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

**Avaliação da morfologia interna e do vigor de sementes de feijão-caupi por
meio de técnicas de análise de imagens**

Carlos Henrique Queiroz Rego

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

**Piracicaba
2019**

Carlos Henrique Queiroz Rego
Engenheiro Agrônomo

**Avaliação da morfologia interna e do vigor de sementes de feijão-caupi por
meio de técnicas de análise de imagens**

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

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

Piracicaba
2019

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

Rego, Carlos Henrique Queiroz

Avaliação da morfologia interna e do vigor de sementes de feijão-caupi por meio de técnicas de análise de imagens / Carlos Henrique Queiroz Rego. - - Piracicaba, 2019.

55 p.

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

1. *Vigna unguiculata* (L.) Walp 2. Raios X 3. Espaço vazio 4. Vigor-SI. Título

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos ao longo de minha trajetória.

A minha mãe **Telma**, por sempre acreditar em mim e por ter abdicado parte de sua vida em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.

Ao meu irmão **Thiago**, por toda a amizade e parceria ao longo desses anos.

Aos meus avós **José Carlos** e **Maria D’Lourdes**, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu infinito amor, por Sua eterna compreensão e tolerância, por me permitir errar, aprender e crescer, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ) pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Silvio Moure Cicero, pela orientação, competência, profissionalismo, dedicação e amizade. Seus inúmeros ensinamentos e seu profissionalismo foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. Sou profundamente grato pela confiança depositada em mim e foi uma honra tê-lo como meu orientador.

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

Ao Prof. Dr. Júlio Marcos-Filho, por toda a contribuição e ensinamento dedicados ao longo da realização da Pós-Graduação. Obrigado!

Ao Eng. Agr. Dr. Francisco Guilhien Gomes Junior, pela valiosa contribuição na realização desse trabalho, por seus ensinamentos, por sua dedicação e amizade. Muito obrigado!

À empresa Sementes Tomazetti e ao Eng. Agr. Edilson Rocha, pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho.

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

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Adilson, David, Hodair, João e Luis Claudio pela amizade, conhecimento e apoio necessário.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Sementes Andres Trujillo, Artur Silva, Bruno Cardillo, Fabiano França, Gustavo Fonseca, Livia Rohr, Lucas Capelaro, Nielsen Moreira e Patricia Galletti, pela amizade, bons momentos compartilhados e todo apoio na realização deste trabalho. Muito obrigado!

À secretária do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Luciane Lopes Toledo, pela atenção e auxílio prestados ao longo da realização do período de Mestrado.

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

À Prof. Charline Zaratini Alves da UFMS campus de Chapadão do Sul, pela amizade, carinho e toda a dedicação e confiança depositada sobre mim durante o período da graduação que foram fundamentais na minha formação profissional e pessoal.

À Bióloga Ana Carina da Silva Candido, Técnica de Laboratório de Sementes da UFMS campus de Chapadão do Sul, pela amizade, apoio e ensinamentos prestados.

À minha mãe Telma Garcia de Queiroz Rego, por todo o amor e apoio incondicional para com seus filhos. Eu jamais teria chegado até aqui sem você! Obrigado por tudo, te amo!

À minha família, por todo carinho e amor. Muito obrigado pela confiança e apoio, vocês são a base de tudo.

A todos os amigos que estiveram presentes ao longo de minha vida, mesmo distantes se fizeram presentes com seu apoio, amizade e companheirismo!

A todos aqueles que de alguma forma estiveram próximos de mim, fazendo a minha vida valer a pena cada dia a mais.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho!

Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Avaliação da morfologia interna das sementes – teste de raios X.....	21
3.2. Análise computadorizada de imagens de plântulas – Vigor-S.....	22
3.3. Avaliações complementares.....	24
3.4. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Avaliação da morfologia interna das sementes – teste de raios X.....	27
4.2. Avaliação do potencial fisiológico das sementes.....	40
4.3. Análise computadorizada de imagens de plântulas – Vigor-S.....	44
5. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	49

RESUMO

Avaliação da morfologia interna e do vigor de sementes de feijão-caupi por meio de técnicas de análise de imagens

Os objetivos deste trabalho consistiram na avaliação da morfologia interna de sementes de feijão-caupi, por meio da análise de imagens radiográficas, relacionando-a com o seu potencial fisiológico e na avaliação do vigor das sementes com a utilização do *software* Vigor-S[®] (Sistema de Análise Automatizada do Vigor de Sementes). Neste estudo foram utilizados sete lotes de sementes do cultivar BRS Guariba. A primeira etapa constituiu na avaliação da morfologia interna de sementes, onde as sementes foram submetidas ao teste de raios X e posteriormente ao teste de germinação. Na determinação dos percentuais de espaço vazio entre a área embrionária e o tegumento das sementes, foi utilizado o *software* ImageJ; com base nos resultados obtidos, foi realizada a classificação das sementes em diferentes categorias. A segunda etapa do experimento consistiu na avaliação do vigor das sementes por meio dos testes de primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, emergência e velocidade de emergência de plântulas em areia e o uso do sistema computadorizado de imagens de plântulas Vigor-S (Sistema de Análise Automatizada do Vigor de Sementes), em duas épocas de avaliação. Os dados foram submetidos a análise da variância, em delineamento inteiramente casualizado e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Concluiu-se que a análise de raios X permite a identificação de diferentes tipos de danos e que a presença de danos nas sementes pode afetar a germinação, dependendo da extensão destes e de sua localização, possibilitando estabelecer relações de causa-efeito; o emprego do *software* ImageJ foi eficiente na mensuração de espaços vazios na cavidade interna de sementes de feijão-caupi; lotes com sementes que contém maior espaço resultam em maior número de plântulas anormais e sementes mortas. A análise computadorizada de plântulas por meio do *software* Vigor-S, com plântulas aos três dias de idade é uma alternativa segura para detectar diferenças de vigor entre os lotes.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, Raios X, Espaço vazio, Vigor-S

ABSTRACT

Evaluation of the internal morphology and vigor of cowpea seeds by image analysis techniques

The objectives of this research were to evaluate the internal morphology of cowpea seeds, through the analysis of radiographic images, relating to the physiological potential and the evaluation of seed vigor with the use of Vigor-S® software (Automated Seed Vigor Analysis system). In this study, seven lots of cowpea seeds, cultivar BRS Guariba, were used. The first step was the evaluation of seed internal morphology, submitting the seeds to the X-ray test and later to the germination test. To determine the percentages of free space between the embryonic area and the seed coat, the ImageJ software was used; based on the results obtained, the seeds were classified into different classes. The second step was to evaluate seed vigor by germination first count, accelerated aging test, electrical conductivity, seedling emergence and speed of emergence in sand and the use of the Vigor-S computerized seedling imaging system, in two evaluation periods. Data were subjected to analysis of variance in a completely randomized design and their means were compared by Tukey test ($p \leq 0.05$). It was concluded that X-ray analysis allows the identification of different types of damage and the presence of seed damage affect germination depending on their extension and location, allowing the establishment of cause-effect relationships. ImageJ software is an effective tool for measuring free spaces in the internal cavity of cowpea seeds; seed lots with higher percentage of free space resulting from abnormal seedlings and dead seeds Computerized seedling analysis using Vigor-S software with three-day-old seedlings is a useful alternative to detect vigor differences between lots.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, X rays, Free space, Vigor-S

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Identificação das partes constituintes de uma semente de feijão-caupi através do teste de raios X.....	21
Figura 2. Aspecto geral da janela de análise do software Vigor-S após o processamento de imagem	23
Figura 3. Imagem radiográfica de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, com ausência de danos nas partes da semente (3a), originando plântula normal (3b).	29
Figura 4. Imagens radiográficas de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, apresentando tecidos deteriorados no eixo embrionário e nos cotilédones (4a e 4c), originando plântula anormal (4b) e semente morta (4d).	31
Figura 5. Imagem radiográfica de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, com danos mecânicos no eixo embrionário e cotilédones (5a, 5c e 5e), originando plântulas anormais (5b e 5d) e semente morta (5f).	33
Figura 6. Imagem radiográfica de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, apresentando dano por malformação no eixo embrionário (6a), originando uma semente morta (6b) e danos por percevejo nos cotilédones (6c), originando uma plântula anormal (6d).	34
Figura 7. Porcentagem de espaços vazios na cavidade interna de cada semente; amostra de 200 sementes de feijão-caupi do cultivar Guariba, lotes 1 a 4.	36
Figura 8. Porcentagem de espaços vazios na cavidade interna de cada semente; amostra de 200 sementes de feijão-caupi do cultivar Guariba, lotes 5 a 7.	37
Figura 9. Porcentagem de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, distribuídas em três categorias com base nos valores médios de espaço vazio no interior da semente.	38
Figura 10. Sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, distribuídas em três categorias de acordo com o espaço vazio no interior das sementes: imagens de raios X (1a, 2a e 3a) e imagens de raios X após o processamento do <i>software ImageJ</i> (1b, 2b e 3b).	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de água de sete lotes de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba. ..	27
Tabela 2. Porcentagem de ocorrência de sementes com danos totais (DT), danos por deterioração (DD), danos mecânicos (DM), danos por malformação (MF), danos por insetos (DI) e plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) de sete lotes de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba.	28
Tabela 3. Médias de espaço vazio (%) na cavidade interna das sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, avaliadas por meio do <i>software ImageJ</i> , e desvio padrão, utilizados para definição das categorias.	35
Tabela 4. Teor de água de sete lotes sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba antes do início das avaliações (TA) e após o envelhecimento acelerado (após EA), em duas épocas de avaliação.	41
Tabela 5. Germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), emergência de plântulas (E) e índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE), em sete lotes de semente de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, em duas épocas de avaliação.	43
Tabela 6. Índices de vigor (IV) e de uniformidade de desenvolvimento (IU) e comprimento total de plântulas (CT), comprimento de hipocótilo (CH) e comprimento de raiz (CR) no software Vigor-S, em sete lotes de sementes de feijão-caupi, cultivar BRS Guariba em duas épocas de avaliação.	45

1. INTRODUÇÃO

Com a expansão do mercado de sementes nos níveis nacional e internacional também é crescente a demanda por materiais que expressem alto potencial após a semeadura ou durante o armazenamento. Esses fatores destacam a importância de um programa de controle de qualidade capaz de selecionar lotes de sementes de alto potencial fisiológico e que atendam as quantidades demandadas. Nesse aspecto, é notória a necessidade do desenvolvimento de técnicas que avaliem, com precisão, a qualidade de sementes.

