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

**Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de
clorofila com o potencial fisiológico de sementes de arroz**

Artur Sousa Silva

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

**Piracicaba
2021**

Artur Sousa Silva
Engenheiro Agrônomo

Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com o potencial fisiológico de sementes de arroz

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2021

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

Silva, Artur Sousa

Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com o potencial fisiológico de sementes de arroz / Artur Sousa Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

73 p.

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

1. *Oryza sativa* L. 2. Espaço vazio 3. Reflectância espectral 4. Eficiência fotossintética de plântulas I. Título

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela vida, por me abençoar e permitir a realização dos meus sonhos, especialmente pela força para concluir esse trabalho.

À minha mãe **Antonia Maria**, pela educação e todo amor que me deu e por sempre me mostrar o poder de acreditar em si mesmo.

Ao meu pai **Valdir Gomes**, por sempre acreditar e apoiar em todos os momentos.

À minha irmã **Laysa**, por toda a amizade e parceria ao longo desses anos.

Aos meus avós **Dico** e **Francisca**, por todo amor, apoio e compreensão.

Aos meus avós **Eunice** e **José** (*in memoriam*), que partiram durante a graduação, mas sempre estiveram presentes em pensamento.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio, pelo incentivo, amor e apoio, a estudar e a fazer o melhor com responsabilidade e coragem.

À Universidade de São Paulo, a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela concedida oportunidade de estudar com excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Silvio Moure Cicero, pela orientação, dedicação, paciência e confiança durante esses anos de convivência, com excelentes sugestões, opiniões e força.

Ao Prof. Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior, pelas grandes contribuições neste trabalho, pela amizade e exemplo profissional.

Ao Dr. Paulo Hideo e a Embrapa Arroz e Feijão pela concessão das sementes para o estudo.

Ao Prof. Dr. Júlio Marcos Filho, pela oportunidade de ingressar na Esalq a partir do estágio na graduação e pelo aprendizado.

À Eng. Agr. Ms. Helena M. C. P. Chamma, pela amizade, ensinamentos e auxílio nas análises em Laboratório.

Aos servidores não docentes do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Adilson, João, David, Hodair e Luiz Claudio pelo apoio constante durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela disponibilidade de utilização dos equipamentos *VideomaterLab*, *SeedReporter* e Sistema de Radiografia *MultiFocus*, vinculados ao Projeto Jovem Pesquisador em Centros Emergentes – Processo 2017/15220-7.

À Dra. Clíssia Barboza da Silva, pelos treinamentos para utilização dos equipamentos acima referidos e por toda ajuda na condução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Instrumentação Nuclear (CENA/USP), em especial ao Prof. Dr. Hudson de Carvalho, pela disponibilidade da câmara de crescimento vegetal.

Ao Ms. Fabiano França, pela ajuda e apoio na elaboração e condução deste trabalho.

Ao Ms. André Medeiros, pela colaboração na análise estatística, que contribuiu bastante para a qualidade do trabalho.

Aos amigos do Setor de Tecnologia de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da Esalq, Abimael Filho, Bruno Cardillo, Carlos Henrique, Lívia Rohr, Lucas Capelaro, Mayara Rodrigues, Nielsen Oliveira, Rafael Alves, Patrícia Galletti, por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho e pela amizade.

À amiga Joelma, por me acolher em sua casa, pelo cuidado e carinho.

Aos amigos de lar, Arthur Paro e Fernando Madalon pelo acolhimento, apoio e amizade.

*“Há multidões em mim.
Na mesa de minha alma sentam-se muitos,
e eu sou todo eles.”
Friedrich Nietzsche*

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Experimento 1: Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência da clorofila com o potencial fisiológico das sementes.....	21
3.1.1 Teste de raios X	21
3.1.2 Aquisição das imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila com o equipamento <i>VideometerLab</i>	23
3.1.3 Aquisição das imagens de fluorescência de clorofila ‘a’ com o equipamento <i>SeedReporter</i> ®	25
3.1.4 Análise computadorizada de imagens de plântulas (<i>SVIS</i> ®).....	25
3.1.5 Imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila das glumelas e do endosperma + embrião das sementes.....	26
3.1.6 Avaliações complementares	27
3.1.6.1 Germinação.....	27
3.1.6.2 Envelhecimento acelerado	27
3.1.6.3 Emergência de plântulas em areia	28
3.1.6.4 Condutividade elétrica	28
3.1.6.5 Análise computadorizada de imagens de plântulas (<i>SVIS</i> ®).....	28
3.2 Experimento 2: Relações entre as imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com a eficiência fotossintética das plântulas	29
3.2.1 Avaliação da eficiência fotossintética das plântulas.....	29
3.3 Análise estatística	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Experimento 1: Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência da clorofila com o potencial fisiológico das sementes.....	33
4.2 Experimento 2: Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com a eficiência fotossintética das plântulas	52
5. CONCLUSÕES	61

REFERÊNCIAS	63
-------------------	----

RESUMO

Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com o potencial fisiológico de sementes de arroz

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de sementes de arroz utilizando técnicas de análise de imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila e relacionar essas informações com o potencial fisiológico das sementes e a eficiência fotossintética das plântulas; para tanto, foram utilizados seis lotes de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana. Foram realizados dois experimentos: 1) relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência da clorofila com o potencial fisiológico das sementes; 2) relações entre as imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com a eficiência fotossintética das plântulas. No experimento 1, com as sementes identificadas e enumeradas, foi realizada a obtenção das imagens radiográficas e, em seguida, as imagens foram processadas utilizando o *software ImageJ* para a obtenção do espaço vazio (área entre o endosperma + embrião e as glumelas). Posteriormente, procedeu-se a aquisição das imagens multiespectrais e das imagens de fluorescência de clorofila com o equipamento *VideometerLab*®; na sequência, foram realizadas as imagens de fluorescência de clorofila 'a' com o equipamento *SeedReporter*®. Após a tomada de todas as imagens, com a finalidade de avaliar o desempenho das sementes em análise, foi realizada a análise computadorizada de plântulas com o *software SVIS*®. Finalizando o experimento 1, foram realizadas análises de germinação e de vigor com as sementes dos seis lotes em análise. No experimento 2, foram adquiridas as imagens de raios X (para obtenção do espaço vazio), as imagens multiespectrais e as imagens de fluorescência de clorofila. Após a obtenção das imagens, as sementes, previamente identificadas (enumeradas), foram colocadas para germinar em copos de polietileno com capacidade de 250 mL, tendo como substrato uma mistura de terra e areia; aos sete, nove e onze dias após a emergência das plântulas, foram realizadas avaliações da eficiência fotossintética (F_v/F_m) e da fluorescência de clorofila. Concluiu-se que as sementes de arroz com espaço vazio interno igual ou superior a 18,68 % não germinam ou originam plântulas anormais. Sementes de arroz que não germinam ou originam plântulas anormais apresentam maior reflectância nas bandas espectrais de comprimento de onda de 590 nm a 780 nm (41,46 % a 64,21 %) e na banda de 970 nm (75,65 %). Sementes de arroz que não germinam ou originam plântulas anormais, apresentam valores de fluorescência de clorofila iguais ou superiores a 40,58 e a 112,92, respectivamente, nas energias de excitação/emissão de 630/700 nm e de 645/700 nm. A maior eficiência fotossintética das plântulas de arroz está diretamente relacionada com as reflectâncias das bandas espectrais de 365 nm a 780 nm das sementes.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., Espaço vazio, Reflectância espectral, Eficiência fotossintética de plântulas

ABSTRACT

Relations between X-ray, multispectral, and chlorophyll fluorescence images with the physiological quality of rice seeds

The objective of this work was to evaluate the quality of rice seeds using X-ray, multispectral and chlorophyll fluorescence image analysis techniques and to relate this information with the physiological quality of seeds and the photosynthetic efficiency of seedlings; for this, six rice seed lots of the cultivar BRS Catiana were used. Two experiments were performed: 1) relations between X-ray, multispectral and chlorophyll fluorescence images with the physiological quality of seeds; 2) relations between X-ray, multispectral and chlorophyll fluorescence images with the photosynthetic efficiency of seedlings. In the first experiment, the seeds were identified and enumerated, after that, radiographic images were obtained and then processed using ImageJ software to obtain the free space (area between endosperm + embryo and glumes). Subsequently, multispectral images and chlorophyll fluorescence images were acquired using VideometerLab[®] equipment; then, chlorophyll fluorescence of chlorophyll 'a' images were taken using SeedReporter[®] equipment. After taking all images, with the purpose of evaluating the performance of the seeds under analysis, a computerized seedling analysis was performed using SVIS[®] software. Finally, germination and vigor tests were performed with the seeds under analysis of the six lots. In the second experiment, X-ray images (to obtain the free space), multispectral images, and chlorophyll fluorescence images were acquired. After obtaining the images, the seeds, previously identified (numbered), were placed to germinate in polyethylene cups with 250 mL capacity, using a mixture of soil and sand as substrate; at seven, nine and eleven days after seedling emergence, photosynthetic efficiency (Fv/Fm) and chlorophyll fluorescence were evaluated. It was concluded that rice seeds with internal free space equal to or greater than 18.68 % either do not germinate or result in abnormal seedlings. Rice seeds that do not germinate or originate abnormal seedlings show higher reflectance in the spectral bands of wavelengths from 590 nm to 780 nm (41.46 % to 64.21 %) and in the 970 nm band (75.65 %). Rice seeds that do not germinate or result in abnormal seedlings show chlorophyll fluorescence values of 40.58 and 112.92, respectively, at excitation/emission energies of 630/700 nm and 645/700 nm. The greater photosynthetic efficiency of rice seedlings is directly related to the reflectance from 365 nm to 780 nm spectral bands of the seeds.

Keywords: *Oryza sativa* L., Free space, Spectral reflectance, Photosynthetic efficiency of seedlings

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna exige cada vez mais eficiência nos processos produtivos, a fim de obtenção de elevadas produtividades; para tanto, é de grande importância o desenvolvimento das mais diversas áreas do conhecimento para o aprimoramento dos setores operacionais ligados ao sucesso da lavoura. Isso, aliado a busca crescente por materiais com alto potencial, alavancaram o mercado de sementes, destacando a importância da utilização de lotes de sementes de alta qualidade.

Em sementes de arroz, um dos principais entraves na produção é a maturação desuniforme, por afetar a germinação e o vigor das mesmas, de modo que, a ocorrência de sementes imaturas (esverdeadas) em lotes comerciais é frequente, por ser uma cultura que apresenta florescimento desuniforme. Assim, a detecção e o descarte de sementes imaturas em lotes comerciais são altamente desejáveis. Contudo, não representa tarefa fácil com os métodos e equipamentos atualmente disponíveis para tais fins.

Novas tecnologias, cujos princípios são baseados na utilização de sistemas computadorizados, tem sido utilizadas para avaliação da morfologia interna de sementes de forma não destrutiva e, também, a avaliação do vigor de sementes, uma vez que apresentam resultados eficientes, com menor subjetividade e maior credibilidade ao processo de análise e controle da qualidade.

As técnicas não destrutivas de análise de imagens de sementes e plântulas, como visão computacional, espectroscopia, raios X e imagens espectrais, são técnicas eficientes para a avaliação da qualidade de sementes, além disso são simples e rápidas.

Uma das principais técnicas de análise de imagens de sementes utilizadas atualmente é o teste de raios X, sendo considerado muito eficiente para estudos da morfologia interna de sementes, além de ser uma análise não destrutiva e não danosa à semente, que permite o exame de partes internas associadas a qualidade de sementes, como, por exemplo, o grau de desenvolvimento embrionário, a partir do espaço vazio na cavidade interna da semente, que está diretamente associado ao desempenho da mesma.

A técnica de imagens multiespectrais em sementes vem sendo utilizada na identificação e classificação de cultivares, diferenças de qualidade fisiológica em lotes distintos, detecção de danos por insetos e infecção por fungos, além da determinação da composição química da semente e qualidade de plântulas, a chamada fenotipagem (HUANG et al., 2015). Contudo, a utilização desta técnica pela indústria de sementes necessita de

adequações, padronização e redução de custos, sem comprometer a precisão da análise. Por exemplo, a avaliação da maturação de sementes por intermédio das técnicas de imagens multi e hiperespectrais têm sido utilizadas com êxito para a obtenção da fluorescência de clorofila (FC) das sementes e rendimento quântico do fotossistema II, pois combinam visão computacional e espectroscopia em um único instrumento e, por sua vez, permite a análise conjunta de dados que podem ser relacionados com o potencial fisiológico das sementes.

Considerando as técnicas de análise de imagens como alternativas para a avaliação da qualidade de sementes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de sementes de arroz utilizando técnicas de análise de imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila e relacionar essas informações com o potencial fisiológico das sementes e a eficiência fotossintética das plântulas.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é a terceira maior cultura cerealífera do mundo, somente ultrapassado pelo milho e trigo (CARVALHO, 2015). Em muitos países em desenvolvimento é considerado o produto de maior importância econômica, servindo como alimentação básica para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, especialmente para população de baixa renda (EMBRAPA, 2015; CARVALHO, 2015).

