% respectivamente; o potencial fisiológico destes lotes foi inferior com os demais lotes na maioria das avaliações realizadas.

É importante destacar que o lote 2 teve a porcentagem de sementes na categoria C4 semelhante aos lotes 5 e 6; no entanto, a porcentagem de germinação de plântulas normais foi superior aos demais lotes na mesma categoria (C4). Este fato demonstra a atuação de outros fatores responsáveis pela manifestação do potencial fisiológico das sementes, como por exemplo, a ação de microrganismos e a deterioração natural das sementes, sem apresentação de sintomas visíveis nas imagens radiográficas (Van der Burg et al., 1994). Provavelmente estes fatores também influenciaram os resultados dessa pesquisa, pois sementes com espaço livre interno semelhante originaram plântulas normais ou plântulas anormais (Figura 25).

Figura 25. Imagens radiográficas de sementes de citrumelo 'Swingle' (A, B, C, D, E, F, G, H), representativas de cada categoria de espaço livre (A e B – categoria C1; C e D – categoria C2; E e F – categoria C3; G e H – categoria C4), com suas respectivas plântulas normais (A', C', E', G') ou anormais (B', D', F', H).

Após 8 meses de armazenamento o espaço livre na cavidade interna e a germinação ocorreram também de modo diferenciado para todos os lotes (Figura 24). De maneira similar ao que ocorreu no início do armazenamento, todos os lotes apresentaram alta porcentagem de sementes na categoria C2, com exceção do lote 4 que apresentou alta porcentagem de sementes na categoria C1.

Vale ressaltar que após 8 meses de armazenamento houve aumento na porcentagem de sementes na categoria C1, ou seja, houve redução do espaço livre interno das sementes. Este fato leva ao questionamento sobre a provável redução da área embrionária das sementes durante o armazenamento, pois se sabe, até o momento, que ao longo deste processo há um consumo de reservas pelo eixo embrionário, o que poderia levar a um aumento do espaço livre e não à sua redução. No entanto nesta pesquisa, a redução do espaço livre pode estar relacionada com o aumento do grau de umidade, não com o grau de desenvolvimento do embrião. Além disso, após 8 meses de armazenamento foi difícil relacionar o espaço livre interno com o potencial germinativo de cada lote, pois houve uma redução bem acentuada do potencial fisiológico destas sementes, principalmente para os lotes 5 e 6, a porcentagem de germinação foi de 0 e 3%, respectivamente.

No entanto, no início do armazenamento foi possível relacionar o espaço livre interno das sementes com o desempenho das sementes, pois lotes que apresentaram alta porcentagem na categoria C4, ou seja, espaço livre interno superior a 22,1%, diminuíram o potencial germinativo das sementes. De acordo com os resultados obtidos verificou-se a eficiência da utilização do *software ImageJ* para mensurar o espaço livre na cavidade interna das sementes de citrumelo 'Swingle'.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa, a análise de imagens de raios X foi eficiente na identificação de embriões malfomados e danos associados à deterioração de tecidos em sementes de citrumelo 'Swingle', permitindo estabelecer relação entre sua ocorrência e prejuízos causados à germinação. Além disso, foi possível verificar, numericamente, que o lote 2 teve comportamento superior e os lotes 4 e 5 apresentaram comportamento inferior aos demais lotes.

Além de identificar os danos que influenciam na germinação, a análise de imagens de raios X foi eficiente para identificar e quantificar os embriões de cada semente, sendo assim, a análise radiográfica é um método eficiente para avaliar a poliembrionia de sementes de citrumelo 'Swingle', pois apresentou 73% de coincidência com o método mais preciso para avaliar da poliembrionia.

A análise por meio do *software ImageJ* a partir de imagens radiográficas possibilitou a determinação do espaço livre interno das sementes; este software é semelhante ao *Tomato Analyzer*[®] e *Image-Pro Plus*[®], sendo uma nova alternativa para avaliar o grau de desenvolvimento do embrião. Desta forma, foi possível relacionar o espaço livre com o desempenho das sementes, visto que lotes que apresentaram alta porcentagem de sementes com o espaço livre, superior a 22,1%, apresentaram prejuízos ao potencial germinativo.

As pesquisas utilizando recursos de análise de imagens devem continuar com o intuito de estabelecer relações entre a morfologia interna das sementes e o potencial fisiológico, que poderá produzir informações importantes para a evolução do conhecimento dirigido para o controle de qualidade de sementes.