A qualidade fisiológica de sementes é rotineiramente aferida por meio do teste de germinação e devem ser complementadas por testes de vigor, já que somente o teste de germinação pode superestimar o potencial germinativo em comparação a resposta das sementes quando expostas às condições adversas de campo. Entretanto, muitos destes testes são demorados e exigem treinamento dos analistas, que podem muitas vezes interpretá-los de forma errônea.

Com o avanço da tecnologia é recorrente o desenvolvimento de novas técnicas para a avaliação do potencial fisiológico das sementes; estas técnicas devem ser simples, de alta reprodutibilidade e apresentar rapidez na geração de resultados. Nesse sentido, a análise de imagens de sementes vem ganhando cada vez mais destaque; um exemplo é o emprego de raios X na avaliação da morfologia interna de sementes (Gomes-Junior, 2010; Melo et al., 2010). Segundo a ISTA (2007), trata-se de uma análise rápida, não destrutiva e que possibilita detectar sementes bem formadas ou vazias, acometidas por algum dano ou que foram atacadas por insetos. Além disso, é possível mensurar características morfológicas das sementes, como área, largura, comprimento, circularidade e espaço vazio no interior das sementes que podem ser relacionadas com o seu potencial fisiológico. Vale ressaltar que essas análises são realizadas com o auxílio de *softwares*, o que torna o processo de avaliação automatizado, rápido e menos subjetivo.

Outra alternativa disponível é a análise computadorizada de imagens de plântulas; as primeiras pesquisas foram realizadas por McCormac et al. (1990) para sementes de cenoura e alface. Mais recentemente, uma parceria entre a Universidade de São Paulo (USP/ESALQ) e a Embrapa (Embrapa Instrumentação), possibilitou o desenvolvimento do *Sistema de Análise Automatizada do Vigor de Sementes* – Vigor-S. Castan et al. (2018), constataram que o Vigor-S é eficiente na avaliação do vigor de sementes de milho e ressaltaram a importância do desenvolvimento de estudos complementares com outras espécies, de forma a ampliar a sua aplicabilidade.

Em um programa de controle de qualidade de sementes é importante que se obtenha o máximo de informações possíveis a respeito das sementes para que seja traçado um diagnóstico preciso quanto a qualidade das mesmas. Dessa forma, a relação entre diversas técnicas pode ser um ótimo aliado dos tecnologistas de sementes. Algumas pesquisas já demonstraram, por exemplo, que há relação direta entre a morfologia interna das sementes com o seu potencial fisiológico. Abud et al. (2018), constataram que por meio de imagens de raios X de sementes de brócolis foi possível classificar os lotes em diferentes níveis de vigor com base na relação das características morfológicas da semente e o comprimento de plântulas.

Considerando as vantagens da utilização da análise de imagens na pesquisa em sementes e que sua aplicabilidade pode constituir uma importante técnica em programas de controle de qualidade de sementes, o presente trabalho tem os objetivos de avaliar a morfologia interna de sementes de feijão-caupi, por meio da análise de imagens radiográficas, relacionando-a com o seu potencial fisiológico e avaliar o vigor das sementes com a utilização do programa Vigor-S.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma espécie autógama, herbácea, de porte variável e rústica, pertencente à família Fabaceae e tem como centro de origem a região tropical da África (Freire-Filho, 2011); foi introduzido no Brasil pelos colonizadores portugueses, no Estado da Bahia, em meados do século XVI (Alves et al., 2010).

A produção de feijão-caupi é destinada, principalmente, ao consumo de grãos, secos ou verdes, podendo ainda ser destinado a produção de forragem, feno, silagem, ou ainda, adubo verde (Dutra; Teófilo, 2007). Por se tratar de uma leguminosa, é uma importante fonte de proteína, principalmente em países da África, Ásia, América Central, América do Sul, em algumas região do Mediterrâneo e nos Estados do sul dos Estados Unidos (Singh et al., 1997; Pasquet, 2000); as sementes contém, em média, 25% de proteínas e 67% de carboidratos (Devi et al., 2015). Além disso, pode ser cultivado em regiões semiáridas e com pouca necessidade de insumos (Langyintuo et al., 2003; Hall, 2012).

As principais regiões produtoras e consumidoras de feijão-caupi são a África Ocidental e Central. Atualmente, a Nigéria é o maior produtor, com cerca de 2,14 milhões de toneladas e com um consumo de 3,0 milhões de toneladas (FAO, 2017). Outros países produtores são a República do Níger e Burkina Faso, com produção em torno de 1,59 e 0,57 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil é o quarto principal produtor e segundo o último levantamento, foram produzidas cerca de 647.134 toneladas de feijão-caupi (Embrapa Arroz e Feijão, 2017).

A produtividade média do feijão-caupi é inferior a 500 kg.ha^{-1} , considerada baixa quando comparada com um rendimento potencial, superior a 2.000 kg.ha^{-1} (Boukar et al., 2019). No Brasil, a maior parte da produção é proveniente da agricultura familiar, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste, que correspondem as menores médias de produtividade do país, 836 e 353 kg.ha^{-1} , respectivamente. Em regiões onde predominam grandes produtores e considerável uso de tecnologia, como é o caso das regiões Centro-Oeste e Sudeste, os rendimentos chegam a 1.085 kg.ha^{-1} e 1.797 kg.ha^{-1} (Embrapa Arroz e Feijão, 2017).

A baixa produtividade do feijão-caupi pode ser atribuída à ocorrência de condições de estresses, sejam eles abióticos ou bióticos. Entretanto, Boukar et al. (2016) enfatizaram que é importante considerar que existe uma considerável limitação ao acesso à sementes de alta qualidade e materiais melhorados geneticamente. Corroborando com estas informações, Freire-Filho (2011), relatou que a taxa do uso de sementes de feijão-caupi está em torno de 10%, sendo que é quase que restrita à região Centro-Oeste, onde são utilizadas sementes certificadas em praticamente toda a área cultivada.

Cardoso e Ribeiro (2006) apontaram que no Brasil um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade de feijão-caupi é o uso de cultivares com baixo potencial produtivo. Segundo Santos et al. (2009), os principais acessos utilizados, são propagados e mantidos pelos próprios produtores, safra a safra, ocasionando a perda da pureza genética destes cultivares. Além disso, as sementes de feijão-caupi geralmente são armazenadas em condições de ambiente não controlados (Smiderle et al., 2017), o que pode contribuir na perda de viabilidade e do vigor até a ocasião da semeadura.

Contudo, pesquisas têm contribuído para o aumento da produtividade da cultura do feijão-caupi, visando sobretudo, estimular a iniciativa empresarial na produção da espécie em larga escala. Segundo Freire-Filho (2011), um importante exemplo disso foi a parceria entre Embrapa, universidades e empresas do setor privado na seleção de cultivares aptos às regiões de cultivo, associado ao uso de sementes de alta potencial fisiológico. Embora a produção agrícola não possa ser superior a capacidade genética da semente utilizada (Damião-Filho; Môro, 2001), o emprego de sementes de alta qualidade é fundamental para o aumento da produtividade (Marcos-Filho, 2015).

Para Krzyzanowski et al. (1993), a utilização de sementes de alto potencial fisiológico é uma peça chave no estabelecimento de uma lavoura. A qualidade de uma semente pode ser definida como o produto da interação de quatro fatores: genético, físico, sanitário e fisiológico (Marcos-Filho, 2015).

A avaliação do potencial fisiológico de sementes é rotineiramente analisada por meio do teste de germinação; entretanto, por ser conduzido sob condições controladas, apresenta limitações e pode superestimar o real potencial dos lotes de sementes. Em razão disso, é necessário que haja complemento destas informações mediante a utilização de testes de vigor. O vigor de sementes pode ser definido como um conjunto de características que determinam o potencial da semente em se estabelecer no campo de forma rápida e uniforme, formando uma plântula normal, sob ampla faixa de condições do ambiente (Baalbaki et al., 2009).

Segundo Marcos-Filho et al. (2009), os testes de vigor têm sido utilizados a fim de identificar diferenças entre lotes de sementes, evidenciando os de maior potencial fisiológico, com maiores chances de sucesso em campo. Diferente do teste de germinação, os testes de vigor são capazes de detectar pequenas variações a respeito do grau de deterioração dos lotes, mesmo que apresentem germinação semelhante (Baalbaki et al., 2009). No entanto, é aconselhável que o analista adote um conjunto de testes ao longo do processo de avaliação, pois nem sempre o teste mais indicado para avaliar o potencial de emergência das plântulas

em campo é também o mais adequado para avaliar diferenças entre o potencial de armazenamento entre lotes de sementes (Marcos-Filho, 1999).

Diversos são os testes recomendados para a avaliação do vigor de sementes de feijão-caupi, dentre eles, o teste de condutividade elétrica (Batista et al., 2012), envelhecimento acelerado (Dutra et al., 2006) e tetrazólio (Rodrigues et al., 2015). Apesar da eficiência comprovada destes testes, estes podem demandar considerável período de tempo para a obtenção dos resultados, necessidade de experiência e treinamento do analista, além da possível subjetividade das avaliações; portanto, vale a pena considerar que a soma desses fatores pode interferir na avaliação de lotes de sementes.

Dessa forma, é sempre desejável que técnicas existentes sejam aprimoradas e que alternativas inovadoras sejam desenvolvidas, de forma a facilitar o processo de avaliação da qualidade de sementes, tornando-o mais eficiente e rápido (Marcos-Filho et al., 2009). Atualmente o uso de recursos computacionais é uma realidade na avaliação da qualidade de sementes (Marcos-Filho, 2015), já que a análise de imagens possibilita obter uma série de informações a respeito das sementes com base em suas características (Mondo; Cicero, 2005).

A aplicação da técnica de raios X na avaliação de sementes foi iniciada na década de 1950 com sementes de *Pinus sylvestris* L. (Simak, 1991). Nesta análise, as sementes são submetidas a uma fonte de raios X, absorvendo parte dessa radiação, em quantidade variável em função de sua espessura, densidade e composição química, além do comprimento de onda da radiação, criando uma imagem permanente (Bino et al., 1993). Os locais escurecidos da imagem correspondem a área onde os raios X penetram com maior facilidade, enquanto que áreas mais claras representam partes de maior densidade da semente, ou seja, onde há atenuação da radiação pela semente (Simak, 1991). Embora os raios X possam ser considerados potencialmente nocivos às sementes, a baixa dose absorvida durante o teste não é capaz de afetar o seu desempenho (Swaminathan; Kamra, 1961).

O teste de raios X é considerado pela ISTA (2004) uma análise rápida, não destrutiva, sem necessidade de tratamento prévio das sementes, com a finalidade de detectar sementes bem-formadas ou vazias, com danos mecânicos ou atacadas por insetos. Segundo Cicero (2010), o teste de raios X, possibilita avaliar com precisão a ocorrência de danos internos na semente, assim como a sua localização e extensão.