O Brasil é o nono maior produtor de arroz do mundo e o maior fora do continente asiático, com 10,4 milhões de toneladas produzidas na safra 2019/2020, em uma área de 1,8 milhões de hectares, com estimativa de crescimento na produção de 6,5 % para a próxima safra. No Brasil, o arroz irrigado ocupa uma área cultivada maior quando comparada com o sistema de sequeiro, representando 90,1 % da produção nacional (CONAB, 2020).

A semente é utilizada para produção de cerca de 80% das espécies cultivadas; com isso, é essencial que apresentem características de qualidade que proporcionem o estabelecimento rápido e uniforme da lavoura (MARCOS-FILHO, 2015), uma vez que a utilização de sementes de qualidade baixa implica em germinação lenta e desuniforme, com reflexos negativos na produção e na restrição da eficiência do uso de outros insumos agrícolas (MATTIONI et al., 2012; MONDO et al., 2012).

A qualidade de sementes envolve a interação dos atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários. O potencial fisiológico de uma semente é influenciado diretamente pelo genótipo, atingindo o máximo na maturidade fisiológica, quando o acúmulo de matéria seca é concluído. Além disso, as condições a que as sementes foram submetidas durante todo o processo de produção, incluindo procedimentos adotados em pré e pós-colheita, determinam os atributos fisiológicos, físicos e sanitários, independentemente da herança genética (TEKRONY; EGLI, 1995).

As informações sobre a germinação de uma semente, definida como a emergência de partes essenciais do embrião que resultam em uma plântula normal sob condições ótimas, compreendem o potencial de germinação de um lote de sementes (MARCOS-FILHO, 2015; BRASIL, 2009); por outro lado, o vigor compreende fatores que vão além da simples viabilidade, sendo caracterizado por atributos que determinam o desempenho das sementes sob diferentes condições de ambiente (KRZYŻANOWSKI et al., 1999). Segundo França-Neto et al. (2016) as sementes de alto vigor apresentam maior probabilidade de gerar plântulas vigorosas e bem desenvolvidas.

O potencial fisiológico das sementes de arroz está ligado a diversos fatores, tais como estágio de maturação (SMIDERLE e DIAS, 2008), o cultivar (GMACH et al., 2015), a composição química das sementes (HENNING et al., 2010) e o teor de água das sementes na colheita (ALVES et al., 2001).

Em sementes de arroz, o processo de maturação é um aspecto bastante relevante, pois devido a maturação desuniforme, as sementes não atingem a maturidade fisiológica em um mesmo momento. O processo de maturação é iniciado a partir da fertilização do óvulo e prolonga-se até o ponto em que a semente atinge a maturidade fisiológica; no processo de maturação as sementes estão sujeitas a diferentes transformações morfológicas, fisiológicas, físicas e bioquímicas, como aumento de tamanho, alteração no teor de água, acúmulo de massa de matéria seca e alterações no potencial de germinação e de vigor (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012), além de, se expostas a condições de cultivo inadequadas, apresentarão malformação do embrião e redução no acúmulo de reservas disponíveis, que são fundamentais para o processo germinativo.

Segundo Vergara (1970), as sementes de arroz apresentam maturação desuniforme, afetando a germinação e o vigor das mesmas, de modo que, a ocorrência de sementes imaturas (esverdeadas) em lotes comerciais é frequente, por ser uma cultura que apresenta florescimento desuniforme (COSTA et al., 2014).

A colheita de sementes de arroz ocorre quando dois terços das sementes da panícula estão maduras (SMIDERLE e PEREIRA, 2008). Sementes colhidas antes do ponto de maturidade estão sujeitas a apresentarem problemas como malformação e baixo vigor, enquanto que se colhidas tardiamente, com grau de umidade baixo, ocorrem perdas devido à degradação natural e maior suscetibilidade a danos mecânicos na colheita e no beneficiamento (STEFF et al., 1980; SMIDERLE e DIAS, 2012; SMIDERLE e PEREIRA, 2008).

A associação entre o início do florescimento, o período em que ocorre a polinização e as condições climáticas durante a maturação estão diretamente relacionados à uniformidade do processo e a composição química da semente (MARCOS FILHO, 2005). Dentro da panícula existe uma competição por fotoassimilados entre as sementes localizadas em posições diferentes. Na cultura do arroz, Mohammed e Tarpley (2011) verificaram diferenças na concentração de nutrientes e dimensionamento físico entre sementes localizadas em posições distintas dentro da panícula, além disso, há diferenças consideráveis na composição proteica e de micronutrientes (CALDERINE e ORTIS-MONASTERIO, 2003; LIU et al., 2005). Portanto, variações na morfologia das sementes são frequentes, aliado ao seu

desenvolvimento variado, é capaz de gerar diferentes níveis de germinação e de vigor (MARCOS FILHO, 2015). Daí a importância de se utilizar testes de germinação e de vigor para a obtenção de informações acerca do potencial fisiológico das sementes.

ISO (1992) e Ward et al. (1995) utilizando métodos de extração de clorofila, verificaram que, durante os estádios finais do processo de maturação a degradação da clorofila é intensificada e que seus níveis finais em semente de colza podem ser afetados tanto pelo genótipo, quanto pelo ambiente. Vários são os fatores que determinam o ritmo de degradação de clorofila, incluindo a ocorrência de temperaturas elevadas durante a maturação das sementes, resultando em "sementes esverdeadas". De forma geral, a quantidade de clorofila presente na semente durante a maturação afeta a sua coloração, e no caso do arroz, a cariopse passa por mudanças de verde para tonalidades de amarelo, que varia com o cultivar.

Concentrações elevadas de clorofila em sementes imaturas de soja, tem acarretado em grandes quantidades de células deterioradas, podendo gerar danos na translocação de reservas para o eixo embrionário no momento da germinação, o que compromete o desempenho das sementes (ZORATO et al., 2007a, 2007b). Segundo Pádua et al. (2007), o sistema de membranas celulares da semente esverdeadas de soja é, geralmente, desorganizado, o que pode ser comprovado a partir do teste de condutividade elétrica, a partir dos índices de lixiviação de solutos. Assim, o aprimoramento de técnicas já existentes e o desenvolvimento de métodos inovadores, mais rápidos, mais práticos e mais eficientes são de grande importância para a avaliação da qualidade de sementes (MARCOS-FILHO et al., 2009). Dentro desse contexto, os recursos computacionais tornaram-se uma técnica com enorme possibilidade de expansão, com alternativas viáveis para avaliação da qualidade de sementes (MARCOS-FILHO, 2015), como as técnicas não destrutivas de análise de imagens de sementes e plântulas.

A visão computacional ou processamento de imagens por computador, é um exemplo disso, que consiste em uma tecnologia da engenharia computacional, com caráter multidisciplinar, envolvendo conceitos da óptica, eletrônica, matemática, tecnologia da informação, inteligência artificial, modelagem, automação, estatística, processamento de imagem digital, dentre outras áreas do conhecimento. É considerada um tipo de inteligência artificial de simulação da visão humana, não destrutiva, confiável e rápida, com eficiência comprovada para detecção de sanidade e avaliação da qualidade de sementes (HUANG et al., 2015).

As análises a partir de imagens multiespectrais (IMS) são não destrutivas, simples e rápidas, o que viabiliza sua utilização para o monitoramento *online* do processo e controle de qualidade, com possibilidade de obtenção de informações a partir de diversos comprimentos de onda do espectro eletromagnético (OLESEN et al., 2011). É uma tecnologia que associa a técnica de visão computacional e a espectroscopia para obtenção de informações espaciais e espectrais dos objetos, sem necessidade de pré-tratamentos, permitindo a aferição simultânea de múltiplos componentes envolvidos na qualidade de sementes (SHRESTHA et al., 2015; BOELT et al., 2018).

No espectro do visível (380 nm a 750 nm) o sistema de visão computacional é capaz de identificar e classificar sementes baseado nas características da imagem, como tamanho, forma, cor e textura. O parâmetro de cor é definido a partir da intensidade dos pixels, o tamanho com base no número de pixels, a forma a partir do limite da região de interesse e a textura é referente a inter-relação de todos os pixels ou a variação nas suas intensidades (ZHENG et al., 2006; JACKMAN e SUN, 2013). Esta técnica vem sendo utilizada na determinação de diversos aspectos ligados a sementes de várias espécies vegetais, como trigo (AREFI et al., 2011), milho (CHEN et al., 2010; WU et al., 2013), arroz (CHENG et al., 2006; RAD et al., 2011) e uva (ORRÙ et al., 2012; RODRÍGUEZ-PULIDO et al., 2012).

As imagens geradas por câmeras RGB, as chamadas imagens RGB, apresentam amplas faixas de bandas de comprimento de onda com um espectro limitado ao do visível; com isso, a resolução espectral é muito restrita e uma grande quantidade de informações são perdidas; por exemplo, as clorofilas 'a' e 'b', apesar de serem distintas em termos de padrões espectrais, se apresentam verdes nas imagens RGB, tornando-se limitantes nas avaliações da qualidade de sementes.

Os sistemas de processamento de imagens espectrais fornecem dados espectrais a partir da radiação refletida de uma amostra, com mensuração da radiação incidente como uma medida da reflectância espectral (NYSTRÖM et al., 2007). Recentemente, o método de espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) vem apresentando eficiência na avaliação simultânea de diferentes características de qualidade de sementes (AGELET et al., 2014). Dependendo do sensor utilizado, os dispositivos geram informações espectrais da faixa ultravioleta (UV) (200 nm a 380 nm), a faixa do visível (VIS) (380 nm a 750 nm) ou toda a faixa de infravermelho próximo (NIR) (780 nm a 2500 nm). A absorção de radiação infravermelha próxima (NIR) e a reflexão por moléculas constituintes da amostra, como proteínas, lipídios, carboidratos e água, são obtidas a partir da absorção de energia e vibrações

moleculares relacionadas a sobretons e combinação de grupos funcionais CH, NH e OH (OSBORNE et al., 1993). Portanto, para solucionar esses problemas, as imagens das sementes são adquiridas, preferencialmente, a partir de um sistema espectral, com a mensuração da radiação refletida em diferentes comprimentos de onda para cada pixel da imagem (ELMASRY et al., 2019). Nesse sistema, em vez de utilizar apenas três faixas de cores, com largas faixas do espectro, a IMS fornece dados de refletância calibrados em várias bandas de comprimento de onda 'discretas', ou seja, em um curto intervalo de faixas do espectro, que vão do ultravioleta (UV) para a região do infravermelho próximo (NIR). A imagem gerada por esse sistema consiste em várias outras sub-imagens em escala de cinza, mostrando a refletância exata da radiação nas faixas de comprimento de onda desejada, sem sobreposição (PANAGOU et al., 2014).

A vantagem do sistema de imagem multiespectral é que a informação espectral pode ser extraída das imagens, fator esse, sem possibilidade no sistema de espectroscopia convencional e isso permite a visualização da distribuição espacial dos constituintes químicos na amostra. A capacidade de combinar a técnica de espectroscopia e imagem computacional, garante à técnica de imagem espectral a investigação extensiva de vários aspectos da determinação da qualidade das sementes (PANAGOU et al., 2014).

As aplicações de imagens espectrais de NIR em sementes são promissoras, com possibilidades inovadoras de utilização desta técnica em empresas produtoras de sementes e em laboratório de análise de sementes, porém os trabalhos são escassos, possuindo ainda, várias áreas e temas a serem explorados e compreendidos. A tecnologia tem sido utilizada para a análise da qualidade de sementes, como avaliações de viabilidade e de vigor (SHRESTHA et al., 2010; OLESEN et al., 2011; JIA et al., 2016;), de pureza física (WANG et al., 2010), detecção de fungos e infestações por insetos (TALLADA et al., 2011) e danos físicos (JIA et al., 2016).

Em adição a imagens multiespectrais, a técnica de fluorescência de clorofila (FC) tornou-se muito relevante, por quantificar um componente com elevada interligação com a qualidade de sementes, a molécula de clorofila, seu princípio consiste na excitação a um comprimento de onda específico. A excitação das clorofilas ocorre sob a luz vermelha (em torno de 650 nm); muitos fluorômetros utilizam emissores de luz (LEDs) vermelha com pico pertinente. Além disso, os LEDs são capazes de emitir pulsos de luz de alta frequência, como modelos de modulação da luz (ligar e desligar a luz em frequências específicas). Com o avanço do conhecimento, os LEDs azuis de alta emissão são capazes de excitar bandas

específicas de clorofila (por exemplo, por emissão de LED de 460 nm), fazendo com que o comprimento de onda de excitação da luz azul possa ser separado por filtros ópticos, possibilitando que o sinal de fluorescência da clorofila excitada pela luz vermelha (680 nm), que é necessário para que o fotodetector sensível à fluorescência rastreie o sinal de luz emitida pela semente. Uma luz actínica externa deve ser adicionada para estimular o transporte de elétrons e, assim, ajustar o desempenho de medição. A irradiância da irradiação excitante influenciará no sinal resultante de fluorescência, que determinará a concentração do pigmento; esses dois fatores devem se manter constantes durante as medições, pois, alterações no sinal de fluorescência captado pelo receptor resultante da mudança na irradiância da luz será medida e não as alterações no desempenho da fotossíntese (HANELT, 2018). Em seguida, a imagem é capturada e processada utilizando *softwares*, que, a partir de logaritmos específicos, quantificam os sinais da clorofila (JALINK et al., 1998).