6. CONCLUSÕES

- a) A análise de imagens de raios X permite a identificação de danos internos em sementes de citrumelo 'Swingle', com efeitos negativos na germinação.
- b) A análise de imagens de raios X permite identificar e quantificar os embriões de cada semente, principalmente comparado com o método mais preciso (contagem de embriões) e é eficiente para avaliar a poliembrionia de sementes de citrumelo 'Swingle'.
- c) A análise de imagens de raios X por meio do *software ImageJ* permite mensurar o espaço livre na cavidade interna das sementes; alta porcentagem de sementes com espaço livre interno superior a 22,1% prejudica o potencial germinativo de sementes de citrumelo 'Swingle'.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. S.; GUIMARÃES, R. M. Avaliação da qualidade de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.) pelo teste de raios X. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 32, n. 6, p. 1713-1718, 2008.
- ARRUDA, N.; CICERO, S. M.; GOMES-JUNIOR, F. G. Radiographic analysis to assess the seed structure of *Crotalaria juncea* L. **Journal Seed Science**, Londrina , v. 38, n. 2, p. 161-168, 2016 .
- BARBOSA, R.M.; COSTA, D.S.; SÁ, M.E. Envelhecimento acelerado em sementes de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1899-1902, 2011.
- BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Science Agricola**, Piracicaba, n. 55 (número especial), p.121-125, 1998
- BEWLEY, J.D.; BLACK , M. **Seed physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 420p.
- BINO, R. J.; AARTSE, J. W.; BURG, W. J. van der. Nondestructive X-ray of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 2, p. 167-170, 1993.
- BONOME, L. T. S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira (*Hevea* sp.) durante o armazenamento**. 2006. 136p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 395p.
- BREWER, M. T.; LANG, L. K.; DUJMOVIC, N.; GRAY, M. VAN DER KNAAP, E. Development of a controlled vocabulary and software application to analyze fruit

shape variation in tomato and other plant species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 1, p. 15-25, 2006.

BREWER, M. T.; MOYSEENKO, J. B.; MUNIFORTE, A. J.; VAN DER KNAPP, E. Morphological variation in tomato: a comprehensive study of quantitative trait loci controlling fruit shape and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n.6, p. 1339-1349, 2007.

CAMP, A. F.; MOWRY, H.; LOUCKS, K. W. The effect of soil temperature on the germination of citrus seeds. **American Journal of Botany**, v. 20, p. 348-357, 1933.

CARVALHO, J. A. **Conservação de sementes de citros**. 2001. 140p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, LAVRAS, 2001.

CARVALHO, J.A.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M; BONOME, L.T. Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de Citromelo swingle. **Resvista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n.1, p. 263-270, 2002.

CARVALHO, L. R.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C.. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae. **Revista Brasileira Sementes**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 57-66, 2009.

CARVALHO, M. L. M.; ALVES, R. A.; OLIVEIRA, L. M. Radiographic analysis in castor bean seeds (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 170-175, 2010.

CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M. Raios X na avaliação da qualidade de sementes. **Informativo Abrates**, Curitiba, v. 16, n. 1/3, p. 2-3, 2006.

- CARVALHO, M. L. M.; VAN AELST, A. C.; VAN ECK, J. W.; HOEKSTRA, F. A. Pre-harvest stress in maize (*Zea mays* L.) kernels as characterized by visual, X ray and digital imaging. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, n.3, p.227-236, 1999.
- CARVALHO, S.A.; CESAR, C.; GRAF, D. VIOLANTE, A. R. Produção de material básico e propagação. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D. de; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. 929p.
- CARVALHO, S. A.; SILVA, L. F. Monitoring the viability of citrus rootstocks seeds stored under refrigeration. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n.1, p. 238-245, 2013.
- CICERO, S. M.; BANZATTO 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**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 25-28, 2003.
- CICERO, S.M.; VAN DER HEIJDEN, G.W.A.M.; VAN DER BURG , W.J.; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 26, p. 603-612, 1998.
- CURSI, P. R.; CICERO, S. M.. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe edulis* Martius seeds. **Journal Seed Science**, Londrina , v. 36, n. 2, p. 134-142, 2014
- CRAVIOTTO, R. M.; YOLDJIAN, A. M.; SALINAS, A. R.; ARANGO, M. R.; BISARO, V.; MATURO, H. Description of pure seed fraction of oat through usual evaluations and radiographic images. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 8, p. 1183-1188, 2002.
- DAVIES, F.S. ALBRIGO, L.G. **Citrus**. Wallingford: Cob International, 1994. 254p.