São diversas as aplicações desta técnica na avaliação de sementes; é possível identificar a ocorrência de danos mecânicos (Cicero; Banzatto-Junior, 2003; Flor et al., 2004; Mondo et al., 2009; Pinto et al., 2012), avaliação de danos por “umidade” em sementes de soja (Pinto et al., 2007), danos por secagem (Menezes et al., 2005), sementes atacadas por

insetos (Masetto et al., 2007; Melo et al., 2010; Brancalion et al., 2011), estudos sobre a maturação de sementes (Nakada et al., 2011), estudos sobre a sensibilidade à dessecação de sementes (Goodman et al., 2005; Muxfeldt et al., 2012), avaliação da estrutura e o estágio de desenvolvimento de embriões de sementes (Nassif; Cicero, 2006), dentre outros.

Além disso, o teste de raios X pode ser usado na relação entre a morfologia interna da semente e seu vigor (Marcos-Filho, 1994); os primeiros estudos nesse sentido, relacionaram a morfologia de sementes de tomate com a germinação e a morfologia das plântulas, neste caso, foi possível observar que sementes que apresentavam algum dano, ou que não se desenvolveram completamente, resultavam em plântulas anormais (Liu et al., 1993; Van Der Burg et al., 1994). Nessa mesma linha, Nassif e Cicero (2006), avaliando a morfologia interna de sementes de acerola, concluíram que sementes com embriões malformados resultaram em plântulas anormais ou em sementes mortas no teste de germinação. Em diversos outros trabalhos, também foi verificada a eficiência do teste de raios X para a avaliação da morfologia interna de sementes e sua relação com o potencial fisiológico em sementes de diversas espécies (Machado; Cicero, 2003; Oliveira et al., 2003; Amaral et al., 2011; Silva P. P. et al., 2014).

Nesse sentido, uma das características morfológicas que pode ser levada em consideração é a área embrionária; esta é definida com base no grau de desenvolvimento do embrião e o espaço vazio na cavidade interna da semente (Marcos-Filho et al., 2010). A expressão espaço vazio, pode ser usada para designar a ocorrência de espaços vazios entre o embrião e o endosperma ou entre o conteúdo da semente e o tegumento (Liu et al., 1993); normalmente essas áreas estão localizadas ao redor do embrião. Sementes com essas características, quando submetidas ao teste de raios X exibem na imagem a ocorrência de manchas escurecidas onde existem espaços vazios, já que a cavidade interna da semente não foi completamente preenchida (Gagliardi; Marcos-Filho, 2011).

Dell'Aquila (2007), verificou que sementes de pimentão que apresentavam espaço vazio maior do que 2,7% da área total da semente, apresentaram significativa redução no número de plântulas normais. Nesse contexto, outras pesquisas também atestaram a eficácia desta técnica (Machado; Cicero, 2003; Gomes-Junior et al., 2012; Silva, V. N. et al., 2012; Silva V. N. et al., 2013). Entretanto, em boa parte dos trabalhos foi adotado um sistema de classificação visual, o que pode tornar a análise subjetiva, por não quantificar de maneira precisa a real dimensão do espaço vazio no interior das sementes (Marcos-Filho et al., 2010).

Dessa forma, a pesquisa tem voltado a sua atenção para a automatização da avaliação de atributos morfológicos por meio do uso de *softwares*. Nesse sentido, pesquisadores da

Universidade Estadual de Ohio, nos EUA, desenvolveram o *software Tomato Analyzer*, para avaliação semiautomática das características fenotípicas dos frutos de tomate e que pode ser adaptado para a avaliação de sementes. O *software* é capaz de processar imagens digitais a fim de determinar o formato do fruto e suas partes e ainda definir parâmetros a partir do perímetro ou área (Gonzalo et al., 2009). Embora este *software* tenha sido desenvolvido para avaliação de frutos, pesquisadores relatam a possibilidade de avaliar imagens de sementes (Marcos-Filho et al., 2010; Rocha et al., 2014).

Outro *software* que vêm sendo utilizado na avaliação de características morfológicas de sementes é o *ImageJ*; é um *software* gratuito para processamento de imagens e foi desenvolvido pelo *National Institute of Mental Health*, nos EUA, em linguagem Java. No *software*, a mensuração das características é feita com base na contagem de pixels da região selecionada, mediante a calibração com base em um objeto de dimensões conhecidas (Ferreira; Rasband, 2012). Além disso, o programa ainda permite a expansão da sua finalidade através do uso de plugins escritos em Java. Fazendo uso do *software ImageJ*, Silva, V. N. et al. (2013), constataram que o mesmo foi eficiente na determinação do espaço vazio de sementes *Acca sellowiana*.

É desejável que novas pesquisas visem estabelecer uma alternativa eficiente para identificar relações entre a morfologia de sementes e o potencial fisiológico, principalmente por se tratar de procedimentos simples, rápidos, econômicos e que possibilitam o uso subsequente da semente.

Outro recurso disponível para avaliar a qualidade fisiológica de sementes é por meio da análise computadorizada de imagens de plântulas. O primeiro estudo foi desenvolvido por McCormac et al. (1990), que avaliaram o comprimento da raiz primária a partir de imagens de plântulas de alface e de cenoura. Posteriormente, foi desenvolvido um *software* para avaliação automatizada do vigor de sementes, o *Seed Vigor Imaging System – SVIS®*; nesse programa as imagens são capturadas com o auxílio de um escâner e posteriormente processadas pelo *software*, permitindo o cálculo do índice de vigor, índice de uniformidade e avaliação do comprimento de plântulas ou de suas partes (raiz primária e o hipocótilo), além de determinar índices baseados no crescimento e na uniformidade inicial das plântulas (Sako et al., 2001).

A partir de então a pesquisa buscou ampliar o uso do *software* para sementes de outras espécies como soja (Hoffmaster et al., 2003; Marcos-Filho et al., 2009; Wendt et al., 2014), milho (Otoni; McDonald, 2005; Mondo et al., 2011), feijão (Gomes-Junior et al., 2014), algodão (Alvarenga; Marcos-Filho, 2014), melão (Marcos-Filho et al., 2006), pepino (Chiquito et al., 2012), milho doce (Gomes-Junior et al., 2009), crotalária (Silva, C. B. et al.,

2012) e girassol (Rocha et al., 2015). Além de ser aplicável a diversas espécies, é considerado um método simples e rápido, onde os resultados podem ser obtidos em até 3 minutos, e preciso, pois, elimina a subjetividade do erro humano, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos (Alvarenga et al., 2012).

Entretanto, algumas dificuldades são observadas no uso do SVIS[®], como por exemplo, a necessidade de realizar ajustes na marcação das plântulas após o processamento das imagens pelo programa, o que demanda considerável atenção do analista, de forma que as partes constituintes das plântulas sejam perfeitamente identificadas pelo sistema e os resultados sejam consistentes (Castan et al., 2018). Além disso, o SVIS não é um software de uso livre, sendo que no Brasil o seu uso está restrito ao Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), por meio de um convênio firmado entre a ESALQ e a Universidade de Ohio.

De forma a aprimorar a análise computadorizada de plântulas e suprir possíveis dificuldades encontradas pelo SVIS[®], uma parceria entre a Universidade de São Paulo (USP/ESALQ) e a Embrapa (Embrapa Instrumentação) e com financiamento da Fapesp foi desenvolvido o “**Sistema de Análise Automatizada do Vigor de Sementes – Vigor-S**”, inicialmente para avaliação de plântulas de soja e de milho.

Além de mensurar o comprimento das plântulas, o Vigor-S fornece índices a respeito do vigor e da uniformidade de desenvolvimento das plântulas; o índice de vigor é baseado na rapidez e na uniformidade de desenvolvimento das plântulas, em relação a um valor máximo estimado para as plântulas com idade pré-estabelecida na programação do *software*; já a uniformidade de desenvolvimento é calculada com base nos desvios de comprimento de cada plântula da amostra em relação ao comprimento máximo da plântula, de acordo com um valor pré-estabelecido no próprio *software*.

O Vigor-S segue os mesmos princípios estabelecidos para o SVIS[®]; entretanto, apresenta uma série de vantagens em relação ao SVIS[®], dentre elas, podem-se destacar: a maior precisão na avaliação das imagens, já que adota uma resolução de imagem três vezes superior (300 dpi) à adotada no SVIS[®]; fornece dados individualizados a respeito do comprimento do hipocótilo e da raiz primária e detecta diferenças no vigor das plântulas; permite que os dados obtidos sejam exportados para planilhas (Castan et al., 2018). Segundo Dell’Aquila (2007), o aprimoramento da tecnologia com a integração de novos algoritmos, a disposição do *hardware* para obtenção dos dados e os cálculos adotados pelo programa, contribuem diretamente com a melhoria da análise. Dessa forma, o procedimento se torna

mais eficiente, havendo menor interferência do analista na marcação das plântulas e reduzindo o tempo da análise. Além disso, o *software* encontra-se disponível gratuitamente, via internet.

Lima et al. (2014), em estudos preliminares atestaram a eficiência do Vigor-S na avaliação do vigor em sementes de soja e milho; entretanto, evidenciaram a necessidade de estudos mais detalhados. Posteriormente, Castan et al. (2018), constataram que o Vigor-S foi eficiente na avaliação do vigor em sementes de milho e ressaltaram a importância no desenvolvimento de estudos complementares com outras espécies, de forma a ampliar a sua aplicabilidade.

Rodrigues (2019), concluiu que através do Vigor-S foi possível determinar o potencial fisiológico de sementes de soja, mediante a análise de plântulas com três dias de idade e ressaltou que as informações obtidas pelo Vigor-S apresentam a mesma coerência em relação ao sistema SVIS[®], porém, as informações obtidas pelo Vigor-S são mais detalhadas e o procedimento da análise não requer demasiada interferência do analista quanto às correções necessárias.

Apesar de ter sido desenvolvido especialmente para avaliação de plântulas de milho e soja, espera-se que o uso do Vigor-S seja estendido para outras espécies, assim como aconteceu com o SVIS[®], principalmente para aquelas espécies que apresentam plântulas semelhantes morfológicamente em relação a aquelas espécies para as quais o software foi desenvolvido; nesse sentido, Medeiros et al. (2019), verificaram que foi possível avaliar o vigor de sementes de feijão comum, a partir do Vigor-S, com plântulas escaneadas com dois, três e quatro dias de idade.