Ainda, Boelt et al. (2017) comprovaram a eficiência da técnica de imagens multiespectrais aliado a tomografia computadorizada, na avaliação física de um lote com maturidade não uniforme de sementes de beterraba açucareira. As imagens multiespectrais foram captadas pelo sistema de imagens multiespectrais VideometerLab (*Videometer A/S, Hørsholm, Dinamarca*). As sementes foram classificadas em graus de maturação, com base nas imagens de tomografia computadorizada. Os autores verificaram que a reflectância da superfície das sementes com diferentes graus de maturação era diferente nos 19 comprimentos de onda, com relação entre a CF e a reflectância nos comprimentos de onda 435, 645 e 660 nm.

Vários trabalhos têm demonstrado que os resultados estão correlacionados com a qualidade das sementes, a partir da magnitude do sinal de FC. A relação entre a FC e a germinação foi analisada para sementes de couve por Jalink et al. (1998; 1999), que concluíram que sementes com baixo sinal de FC apresentavam maior germinação, quando comparadas a sementes com alto e intermediário sinal de FC. Konstantinova et al. (2002), ao medirem a FC em sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) com o *SeedScan I Laser Sorter* (Satake, Stafford, TX. EUA), tomando como base o princípio desenvolvido por Jalink et al. (1998), concluíram que a classificação de lotes de sementes de cevada com variações de FC possui relação com o vigor das sementes.

A eficiência da técnica de FC para avaliar a qualidade de sementes já foi comprovada para couve (JALINK et al., 1998; YADAV et al., 2015), soja (CICERO et al., 2009), trigo

(XING et al., 2010), chicória (OOMS e DESTAIN, 2011), *Arabidopsis* (NIKAJIMA et al., 2012), coentro (GÓRNIK et al., 2013) e tomate (LI et al., 2016).

Outra técnica de análise de imagens utilizada na avaliação da qualidade de sementes e bastante difundida atualmente é o teste de raios X, empregado com êxito na avaliação da morfologia interna de sementes; o fato de ser uma análise não destrutiva e não danosa, garante o sucesso da sua utilização em laboratórios de análise de sementes, permitindo o exame de partes internas das sementes associadas à anormalidades morfológicas e à germinação de sementes (MACHADO; CICERO, 2003; MARCHI; GOMES-JUNIOR, 2017), dimensionamento interno de sementes (LIU et al., 1993), indicação de estádios de desenvolvimento de sementes (FERNANDES et al., 2016) e danos mecânicos internos (CICERO, 2010; GOMES-JUNIOR et al., 2014).

O teste de raios X foi recomendado por Simak e Gustafsson (1953), para avaliar a morfologia interna de coníferas. O teste baseia-se na exposição da semente a uma fonte de baixa energia de raios X e um filme fotossensível, que produz uma imagem caracterizada por diferentes tonalidades de cinza. A absorção de raios X em quantidades distintas pelos tecidos das sementes, conforme a sua estrutura, composição e densidade, além do tempo de exposição à radiação, determinam as diretrizes do teste (ISTA, 2004). O teste de raios X é padronizado pelas Regras Internacionais para Análise de Sementes (ISTA, 1996) e pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

O grau de desenvolvimento embrionário, a partir do espaço livre na cavidade interna da semente, que está diretamente associado ao desempenho da semente, constitui uma das variações morfológicas possível de ser observada pelo teste de raios X (MARCOS-FILHO et al., 2010). A ocorrência de espaços vazios entre o embrião e o endosperma ou entre o conteúdo da semente e o tegumento, o chamado “espaço livre” (LIU et al., 1993), foi um parâmetro utilizado pela primeira vez com sementes de tomate, afim de apontar relação entre o espaço vazio e a germinação de sementes (BREWER et al., 2007).

As informações acerca do espaço vazio interno de sementes vem sendo relatados em diversos trabalhos, como a baixa germinação de sementes com preenchimento da cavidade interna inferior a 50% em mamona (CARVALHO; ALVES; OLIVEIRA, 2010), perda da germinação de sementes com espaço vazio superior a 22,1 % em citrumelo “Swingle” (ARRUDA, 2016), a ocupação da cavidade interna pelo embrião e endosperma de sementes de pimentão e sua relação com a germinação (GAGLIARDI; MARCOS-FILHO, 2011) e

presença de sementes mortas de aroeira, de acordo com o aumento da proporção de espaço vazio interno (MACHADO; CICERO, 2003).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de comprovar eficiência do teste de raios X na avaliação de várias características, incluindo aquelas relacionadas como a morfologia interna de sementes de girassol (ROCHA et al., 2014), sementes fisicamente puras de aveia (CRAVIOTTO et al, 2002), danos por umidade em sementes de soja (PINTO; CICERO; FORTI, 2007), estágio de desenvolvimento de embriões de sementes de acerola (NASSIF; CICERO, 2006), danos mecânicos em sementes de soja (FLOR et al., 2004) e de milho (CICERO; BANZATTO JUNIOR, 2003), viabilidade de sementes de pinhão-mansão (PINTO et al., 2009), danos por percevejos em sementes de soja (PINTO et al., 2009) e germinação e morfologia de plântulas de tomate (VAN DER BURG et al., 1994) e pimentão (DELL'ÁQUILLA, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP. Foram utilizados seis lotes de sementes de arroz, do cultivar BRS Catiana.

Foram realizados dois experimentos: 1) relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência da clorofila com o potencial fisiológico das sementes; 2) relações entre as imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com a eficiência fotossintética das plântulas.

3.1 Experimento 1: Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência da clorofila com o potencial fisiológico das sementes

3.1.1 Teste de raios X

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada lote. As sementes foram fixadas com fita adesiva dupla face em placas de Petri transparentes de 9,0 cm de diâmetro, posicionando as sementes uma a uma, em camada única e equidistantes entre si, sob sequência de identificação para os teste posteriores (Figura 3.1). Afim de se obter as imagens radiográficas foi utilizado o equipamento “*MultiFocus Digital Radiography System – MDRS*” (Faxitron Bioptics, LLC, Tucson, EUA) (Figura 3.2). As imagens radiográficas foram salvas em pasta específica do disco rígido em um computador Pentium IV, com CPU de 2,0 GHz, 768 MB RAM e HD de 40 Gb, operado por sistema Windows XP Profissional. Na Figura 1 é possível observar a imagem de raios X de uma semente (cariopse) de arroz, com indicações de suas partes: glumelas; endosperma; embrião.

Figura 1. Imagem radiográfica de uma semente (cariopse) de arroz, com indicação de suas partes.

Em seguida as sementes foram analisadas individualmente, a partir das imagens radiográficas e separadas de acordo com a ocorrência ou não de danos (danos mecânicos e danos por insetos), sendo retiradas da análise subsequente as sementes em que os referidos danos foram detectados, para eliminação dos efeitos dos mesmos e, assim, possibilitando avaliar de fato a relação do espaço vazio interno das sementes sobre o seu potencial fisiológico. Devido a pequena quantidade de sementes com danos nos lotes, foi desconsiderada este fator nas análises estatísticas.

Para a obtenção da área do espaço vazio interno das sementes, as imagens radiográficas foram analisadas utilizando o *software ImageJ*, versão 1.48v (SCHNEIDER et al., 2012), seguindo a metodologia proposta por Silva et al. (2013), mediante o uso do comando *fraction area*, a qual determina a área livre interna das sementes, a partir da separação e contagem de pixels pela intensidade da cor, em escala de cinza, de todas as sementes, de forma individual, sendo expressa em porcentagem. Também foram obtidos os

valores de área total (mm^2) das sementes individuais e a densidade relativa (cinza.pixel^{-1}), representando a intensidade média de pixel em nível de cinza.

3.1.2 Aquisição das imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila com o equipamento *VideometerLab*

Após a realização do teste de raios X, cada placa contendo as mesmas sementes foi posicionada sob a esfera de integração do equipamento *VideometerLab 4* (Videometer A/S, Hørsholm, Dinamarca) (Figura 3.3) e, após acionamento sucessivo dos 19 diodos emissores de luz (LEDs) contíguos, dispostos na borda da esfera, o chip padrão de carga acoplada monocromática (CCD) registrou e capturou a reflectância das sementes, gerando 19 imagens espectrais correspondentes a cada comprimento de onda (365, 405, 430, 450, 470, 490, 515, 540, 570, 590, 630, 645, 660, 690, 780, 850, 880, 940, 970 nm) por amostra, com resolução de 2056 x 2056 pixels (Figura 2).

Para a mensuração da fluorescência de clorofila (FC) das sementes, são adicionados três filtros de densidade óptica curta, que permitem a captura da intensidade da radiação somente do comprimento de onda de 700 nm (energia de emissão), permitindo o equipamento gerar 3 imagens específicas das bandas correspondentes à fluorescência para as energias de excitação de: 1- 630 nm (região do vermelho); 2- 645 nm (clorofila 'a'); 3-660 nm (clorofila 'b').

Figura 2. Interface do *software VideometerLab4®*, com as imagens espectrais de vinte e duas bandas distintas, com utilização do filtro ‘*Inverse jat*’, para visualização a partir da aplicação de cores falsas.

Posteriormente, as imagens obtidas foram processadas utilizando o *software VideometerLab4®* versão 3.14.9. Para a segmentação do plano de fundo (placa de Petri e ruídos) e a região de interesse (sementes), foi utilizado a máscara de segmentação ‘*Blue background*’. Em seguida as sementes foram selecionadas individualmente por meio do comando ‘*full*’, fornecendo a média de reflectância de todas as imagens de cada semente; com isso, obteve-se a FC e as demais reflectâncias das bandas do espectro correspondentes.

Para a obtenção de parâmetros de cor e de textura das sementes utilizou-se o método supervisionado nCDA (Análise Discriminante Canônica Normalizada) para transformação das imagens multiespectrais (MSI) e sua segmentação em regiões de interesse, de modo a minimizar ou maximizar a distância das observações dentro e entre as amostras de sementes (Olesen et al., 2011). Com auxílio do comando “*blob*” (Objeto Binário Rotulado) analisou-se as sementes individualmente e foram obtidos os atributos de aparência de cor CIELab a^* (verde a vermelho), CIELab b^* (azul a amarelo) e CIELab L (claridade das glumelas).

Todos os dados extraídos a partir das imagens multiespectrais foram exportados para o Excel.

3.1.3 Aquisição das imagens de fluorescência de clorofila ‘a’ com o equipamento *SeedReporter*[®]

Para a obtenção das imagens de fluorescência de clorofila (FC), as sementes submetidas às duas avaliações anteriormente descritas foram transferidas uma a uma para uma placa de polietileno de coloração preta e opaco, sob a sequência de identificação. Em seguida as placas foram colocadas dentro da cabine de integração do equipamento e as imagens foram geradas por meio da rápida repetição da taxa fluorimétrica (FRRF) e da duração dos impulsos. Subpulsos saturantes que excitam a clorofila ‘a’ que é captada por uma câmera CCD (*Charged Coupled Device*). A excitação da clorofila das sementes é induzida pela emissão de radiação com comprimento de onda de 620 nm e os sinais de fluorescência de clorofila são detectados a 730 nm, a partir da utilização de um filtro dessa densidade óptica. As imagens foram geradas na escala de cinza, com 320 x 240 pixels, de forma síncrona dentro de intervalos de 4 segundos (Figura 3.4).

As imagens foram processadas com o auxílio do *Software Data Analysis PhenoVation* (versão 5.5.1). Cada imagem foi tratada com auxílio de filtros para retirada de ruídos e um último filtro para possibilitar a leitura da FC individual de cada semente, obtendo-se dados FC de sementes individuais e sequenciadas. Também foram obtidos das imagens os índices de clorofila e de antocianina.

3.1.4 Análise computadorizada de imagens de plântulas (SVIS[®])

Com a finalidade de avaliar o desempenho das sementes em análise, foi realizado a análise computadorizada de plântulas com o *software* SVIS. As sementes de cada repetição de cada lote, provenientes das três avaliações anteriormente descritas, foram divididas em dois grupos de 20 e um de 10 e colocadas para germinar, enumeradas, em duas fileiras situadas no terço superior do papel-toalha, a 25 °C, durante cinco dias. O substrato foi umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a sua massa.

As plântulas foram transferidas para uma folha de cartolina de coloração preta, a fim de proporcionar o contraste necessário para análise pelo sistema. Em seguida, foi realizada a digitalização das imagens das plântulas por meio de escâner HP Scanjet 200, ajustado na resolução de 100 DPI, instalado em posição invertida no interior de uma caixa de alumínio (60,0 x 50,0 x 12,0 cm) acoplado a um computador (Figura 3.5).