- DELL'AQUILA, A. The use of image analysis to monitor the germination of seeds of broccoli and radish. **Annals of Applied Biology**, v. 146, p. 545-550, 2005.
- DELL'AQUILA, A. Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. **Seed Science and Technology**, v.35, p.519-538, 2007a.
- DELL'AQUILA, A. Pepper seed germination assessed by combined X-radiography and computer-aided imaging analysis. **Biologia Plantarum**, Praha, v.51, p.777-781, 2007b.
- DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; TOKUHISA, D.; HILST, P. C. Teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 154-162, 2006.
- DIAS, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; GOMES-JUNIOR, F. G.; CICERO, S. M. Morphological changes and quality of papaya seeds as correlated to their location within the fruit and ripening stages. **IDESIA** (Chile), v. 32, n. 1, p. 27-34, 2014.
- DIAS, M. A.; ZUCOLOTO, M.; DIAS, D. C. F. S.; SILVA, D. F. P.; SEDIYAMA, C. A. Z.; SOUZA-NETO, J. D. Resposta fisiológica de sementes de variedades porta-enxertos de citros submetidas à condicionamento osmótico. **Comunicata Scientiae**, v.3, n. 4, p. 238-243, 2012.
- FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos da embriogênese somática *in vitro* em soja (*Glycine max* (L) Merrill)**. 1999. 86p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- FONSECA, S.C.L.; FREIRE H. B. Sementes recalcitrantes: Problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n.2, p.297-303, 2003.
- FROST, H.B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H. J. **The citrus industry**. University of California, Riverside, p. 290-324, 1968.

- GAGLIARDI, B.; MARCOS-FILHO, J. Relationship between germination and Bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n.4, p.411-416, 2011.
- GOMES JUNIOR, F. G.; CHAMMA, H. M. C. P. CICERO; S. M. Automated image analysis of seedlings for vigor evaluation of common bean seeds. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 36, n.2, p. 195-200, 2014.
- GREVE, A.; PRATES, H.S.; MULLER, G.W. Produção de borbulhas certificadas de citros no Estado de São Paulo. In: RODRIGEZ, O. et al., **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, v.1, n.2, p.302-317. 1991.
- GUERRA, D.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; SCHWARZ, S. F.; SOUZA, P. V. D.; WEILER, R. L. Caracterização morfológica, determinação do número de embriões e taxa de poliembrionia em três porta-enxertos híbridos de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 196-201, 2012.
- HOFFMASTER, A.L.; FUJIMURA, K.; McDONALD, M.B.; BENNETT, M.A; An automated system for vigour testing three day soybean seedlings. **Seed Science and Technology**, v. 31, p. 701-713, 2003.
- HOWARTH, M.S. AND STANWOOD, P.C. Measurement of seedling growth rate by machine vision. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineer**, v. 36, p. 959–963, 1993.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. Sistema de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>>. Acesso em:
25 de outubro de 2015.
- INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Rules for seed testing. **ISTA**. Switzerland, 1996. 323p.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING. **ISTA**. Zurich, 2004. 180 p.

KING, M.W.; SOESTINA, U.; ROBERTS, E.H. The dry storage of *Citrus* seeds. **Annals of Botany**, London, v.48, p.865-872, 1981.

KOLLER, O. L.; STUKER, H.; VERONA, L. F. Efeito da umidade e temperatura de estocagem e duração da estocagem sobre a germinação de *Poncirus trifoliata* e outros porta-enxertos de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 15, n. 1, p. 27-33, 1993.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LIU, Y.; VAN DER BURG, W. J.; AARSTE, J. W.; VAN ZWOL, R. A.; JALINK, H.; BINO, R. J. X-ray studies on changes in embryo and endosperm morphology during priming and imbibitions of tomato seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, p. 171-178, 1993.

MACHADO, C. F. **Metodologia para condução do teste de germinação e utilização de raios-X para a avaliação da qualidade de sementes de aroeira branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.)**. 2002. 51p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MACHADO, C. F.; CICERO, S. M. 'Aroeira branca' seed quality evaluation by the X-ray test. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 393-397, 2003.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC; ESAL; FAEPE, 1988. 106 p.

- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D. de; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. 929p.
- MARCHI, J. L., **Avaliação da qualidade de sementes tratadas com fungicida e inseticida, incluindo a análise de imagens**. 2010. 88p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 660 p.
- MARCOS-FILHO, J.; GOMES-JUNIOR, F. G.; BENNETT, M. A.; WELLS, A. A.; STIEVE, S. Using tomato analyzer software to determine embryo size in X-rayed seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p. 146-153, 2010.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in relation evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MASSETO, T. E.; FARIA J. M. R.; QUEIROZ, S. E. E. Avaliação da qualidade de sementes de cedro pelo teste de raios X. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1708-1712, 2008.
- McCORMAC, A.C.; KEEFE, P.D. Cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seed vigour: imbibition effects. **Journal of Experimental Botany**, v.41, p. 893-899, 1990.
- MENDES-DA-GLORIA, F. J.; MOURAO FILHO, F. A. A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Morfologia de embriões nucelares de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo , v. 15, n. 1, p. 17-25, 2001 .
- MONDO, V. H. V.; GUILHIEN JUNIOR, F. G.; PUPIM, T. L.; CICERO, S. M. Avaliação de danos mecânicos em sementes de feijão por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 2, p.27-035, 2009.

- MOREIRA, R.A.; RAMOS, J.D.; CRUZ, M.C.M. Caracterização de frutos e poliembrionia em sementes de 'Flying Dragon' e de híbridos de porta-enxerto de citros. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, 2010.
- MOREIRA, S.; SALIBE, A. A. Nucellar lines in the State of São Paulo, Brazil. In: **Internation Organizaion Citrus Virologist**, Campinas. Proceedings... Gainesville: University of Florida Press, p. 309-313. 1965.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. Poliembrionia em *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.7, p.69-106, 1947.
- NASSIF, D.S.P.; CÍCERO, S.M. Avaliação de sementes de acerola por meio de raios X. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 542-545, 2006.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**, Ribeirão Preto: v.1. 2010.137p.
- NICKLE, T. C.; YENG, E. C. Further evidence of a role for abscisic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*. **In vitro Cellular and Development Biology**, v. 30, n. 2, p. 96-103, 1994.
- OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M.; MASSETO, T. E. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e t. *Impetiginosa* (Martius ex a. p. de Candolle) Standley – (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.26, n.2, p.138-143, 2004.
- OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; RADMANN, E.B. Procedimento para o armazenamento de sementes de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.461-463, 2003.

- PADMANABHAN, K.; CANTLIFFE, D. J.; HARRELL, R. C. A comparison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using computer vision and histological analyses. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 9, p. 685-692, 1998.
- PARMEJIANI, R. S. **Avaliação da sensibilidade de sementes de pupunha à dessecação**. 2013. 48p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PASSOS, I.; APPEZZATO-da-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C. Embryogenic responses of *Vitis* spp: effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. **Vitis**, v. 38, n.2, p. 47-50, 1999.
- PASSOS, O.S.; PEIXOUTO, L.S.; SANTOS, L.C.S.; CALDAS, R.C.; FILHO, W.S.S. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n.3, p. 410-413, 2006.
- PAZANI, C.R.; PRATES, H.S.; GREVE, A. Sistema de produção de muda certificada de citros no Estado de São Paulo. **Revista Laranja**, v.23, n.2, p-371-386, 2002.
- PINTO, T. L. F., CICERO, S. M., FRANÇA-NETO, J. B.; FORTI, V. A. An assessment of mechanical and stink bug damage in soybean seed using X-ray analysis test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.37, p.110-120, 2009.
- POMPEU-JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU-JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. 929p.
- PUPIM, T.L.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CARVALHO, M.L.M.; CÍCERO, S.M. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, p.028-032, 2008.

- QUEIROZ-VOLTAN, B.; BLUMER, S. Morfologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M. e POMPEU-JUNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. 2005. cap.5, p.105-123.
- RASBAND, W., *ImageJ* documentation. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, acesso em 25/10/2016.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499-514, 1973.
- ROCHA, C.R.M.; SILVA, V.N.; CICERO, S.M. Internal morphology and germination of sunflower seeds. **Journal Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2014.
- RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, Y. H. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. **Plant Cell Reports**, v. 13, n.11 , p. 607-611, 1994.
- SAHLEN, K.; BERGSTEN, U.; WIKLUND, K. Determination of viable and dead Scots pine of different anatomical maturity after freezing using the IDX method. **Seed Science Research**, v. 23, p. 405-414, 1995.
- SCHAFER, G.; SOUZA, P. V. D.; DAUDT, R. H. S.; DORNELLES, A. L. C. Substratos na emergência de plântulas e expressão da poliembrionia em porta-enxertos de citros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 471-474, 2005.
- SAKO, Y.; McDONALD, M. B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A.F.; BENNETT, M. A. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and technology**, Zurich, v. 29, p. 625-636, 2001.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**: getting started with the SAS learning. Cary, 2000. 8 p.