Dessa forma, fica evidente a necessidade do aprimoramento de técnicas e recursos computacionais voltados à avaliação do potencial fisiológico das sementes, o desenvolvimento e a ampliação do emprego de técnicas de análise de sementes em outras espécies. Considerando as vantagens da utilização da análise de imagens na pesquisa em sementes, a avaliação da eficiência do teste de raios X e do Vigor-S na avaliação da qualidade de lotes de sementes de feijão-caupi, pode constituir uma importante técnica em programas de controle de qualidade de sementes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e no Laboratório Análise de Imagens do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, campus de Piracicaba, SP. Foram utilizados sete lotes de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba.

3.1. Avaliação da morfologia interna das sementes – teste de raios X

Para a avaliação da morfologia interna das sementes foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada lote. As sementes foram fixadas em fita adesiva dupla face transparente, coladas sobre lâmina de acetato (210 mm x 297 mm) e numeradas de acordo com a posição ocupada na lâmina, para identificação posterior no teste germinação (item 3.3.2.). Afim de se obter as imagens radiográficas foi utilizado o equipamento “*MultiFocus Digital Radiography System – MDRS*”. As imagens radiografadas 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 pode-se observar a imagem de raios X de uma semente de feijão-caupi, com indicações de suas partes (tegumento, cotilédones e eixo embrionário).

Figura 1. Identificação das partes constituintes de uma semente de feijão-caupi através do teste de raios X.

Posteriormente, as sementes (em grupos de 10) foram colocadas para germinar em papel-toalha, distribuídas no terço superior do substrato, de forma que permitisse o desenvolvimento individualizado de cada plântula. Após cinco dias em germinador a 25 °C, as plântulas (normais e anormais) e as sementes não germinadas foram analisadas individualmente por meio da comparação entre as imagens radiografadas das sementes e os danos e alterações morfológicas (danos por deterioração de tecidos, danos mecânicos, danos por insetos e sementes malformadas) que possam ter acometido as sementes, relacionando-os com possíveis anormalidades das plântulas e sementes não germinadas. As plântulas foram fotografadas com o auxílio de uma câmera digital e os resultados foram expressos em porcentagem de danos observados.

Além disso, as imagens radiográficas das sementes foram analisadas pelo *software ImageJ*, versão 1.46r, a fim de que se obter a área do espaço vazio interno, mediante o uso da ferramenta ***fraction area***, a qual representa as áreas livres internas das sementes, expressas em porcentagem; para esta análise foi adotada a metodologia utilizada por Silva, V. N. et al. (2013). Embora as sementes tenham sido analisadas individualmente, foi calculado o valor médio de cada parâmetro para cada na amostra de 200 sementes, a fim de facilitar a discussão dos resultados. Para a área do espaço vazio de sementes, as sementes foram classificadas em três categorias, discriminadas a seguir, com base na média (M) e no desvio padrão (dp) dos valores obtidos para todos os lotes.

- **Categoria 1:** sementes com área livre inferior ao valor da média subtraindo o desvio padrão ($x < M - dp$).
- **Categoria 2:** sementes que tiveram área livre compreendida entre a média subtraindo o desvio padrão e a média ($M - dp < x$).
- **Categoria 3:** sementes com área livre maior que a média mais o desvio-padrão; ($x > M + dp$).

3.2. Análise computadorizada de imagens de plântulas – Vigor-S

Para a análise computadorizada de plântulas pelo programa Vigor-S, foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para cada lote, distribuídas em duas fileiras no terço superior sobre duas folhas de papel-toalha e cobertas com uma terceira folha. O substrato foi previamente umedecido com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato e os rolos de papel-toalha foram mantidos em germinador a 25°C.

Após três dias, as plântulas de cada repetição foram transferidas do rolo de papel-toalha para uma folha de E.V.A. (*Ethylene Vinyl Acetate*) de coloração azul, com dimensões

de 30 cm x 22 cm, correspondente a área útil do escâner HP Scanjet 200, instalado em posição invertida no interior de uma caixa de alumínio (60 x 50 x 12 cm), ajustado para resolução 300dpi e acoplado a um computador Core i7 (3.50 GHz, 16 GB de memória RAM, HD de 1 TB e monitor de 23 polegadas).

No *software*, foram definidas as seguintes configurações: para a contribuição dos valores de crescimento e uniformidade, utilizados para calcular o índice de vigor, foram adotados os valores de 70% e 30%, respectivamente; a contribuição do valor do hipocótilo e da raiz primária para o cálculo do crescimento de plântula foram de 10% e 90%, respectivamente. O software ainda apresenta o valor pré-fixado quanto ao comprimento máximo de plântulas (12,7 cm, para soja). Com base nessas configurações e valores, são calculados os índices médios de vigor e uniformidade de desenvolvimento, que variam de 0 a 1000, além disso, o software também fornece o comprimento médio de hipocótilo, da raiz e do total de plântulas, em centímetros (Figura 2).

Figura 2. Aspecto geral da janela de análise do software Vigor-S após o processamento de imagem

Durante o processamento das imagens escaneadas, o hipocótilo é marcado na cor azul e a raiz na cor vermelha; em alguns casos a mensuração pode não corresponder à dimensão real destas partes; neste caso, é necessário que se realize o ajuste manual, com o auxílio do “mouse”; as plântulas anormais e as sementes não germinadas foram excluídas da leitura mediante um comando específico do programa (“Ctrl+M”). Após todas as correções

necessárias nas plântulas que apresentaram leitura do programa inadequada, os dados foram exportados para uma planilha e analisados posteriormente.

Visando avaliar a eficiência do Vigor-S na avaliação do vigor de sementes de feijão-caupi, foram realizados teste de vigor tradicionalmente indicados para a espécie, discriminados a seguir.

3.3. Avaliações complementares

As avaliações no *software* Vigor-S e demais avaliações complementares, listadas em seguida, foram realizadas em duas épocas com intervalos de quatro meses. Durante o período experimental as sementes foram armazenadas em embalagem porosa em ambiente de câmara seca (20 °C e 50% umidade relativa do ar).

3.3.1. Teor de água

Foi determinado pelo do método da estufa, onde duas repetições com aproximadamente 4,0 g de sementes para cada lote foram submetidas durante 24 horas, a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida).

3.3.2. Germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por lote, tendo como substrato folhas de papel germitest, previamente umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato, mantidas em germinador a 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco (primeira contagem de germinação) e oito dias após a semeadura, computando-se o número de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais segundo metodologia prescrita pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

3.3.3. Envelhecimento acelerado

Quatro repetições de 50 sementes de cada lote foram distribuídas em camada única sobre tela suspensa no interior de caixa de plástico (11 x 11 x 3 cm), contendo 40 mL de água destilada. As caixas foram mantidas em incubadora tipo BOD, regulada 42°C, durante 48 horas, segundo metodologia descrita por Dutra e Teófilo (2007). Posteriormente, as sementes envelhecidas foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito no item 3.3.2. e as avaliações foram realizadas no 5º dia após a instalação do teste de germinação, contabilizando

o número de plântulas normais (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.3.4. Condutividade elétrica

Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas em balança com precisão de 0,0001 g e, posteriormente, colocadas para embeber em copos de plástico (200 mL) contendo 75 ml de água destilada e mantidas em germinador durante 16 horas a 25° C (Dutra et al., 2006). As leituras da condutividade elétrica foram realizadas com o auxílio de um condutivímetro “DIGIMED DM-31” e os valores médios expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ de semente.

3.3.5. Emergência de plântulas em areia

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada lote, distribuídas sobre uma camada de 6 cm de areia de textura média, colocada em caixas de plástico (32 x 28 x 10 cm). Após semeadura, as sementes foram cobertas com uma fina camada de 3 cm de areia e, posteriormente, foi realizada a irrigação até que se atingisse 60% da capacidade de retenção do substrato. As avaliações foram realizadas diariamente, computando-se o número de plântulas emersas até sétimo 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).

3.4. Análise estatística

Os dados do teste de raios X e a avaliação do espaço vazio na cavidade interna de sementes não foram submetidos a análise estatística. O total de plântulas normais, anormais e sementes não germinadas, assim como, a ocorrência de danos às sementes foram calculados em porcentagem em relação à amostra de sementes analisadas. Sendo interpretados mediante o confronto das imagens radiografadas com as imagens fotografadas das plântulas ou das sementes não germinadas provenientes do teste de germinação.

Os resultados obtidos pela análise do vigor de sementes utilizando o Vigor-S e demais testes de vigor tradicionalmente utilizados, foram submetidos a análise da variância, em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da morfologia interna das sementes – teste de raios X

O teor de água das sementes variou de 8,85 a 9,46 (Tabela 1), estes se mostraram adequados para a visualização das estruturas internas das sementes; para Simak (1991), o teor de água das sementes interfere diretamente na densidade óptica e esta influencia na visualização das partes internas que compõe a semente, quanto menor o teor de água da semente, melhor será a visualização de suas estruturas.

Tabela 1. Teor de água de sete lotes de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba.

Lotes	Teor de água (%)
1	9,5
2	9,0
3	9,0
4	9,1
5	9,3
6	8,9
7	9,4

A análise das imagens de raios X permitiu avaliar a ocorrência de danos nas sementes de feijão-caupi (Tabela 2); foram detectados diversos tipos de danos, entre eles, dano ocasionado por deterioração de tecidos, dano mecânico, dano por malformação e dano por inseto (percevejo). O principal dano observado nas sementes foi por deterioração de tecidos; o lote 2 teve 47% de suas sementes classificadas com esse tipo de dano, seguido pelo lote 7, com 39%, já os demais lotes apresentaram em média menos de 25% de suas sementes acometidas por esse dano.

O segundo tipo de dano mais comum encontrado nas sementes foi o mecânico; o lote 1 apresentou a menor porcentagem, cerca de 8%, já o lote 7 teve cerca de 20%, os outros lotes apresentaram de 10 a 16,5% de danos mecânicos em suas sementes. Ainda é possível verificar que danos por malformação de sementes e danos por insetos também acometeram as sementes de feijão-caupi, mas não com a mesma intensidade dos outros danos, já que a sua ocorrência foi significativamente baixa, não ultrapassando 2% das sementes em cada lote.

Tabela 2. Porcentagem de ocorrência de sementes com danos totais (DT), danos por deterioração (DD), danos mecânicos (DM), danos por malformação (MF), danos por insetos (DI) e plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) de sete lotes de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba.