As imagens foram analisadas pelo *software Seed Vigor Imaging System (SVIS®)*, gerando comprimentos individuais das plântulas (cm), conforme descrito por Hoffmaster et al. (2003) e Marcos-Filho et al. (2006).

3.1.5 Imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila das glumelas e do endosperma + embrião das sementes

Com o objetivo de verificar a relação entre a quantidade de clorofila presentes nas glumelas e no endosperma + embrião das sementes, realizou-se a quantificação da FC e reflectância nas 19 bandas espectrais das partes em questão. Foram utilizadas quatro repetições de quatro sementes por lote. Dentro de cada lote foi realizado uma amostragem de 200 sementes, submetendo-as às técnicas de IMS e FC utilizando os equipamentos *VideometerLab 4* e *SeedReporter®*; em seguida as imagens foram analisadas nos seus respectivos *softwares*, para obtenção dos dados espectrais.

Na sequência, foram separadas manualmente as glumelas do endosperma + embrião de dezesseis sementes de cada lote, de forma a manter as suas partes íntegras. Posteriormente, as partes das sementes (glumelas e endosperma + embrião) foram fixadas com fita adesiva dupla face em placas de Petri transparentes de 9,0 cm de diâmetro, posicionadas lado a lado, em camada única e equidistantes entre si, em sequência de identificação. Em seguida as placas foram submetidas às análises multiespectrais e de fluorescência de clorofila já descritas os itens 3.1.2 e 3.1.3, respectivamente.

Figura 3. Fluxograma das análises realizadas: posicionamento das sementes de cada repetição em placas de Petri (1); aquisição das imagens de Raios X (2) e das imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila com o equipamento *VideometerLab* (3); obtenção das imagens de fluorescência de clorofila ‘a’ com o equipamento *SeedReporter*[®] (4); análise computadorizada de imagens de plântulas (*SVIS*[®]) (5).

3.1.6 Avaliações complementares

Na sequência, as sementes dos referidos lotes foram avaliadas quanto ao potencial fisiológico com os testes descritos a seguir.

3.1.6.1 Germinação

Foram avaliadas com quatro repetições de 50 sementes em rolos de papel-toalha umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, a 25 °C. A primeira e segunda contagens de germinação foram realizadas aos cinco e 14 dias, respectivamente, após a semeadura, contabilizando a porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

3.1.6.2 Envelhecimento acelerado

Quatro repetições de 50 sementes foram distribuídas em camada única sobre tela metálica suspensa no interior de caixas de plástico transparentes (11,0 x 11,0 x 3,0 cm),

contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram mantidas a 41 °C, durante 96 horas (AOSA, 2009). Após este período, foi instalado o teste de germinação, conforme o item anterior e a avaliação foi realizada cinco dias após a instalação do teste; os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.1.6.3 Emergência de plântulas em areia

As sementes foram semeadas à 1 cm de profundidade, em caixas de plástico (32,0 x 28,0 x 10,0 cm); a irrigação foi feita de maneira que o substrato atingisse 60% da capacidade de retenção de água. As avaliações foram realizadas diariamente, computando-se o número de plântulas emersas até o décimo quarto dia após a instalação do teste, determinando a porcentagem média de emergência de plântulas para cada lote e o índice de velocidade de emergência de plântulas, utilizando-se o método proposto por Maguire (1962).

3.1.6.4 Condutividade elétrica

Foi determinada a partir do sistema massal, conforme metodologia proposta pelo Comitê de Vigor da AOSA (2009). Quatro repetições de 50 sementes foram previamente pesadas, em balança de precisão (0,001 g); em seguida, as sementes foram colocadas em copos de plástico preenchidos com 75 mL de água destilada. Os copos foram mantidos durante 24 horas a 25 °C (CUSTÓDIO; MARCOS FILHO, 1997). Ao final deste procedimento foi aferida a leitura da condutividade elétrica da solução, utilizando o aparelho da marca DIGIMED®, modelo DM-31. Os resultados estão expressos em $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de semente.

3.1.6.5 Análise computadorizada de imagens de plântulas (SVIS®)

Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes por lote, seguindo metodologia descrita no item 3.1.4.

As imagens foram analisadas pelo software *Seed Vigor Imaging System* (SVIS®) sendo gerados os índices de uniformidade de desenvolvimento e de vigor conforme Sako et al. (2001), compreendendo valores de 0 a 1000; o vigor das sementes é diretamente proporcional a estes valores. Após o processamento das imagens, foram obtidos os valores médios de

índices de vigor e de uniformidade de desenvolvimento e comprimento de plântulas (cm) para cada lote, conforme descrito por Hoffmaster et al. (2003) e Marcos-Filho et al. (2006).

Com o objetivo de monitorar o grau de umidade das sementes durante a realização dos testes anteriormente descritos, foi determinado o teor de água pelo método da estufa a 105 ($\pm$ 3 °C) durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 5 g de sementes para cada lote. Os resultados estão expressos em percentagem (base úmida). Essa determinação também foi realizada antes de cada teste e após a realização do teste de envelhecimento acelerado.

3.2 Experimento 2: Relações entre as imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com a eficiência fotossintética das plântulas

Para a realização do experimento foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes de cada lote. Realizou-se a avaliação da morfologia interna das sementes com o teste de raios X, aquisição das imagens multiespectrais e de FC com o equipamento *VideometerLab* e aquisição das imagens de fluorescência de clorofila 'a' com o equipamento *SeedReporter*[®], descritos nos itens 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3, respectivamente.

3.2.1 Avaliação da eficiência fotossintética das plântulas

Para avaliação da eficiência fotossintética das plântulas, as sementes provenientes das avaliações de raios X, aquisição das imagens multiespectrais, de FC com o equipamento *VideometerLab*[®] e aquisição das imagens de fluorescência de clorofila 'a' com o equipamento *SeedReporter*[®], previamente identificadas, foram colocadas para germinar em substrato constituído por uma mistura de areia e terra na proporção 1:3, sem necessidade de adubação, em copos de polietileno com capacidade de 250 mL; em seguida, foram acondicionados em câmara de crescimento vegetal com temperatura de 25 °C e iluminação constante. A irrigação foi realizada com volume de água equivalente a 60 % da capacidade de retenção do substrato e, quando necessário, foram realizadas irrigações adicionais para manter o substrato com conteúdo adequado de água até o final das avaliações.

Aos 7, 9 e 11 dias após a emergência das plântulas, os recipientes com as plântulas de cada lote foram transferidos para o Laboratório de Análise de Imagens e mantidas por 30 minutos no escuro; em seguida foram submetidas a análise pelo *SeedReporter*[®], obtendo-se a fluorescência de clorofila inicial (F_0), conduzindo a fluorescência máxima (F_m), ou o ponto

em que a curva satura e a um rendimento fotoquímico do fotossistema II da fotossíntese (FSII) próximo a zero, após os impulsos múltiplos.

A partir da equação discriminada a seguir, aplicada para cada pixel, foi calculado o rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m).

$$\Phi_{po} = \frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

sendo: Φ_{po} e F_v/F_m , o rendimento quântico máximo do PSII e a máxima eficiência fotoquímica do FSII, respectivamente, e F_0 , a fluorescência mínima no instante $t = 0$.

3.3 Análise estatística

Para o experimento 1, os resultados obtidos pelo teste de germinação, de vigor e de parâmetros de imagens, foram submetidos a análise da variância, em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo as médias dos lotes comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Análise multivariada, incluindo análise de componentes principais (PCA) e coeficientes de correlação de Pearson (r), foram realizadas para todos os parâmetros de imagens obtidos e para os dados de germinação e de vigor.

Análise de componentes principais (PCA)

Para identificar os padrões ocultos nas características de raios X, espectrais e de FC extraídas dos dados médios das sementes dos lotes, a análise de componentes principais (PCA) foi realizada como uma técnica exploratória de análise de dados multivariados. A PCA, normalmente é utilizada para obter uma visão geral da variação dos dados com a possibilidade de agrupamento de sementes de morfologia interna, perfis espectrais e de FC semelhantes (EIMASRY et al., 2011, 2019).

Coefficiente de correlação de Pearson (r)

O coeficiente de correlação de Pearson (r) mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. Consiste em um índice adimensional com valores situados entre -1,0 e 1,0, representando a intensidade de uma relação linear entre dois conjuntos de dados.

Baseado no teste de germinação, as sementes que passaram pela análise de imagens foram classificadas em dois grupos: germinadas e não germinadas ou que originam plântulas anormais. Em seguida, as classes foram submetidas a análise da variância, para as variáveis

espaço vazio, bandas espectrais, FC de 630/700 nm, de 645/700 nm, de 660/700 nm e de 620/730 nm, em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). O *software R* (CORE TEAM, 2018) foi utilizado para análises estatísticas.

Para o experimento 2, os resultados obtidos a partir da análise de imagens das sementes e das plântulas, foram submetidos a análise da variância, em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo as médias dos lotes comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Análise multivariada, incluindo análise de componentes principais (PCA) e coeficientes de correlação de Pearson (r), foram realizadas para todos os parâmetros de imagens obtidos das sementes e plântulas, considerando as sementes individualmente. O *software R* (CORE TEAM, 2018) foi utilizado para análises estatísticas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência da clorofila com o potencial fisiológico das sementes.

O teor de água das sementes variou de 8,8 % a 10,0 % (Tabela 1); considerando a influência deste parâmetro na densidade óptica e, posteriormente, na visualização das imagens de raios X (SIMAK, 1991), estes valores mostraram-se adequados para visualização da morfologia interna das sementes em estudo.

Tabela 1. Teor de água de seis lotes de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana.

Lotes	Teor de água (%)
1	10,0
2	9,8
3	8,8
4	10,0
5	9,0
6	8,9

A partir da análise das imagens de raios X foi possível mensurar a área do espaço vazio interno em sementes de arroz. Na figura 5 pode-se observar imagens radiográficas de sementes com diferentes níveis de ocorrência de espaços vazios no seu interior (área escura na imagem de raios X e área marcada em vermelho na imagem radiográfica após o processamento pelo *software Image J*): assim, na figura 5.1a observa-se, na imagem radiográfica, uma semente bem formada, com o endosperma e embrião ocupando grande parte da cavidade interna da semente e, neste caso, o espaço vazio foi muito pequeno, ocupando apenas 2,31 % de toda a área do interior da semente, como pode ser verificado na imagem radiográfica após o processamento pelo *software ImageJ* (Figura 5.1b, área colorida em vermelho). Por outro lado, nas sementes que apresentaram problemas no processo de formação, observa-se níveis de espaço vazio consideravelmente maiores, como pode ser observado na imagem radiográfica da figura 5.2a, cuja semente apresenta espaço vazio correspondendo 10,89 % de toda a área do interior da semente, conforme pode ser verificado na figura 5.2b (área colorida em vermelho). Em outra situação, na figura 5.3a, pode-se observar, na imagem radiográfica, uma semente onde não houve a formação nem do embrião

e nem do endosperma (semente vazia), cuja semente apresenta espaço vazio correspondendo a 72,54 % de toda a área do interior da semente, conforme pode ser visualizado na figura 5.3b (área colorida em vermelho).

Figura 4. Sementes de arroz do cultivar BRS Catiana, com diferentes níveis de área do espaço vazio interno: imagens de raios X (1a, 2a e 3a) e respectivas imagens de raios X após o processamento com o *software ImageJ* (1b, 2b e 3b), apresentando, respectivamente, 2,31 %, 10,89 % e 72,54 % de área do espaço vazio.

Na figura 5A é possível observar que as sementes dos lotes 1 e 2 apresentaram maiores valores médios de espaço vazio, com 9,18 % e 7,85 %, respectivamente; já os demais lotes não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Foi verificada uniformidade na área das sementes dos lotes avaliados (Figura 5B), sem diferenças estatísticas significativas, indicando que, para os lotes testados, este parâmetro não é afetado por possíveis diferenças no conteúdo interno das sementes.

A análise das imagens, partindo de estimativas da densidade relativa, por meio do *software ImageJ*, não proporcionou a discriminação dos lotes de sementes (Figura 5C).

A análise de fluorescência de clorofila 'a' com o equipamento *SeedReporter*[®] de 620/730 nm (energia de excitação/emissão), permitiu a separação dos lotes de sementes

(Figura 5D), com maior intensidade média para o lote 3 (5537,11) e a menor para o lote 4 (3931,03). Por outro lado, os lotes 2, 4, 5 e 6 apresentaram valores de antocianina maiores em relação aos lotes 1 e 3, sendo que o lote 3 foi inferior ao lote 1 (Figura 5F).

Na figura 5E, observa-se que o teor de clorofila das sementes, mensurado pelo índice de clorofila, apontou maiores valores para os lotes 2 e 5, valores intermediários para os lotes 1 e 6 e valores mais baixos para os lotes 3 e 4.