- SCHUCH, L. O. B.; LIN, S. N. efeito do envelhecimento rápido sobre o desempenho de sementes e de plantas de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.8, p.1163-1170, 1982.
- SILVA, D. G.; OLIVEIRA, L. M.; CALDEIRA, C. M.; SILVA, C. D.; CARVALHO, M. L. M.; GOMES, L. A. A. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**, Porto Seguro, v.5, 2007a.
- SILVA, D. G.; OLIVEIRA, L. M.; CALDEIRA, C. M.; SILVA, C. D.; CARVALHO, M. L. M.; GOMES, L. A. A. Técnica de raios x na avaliação e melhoria da qualidade de sementes de melancia. **Horticultura Brasileira**, Porto Seguro, v.5, 2007b.
- SILVA, L. F. C.; CARVALHO, S. A. Germinação da semente de porta-enxertos de citros em função da presença do tegumento e a sua orientação no substrato. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 28, n. 1-2, p. 47-59, 2007.
- SILVA, T. T. A.; GUIMARÃES, R. M.; VON PINHO, E. V. R.; ABREU, L. A. S. Storage of 'Swingle' citrumelo seeds in different maturation stages subjected to fungicide treatment. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 768-776, 2011.
- SILVA, V. N.; ARRUDA, N.; CICERO, S. M.; ALBERTO, C. M.; GIACOMELI, R. Morfologia interna e germinação de sementes de arroz de terras baixas produzidas em diferentes regimes hídricos. **Irriga**, Botucatu, v.19, n.3, p. 453-463, 2014.
- SILVA, V. N.; CICERO, S. M.; BENNETT, M. Relationship between eggplant seed morphology and germination. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n.4, p.597-604, 2012.
- SILVA, V. N.; CICERO, S. M.; BENNETT, M. Associations between X-ray visualised internal tomato seed morphology and germination. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 41, n.2, p.225-234, 2013a.

- SILVA, V. N.; SARMENTO, M. B.; SILVEIRA, A. C.; SILVA, C. S.; CICERO, S. M. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.35, n. 4, p. 1158-1169, 2013b.
- SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON, A.G.; GOSLING, P.; WANG, B.S.P. (Ed.). **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: ISTA, 1991. p. 1-28.
- SIMAK, M.; BERGSTEN, U.; HENRIKSSON, G. Evaluation of ungerminated seeds at the end of germination test by radiography. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 17, n. 2, p. 361-369, 1989.
- SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, Lund, v. 39, p. 458-468, 1953.
- SPIEGEL-ROY, P. GOLDSCHMIDT, E.E. **Biology of citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230p.
- SOUZA NETO, A. G. S. **Avaliação da área foliar de cinco espécies florestais ocorrentes no semiárido paraibano**. 2009. 37p. Monografia (Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos.
- SWAMINATHAN, M. S.; KAMRA, S. K. X-ray analysis of the anatomy and viability of seeds of some economic plants. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, New Delhi, v.21, n.2, p. 129- 135, 1961.
- TÉOFILO SOBRINHO, J. Propagação de citros. In: RODRIGUEZ, O. (Ed). **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 281-301, 1991.

- USBERTI, R.; FELIPE, G. M. Viabilidade de sementes de *Citrus limonia* Osb. com baixo teor de umidade, armazenadas em diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 4, p.393-397, 1980.
- VAN der BURG, W.J.; AARTSE, J.W.; ZWOL, R.A. van; JALINK, H.; BINO, R.J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 2, p. 258-263, 1994.
- VAN der HEIJDEN, W.G.A.M., POLDER, G., VAN ECK, J.W., JALINK, H. AND VAN der SCHOOR, R. Automatic determination of germination of seeds. **Word Seed Conference**, Cambridge, UK, Programme and Abstracts, 1999. 14p.
- VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p. 1-26, 1999.
- VON PINHO, E. V. R.; SILVA, T. T. A.; CARVALHO, J. A.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M. Conservação de sementes de citrumelo Swingle. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 30, p. 178-185, 2005.
- WETZSTEIN, H. Y.; BAKER, C. M. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v.92, n. p. 81-89, 1993.
- ZABOT, L.; DUTRA, L.M.C.; MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C.; LUDWIG, M.P.; SANTOS, V, J. Uso de imagens digitais para avaliação de plântulas de Feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, nº 2, p.184-192, 2008.
- ZUCARELI, V.; BONJOVANI, M.R.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Tolerância à dessecação e influência do tegumento na germinação de sementes de citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 291-295, 2009.