Lotes	Danos em sementes					Germinação		
	DD	DM	MF	DI	DT	PN	PA	SM
	-----	%	-----			-----	%	-----
1	20	8	1	0,5	29,5	91,5	5,5	3
2	47	12,5	1	0	60,5	74	13	13
3	20	12	0	0	32	90	6	4
4	24	10	1,5	0,5	36	86,5	7,5	6
5	24	16	1	0	41	83	9	8
6	25	16,5	1,5	0,5	43,5	79	12	9
7	35	20	1	0,5	56,5	78	11	11

Portanto, verifica-se que os lotes 1, 3 e 4 apresentaram os menores valores de danos totais em suas sementes (29,5%, 32% e 36%, respectivamente), ao passo que, os lotes 2 e 7 tiveram uma taxa de ocorrência de danos superior a 50%, enquanto que os lotes 5 e 6 se comportaram de forma intermediária em relação aos demais. Observando ainda a Tabela 2, é possível observar o comportamento das sementes radiografadas no teste de germinação, podendo-se verificar que, numericamente, os lotes 1 e 3 apresentaram maior número de plântulas normais (91,5% e 90%, respectivamente), enquanto os lotes 2 e 7 apresentaram maior número de plântulas anormais e sementes mortas (13% e 11% para cada uma das variáveis, respectivamente) e menor número de plântulas normais (74% e 78%, respectivamente). Por outro lado, os lotes 4, 5 e 6, apresentaram um desempenho intermediário, apresentando 86%, 83% e 79% de plântulas normais, respectivamente, 8%, 9% e 12% de plântulas anormais, respectivamente, e em média menos de 10% de sementes que não germinaram. Relacionando a percentagem de danos das sementes obtidas por meio do teste de raios X e a posterior germinação das sementes é possível afirmar que lotes que apresentaram maior porcentagem de danos em suas sementes, também foram aqueles lotes que detiveram maior taxa de plântulas anormais ou sementes mortas no teste de germinação.

É importante destacar que nem sempre a ocorrência de danos nas sementes resultam em efeitos negativos na germinação das sementes, já que o local de ocorrência do dano, sua extensão e profundidade é que irá determinar o real efeito do dano sobre a semente. Dessa forma, mesmo os lotes com os menores valores de danos totais (lotes 1 e 3), apresentaram no mínimo 30% de sementes com algum tipo de dano e estas quando submetidas ao teste de

germinação resultaram em mais de 90% de plântulas normais, demonstrando que a severidade do dano é quem determina o real efeito no desempenho da semente. Por exemplo, quando os danos estão restritos aos cotilédones estes podem ser considerados não severos, desde que estejam distantes do eixo embrionário, ao passo que, danos que acometem diretamente o eixo embrionário, tornam a semente incapaz de germinar, já que é uma região vital nos processos metabólicos, onde estão inseridas as partes que constituem o embrião que formará a futura plântula. Melo et al. (2010), observaram que danos severos na região do eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de feijão-caupi resultaram em sementes mortas ou plântulas anormais no teste de germinação.

Na Figura 3a, é possível observar uma semente de feijão-caupi bem formada e livre de danos em suas estruturas. A plântula originada a partir dessa semente foi considerada normal (Figura 3b), pois todas as estruturas essenciais estão intactas e bem desenvolvidas.

Figura 3. Imagem radiográfica de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, com ausência de danos nas partes da semente (3a), originando plântula normal (3b).

Nas Figuras 4a e 4c, podem ser observadas danos por deterioração de tecidos em sementes de feijão-caupi; a principal característica desse dano é a presença de manchas escuras sobre as sementes; estes tecidos apresentam baixa densidade e permitem com maior facilidade a passagem da radiação durante a análise de raios X, promovendo o escurecimento da imagem. Na Figura 4a, é possível observar manchas escuras na parte inferior do eixo embrionário e nas partes periféricas dos cotilédones e quando submetida ao

teste de germinação a semente originou uma plântula anormal, com o sistema radicular comprometido (Figura 4b). Já na Figura 4c, é observado a presença de uma grande mancha escurecida cobrindo boa parte da semente, na região dos cotilédones e do eixo embrionário, provocando a morte da semente (Figura 4d).

A deterioração de sementes pode ser definida como qualquer transformação degenerativa de natureza bioquímica, física, fisiológica ou genética, que culmina na perda do vigor e da viabilidade (Marcos-Filho, 2015). A ocorrência deste tipo de dano está relacionada com condições desfavoráveis de ambiente no campo após a semente atingir a maturidade fisiológica, além disso, a ocorrência de fungos nas sementes pode acentuar a ocorrência desse tipo de dano.

Figura 4. Imagens radiográficas de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, apresentando tecidos deteriorados no eixo embrionário e nos cotilédones (4a e 4c), originando plântula anormal (4b) e semente morta (4d).

É possível observar na Figura 5 a ocorrência de danos mecânicos; a principal característica deste tipo de dano é a presença de trincas sobre as partes que compõe as sementes. A severidade do dano se baseia na sua localização, extensão e profundidade; quando estes estão opostos ao eixo embrionário ou superficiais nas sementes, tendem a não ser tão prejudiciais em relação a germinação das sementes, já quando incide diretamente sobre o eixo embrionário, pode resultar na morte da semente.

Na Figura 5a observa-se que as trincas incidiram longitudinalmente sobre os cotilédones e em parte na região da plúmula, resultando na germinação de uma plântula anormal, com suas estruturas pouco desenvolvidas (Figura 5b). Também é possível observar a ocorrência de danos mecânicos incidentes apenas na região da plúmula (Figura 5c), resultando

em uma plântula anormal, com ruptura dos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula (Figura 5d); conforme observado na a Figura 5e danos que incidiram sobre a plúmula e cotilédones, resultaram na morte da semente (Figura 5f).

Sementes com trincas, rupturas ou perdas de parte dos cotilédones, ainda são capazes de germinar, porém apresentam menor tamanho e podem ter sua estrutura comprometida quando a ruptura é completa. Cicero et al. (1998), fazendo uso de análise de imagens na identificação de danos mecânicos e seu efeito na germinação de sementes de milho constataram que rupturas incidentes transversalmente no endosperma, comprometem a translocação das reservas da semente para o eixo embrionário ou quando ocorriam diretamente no eixo embrionário, afetavam negativamente a germinação das sementes.

Figura 5. Imagem radiográfica de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, com danos mecânicos no eixo embrionário e cotilédones (5a, 5c e 5e), originando plântulas anormais (5b e 5d) e semente morta (5f).

Na Figura 6a, observa-se dano por malformação do eixo embrionário e dano por deterioração de tecidos nos cotilédones e no eixo embrionário; devido ao dano por

deterioração de tecidos ter incidido diretamente sobre o eixo embrionário, resultou na morte da semente; além disso, é possível observar que a semente apresenta um formato diferente quando comparada as demais, sendo mais estreita na região superior.

Na Figura 6c, observa-se um dano por inseto (percevejo) nos cotilédones; é possível observar que os danos incidem sobre região oposta ao eixo embrionário e distante do mesmo, resultando na formação de uma plântula anormal (Figura 6d); o dano provocado pela a picada do percevejo, pode afetar negativamente o desempenho da semente, dependendo do local e extensão da área lesionada, sendo mais grave quando incide diretamente sobre o eixo embrionário (França-Neto; Krzyzanowski, 2018).

Figura 6. Imagem radiográfica de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, apresentando dano por malformação no eixo embrionário (6a), originando uma semente morta (6b) e danos por percevejo nos cotilédones (6c), originando uma plântula anormal (6d).

A análise das imagens radiográficas por meio do *software ImageJ* possibilitou a mensuração dos espaços vazios internos das sementes de feijão-caupi e permitiu a classificação das sementes em diferentes categorias. Na Tabela 3 estão contidos os dados

referentes ao percentual médio do espaço vazio e o desvio padrão dos diferentes lotes de sementes; esses valores serviram como base na determinação das diferentes categorias propostas neste trabalho. Ainda, na Tabela 3, é possível observar que as sementes tiveram entre 4,98% e 6,49% de espaços vazios na cavidade interna.

Tabela 3. Médias de espaço vazio (%) na cavidade interna das sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, avaliadas por meio do *software ImageJ*, e desvio padrão, utilizados para definição das categorias.

Lotes	Espaço vazio (%)	Desvio padrão
1	4,98	1,08
2	6,16	1,26
3	4,74	1,03
4	4,96	1,05
5	5,99	1,35
6	6,31	1,15
7	6,49	1,42
Média	5,66	1,19
Classes		
Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3
< 4,48%	4, 48% a 6,84%	> 6,84%

A distribuição das sementes quanto aos espaços vazios dentro de cada lote podem ser visualizadas nas Figuras 7 e 8. Na Figura 7,, se observa que a maioria das sementes dos lotes 1, 3 e 4 tiveram valores médios de espaços vazios inferiores a 5%, em relação à área total da semente. No lote 5 (Figura 8) as sementes apresentaram, em média, 5,9% de espaço vazio. No lote 2 (Figura 7), e nos lotes 6 e 7 (Figura 8) os valores médios de espaços vazios foram acima de 6%; nesses lotes, várias sementes tiveram valores de espaço vazio acima de 10% e, em alguns casos, chegando aos 15%.

É possível observar diferenças de espaços vazios nas sementes dentro de cada lote, sendo mais acentuadas nos lotes que apresentaram os maiores valores de espaço vazio (lotes 2, 5, 6 e 7); essa amplitude dos valores pode ser atribuída a desuniformidade de maturação de sementes, comum em materiais de crescimento indeterminado, como é caso do cultivar estudado (Gonçalves et al., 2009).

Figura 7. Porcentagem de espaços vazios na cavidade interna de cada semente; amostra de 200 sementes de feijão-caupi do cultivar Guariba, lotes 1 a 4.

Figura 8. Porcentagem de espaços vazios na cavidade interna de cada semente; amostra de 200 sementes de feijão-caupi do cultivar Guariba, lotes 5 a 7.

Na Figura 9 estão expressos os dados referentes à porcentagem de sementes de feijão-caupi atribuídas nas três categorias de espaços vazios; é possível observar que na Categoria 1, ou seja, sementes com menor espaços vazios na cavidade interna, os lotes 3, 1 e 4 foram quem apresentaram as maiores porcentagens de sementes distribuídas nessa categoria, 45%, 43% e 37%, respectivamente; já os lotes 2, 6, 7 e 5 obtiveram os menores valores de número de sementes nessa categoria, cerca de 5%, 7%, 9% e 13% respectivamente. Na Categoria 2, todos os lotes se comportaram de forma semelhante, apresentando grande número de sementes descritas nessa faixa de espaço vazio, sendo que a distribuição das sementes variou entre 51% e 62%. Ainda na Figura 9, observando a distribuição de sementes na Categoria 3, os lotes 7, 2 e 6 foram aqueles que apresentaram sementes com maior área livre no interior de suas

sementes; paralelamente os lotes 1, 3, 4 e 5, tiveram baixos valores percentuais de sementes enquadradas nessa categoria, 2%, 3%, 9% e 17%, respectivamente.