Figura 5. Variáveis obtidas com análise de imagens de raios X: espaço vazio (A), área da semente (B) e densidade relativa (C); com imagens de fluorescência de clorofila de 620/730 nm – energia de excitação/emissão: fluorescência de clorofila (D), índice de clorofila (E) e índice de antocianina (F), de sementes de seis lotes de arroz do cultivar BRS Catiana. Letras diferentes nas extremidades superiores de cada coluna, dentro de cada avaliação, indicam diferenças significativas entre os lotes pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). As barras representam o desvio padrão.

Os espectros médios de reflectância nos comprimentos de ondas das 19 bandas espectrais, obtidos pelo equipamento *VideomaterLab*, apresentaram diferença estatística entre os lotes de sementes (Figura 6), com maior intensidade média para o lote 3. Vale ressaltar que o comportamento espectral das sementes variou de acordo com a banda espectral, por exemplo, no comprimento de onda de 470 nm (Banda 5) apenas o lote 3 diferenciou-se dos demais, com maior valor médio, ao passo que nos comprimentos de onda de 630, 645, 660 e 690 nm (Bandas 11, 12, 13 e 14) houve uma discriminação maior entre os lotes.

A fluorescência de clorofila mensurada pelo equipamento *VideometerLab* (Figura 6), correspondendo as bandas de 630/700nm (região do vermelho), 645/700 nm (clorofila a), 660/700 nm (clorofila b), energias de excitação/emissão (Bandas 21, 22 e 23), apresentaram comportamentos espectrais semelhantes à fluorescência de clorofila ‘a’ mensurado com o equipamento *SeedReporter*[®], com correlação positiva significativa (Figura 8), com maiores valores observados para o lote 3, com 50,170 (630/700 nm), 100,754 (645/700 nm) e 91,325 (660/700 nm).

Baseado no modelo nCDA (Análise Discriminante Canônica Normalizada) do *VideometerLab*, os parâmetros de cor obtiveram médias com comportamentos distintos para os lotes de sementes. Na figura 6, observa-se que o atributo CIELab L apresentou padrão de médias semelhantes às 19 bandas espectrais, com maior média para o lote 3 (67,49) e as menores para os lotes 1 e 2 (63,49 e 64,04, respectivamente). Já para os atributos CIELab a* e CIELab b*, o lote 3 apresentou menor média (8,00 e 24,01, respectivamente).

Figura 6. Análises multiespectrais, correspondendo a 22 bandas espectrais (365, 405, 430, 450, 470, 490, 515, 540, 570, 590, 630, 645, 660, 690, 780, 850, 880, 940, 970, 630/700, 645/700, 660/700 nm, respectivamente) com gráficos individuais, e de cor (CIELab L, CIELab a* e CIELab b*) de sementes de seis lotes de arroz do cultivar BRS Catiana. Letras diferentes nas extremidades superiores das colunas, dentro de cada avaliação, diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). As barras representam o desvio padrão.

Mediante realização do teste de germinação das sementes e de acordo com seus resultados, ilustrado na figura 7B, foi observado que as sementes do lote 2 apresentaram as maiores médias de germinação (95,5 %), seguidas pelas sementes dos lotes 3, 5 e 4 (93,5 %, 91,5 % e 90,5 %, respectivamente) com médias intermediárias e, por fim, as sementes dos lotes 6 e 1 (88,5 % e 84,5 %, respectivamente) com as menores médias de germinação. Ressalta-se, ainda, que as sementes do lote 2 também apresentaram os maiores percentuais na primeira contagem de germinação, com 86,5 % (Figura 7A).

Em relação aos resultados do teste de envelhecimento acelerado e de emergência de plântulas em areia, as sementes dos lotes 2 e 5 apresentaram os maiores percentuais de envelhecimento acelerado (91,5 % e 90,5 %, respectivamente) (Figura 7C) e de emergência de plântulas em areia (97,0 % e 95,5 %, respectivamente) (Figura 7E), enquanto que as sementes dos lotes 1, 3, 4 e 6 não diferiram entre si em ambas as avaliações (Figuras 7C e 7E).

Para condutividade elétrica (Figura 7D), os lotes 3 e 1 apresentaram os maiores valores ($46,19 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e $42,51 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, respectivamente), seguidos pelos lotes 5, 6 e 2, que obtiveram valores intermediários de condutividade (na ordem de $37,31 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, $36,92 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e $35,08 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, respectivamente) e o lote 4 apresentou a menor média de condutividade elétrica ($27,09 \mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$).

Foi observado que o lote 2 apresentou maior comprimento total de plântulas, com média de 5,17 cm (Figura 7F), da mesma forma que no teste de vigor com o *software* SVIS, os lotes 2 e 6 apresentaram os maiores índices de vigor (341,3 e 303,0, respectivamente), não havendo diferenças entre os demais lotes (Figura 7G). Ressalta-se que não houve diferenças entre os lotes de sementes, em relação ao índice de uniformidade de plântulas aferido pelo *software* SVIS (Figura 7H).

Figura 7. Primeira contagem de germinação (A), germinação (B), envelhecimento acelerado (C), condutividade elétrica (D), emergência de plântulas em areia (E), comprimento de plântula (F), índice de vigor (G), índice de uniformidade de desenvolvimento (H) de sementes de seis lotes de arroz do cultivar BRS Catiana. Letras diferentes nas extremidades superiores das colunas, dentro de cada avaliação, indicam diferenças significativas entre os lotes pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). As barras representam o desvio padrão.

Os dados obtidos a partir da análise das imagens radiográficas, multiespectrais e de FC das sementes, foram submetidas à análise de componentes principais (PCA) (Figura 8A). Os dois primeiros componentes principais explicaram 79,5 % da variância total entre os parâmetros de imagens e o potencial fisiológico dos lotes de sementes, com 59,2 % e 20,3 % para PC1 e PC2, respectivamente. Houve separação dos lotes de sementes de arroz, com tendência do lote 3 com maiores valores de refletância das bandas espectrais, características de cor e de FC, enquanto que o lote 4 apresentou tendência de menores valores dos testes de vigor e de germinação, com menores valores das refletâncias das bandas espectrais, características de cor e de FC.

De maneira geral, os parâmetros obtidos a partir da análise de imagens de raios X (espaço vazio, área da semente e densidade relativa) de sementes de arroz, considerando os valores médios dos lotes, não foram constatadas correlações significativas com testes de germinação e de vigor com nenhum parâmetro de imagens multiespectral e de FC dos lotes de sementes (Figura 8B); a possível explicação para este comportamento pode ser atribuída ao fato de que as referidas avaliações apresentaram valores que não foram suficientes para que houvesse comprometimento dos lotes avaliados.

A área ocupada pelo embrião e pelo endosperma no interior das sementes de arroz, em valores médios, não se relacionou com o potencial fisiológico das sementes (Figura 8B); de fato, lotes que apresentaram sementes com maior porcentagem de espaço vazio no interior das sementes (lotes 1 e 2) tiveram desempenhos fisiológicos distintos, sendo que o lote 1 apresentou baixos valores nos testes de germinação e de vigor, ao passo que, o lote 2 obteve os melhores resultados; novamente, é importante destacar que o fato de terem sido observados valores mais elevados de espaços vazios no interior das sementes dos lotes 1 e 2, não significa que poderia ter havido comprometimento na germinação e no vigor das sementes, pois, para tanto os espaços vazios deveriam estar ocupando o interior das sementes, acima de um determinado valor. Gomes Junior (2010) observou que, sementes de mamona com maior área embrionária, não necessariamente geram plântulas com maior comprimento, sendo que a relação entre a morfologia interna da semente e o potencial fisiológico nem sempre é verificada, como também já foi constatado em berinjela (SILVA et al., 2012) e pimentão (GAGLIARDI; MARCOS-FILHO, 2011).

A densidade relativa da semente refere-se aos níveis de radioluminescência (escuro) e radiopacidade (claro) da imagem radiográfica em nível de cinza, podendo estar relacionada, indiretamente, à deterioração de tecidos, danos mecânicos e preenchimento do embrião e do endosperma das sementes (MEDEIROS et al., 2018). Em sementes de arroz, este parâmetro não apresentou correlação com o potencial fisiológico das sementes (Figura 8B); resultados semelhantes, também foram observados por Machado et al. (2020) em sementes de feijão mungu (*Vigna radiata* L.), em que a densidade relativa depende de características da semente da espécie em estudo, como teor de óleo, espessura, dentre outras.

Conforme análise da figura 8B, a condutividade elétrica média dos lotes de sementes foi o único parâmetro fisiológico que apresentou correlação significativa com dados multiespectrais, nas bandas espectrais de 940 nm e 970 nm (Bandas 18 e 19). Esta variável também apresentou correlação com a banda de fluorescência de clorofila 'a' de energia de

excitação/emissão de 645/700 nm (Banda 22) e a fluorescência de clorofila 'a' com o equipamento *SeedReporter*[®] de energia de excitação/emissão de 620/730 nm. A carga elétrica da molécula de clorofila influencia de maneira direta a condutividade elétrica da solução de embebição, por se tratar de uma molécula muito sensível a degradação química, com liberação de elétrons em solução aquosa (PORRA et al, 1989); assim, para sementes com maior intensidade de FC, há uma maior interferência da quantidade de eletrólitos pela clorofila.

Figura 8. A: Gráfico biplot da análise de componentes principais obtido a partir das variáveis relacionadas às análises de raios X, multiespectrais, fluorescência de clorofila e fisiológicas de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana. PC1 - Componente Principal 1; PC2 - Componente Principal 2. B: Estimativas das correlações de Pearson entre as múltiplas características de análises de raios X, multiespectrais, fluorescência de clorofila e fisiológicas de seis lotes em estudo.

PCG – primeira contagem de germinação; EA - envelhecimento acelerado; CE - condutividade elétrica; Emergência - emergência de plântulas em areia; CP- comprimento de plântula; Uniformidade - índice de uniformidade de desenvolvimento; Vigor - índice de vigor.

A constatação de que os dados médios de FC das sementes dos lotes não apresentaram correlações significativas com dados do teste de germinação e de vigor, exceto condutividade elétrica (Figura 8B), podem indicar que, considerando valores médios dos lotes, as individualidades das sementes não estão sendo levadas em consideração. Dessa forma, os lotes podem apresentar valores médios de FC semelhantes, porém com as sementes apresentando valores de germinação e de vigor distintos, ou seja, algumas sementes podem apresentar valores de FC mais altos e outras sementes valores mais baixos, com reflexos diferentes na germinação e no vigor das mesmas. Nesse sentido, a figura 9 exemplifica estas individualidades: as sementes 1, 2 e 3, provenientes de lotes diferentes com valores médios de FC semelhantes, apresentam valores de fluorescência de clorofila 'a' (620/730 nm) de 3865 (Figura 9.1a), 3576 (Figura 9.2a) e 3694 (Figura 9.3a), bem como médias de fluorescência de clorofila 'a' (645/700 nm) de 91,19 (Figura 9.1b), 85,58 (Figura 9.2b) e 87,66 (Figura 9.3b) e de clorofila 'b' (660/700 nm) de 85,30 (Figura 9.1c), 80,54 (Figura 9.2c) e 81,13 (Figura 9.3c) e quando as sementes foram submetidas ao teste de germinação, exibiram comportamentos distintos, com a semente 1 originando uma semente morta (Figura 9.1d) e com as sementes 2 e 3 originando, respectivamente, plântulas com 0,78 cm e 2,61 cm de comprimento total aos 5 dias após a semeadura (Figuras 9.2d e 9.3d), indicando diferenças na viabilidade e no vigor das sementes.

Figura 9. Imagens de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana com valores médios semelhantes de fluorescência de clorofila ‘a’ de 620/730 nm (1a, 2a e 3a), de fluorescência de clorofila ‘a’ de 645/700 nm (1b, 2b e 3b) e de fluorescência de clorofila ‘b’ de 660/700 nm (1c, 2c e 3c), originando semente morta (1d) e plântulas com diferentes comprimentos (2d e 3d).

Outro fator interligado são os padrões de distribuição da clorofila na semente, pelo fato da semente de arroz ser na realidade um fruto (cariopse) envolto pelas glumelas (NEDEL et al., 2004), podendo interferir em análises de imagens, por apresentarem limitações de penetração da radiação incidente na amostra, como é o caso das análises de imagens multiespectrais e de FC. Diante disto, é possível observar na figura 10, que existem padrões de distribuição da clorofila na sementes de arroz (cariopse), considerando as glumelas e o endosperma + embrião: na semente 1, o valor de fluorescência de clorofila ‘a’ de 620/730 nm nas glumelas foi de 3177 e no endosperma + embrião de 1817 (Figura 10.1b), valores estes considerados baixos; já na semente 2 verificou-se os valores 6273 e 5913 (Figura 10.2b), respectivamente, valores estes considerados altos, revelando uma concentração maior de clorofila nas glumelas; por outro lado, na semente 3, há uma maior concentração de clorofila no endosperma + embrião (11031) do que nas glumelas (5176), observadas na Figura 10.3b, isso possivelmente ocasionou falhas no processo de formação da semente, com interferência

na síntese de tecidos do endosperma e, provavelmente, acarretando em um maior espaço vazio da cavidade interna da semente.