Figura 9. Porcentagem de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, distribuídas em três categorias com base nos valores médios de espaço vazio no interior da semente.

A ocorrência de espaços vazios no interior das sementes, ou seja, áreas não ocupadas pelas partes internas da semente, não oferecem resistência à passagem dos raios X (regiões escurecidas). A Figura 10 é composta por exemplos de sementes de feijão-caupi distribuídas nas três categorias com base na ocorrência das áreas livres (área escura); é possível observar que as sementes 10.1a e 10.2a apresentam maior área ocupada pelos tecidos do embrião e dos cotilédones, do que quando comparadas com a semente 10.3a. Vale ressaltar que a análise das imagens, partindo de estimativas visuais, pode levar a uma quantificação não real a respeito da dimensão de áreas livres presentes no interior das sementes; dessa forma, quando se observa a determinação da área por meio do *software ImageJ* (Figuras 10.1b, 10.2b e 10.3b), a quantificação é muito mais consistente quanto a real extensão do desenvolvimento embrionário ou dos espaços livres dentro das sementes. Além do *software ImageJ*, são indicados na literatura para proceder com esse tipo de análise, o *Tomato Analyzer*[®], sendo que é mais utilizado para sementes que não possuem endosperma (Marcos-Filho et al., 2010) e o *Image ProPlus*[®] (Dell'aquila, 2007; Silva, V. N. et al., 2012).

Figura 10. Sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, distribuídas em três categorias de acordo com o espaço vazio no interior das sementes: imagens de raios X (1a, 2a e 3a) e imagens de raios X após o processamento do *software ImageJ* (1b, 2b e 3b).

É possível afirmar que quanto maior for a área ocupada pelo embrião e os cotilédones no interior da sementes e dessa forma, menor ocorrência de espaços livres, o potencial fisiológicos dessas sementes seria favorecido; um embrião bem desenvolvido requer menor quantidade de energia para seu crescimento, além disso, a maior disponibilidade de reservas, mediante a maior área ocupada pelos cotilédones, representa maior disponibilidade de reservas a serem assimiladas durante a germinação.

Dell'Aquila (2007), avaliou a ocorrência de espaço vazio entre o embrião e o endosperma de sementes de pimentão e constatou que sementes com área (embrião + endosperma) inferior a 97,3% tiveram a germinação comprometida devido ao aumento do

número de plântulas anormais; Machado e Cicero (2003), constataram que sementes de aroeira-branca (*Lithraea molleoides*) em que a proporção embrião/cavidade embrionária foi inferior a 100% não germinaram.

Dessa forma, parece haver uma relação entre a área ocupada pelo embrião no interior da estrutura da semente e o desempenho da semente no momento da germinação; de fato, lotes que apresentaram sementes com maior porcentagem de espaço vazio entre o tegumento e os tecidos embrionários (lotes 2, 6 e 7) tiveram um menor desempenho fisiológico, ao passo que, lotes com sementes bem formadas (maior área embrionária) resultaram em maior número de plântulas normais no teste de germinação (lotes 1, 3 e 4).

Todavia, deve-se considerar que além da área ocupada pelo embrião, a presença de manchas que indiquem deterioração dos tecidos das sementes, danos mecânicos ou ocasionado por insetos e por malformação da semente também podem influenciar a germinação, o que de fato foi constatado no presente estudo. Nem sempre sementes com a maior área livre interna é responsável por reduzir a germinação de sementes, como já foi constatado em outros trabalhos como, berinjela (Silva, V. N. et al., 2012), pimentão (Gagliardi; Marcos-Filho, 2011) e mamona (Gomes-Junior, 2010).

4.2. Avaliação do potencial fisiológico das sementes

O teor de água das sementes no início das avaliações e após o teste de envelhecimento acelerado em duas épocas de avaliação encontram-se na Tabela 4. O teor de água variou de 8,5 a 9,5% na primeira época de avaliação e de 8,1 a 8,3 na segunda época de avaliação. Após serem submetidas ao teste de envelhecimento acelerado, o teor de água das sementes variou de 25,3 a 26,4 na primeira época de avaliação e de 27,4 a 28,1 na segunda época de avaliação. Em cada época a variação do teor de água não foi superior a dois pontos percentuais; dessa maneira, o teor de água não interferiu no desempenho de lotes de sementes durante as avaliações de germinação e vigor (Marcos-Filho et al., 1987).

Tabela 4. Teor de água de sete lotes sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba antes do início das avaliações (TA) e após o envelhecimento acelerado (após EA), em duas épocas de avaliação.

Lotes	Teor de água (%)			
	1ª época		2ª época	
	TA	após EA	TA	após EA
1	9,3	26,1	8,3	27,5
2	8,6	25,3	8,3	27,4
3	9,2	26,4	8,1	27,9
4	9,4	25,7	8,1	27,7
5	9,1	25,9	8,3	27,9
6	9,5	25,5	8,1	27,4
7	8,5	25,8	8,1	28,1

Por meio da análise da variância dos dados verificou-se que o teste F se mostrou significativo ($p \leq 0,05$) na diferenciação dos lotes em todos os testes realizados e nas duas épocas de avaliação. As médias obtidas nos testes de germinação e de vigor (primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, emergência de plântulas e índice de velocidade de emergência de plântulas) e os respectivos coeficientes de variação encontram-se na Tabela 5.

No teste de germinação, durante a primeira época de avaliação, a maior porcentagem de sementes que germinaram foi obtida pelo lote 1 (99%), mas não diferiu significativamente dos lote 3 (97%) e 4 (96%); já o lote com a menor média de plântulas normais foi o lote 2 (85%), não diferindo significativamente dos lotes 5 (91%), 6 (89%) e 7 (88%). Na segunda época de avaliação o lote 1 foi novamente quem apresentou a maior porcentagem de germinação (81%) e este não diferiu significativamente dos lotes 3 (97%) e 4 (90%), da mesma forma, o lote 2 foi responsável pela menor média de germinação (82%), seguido dos lotes 6 (86%) e 7 (84%). Todos os lotes apresentaram porcentagem de germinação dentro dos padrões para comercialização de sementes no Brasil ($G \geq 80\%$).

De maneira semelhante ao teste de germinação, foi possível ranquear os lotes com base nos resultados da primeira contagem de germinação. Na primeira época os lotes 1 e 3 tiveram as maiores médias de plântulas normais (81%), seguido do lote 4 (75%); novamente os lotes 2 e 7 apresentam o menor potencial fisiológico (60%), não diferindo dos lotes 6 e 5 (61% e 66%). Durante a segunda época foi possível observar o mesmo padrão de comportamento dos lotes, sendo o lote 3 com a maior média (75%), seguido do lote 1 (68%), enquanto que os lotes 2 e 7 com as menores porcentagens de plântulas normais (46%).

Ainda analisando os dados de germinação é possível verificar que independentemente da época em que foi conduzido, a taxa de germinação pouco se alterou; em contrapartida, após o período de armazenamento, na segunda época de avaliação, houve redução na quantidade de plântulas normais geradas no teste de primeira contagem de germinação, mesmo em lotes que apresentaram um melhor desempenho fisiológico. Apesar de ser uma importante técnica para a avaliação de sementes, o teste de germinação permite avaliar o potencial de uma amostra para germinar em condições ótimas de ambiente, não sendo capaz de identificar pequenas variações do vigor da amostra de sementes, ficando evidente a necessidade de se complementar as informações mediante a aplicação de testes de vigor.

O ranqueamento dos lotes no teste de envelhecimento acelerado seguiu a mesma tendência dos testes anteriormente discutidos; na primeira época os lotes, 1, 3 e 4 foram os de maior vigor, ao passo que, os lotes 2, 5, 6 e 7 os de menor vigor. Na segunda época, mais uma vez, o lote 1 foi responsável pela maior porcentagem de plântulas normais, seguido pelos lotes 4 e 3; já o lote 2 foi novamente responsável pela menor média; os demais lotes ocuparam o ranqueamento intermediário. Para Marcos-Filho (2015), o teste de envelhecimento acelerado fornece informações valiosas sobre os potenciais de armazenamento e de emergência das plântulas no campo.

Com base nos resultados do teste de condutividade elétrica, durante a primeira época de avaliação, o lote 1 apresentou a menor média dentre os lotes, entretanto, não diferiu dos lotes 3, 4, 5 e 7, já o lote 2 teve a maior média, não diferindo significativamente dos lotes 6, 7, 5 e 4; na segunda época, os lotes 1, 3 e 4 apresentaram maior nível de vigor, ao passo que, os lotes 2 e 7 foram os de menor vigor. O teste de condutividade obedece o princípio de que quanto mais avançado for o estágio de deterioração do lote, e, portanto, menor a sua qualidade, apresentará maior lixiviação de eletrólitos, resultado da menor capacidade de suas membranas em se reorganizarem quando submetidas à embebição (Vieira; Krzyzanowski, 1999); dessa forma, quanto menor o valor de condutividade elétrica apresentado pelo lote, maior qualidade terá o lote.

O teste de emergência de plântulas em areia proporcionou uma classificação dos lotes de forma semelhante aos demais destes realizados, nas duas épocas de avaliação, sendo os lotes 1, 3 e 4 os de maior vigor, já que resultaram nas maiores porcentagem de plântulas que emergiram, enquanto que os lotes 2 e 7 resultaram em menor número de plântulas estabelecidas durante a condução do teste. Em relação a maior velocidade de emergência de plântulas, o lote 1 apresentou a maior média, não diferindo significativamente dos lotes 3 e 4; já a menor média foi obtida pelo lote 7, seguido pelos lotes 6, 5 e 2, durante a primeira época de

avaliação; posteriormente, na segunda época de avaliação, novamente o lote 1 resultou no maior índice, seguido pelos lotes 3 e 5, enquanto que o lote 2 obteve o menor índice, não diferindo significativamente do lote 7.

Tabela 5. Germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado (EA), condutividade elétrica (CE), emergência de plântulas (E) e índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE), em sete lotes de semente de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba, em duas épocas de avaliação.

Lotes	G	PCG	EA	CE	E	IVE
	-----%-----			µS/cm/g	%	-
1ª época						
1	99 a	81 a	77,0 a	179,77 a	96,5 a	2,06 a
2	85 d	60 b	57,5 c	195,10 c	83,5 c	1,70 bc
3	97 ab	81 a	74,50 a	181,87 ab	94,5 ab	1,92 ab
4	96 abc	75 a	71,0 ab	187,46 abc	92,0 abc	1,87 ab
5	91 bcd	66 b	63,5 bc	188,27 abc	85,5 bc	1,72 bc
6	89 cd	61 b	63,5 bc	193,76 bc	84,5 bc	1,57 c
7	88 d	60 b	64,0 bc	191,77 abc	82,5 c	1,45 c
(F)	10,01*	24,27*	13,43*	4,20*	6,54*	11,72*
CV (%)	3,62	5,58	5,69	3,01	5,14	6,95
2ª época						
1	98 a	68 ab	67,5 a	224,82 a	97,50 a	2,01 a
2	82 c	46 d	53,0 c	277,94 c	78,0 c	1,53 a
3	97 ab	75 a	65,0 ab	237,98 ab	93,5 ab	1,93 ab
4	90 abc	66 b	66,50 a	243,49 ab	83,0 bc	1,72 bcd
5	89 bc	63 bc	62,5 bc	256,07 bc	84,5 bc	1,88 abc
6	86 c	56 c	60,0 abc	249,78 b	81,5 bc	1,63 cd
7	84 c	46 d	57,0 bc	275,94 c	81,0 c	1,56 d
(F)	10,89*	36,64*	7,09*	16,52*	7,13*	12,07*
CV (%)	4,22	6,07	6,46	3,80	6,27	10,87

(*) Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, em cada época, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Diante dos resultados apresentados, principalmente naqueles obtidos por meio dos testes de vigor, é possível distinguir um certo padrão quanto ao desempenho dos lotes; os lotes 1, 3 e 4 apresentaram melhor desempenho, ao passo que os lotes 2 e 7 foram os lotes de pior desempenho dentre os destes, enquanto que os lotes 5 e 6 apresentaram um comportamento intermediário, o que pode ser atribuído a diferenças de resultado entre os testes de vigor utilizados; entretanto, estes sempre apresentaram resultados inferiores aos lotes de melhor potencial fisiológico e superior aos de menor potencial fisiológico.

4.3. Análise computadorizada de imagens de plântulas – Vigor-S

A análise da variância dos dados obtidos na avaliação dos lotes pelo *software* Vigor-S foi significativa para todos os parâmetros avaliados (índice de vigor, índice de uniformidade de plântulas, comprimento de plântulas, comprimento de hipocótilo e comprimento de raiz). As médias obtidas na análise computadorizada de imagens de plântulas aos três dias de germinação, encontram-se na Tabela 6.

As informações obtidas com a utilização do Vigor-S foram consistentes nas duas épocas de avaliação e permitiram distinguir os lotes em diferentes níveis de vigor. Os índices de vigor e de uniformidade de plântulas, identificaram os lotes 1, 3 e 4 como os de maior vigor, ao passo que os lotes 2 e 7 menor vigor, concordando com os resultados obtidos nos testes de vigor tradicionalmente utilizados. Segundo Marcos-Filho et al. (2009), o índice de uniformidade de plântulas é parâmetro importante na avaliação do vigor de sementes, pois a formação de um estande inicial adequado depende da emergência rápida e uniforme de plântulas normais. Entretanto, deve-se salientar que lotes compostos apenas por plântulas pouco desenvolvidas também podem gerar alto índice de uniformidade, não sendo composto necessariamente por sementes de alto vigor.

Quanto a avaliação do comprimento total de plântulas e de suas partes (hipocótilo e radícula), o ranqueamento dos lotes obedeceu ao mesmo padrão de comportamento dos lotes nas duas épocas de avaliação; os lotes 1, 3 e 4 apresentaram as maiores médias de crescimento, tanto no comprimento total, quanto de suas estruturas avaliadas separadamente e novamente os lotes 2 e 7 foram quem resultou nos menores valores obtidos; já os demais lotes, apresentaram comportamento intermediário.

Tabela 6. Índices de vigor (IV) e de uniformidade de desenvolvimento (IU) e comprimento total de plântulas (CT), comprimento de hipocótilo (CH) e comprimento de raiz (CR) no software Vigor-S, em sete lotes de sementes de feijão-caupi, cultivar BRS Guariba em duas épocas de avaliação.

Lotes	IV	IU	CT	CH	CR
	-			----- cm -----	
1ª época					
1	597,94 a	778,46 a	7,23 a	2,43 a	4,80 a
2	448,24 d	617,20 c	5,43 c	1,97 c	3,48 d
3	586,72 ab	758,46 a	6,76 a	2,33 ab	4,43 ab
4	546,58 abc	735,96 ab	6,65 ab	2,29 ab	4,35 abc
5	519 c	736,16 ab	5,78 bc	2,18 abc	3,60 cd
6	524,12 c	681,72 bc	5,71 bc	2,12 abc	3,58 cd
7	538,06 bc	668,94 bc	5,78 bc	2,07 bc	3,70 bcd
(F)	13,95*	10,98*	9,86*	4,85*	8,89*
CV (%)	5,50	5,42	7,75	7,40	9,79
2ª época					
1	554,62 a	762,88 a	7,19 a	2,41 a	4,78 a
2	477,46 c	603,98 b	4,85 d	1,49 c	3,35 c
3	547,52 ab	744,62 a	6,79 ab	2,34 ab	4,45 ab
4	528,84 abc	741,08 a	6,58 abc	2,25 ab	4,32 ab
5	539,96 ab	736,96 a	5,86 bcd	2,17 ab	3,68 bc
6	528,56 abc	729,58 a	5,70 cd	2,08 ab	3,62 bc
7	493,24 bc	643,82 b	5,38 d	1,99 b	3,39 c
(F)	4,49*	30,91*	12,31*	11,58*	8,74*
CV (%)	5,75	3,41	8,78	9,52	10,87

(*) Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, em cada época, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Segundo Nakagawa (1999), o teste de comprimento de plântulas ou de suas partes, mensurados manualmente, é eficiente na avaliação do vigor de sementes para diversas espécies; entretanto, é um teste que pode demandar considerável período de tempo para ser executado. Dessa forma, a análise computadorizada de plântulas permitem reduções do período de tempo da análise e da interferência humana (Marcos-Filho et al., 2009).

Embora o uso do Vigor-S seja mais recente, sua eficiência já foi comparada ao SVIS® e a testes de vigor tradicionalmente utilizados, por Rodrigues (2019), em sementes de soja, Castan et al. (2018), em sementes de milho e Medeiros et al. (2019), em sementes de feijão-comum; entre as principais vantagens destacadas por esses autores, estão a maior precisão da análise, obtenção de informações sobre o vigor das plântulas e de partes constituintes (parte aérea, sistema radicular e comprimento total de plântulas), redução do período de tempo da análise e da interferência humana, além de apresentar o custo reduzido da aquisição do sistema, que neste caso se restringe ao escâner.

De maneira geral, diante dos resultados obtidos por meio da avaliação da morfologia interna das sementes, análise computadorizada de plântulas e os testes tradicionalmente recomendados (germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, emergência de plântulas em areia e índice de velocidade de emergência) foi possível separar, de maneira consistente, os lotes de maior (lotes 1, 3 e 4) e de menor (L2 e L7) vigor, nas duas épocas de avaliação. Diante do exposto, pode-se afirmar sistema Vigor-S apresenta sensibilidade na classificação de lotes de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba e em função das diversas vantagens que o sistema apresenta pode se constituir em uma importante técnica em programas interno de controle de qualidade de sementes.

5. CONCLUSÕES

A análise morfológica de sementes, por meio da técnica de raios-X permite avaliar a morfologia interna de sementes de feijão-caupi, identificando suas partes, danos que possam ter acometidos as sementes, entre eles, dano por deterioração de tecidos, dano mecânico, dano por malformação da semente e por insetos, possibilitando estabelecer uma relação entre o dano observado e seu efeito na germinação.

É possível estabelecer uma relação entre porcentagem de espaço vazio na cavidade interna de sementes de feijão-caupi com o seu desempenho durante a germinação; lotes com sementes que contém maior espaço resultam em maior número de plântulas anormais e sementes mortas.

A análise automatizada de imagens de plântulas com três dias de idade, através do *software* Vigor-S é eficiente para a determinação do vigor de sementes de feijão-caupi do cultivar BRS Guariba.

REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F.; CICERO, S. M.; GOMES-JUNIOR, F. G. Radiographic images and relationship of the internal morphology and physiological potential of broccoli seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, 2018.
- ALVARENGA, R. O.; MARCOS-FILHO, J. Vigor evaluation of stored cotton seeds, including the Seed Vigor Imaging System (SVIS®). **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 222-230, 2014.
- ALVARENGA, R. O.; MARCOS-FILHO, J.; GOMES-JUNIOR, F. G. Avaliação do vigor de sementes de milho superdoce por meio da análise computadorizada de imagens de plântulas. **Journal of Seed Science**, v. 34, n. 3, 2012.
- ALVES, J. M. A.; ARAÚJO, N. P.; UCHÔA, S. C. P.; ALBUQUERQUE, J. A. A.; SILVA, A. J.; RODRIGUES, G. S.; SILVA, D. C. O. Avaliação agroeconômica da produção de cultivares de feijão-caupi em consórcio com cultivares de mandioca em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 3, n. 1, p. 15-30, 2010.
- AMARAL, J. B.; MARTINS, L.; FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J. Teste de raios x para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 601-607, 2011.
- BAALBAKI, R.; ELIAS, S.; MARCOS-FILHO, J.; McDONALD, M.B. **Seed vigor testing handbook**. Ithaca: Association of Official Seed Analysts, 2009. 341 p. (Contribution, 32)
- BATISTA, N. A. S.; LUZ, P. B.; SOBRINHO, S. P.; NEVES, L. G.; KRAUSE, W. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi pelo teste de condutividade elétrica. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 550-554, 2012.
- BINO, J. R.; AARTSE, J. W.; VAN DER BURG, W. J. Non-destructive X-ray analysis of Arabidopsis embryo mutants. **Seed Science Research**, v. 3, n. 3, p. 167-170, 1993.
- BOUKAR, O.; BELKO, N.; CHAMARTHI, S.; TOGOLA, A.; BATIENO, J.; OWUSU, E.; HARUNA, M.; DIALLO, S.; UMAR, M. L.; OLUFAJO, O.; FATOKUN, C. A. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 415-424, 2019.
- BOUKAR, O.; FATOKUN, C. A.; HUYNH, B. L.; ROBERTS, P. A.; CLOSE, T. J. Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 757, 2016.
- BRANCALION, P. H. S.; RODRIGUES, R. R.; NOVENBRE, A. D. L. C.; GÓMEZ, J. M. Are we misinterpreting seed predation in palms? **Biotropica**, p. 12-14, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de defesa agropecuária. Brasília, 2009. 399p

- CARDOSO, M. J.; RIBEIRO, V. Q. Desempenho agrônomo do feijão-caupi, cv. Rouxinol, em função de espaçamentos entre linhas e densidades de plantas sob regime de sequeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p. 102-105, 2006.
- CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 2, p. 167-172, 2018.
- CHIQUITO, A. A.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Assessment of physiological potential of cucumber seeds using the software Seedling Vigor Imaging System[®](SVIS[®]). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 255-263, 2012.
- CICERO, S. M. Aplicação de imagens radiográficas no controle de qualidade de sementes. **Informativo Abrates**, v. 20, n. 48, p. 48-51, 2010.
- CICERO, S. M.; VAN DER HEIJDEN, G.; VAN DER BURG, W.; BINO, R. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 603-612, 1998.
- 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. 29-36, 2003.
- DAMIÃO-FILHO, C.F; MÔRO, F.V. Morfologia externa das espermatófitas. In: DAMIÃO-FILHO, C.F. **Morfologia e anatomia de sementes**. Jaboticabal – SP: FCAV/UNESP, 1993. 145p.
- 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.
- DEVI, C. B.; KUSHWAHA, A.; KUMAR, A. Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6821-6827, 2015.
- DUTRA, A. S.; MEDEIROS-FILHO, S.; TEÓFILO, E. M. Condutividade elétrica em sementes de feijão caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p. 166-170, 2006.
- DUTRA, A. S.; TEÓFILO, E. M. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 193-197, 2007.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2017): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2017. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 03 set. 2019.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Statistical Databases. FAO, 2017.** Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 03 set. 2019.