Figura 10. Fluorescência de clorofila nas glumelas e no endosperma + embrião das sementes de arroz do cultivar BRS Catiana: imagens RGB (1a, 2a e 3a) e imagens de fluorescência de clorofila ‘a’ de 620/730 nm (1b, 2b e 3b) das glumelas e do endosperma + embrião, separadamente.

O endosperma + embrião das sementes de arroz apresentaram padrão de reflectância média maior que das glumelas até a banda espectral de 570 nm, com uma inversão dos valores a partir daí (Figura 11). A menor reflexão das bandas correspondentes ao vermelho e infravermelho próximo (NIR) pelo endosperma + embrião se deve ao maior conteúdo de carboidratos, como o amido, e em menores quantidades a amilose e amilopectina (BEWLEY e BLACK, 2006), sendo a absorvância destes componentes químicos maior nesses comprimentos de onda e, portanto, menor a reflectância (LI et al., 2018; SPIELBAUER et al., 2009; SATO et al., 2008). Segundo Peske et al. (2003) os carboidratos são os principais constituintes da semente de arroz, representando em termos médios, 85 % da composição química da semente. A principal função do carboidrato na semente é o fornecimento de energia para a retomada de desenvolvimento do embrião durante a germinação (MARCOS FILHO, 2005). A concentração de amido na semente de arroz depende do cultivar, variando de 72 % a 82 % em arroz integral, por exemplo, conforme observado por Frei et al. (2003).

Esse comportamento espectral, considerando os aspectos morfológicos da semente de arroz (cariopse), varia de acordo com a composição química e a quantidade de tecidos do endosperma e isso, aliado aos diferentes padrões de reflectância individuais das glumelas e do endosperma + embrião, torna imprecisa a avaliação da média de lotes de sementes e sua relação com testes de germinação e de vigor, como constatado no teste de correlação de Pearson (Figura 8).

Figura 11. Intensidade média espectral de 19 comprimentos de onda (nm) das glumelas e do endosperma + embrião de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana.

Considerando todas as sementes de todos os lotes, as médias de reflectância das sementes que foram submetidas ao teste de germinação e geraram sementes mortas ou originam plântulas anormais e sementes que geraram plântulas normais diferiram estatisticamente nas bandas espectrais de comprimento de onda de 590 nm a 780 nm e na banda de 970 nm (Figura 12). As bandas correspondentes ao vermelho e NIRs, no espectro eletromagnético, apresentaram distinção entre os grupos de sementes, expondo semelhança no padrão de reflectância das glumelas e no endosperma + embrião (Figura 11), sendo possível afirmar que estas bandas possibilitam a discriminação de sementes de arroz para estimar sua germinação.

Figura 12. Intensidade média espectral de 19 comprimentos de onda (nm) para as sementes que não germinaram ou originaram plântulas anormais e sementes que geraram plântulas normais de arroz do cultivar BRS Catiana. ** indica diferença significativa entre sementes não germinadas e germinadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). NS indica que não há diferença significativa.

Na figura 13, é possível observar que as sementes que não germinam ou originam plântulas anormais apresentaram maior valor médio de fluorescência de clorofila da região do vermelho – 630/700 nm (A) e de clorofila ‘a’ – 645/700 nm (B), com diferença estatística significativa entre si, enquanto que as médias de fluorescência de clorofila ‘b’ – 660/700 nm (C) e de clorofila ‘a’ – 620/730 nm (D), não apresentaram diferença estatística significativa entre si. Resultados semelhantes também foram observados por Jalink et al. (1998), que verificaram que a magnitude da fluorescência de clorofila nas sementes de repolho (*Brassica oleracea* L.) é inversamente relacionada ao desempenho germinativo ou à capacidade de geração de plântulas normais. Utilizando sementes de couve, Jalink et al. (1998; 1999), verificaram que a germinação das sementes foi maior em sementes com baixo sinal de FC; resultados semelhantes também foram observados por Cicero et al. (2009) em sementes de soja e por Xing et al. (2010) em sementes de trigo.

Ainda na figura 13, é possível observar que sementes que apresentaram valores de fluorescência de clorofila de 630/700 nm e de 645/700 nm iguais ou superiores a 55,58 e 112,92, respectivamente, não germinam ou originam plântulas anormais.

Figura 13. Diferenças entre sementes que não germinaram ou originaram plântulas anormais e sementes que geraram plântulas normais de arroz do cultivar BRS Catiana, em fluorescência de clorofila da região do vermelho - 630/700 nm (A), de clorofila 'a' - 645/700 nm (B), de clorofila 'b' - 660/700 nm (C) e de clorofila 'a' - 620/730 nm (D). ** indica diferença significativa entre sementes não germinadas e germinadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). NS indica que não há diferença significativa. Linha verde representa a média. As barras representam o desvio padrão.

A percentagem média de espaço vazio na cavidade interna de sementes de arroz que não germinam ou originam plântulas anormais (13,66 %) foi maior do que as sementes que geraram plântulas normais (6,68 %), com diferença estatística significativa (Figura 14). Vale ressaltar que, sementes que obtiveram valores de espaço vazio igual ou superior a 18,68 % não germinaram ou originam plântulas anormais.

Outros trabalhos apresentaram resultados similares em sementes de outras espécies, como em sementes de aroeira-branca, em que a germinação estava relacionada com o espaço

ocupado pelo embrião na cavidade embrionária (MACHADO e CICERO, 2003), a baixa germinação de sementes de mamona com o preenchimento da cavidade interna inferior a 50% (CARVALHO et al., 2010) e a elevada área do espaço vazio da cavidade interna de sementes de pimentão que gerou aumento na percentagem de plântulas anormais ou sementes não germinadas (GAGLIARDI e MARCOS-FILHO, 2011).

Figura 14. Diferença entre sementes que não germinaram ou originaram plântulas anormais e sementes que geraram plântulas normais de arroz do cultivar BRS Catiana, em percentagem de espaço vazio na cavidade interna. ** Indica diferença significativa entre sementes não germinadas e germinadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). Linha verde representa a média. As barras representam o desvio padrão.

Dell'Aquila (2007), observou que a área ocupada pelo embrião + endosperma em sementes de pimentão, quando inferior a 97,3 % comprometeram a germinação devido ao aumento do número de plântulas anormais. O desenvolvimento do embrião está diretamente ligado ao sucesso do processo germinativo, além disso, a maior quantidade de tecidos de reservas, mediante a maior área ocupada pelo endosperma, representa maior disponibilidade de reservas a serem assimiladas durante a germinação (LIU et al., 1993).

Na figura 15, é possível observar uma semente com baixa percentagem de espaço vazio na cavidade interna (4,2 %), apresentando elevada área ocupada pelos tecidos do endosperma e do embrião (Figura 15A), além de apresentar baixos valores médios de

fluorescência de clorofila ‘a’ de 620/730 nm (4380), de fluorescência de clorofila ‘a’ de 645/700 nm (88,76) e ‘b’ de 660/700 nm (87,64), representadas nas figuras 15B, 15C e 15D, respectivamente. Esta semente apresentou um padrão de reflectância de 19 bandas espectrais (Figura 15E), seguindo valores baixos nos comprimentos de ondas do vermelho e NIRs, com um padrão espectral de sementes que geraram plântulas normais (Figura 11), como a semente em questão, originando uma plântula normal com 2,97 cm de comprimento total aos 11 dias após a emergência da plântula (Figura 15F).

Figura 15. Imagens de semente de arroz do cultivar BRS Catiana, com baixa percentagem de espaço vazio na cavidade interna, mensurado a partir da imagem radiográfica (A) e baixos valores médios de fluorescência de clorofila ‘a’ de 620/730 nm (B), de fluorescência de clorofila ‘a’ de 645/700 nm (C) e ‘b’ de 660/700 nm (D), e de 19 bandas espectrais com utilização do filtro “Inverse jet” (software VideometerLab4®), com respectivo histograma de reflectância (E), originando uma plântula normal (F).

Por outro lado, na figura 16, observa-se uma semente com elevada percentagem de espaço vazio na cavidade interna (18,89 %), com desenvolvimento embrionário e endospermático comprometido (Figura 16A); além disso, valores médios de FC se mostraram elevados: fluorescência de clorofila ‘a’ de 620/730 nm (69,13), fluorescência de clorofila ‘a’ de 645/700 nm (152,22) e ‘b’ de 660/700 nm (135,39), representadas nas Figuras 16B, 16C e

16D, respectivamente. O padrão de reflectância de 19 bandas espectrais da semente (Figura 16E) apresentou maiores valores nos comprimentos de ondas do vermelho e NIRs, se comparada com a semente da Figura 15, que seguiu um padrão espectral de sementes que geraram plântulas normais, e por sua vez, a semente da figura 16F, apresentou padrão espectral de sementes que não germinaram (Figura 11).

Figura 16. Imagens de semente de arroz do cultivar BRS Catiana, com elevada percentagem de espaço vazio na cavidade interna, mensurado a partir da imagem radiográfica (A) e altos valores médios de fluorescência de clorofila ‘a’ de 620/730 nm (B), de fluorescência de clorofila ‘a’ de 645/700 nm (C) e ‘b’ de 660/700 nm (D), e de 19 bandas espectrais com utilização do filtro “Inverse jet” (software VideometerLab4®), com respectivo histograma de reflectância (E), originando uma semente morta (F).

Assim, verifica-se que as imagens de fluorescência de clorofila, multiespectral e de raios X são técnicas importantes para análise não destrutiva e confiável da qualidade das sementes de arroz. O grau de desenvolvimento embrionário, a partir do espaço livre na cavidade interna da semente de arroz, está diretamente associado ao seu desempenho, com possibilidade de utilização na indústria de sementes. Já as técnicas de imagens de fluorescência de clorofila e multiespectral, constituem tecnologia que associam a visão computacional e a espectroscopia para obtenção de informações espaciais e espectrais das sementes de arroz, sem necessidade de pré-tratamentos, podendo abrir novas possibilidades de monitoramento em tempo real de sementes, com a integração de sensores ópticos. Entretanto,

para aumentar a confiabilidade e a reprodutibilidade dessas técnicas, a integração de sistemas devidamente calibrados é essencial, para evitar saturações e medições incorretas. Além disso, o custo e a vida útil dos equipamentos (*hardware* e *software*) devem ser considerados para a construção de um sistema viável de imagem óptica *on line*.

4.2 Experimento 2: Relações entre imagens de raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila com a eficiência fotossintética das plântulas

Apesar das análises estatísticas de PCA e correlações de Pearson deste experimento não considerarem as médias dos lotes e sim as sementes como dados individuais, as figuras 17, 18 e 19 apresentam as médias dos parâmetros de imagens para os lotes, para fins de visualização prévia dos dados obtidos.

O espaço vazio (Figura 17A) da cavidade interna de sementes de arroz não apresentou diferença estatística entre os lotes, ao contrário do que foi verificado no experimento 1. Por outro lado, a área média das sementes (Figura 17B) apresentou maior valor para o lote 3 (24,82 mm²), com diferença estatística significativa em relação aos demais lotes, os quais apresentaram valores semelhantes entre si. Com relação à densidade relativa (Figura 17C), na média dos lotes, não foram observadas diferenças estatísticas entre os lotes.

Todos os parâmetros obtidos a partir das imagens de fluorescência de clorofila 'a' de 620/730 nm (energia de excitação/emissão) apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os lotes. O índice de antocianina (Figura 17D) apresentou menor valor médio para o lote 4 (0,78), enquanto que para o índice de clorofila (Figura 17E) o menor valor médio foi observado para o lote 3 (0,77). A FC (Figura 17F) das sementes do lote 3 apresentou o maior valor médio (5445,21).

Figura 17. Variáveis obtidas com análise de imagens de raios X: espaço vazio (A), área da semente (B) e densidade relativa (C), e com imagens de fluorescência de clorofila de 620/730 nm – energia de excitação/emissão: índice de antocianina (D), índice de clorofila (E) e fluorescência de clorofila (F) de sementes de seis lotes de arroz do cultivar BRS Catiana. Letras diferentes nas extremidades superiores das colunas, dentro de cada avaliação, indicam diferenças estatísticas entre os lotes pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). As barras representam o desvio padrão.

Os espectros médios de reflectância dos seis lotes de sementes nos comprimentos de ondas das 19 bandas espectrais estão expostos na Figura 18 e apresentaram padrões semelhantes aos observados no experimento 1 (Figura 6) e a exemplo deste, com maior intensidade média para o lote 3 em todas as bandas espectrais.

Ainda na figura 17, observa-se que a análise de fluorescência de clorofila de 630/700 nm (Banda 21), de 645/700 nm (Banda 22) e de 660/700 nm (Banda 23) apresentaram maiores valores para o lote 3; este lote também apresentou maior valor médio para o parâmetro de cor CIELab L, mas com menores valores médios para CIELab a^* e CIELab b^* , pelo modelo nCDA do VideometerLab.

Figura 18. Análises multiespectrais, correspondendo a 22 bandas espectrais (365, 405, 430, 450, 470, 490, 515, 540, 570, 590, 630, 645, 660, 690, 780, 850, 880, 940, 970, 630/700, 645/700, 660/700 nm, respectivamente) com gráficos individuais e de cor (CIELab L, CIELab a* e CIELab b*) de sementes de seis lotes de arroz do cultivar BRS Catiana. Letras diferentes nas extremidades superiores das colunas, dentro de cada avaliação, indicam diferenças estatísticas entre os lotes pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). As barras representam o desvio padrão.

Os valores médios dos lotes de sementes referentes ao rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m) e à fluorescência de clorofila de plântulas (FC plântula) aos 7, 9 e 11 dias após a emergência estão expostos nas Figura 19. Nesta figura é possível observar que o F_v/F_m apresentou diferença estatística entre os lotes apenas aos 9 dias após a emergência (Figura 19C), enquanto que a FC das plântulas diferiu aos 9 e 11 dias após a emergência (Figuras 19D e 19F). Além disso, é possível observar aumento da fluorescência de clorofila e da eficiência fotossintética com o progresso do desenvolvimento da plântula.

Figura 19. Análises de rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m) (A, C, E) e fluorescência de clorofila (FC) de plantas (B, D, F) aos 7, 9 e 11 dias após a emergência (DAE) das plântulas de seis lotes de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana. Letras diferentes nas extremidades superiores das colunas, dentro de cada avaliação, indicam diferenças estatísticas entre os lotes pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). As barras representam o desvio padrão.

Os dados obtidos nas análises das imagens radiográficas, multiespectrais e de FC das sementes, além do F_v/F_m e FC de plântulas foram submetidas à análise de PCA (Figura 20A). Os dois primeiros componentes principais explicaram 86,5 % da variância total entre os parâmetros de imagens das sementes e de plântulas, com 70,9 % e 15,6 % para PC1 e PC2, respectivamente. A partir desta análise é possível observar a separação dos lotes de sementes, com tendência do lote 3 com maiores valores das refletâncias das bandas espectrais e de FC das sementes e maiores valores de F_v/F_m e FC das plântulas aos 9 e 11 dias após a emergência das plântulas, enquanto que os lote 1, 2, 5 e 6 apresentaram os menores valores dessas variáveis.

Considerando os valores dos parâmetros de imagens (raios X, multiespectrais e de fluorescência de clorofila) das sementes individuais e os parâmetros das imagens de eficiência fotossintética (F_v/F_m) e de fluorescência de clorofila das plântulas geradas a partir destas, e não valores médios de lotes, é possível observar correlações significativas (Figura 20B).

Sementes que apresentaram elevada reflectância média nas bandas espectrais de comprimento de ondas de 365 nm a 780 nm geraram plântulas com maior eficiência fotossintética (F_v/F_m) aos 11 dias após a emergência das plântulas (Figura 20B), podendo-se afirmar que essas bandas espectrais estão relacionadas ao desempenho das plântulas.

A determinação do rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do PSII, dada por F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0$), é mensurada tipicamente em uma folha intacta, a partir de uma adaptação no escuro durante 20 minutos antes da determinação. É incidido sobre a superfície da folha um flash saturador, fazendo com que a fluorescência aumente do estado basal (F_0) ao seu valor máximo (F_m). Assim, o primeiro aceptor de elétrons de PSII, a Quinona A, é totalmente reduzida. Em folhas saudáveis, o valor de F_v/F_m gira em torno de 0,8, independentemente da espécie vegetal. Um valor mais baixo indica que os centros de reação PSII estão danificados, um fenômeno chamado foto-inibição (SCHREIBER et al, 1993).

Diante deste resultado, pode-se afirmar que em sementes de arroz que germinaram, o teor de clorofila, mensurado a partir da técnica de imagens de fluorescência de clorofila, afetou positivamente no potencial fotossintético da plântula gerada, com possível contribuição das moléculas de clorofila presentes na semente no aparelho fotossintético.

Baseado no modelo nCDA, sementes com elevados valores de CIELab L e baixos de CIELab b * geraram plântulas com maior eficiência fotossintética (F_v/F_m) aos 11 dias após a emergência das plântulas, apresentando correlações significativas (Figura 20B).

A

B

Figura 20. A: Gráfico biplot da análise de componentes principais obtido a partir das variáveis relacionadas às análises de raios X, imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila e fisiológicas de sementes e rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m) e fluorescência de clorofila de plantas de seis lotes de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana. PC1 - Componente Principal 1; PC2 - Componente Principal 2. B: Estimativas das correlações de Pearson entre as múltiplas características de análises de raios X, imagens multiespectrais e de fluorescência de clorofila e análises fisiológicas de sementes e rendimento quântico da máxima eficiência fotoquímica do FSII (F_v/F_m) e fluorescência de clorofila de plantas de seis lotes de sementes de arroz do cultivar BRS Catiana.

Na figura 21, é possível observar uma semente que gerou uma plântula com elevada capacidade fotossintética aos 11 dias após a emergência, indicado pelo elevado valor de F_v/F_m , de 0,777 (Figura 21H), além de apresentar elevada FC, de 34.090 (Figura 21G); esta semente apresentou valores médios de fluorescência de clorofila 'a' de 645/700 nm de 90,12 (Figura 21B), de clorofila 'b' de 660/700 nm de 84,15 (Figura 21C), de clorofila 'a' de 620/730 nm de 34.234 (Figura 21D) e com um padrão de reflectância seguindo valores elevados nos comprimentos de ondas de 365 nm a 780 nm (Figura 21E).

Figura 21. Imagens RGB (A), de fluorescência de clorofila 'a' de 620/730 nm (B), de fluorescência de clorofila 'a' de 645/700 nm (C), de fluorescência de clorofila 'b' de 660/700 nm (D) e de 19 bandas espectrais com utilização do filtro “*Inverse jet*” (software *VideometerLab4*®), com respectivo histograma de reflectância (E) de semente de arroz do cultivar BRS Catiana, com as imagens RGB (F), de fluorescência de clorofila (G) e de eficiência fotossintética mensurada pelo F_v/F_m (H) da plântula originada, aos 11 dias após a emergência.

A semente da figura 22, apresentou valores médios de fluorescência de clorofila 'a' 645/700 nm de 88,72 (Figura 22B), de clorofila 'b' de 660/700 nm de 79,81 (Figura 22C) e de clorofila 'a' de 620/730 nm de 4234 (Figura 22D), valores estes menores que os observados para a semente da Figura 21. Esta distinção também foi observada para o padrão de reflectância, que apontou valores baixos nos comprimentos de ondas de 365 nm a 780 nm (Figura 22E). A plântula gerada a partir desta semente obteve baixa capacidade fotossintética aos 11 dias após a emergência, indicado pelo baixo valor de F_v/F_m , de 0,526 (Figura 22H), além de apresentar baixa FC, de 31.889 (Figura 22G).

Figura 22. Imagens RGB (A), de fluorescência de clorofila 'a' de 620/730 nm (B), de fluorescência de clorofila 'a' de 645/700 nm (C), de fluorescência de clorofila 'b' de 660/700 nm (D) e de 19 bandas espectrais com utilização do filtro "Inverse jet" (software VideometerLab4®), com respectivo histograma de reflectância (E) de semente de arroz do cultivar BRS Catiana, com as imagens RGB (F), de fluorescência de clorofila (G) e de eficiência fotossintética mensurada pelo F_v/F_m (H) da plântula originada, aos 11 dias após a emergência.

Assim, a imagem de fluorescência de clorofila utilizando diferentes combinações de emissão de excitação, aliado a imagem multiespectral, tem alta precisão em distinguir sementes que gerarão plantas com diferentes capacidades de conversão de luz em processos químicos da fotossíntese. Tendo em vista a crescente demanda da indústria agrícola por tecnologia capazes de melhorar a eficiência nos processos produtivos, essas novas tecnologias surgem como importantes alternativas na utilização em programas de controle de qualidade de sementes de arroz.

5. CONCLUSÕES

Sementes de arroz com espaço vazio interno igual ou superior a 18,68 % não germinam ou originam plântulas anormais.

Sementes de arroz que não germinam ou originam plântulas anormais apresentam maior reflectância nas bandas espectrais de comprimento de onda de 590 nm a 780 nm (41,46 % a 64,21 %) e na banda de 970 nm (75,65 %).

Sementes de arroz que não germinam ou originam plântulas anormais, apresentam valores de fluorescência de clorofila iguais ou superiores a 55,58 e a 112,92, respectivamente, nas energias de excitação/emissão de 630/700 nm e de 645/700 nm.

O endosperma + embrião das sementes de arroz apresentam reflectância média maior que das glumelas nas bandas espectrais de 395 nm a 570 nm; por outro lado, no intervalo de 570 nm a 970 nm são as glumelas que apresentam maior reflectância média.

A maior eficiência fotossintética das plântulas de arroz aos 11 dias após a emergência está diretamente relacionada com as reflectâncias das bandas espectrais de 365 nm a 780 nm das sementes.

REFERÊNCIAS

- ALVES, W.M.; FARONI, L.R.D.A.; QUEIROZ, D.M.; CORRÊA, P.C.; GALVÃO, J.C.C. Qualidade dos grãos de milho em função da umidade de colheita e da temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.3, p.469-474, 2001.
- AREFI, A.; MOTLAGH, A.M.; TEIMOURLOU, R.F. Wheat class identification using computer vision system and artificial neural networks. **International Agrophysics**, v.25, p.319-325, 2011.
- ARRUDA, N. Avaliação da morfologia interna de sementes de citrumelo “Swingle” por meio de raios X. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** – Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- AOSA - Association of Official Seed Analysts. **Seed vigor testing handbook**. Springfield: AOSA, 2009. 341p. (Contribution, 32).
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M.; HALMER, P. **The encyclopedia of Seeds: Science, technology and uses**. Cambridge: CABI, 2006. 828p.
- BOELT, B.; SHRESTHA, S.; SALIMI, Z.; JØRGENSEN, J.R.; NICOLAISEN, M.; CARSTENSEN, J.M. Multispectral imaging—A new tool in seed quality assessment?. **Seed Science Research**, v.28, p.222–228, 2018.
- BOELT, B.; SHRESTHA, S.; SALIMI, Z.; JØRGENSEN, J.R.; NICOLAISEN, M.; CARSTENSEN, J.M. Multispectral imaging – a new tool in seed quality assessment? **Seed Science Research**, p.1–7, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 2009. 395p.
- 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**, v.58, n.6, p.1339-1349, 2007.

- CALDERINI, D.F.; ORTIZ-MONASTERIO, I. Grain position affects grain macronutrient and micronutrient concentrations in wheat. **Crop Science**, v.43, n.1, p.141-151, 2003.
- CARVALHO, I.L. Aperfeiçoamento metodológico do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de arroz. – **Tese (Doutorado)**: UFPel. Pelotas, 2015. 95p.
- 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, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.
- CHEN, X.; XUN, Y.; LI, W.; ZHANG, J.X. Combining discriminant analysis and neural networks for corn variety identification. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.71, p.148-153, 2010.
- CHENG, F.; YING, Y.B.; LI, Y.B. Detection of defects in rice seeds using machine vision. Transactions of the **ASABE**, v.49, p.1929-1934, 2006.
- CICERO, S.M. Aplicação de imagens radiográficas no controle de qualidade de sementes. **Informativo Abrates**, v.20, p.48, 2010.
- 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**, v.25, n.1, p.25-28, 2003.
- CICERO, S.M.; VAN DER SCHOOR, R.; JALINK, H. Use of chlorophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.4, p.145-151, 2009.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Décimo levantamento. Brasília, DF, v.7, n.10, 2020.
- COSTA, D.S.; KODDE, J.; GROOT, S.P.C. Chlorophyll fluorescence and X-ray analyses to characterise and improve paddy rice seed quality. **Seed Science and Technology**, v.42, p.449-453, 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**, v.37, n.8, p.1183-1188, 2002.
- CUSTÓDIO, C.C.; MARCOS FILHO, J. Potassium leachate test for the evaluation of soybean seed physiological quality. **Seed Science and Technology**, v.25, n.3, p.549-564, 1997.
- DELL'AQUILA, A. Pepper seed germination assessed by combined X radiography and computer-aided imaging analysis. **Biologia Plantarum**, v.51, n.4, p.777-781, 2007.
- ELMASRY, G.; MANDOUR, N.; WAGNER, M.H.; DEMILLY, D.; VERDIER, J.; BELIN, E.; ROUSSEAU, D. Utilization of computer vision and multispectral imaging techniques for classification of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Plant Methods**, n.15, v.24, 2019
- ELMASRY, G.; SUN, D.W.; ALLEN, P. Non-destructive determination of water-holding capacity in fresh beef by using NIR hyperspectral imaging. **Food Research International**, v.44, p.2624-2633, 2011.
- EMBRAPA Clima Temperado: **Cultivo do arroz irrigado no Brasil, 2005**: importância econômica, agrícola e alimentar do arroz. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadBrasil/cap01.htm>. Acesso em: dezembro de 2018.
- FERNANDES, J.S.; SILVA, D. F.; SANTOS, H.O.; PINHO, H.V.O. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de frutos de fisális em diferentes estádios de desenvolvimento. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.15, n.2, p.165-168, 2016.
- FLOR, E.P.O.; CICERO, S.M.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.68-76, 2004.
- FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; PÁDUA, G.P.; LORINI, I.; HENNING, F.A. Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade. **Embrapa Soja - Documentos**, p.75, 2016.