- FERREIRA, T.; RASBAND, W. ImageJ user guide. **ImageJ/Fiji**, v. 1, p. 155-161, 2012.
- 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**, Pelotas, v. 26, n.1, p.68-76, 2004.
- FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja**. 2018. 108 p.
- FREIRE-FILHO, F. R. **Feijão Caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio Norte, Teresina, 84 p. 2011
- GAGLIARDI, B.; MARCOS-FILHO, J. Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 4, p. 411-416, 2011.
- GOMES-JUNIOR, F. G.; YAGUSHI, J. T.; BELINI, U. L.; CICERO, S. M.; TOMAZELLO-FILHO, M. X-ray densitometry to assess internal seed morphology and quality. **Seed Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 102-107, 2012.
- GOMES-JUNIOR, F. G.; MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M.; MCDONALD, M. B.; BENNETT, M. A. Evaluation of priming effects on sweet corn seeds by SVIS. **Seed Technology**, p. 95-100, 2009.
- 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.
- GOMES-JUNIOR, F. G.; CHAMMA, H. M. C. P.; CICERO, S. M. Automated image analysis of seedlings for vigor evaluation of common bean seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 2, p. 195-200, 2014.
- GONÇALVES, J. R. D.; FONTES, J. R. A.; DIAS, M. C.; ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R. **BRS Guariba – Nova Cultivar de Feijão-Caupi para o Estado do Amazonas**. Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, Dezembro, 2009.
- GONZALO, M. J.; BREWER, M. T.; ANDERSON, C.; SULLIVAN, D.; GRAY, S.; VAN DER KNAAP, E. Tomato fruit shape analysis using morphometric and morphology attributes implemented in Tomato Analyzer software program. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 134, n. 1, p. 77-87, 2009.
- GOODMAN, R. C.; JACOBS, D. F.; KARRFALT, R. P. Evaluating desiccation sensitivity of *Quercus rubra* acorns using X-ray image analysis. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 35, n. 12, p. 2823-2831, 2005.
- HALL, A. Phenotyping cowpeas for adaptation to drought. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 155, 2012.
- 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.

- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Seed Science and Technology, Zurich, 174p. 2007.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **International rules for seed testing**. Seed Science and Technology, Zurich, 174p. 2004.
- KRZYZANOWSKI, F. C.; GILIOLI, J. L.; MIRANDA, L. C. Produção de sementes nos cerrados. In: ARANTES N. E.; SOUZA, P. I. M. (eds.) **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.465-513.
- LANGYINTUO, A. S.; LOWENBERG-DEBOER, J.; FAYE, M.; LAMBERT, D.; IBRO, G.; MOUSSA, B.; KERGNA, A.; KUSHWAHA, S.; MUSA, S.; NTOUKAM, G. Cowpea supply and demand in West and Central Africa. **Field crops research**, v. 82, n. 2-3, p. 215-231, 2003.
- LIMA, D. C.; JORGE, L. A. C.; RODRIGUES, E. L. L.; GOMES-JUNIOR, F. G. Sistema de Análise Automatizada do Vigor de Sementes. **Anais do SIAGRO**, p.45, 2014
- LIU, Y.; VAN DER BURG, W. J.; AARTSE, J. W.; VAN ZWOL, R. A.; JALINK, H.; BINO, R. J. X-ray studies on changes in embryo and endosperm morphology during priming and imbibition of tomato seeds. **Seed Science Research**, v. 3, n. 3, p. 171-178, 1993.
- MACHADO, C. F.; CICERO, S. M. 'Aroeira-branca'[*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.-Anacardiaceae] seed quality evaluation by the X-ray test. **Scientia Agrícola**, v. 60, n. 2, p. 393-397, 2003.
- MAGUIRE, J. D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1. **Crop science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS-FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 33-35, 1994.
- MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, v. 1, p. 1-21, 1999.
- _____. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**, ABRATES, Londrina, ed.2, 2015. 659 p.
- MARCOS-FILHO, J.; BENNETT, M. A.; MCDONALD, M. B.; EVANS, A. F.; 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. 485-497, 2006.
- MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.
- 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, 2009.
- MASETTO, T. E.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; FARIA, J. M. R. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia pleurantha* (Myrtaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 170-174, 2007.
- MCCORMAC, A.; KEEFE, P.; DRAPER, S. Automated vigour testing of field vegetables using image analysis. **Seed Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 103-112, 1990.
- MEDEIROS, A. D.; SILVA, L. J.; CAPOBIANGO, N. P.; FIALHO, C. A.; DIAS, D. C. F. S. Assessing the physiological quality of common bean seeds using the Vigor-S[®] system and its relation to the accelerated aging test. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 187-195, 2019.
- MELO, R. A.; FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; MELO, P. C. T. Use of X-ray to evaluate damage caused by weevils in cowpea seeds. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 472-476, 2010.
- MENEZES, N. L.; CICERO, S. M.; VILLELA, F. A. Identificação de fissuras em sementes de arroz após a secagem artificial, por meio de raios-X. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1194-1196, 2005.
- MONDO, V. H. V.; DIAS, M. A. N.; MCDONALD, M. B. Seed vigor imaging system for two-day-old corn seedling evaluation. **Seed Technology**, p. 191-196, 2011.
- MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M. Análise de imagens na avaliação da qualidade de sementes de milho localizadas em diferentes posições na espiga. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 9-18, 2005.
- MONDO, V. H. V.; JUNIOR, F. G.; PUPIM, T. L.; CICERO, S. M. Avaliação de danos mecânicos em sementes de feijão por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 27-35, 2009.
- MUXFELDT, R. E.; FARIA, J. M. R.; TONETTI, O. A. O.; SILVA, E. A. A. Utilização do teste de raios-x na avaliação dos efeitos da dessecação e infestação em diásporos de *Canela-Batalha-Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Cerne**, p. 657-666, 2012.
- NAKADA, P. G.; OLIVEIRA, J. A.; MELO, L. C.; GOMES, L. A. A.; VON PINHO, É. V. R. Physiological and biochemical performance of cucumber seeds at different maturation stages. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 113-122, 2011.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, v. 1, p. 20-31, 1999.
- NASSIF, S. 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.

- OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Utilização do teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 116-120, 2003.
- OTONI, R. R.; MCDONALD, M. B. Moisture and temperature effects on maize and soybean seedlings using the seed vigor imaging system. **Seed Technology**, p. 243-247, 2005.
- PASQUET, R. S. Allozyme diversity of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 1-2, p. 211-219, 2000.
- PINTO, T. L. F.; CICERO, S. M.; FORTI, V. A. Avaliação de danos por umidade, em sementes de soja, utilizando a técnica de análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 31-38, 2007.
- PINTO, T. L. F.; MONDO, V. H. V.; GOMES-JÚNIOR, F. G.; CICERO, S. M. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 3, p. 310-316, 2012.
- ROCHA, C. R. M.; SILVA, V. N.; CICERO, S. M. Internal morphology and germination of sunflower seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2014.
- _____. Avaliação do vigor de sementes de girassol por meio de análise de imagens de plântulas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 970-976, 2015.
- RODRIGUES, A. P. M. S.; MENDONÇA-JUNIOR, A.F.; TORRES, S. B.; NOGUEIRA, N. W.; FREITAS, R. M. O. Tetrazolium test for evaluation of the physiological quality of seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 638-644, 2015.
- RODRIGUES, M. **Vigor-S: sistema para avaliação automatizada do vigor de sementes de soja**. 2019. 65p. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
- 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.
- SANTOS, J. F.; GRANGEIRO, J. I. T.; BRITO, C. H.; SANTOS, M. C. C. A. Produção e componentes produtivos de variedades de feijão-caupi na microregião Cariri paraibano. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 6, n. 1, 2009.
- 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. 055-060, 2012.
- SILVA, P. P.; FREITAS, R. A.; CICERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J.; NASCIMENTO, W. M. Image analysis to associate morphological and physiological characteristics in pumpkin seeds. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 210-214, 2014.

- SILVA, V. N.; CICERO, S. M.; BENNETT, M. Relationship between eggplant seed morphology and germination. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 597-604, 2012.
- SILVA, V. N.; SARMENTO, M. B.; SILVEIRA, A. C.; SILVA, C. S.; CICERO, S. M. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 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.
- SINGH, B.; CHAMBLISS, O.; SHARMA, B. Recent advances in cowpea breeding. **Advances in cowpea research**, v. 3049, 1997.
- SMIDERLE, O. J.; SOUZA, A. G.; ALVES, J. M. A.; BARBOSA, C. Z. R. Physiological quality of cowpea seeds for different periods of storage. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, p. 817-823, 2017.
- SWAMINATHAN, M.; KAMRA, S. X-ray analysis of the anatomy and viability of seeds of some economic plants. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)**, v. 21, n. 2, p. 129-135, 1961.
- VAN DER BURG, W. J.; AARTSE, J. W.; VAN ZWOL, R. A.; JALINK, H.; BINO, R. J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 119, n. 2, p. 258-263, 1994.
- VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, v. 1, p. 1-26, 1999.
- WENDT, L.; GOMES-JUNIOR, F. G.; ZORATO, M. F.; MOREIRA, G. C. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja por meio de imagens. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, p. 280-286, 2014.