- FRANCO, D.F.; PETRINI, J.A. **Testes de vigor em sementes de arroz**. Brasília. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2002. (Comunicado Técnico, 68).
- FREI, M.; SIDDHURAJU, P.; BECKERSTUDIES, K. Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, n.83, p.395–402, 2003.
- GAGLIARDI, B.; MARCOS-FILHO, J. Relação entre germinação e estrutura de sementes de pimentão avaliada pelo teste de raios X. **Scientia Agricola**, v.68, n.4, p.411-416, 2011.
- GMACH, J.R. **Caracterização agronômica de variedades locais de arroz de sequeiro para produção de sementes no sistema orgânico**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2015.
- 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**, v.36, n.2, p.195-200, 2014.
- GOMES-JUNIOR, F.G. Aplicação da análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes. **Informativo Abrates**, v.20, n.3, p.33-39, 2010.
- GÓRNIK, K.; JANAS R.; GRZESIK M. Fluorescencja chlorofilu miernikiem dojrzalosci nasion kolendry siewnej [chlorophyll fluorescence of coriander seeds as maturation meter. **Episteme**, v.20, n.1, p.317–322, 2013.
- HANELT, D. Photosynthesis assessed by chlorophyll fluorescence. **Bioassays**. p.169-198, 2018.
- HENNING, F.A.; MERTZ, L.M.; JACOB JUNIOR, E.A.; MACHADO, R.D.; FISS, G.; ZIMMER, P.D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, v.69, n.3, p.727-734, 2010.
- HOFFMASTER, A.L.; FUJIMURA, K.; MCDONALD, M.B.; BENNETT, M.A. An automated system for vigor testing three-day old soybean seedlings. **Seed Science and Technology**, v.31, n.3, p.701-713, 2003.

- HUANG, M.; WANG, Q.G; ZHU, Q.B.; QIN, J.W.; HUANG, G. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. **Seed Science and Technology**, v.43, p.337–366, 2015.
- INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 323 p.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Method 10519: rapeseed; determination of chlorophyll content; spectrometric method**. Geneva, 1992. 190 p.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **International rules for seed testing**, Zurich, 2004. p.174.
- JACKMAN, P.; SUN, D.W. Recent advances in image processing using image texture features for food quality assessment. **Trends in Food Science and Technology**, v.29, p.35-43, 2013.
- JALINK, H.; FRANDAS, A.; VAN DER SCHOOR, R.; BINO, J.B. Chlorophyll fluorescence of the testa of *Brassica oleracea* seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. **Scientia Agricola**, v.55, p.88–93, 1998.
- JALINK, H.; VAN DER SCHOOR, R.; BIRNBAUM, Y.E.; BINO, R.J. Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. **Acta Horticulturae**, v.504, n.12, p.219–228, 1999.
- KONSTANTINOVA, P.; VAN DER SCHOOR, R.; VAN DEN BULK, R.; JALINK, H. Chlorophyll fluorescence sorting as a method for improvement of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed health and germination. **Seed Science and Technology**, v.30, p.411-421, 2002.
- KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p.218, 1999.
- LI, C.; WANG, X.; MENG, Z. Tomato seeds maturity detection system based on chlorophyll fluorescence. **Optical Design and Testing VII**, v.10021, p.1-7, 2016.

- LIU Z.H.; CHENG, F.M.; CHENG, W.D.; ZHANG, G.P. Positional variations in phytic acid and protein content within a panicle of japonica rice. **Journal of Cereal Science**, v.41, p.297–303, 2005.
- 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**, v.3, p.171-178, 1993.
- 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**, v.3, p.171-178, 1993.
- MACHADO, C.F.; CICERO, S.M. ‘Aroeira branca’ seed quality evaluation by the X-ray test. **Scientia Agricola**, v.60, n.2, p.393-397, 2003.
- MACHADO, T.P.M.; MEDEIROS, A.D.; PINHEIRO, D. T.; SILVA, L.J.; DIAS, D.C.F. S. Non-destructive identification of physical damage in mung bean (*Vigna radiata* L.) Seeds by x-ray image analysis. **Bioscience Journal**, v.36, n.3, p.932-941, 2020.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.
- MARCHI, J.L.; GOMES JUNIOR, F.G. Uso de técnicas de análise de imagem para determinar o tamanho do embrião das sementes de *Senna multijuga* (Rich) e sua relação com germinação e vigor. **Journal of Seed Science**, v.39, p.13-19. 2017.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.
- MARCOS-FILHO, J.; BENNETT, M.A.; EVANS, A.S.; GRASSBAUGH, E.M. Assessment of melon seed vigour by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. **Seed Science and Technology**, v.34, n.2, p.507-519, 2006.

- 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.
- MARCOS-FILHO, J.; KIKUTI, A.L.P.; LIMA, L.B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo a análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.102-112, 2009.
- MATTIONI, F.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; MARCOS-FILHO, J.; GUIMARÃES, S.C. Vigor de sementes e desempenho agrônômico de plantas de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.1, p.108 - 116, 2012.
- MEDEIROS, A.D.; ARAÚJO, J.O.; ZAVALA-LEÓN, M.J.; SILVA, L.J.; DIAS, D.C.F.S. Parameters based on x-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v.42, n.6, p.643–652, 2018.
- MOHAMMED, A.R.; TARPLEY, L. Effects of night temperature, spikelet position and salicylic acid on yield and yield-related parameters of rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Journal of Agronomy and Crop Science** v.197, n.1, p.40-49, 2011.
- MONDO, V.H.V.; CICERO, S.M.; DOURADO-NETO, D.; PUPIM, T.L.; DIAS, M.A.N. Effect of seed vigor on intraspecific competition and grain yield in maize. **Agronomy Journal**, v.105, n.1, p.222-228, 2012.
- NASSIF, P.; CICERO, S.M. Avaliação de sementes de acerola por meio de raios-X. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.542-545, 2006.
- NEDEL, J.L.; SCHUCH, L.O.B.; ASSIS, F.N.; CARMONA, P.S. A planta de arroz: morfologia e fisiologia. In: PESKE, S.T.; SCHUCH, L.O.B.; BARROS, A.C.S.A. Ed. **Produção de arroz irrigado**, 3ed. Pelotas: Universitária/UFPel, 2004.
- NIKAJIMA, S.; ITO, H.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, v.160, p.261–273, 2012.

- OLESEN, M.H.; CARSTENSEN, J.M.; BOELT, B. Multispectral imaging as a potential tool for seed health testing of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Seed Science and Technology**, v.39, p.140-150, 2011.
- OOMS, D.; DESTAIN, M.S. Evaluation of chicory seeds maturity by chlorophyll fluorescence imaging. **Biosystems engineering**, v.110, p.168-177, 2011.
- ORRÙ, M.; GRILLO, O.; VENORA, G.; BACCHETTA, G. Computer vision as a method complementary to molecular analysis: Grapevine cultivar seeds case study. **Comptes Rendus Biologies**, v.335, p.602-615, 2012.
- PÁDUA, G.P.; FRANÇA-NETO, J.D.B.; CARVALHO, M.L.M.; COSTA, O.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Tolerance level of green seed in soybean seed lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.128–138, 2007.
- PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.A.; ROTA, G.R.M. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, Editora Universitária, 2003.
- 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**, v.37, p.110-120, 2009.
- PORRA, R.; THOMPSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic spectroscopy. **Biochimic Biophysic Acta**, v.975, p.384-394, 1989.
- R CORE TEAM. **R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing**. 2018. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acessado em: 30 mar. 2020
- RAD, S.J.M.; TAB, F.A.; MOLLAZADE, K. Classification of rice varieties using optimal color and texture features and BP neural networks. **Seventh Iranian Conference on Machine Vision and Image Processing**, IEEE Iran Section, p.1-5, 2011.
- ROCHA, C.R.M.; SILVA, V.N.; CICERO, S.M. Internal morphology and germination of sunflower seeds. **Journal Seed Science**, v.36, n.1, p.48-53, 2014.

- PULIDO, F.J.R.; GALLEGU, R.F.; MIRET, M.L.G.; GONZALO, J.C.R.; BAILON, M.T.E.; HEREDIA, F.J. Preliminary study to determine the phenolic maturity stage of grape seeds by computer vision. **Analytica Chimica Acta**, v.732, p.78-82, 2012.
- SAKO, Y.; McDONALD, M.B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A.F.; BENNETT, M.A. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, v.29, n.3, p.625-636, 2001.
- SATO, T. Nondestructive measurements of lipid content and fatty acid composition in rapeseeds (*Brassica napus* L.) by near infrared spectroscopy. **Plant Production Science**, v.11, p.146–150, 2008.
- SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". **Nature methods**, v.9, p.671-675, 2012.
- SCHREIBER U.; BILGER W. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. In: Lu'ttge U, Ziegler H, editors. **Progress Botany**, v.54, p.151-73, 1993.
- SHRESTHA, S.; DELEURAN, L.; OLESEN, M.; GISLUM, R. Use of multispectral imaging in varietal identification of tomato. **Sensors**, v.15, p.4496–4512, 2015.
- SILVA, C.B.; LOPES, M.M.; MARCOS-FILHO, J.; VIEIRA, R.D. Automated system of seedling image analysis (SVIS) and electrical conductivity to assess sun hemp seed vigor. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.1, p.55-60, 2012.
- SILVA, V.N.; SARMENTO, M.B.; SILVEIRA, A.C.; SILVA, C.S.; CICERO, S.M. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acça sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.1158-1169, 2013.
- SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. **Tree and shrub seed handbook**, p.14-28, 1991.
- SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, v.39, n.3/4, p.458-468, 1953.

- SMIDERLE, O.J.; PEREIRA, P.R.V.S. Épocas de colheita e qualidade fisiológica das sementes de arroz irrigado cultivar BRS 7 Taim, em Roraima. **Revista Brasileira de Sementes (Impresso)**, v.30, p.74-80, 2008.
- SMIDERLE, O.J.; DIAS, C.T. Época de colheita e armazenamento de sementes de arroz produzidas no cerrado de Roraima. **Revista Agro@mbiente**, v.5, n.1, p.18-23, 2011.
- SOARES, A.A. **Cultura do arroz**. 3. ed. rev. Lavras: UFLA, 2012. 119 p.
- SPIELBAUER, G.; ARMSTRONG, P.; BAIER, J.W.; ALLEN, W.B.; RICHARDSON, K.; SHEN, B.; SETTLES, A.M. High-throughput near-infrared reflectance spectroscopy for predicting quantitative and qualitative composition phenotypes of individual maize kernels. **Cereal Chem.** v.86, p.556–564, 2009.
- STEFFE, J.F.; SINGH, R.P.; MILLER JR. G.E. Harvest, drying and storage of rough rice. In: LUH, B. S. (ed) Rice: production and utilization. **Westport: Connecticut AVI Publishing**, p.311-359, 1980.
- TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Accumulation of seed vigour during development and maturation. In: ELLIS, R.H.; BLACK, M.; MURDOCH, A.J. (Ed.). **Proceedings of the fifth international workshop on seeds**, p.369-384, 1995.
- 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**, v.119, n.2, p.258-263, 1994.
- VERGARA, B.S. Plant growth and development. In: UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES. **Rice production manual**. Laguna, p.17-37. 1970.
- WARD, K.; SCARTH, R.; DAUN, J.; VESSEY, J.K. Chlorophyll degradation in summer oilseed rape and summer turnip rape during seed ripening. **Canadian Journal of Plant Science**, v.75, n.2, p.413–420, 1995.
- WU, D.; SUN, D. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review - Part I: Fundamentals. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.19, p.1-14 2013.

- XING, J., SYMONS, S., SHAHIN, M. AND HATCHER, D. Detection of sprout damage in Canada western red spring wheat with multiple wavebands using visible/near-infrared hyperspectral imaging. **Biosystems Engineering**, v.106, p.188-194, 2010.
- YADAV, S.K.; JALINK, H.; GROOT, S.P.C.; VAN DER SCHOOR, R. YADAV, S.; MADLANI, M.; KODDLE, J. Quality improvement of aged cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) seeds using chlorophyll fluorescence sensor. **Scientia Horticulturae**, v.189, p.81–85, 2015.
- ZHENG, C.; SUN, D.; ZHENG, L. Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p.642-655 2006.
- ZORATO, M.F.; PESKE, S.T.; TAKEDA, C.; FRANÇA NETO, J.B. Sementes esverdeadas em soja: testes alternativos para determinar a sua qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.1-10, 2007a.
- ZORATO, M.F.; PESKE, S.T.; TAKEDA, C.; FRANÇA NETO, J.B. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.11–19, 2007b.