

**MARCELO AUGUSTO ROCHA LIMÃO**

**TESTES DE VIGOR, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO PRÓXIMO EM SEMENTES DE LENTILHA (*Lens culinaris*  
Medik.)**

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

Orientadora: Denise Cunha F. dos Santos Dias

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

L732t  
2022  
Limão, Marcelo Augusto Rocha, 1994-  
Testes de vigor, atividade enzimática e espectroscopia no  
infravermelho próximo em sementes de lentilha (*Lens culinaris*  
Medik.) / Marcelo Augusto Rocha Limão. - Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (88 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Agronomia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 72-88.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufv/bbt.2022.101>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Lentilha - Sementes - Fisiologia - Qualidade. 2. Imagens  
digitais -Análise . 3. Inteligência artificial. 4. Espectroscopia no  
infravermelho próximo. I. Dias, Denise Cunha Fernandes dos Santos,  
1958-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 635.658

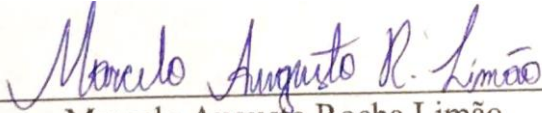
**MARCELO AUGUSTO ROCHA LIMÃO**

**TESTES DE VIGOR, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO PRÓXIMO EM SEMENTES DE LENTILHA (*Lens culinaris*  
Medik.)**

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


APROVADA: 11 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



---

Marcelo Augusto Rocha Limão  
Autor



---

Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias  
Orientadora

Aos meus PAIS por todo amor, educação e ensinamentos. Aos meus IRMÃOS e minha SOBRINHA que também vivem esse sonho comigo.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado durante todo esse caminho com sabedoria, humildade e discernimento, dando-me força e coragem nessa caminhada.

Aos meus pais Neide Rocha e Gerismar Limão, por toda educação, ensinamentos e não medirem esforços para sonhar este sonho comigo.

Aos meus irmãos Mabel Limão e Marcel Limão e minha sobrinha Ana Cecília por sempre me apoiarem e confiarem no meu potencial, dando coragem para viver e lutar por dias melhores.

À minha Vó Ana Bessa e todos meus familiares por terem me apoiado durante toda a caminhada com toda a sua generosidade e sutileza.

Aos meus amigos e parceiros de Viçosa, Tom Avelar e Gabriela Chequer, por toda força, amizade, generosidade e torcida, vocês foram fundamentais nesse processo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, por agregar de forma impar na minha formação profissional, é um prestígio.

À minha professora e orientadora Dra. Denise Cunha F. S. Dias, por toda dedicação, ensinamentos e paciência durante esses anos de orientação.

Ao meu coorientador Dr. Laércio Junio da Silva, por sua colaboração, disponibilidade e suporte em todas as vezes que recorri para a realização deste trabalho.

À Embrapa Hortaliças e ao pesquisador Dr. Warley Marcos Nascimento pela disponibilização das sementes de lentilha para condução da pesquisa.

Aos técnicos e amigos do Grupo de Estudos em Sementes (GSEM):: Wander, Tainara, Daniel, Joyce, Ana Clara, Rafaela, João Paulo, Gabriel, Júlia, Bruno e Geovana, obrigado por todo apoio e ajuda.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos e desenvolvimento da pesquisa.

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

## RESUMO

LIMÃO, Marcelo Augusto Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Testes de vigor, atividade enzimática e espectroscopia no infravermelho próximo em sementes de lentilha (*Lens culinaris medik.*)**. Orientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

O cultivo e consumo da lentilha (*Lens culinaris* Medik.) vêm ganhando destaque nos últimos anos devido ao alto valor proteico e nutricional dos seus grãos. Assim, pesquisas relacionadas à tecnologia de sementes são importantes para a expansão dos cultivos e para disponibilizar no mercado sementes de alta qualidade. O trabalho teve como objetivos adequar metodologias para os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, análise computadorizada de imagens por meio dos softwares SAPL® e ILASTIK para a avaliação do vigor de sementes de lentilha, bem como avaliar se a atividade das enzimas do sistema antioxidativo e a análise de espectroscopia no infravermelho próximo FT-NIR estão relacionadas ao potencial fisiológico das sementes. Sementes de sete lotes da cultivar Silvina foram submetidas a testes para caracterização da sua qualidade fisiológica inicial. O teste de envelhecimento acelerado foi realizado pelos métodos tradicional (100% UR) e alternativo com solução salina saturada (76% UR), a 41° C, por 24, 36, 48 e 72 h. O teste de condutividade elétrica foi avaliado com quatro volumes de água (75, 100, 150 e 250 mL) e quatro períodos de embebição (4, 8, 12 e 24 h). Foram determinadas também a atividade das enzimas SOD, CAT e APX. Pelo software SAPL®, foram determinados o comprimento de parte aérea, comprimento da raiz, comprimento total de plântulas e os índices de uniformidade, crescimento e vigor aos 3, 4, 5 e 10 dias após a semeadura. Já pelo software ILASTIK, determinou-se a probabilidade dos lotes gerarem plântulas vigorosas, plântulas não vigorosas e sementes mortas aos 3, 4, 5 e 10 dias após a semeadura. Foram realizadas também análises no FT-NIR, com 200 varreduras sucessivas dos espectros médios de cada lote, processadas individualmente por 30 segundos. As sementes submetidas às análises espectrais foram submetidas ao teste de germinação para validação da técnica. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. Para os testes de avaliação da qualidade inicial, atividade de enzimas antioxidantes, análise de plântulas pelo SAPL® e ILASTIK, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os dados obtidos no teste de envelhecimento acelerado foram analisados em esquema fatorial triplo 2 (método tradicional e método com solução salina saturada) x 7 (lotes) x 4 (períodos – 24, 36, 48 e 72 h) e os de condutividade elétrica analisados em esquema fatorial triplo 4 (períodos: 4, 8, 12 e 24 h) x 7 (lotes) x 4 (volumes: 75, 100, 150 e 250 mL), onde os fatores quantitativos foram

submetidos à análise de regressão e os qualitativos ao teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para os dados espectrais obtidos pelo FT-NIR, foram empregadas as técnicas de PLS-DA e PCA, separando-os em dois conjuntos, sendo 70% dos dados obtidos para o treinamento e 30% para o teste e validação. Foram empregadas duas abordagens, sendo baseada na formação de espectros com o escalonamento automático e outra por meio da derivada do filtro Savitzky-Golay. O teste de envelhecimento acelerado conduzido a 41°C/48 h pelo método tradicional (100% UR) e o de condutividade elétrica conduzido com 50 sementes imersas em 75 mL de água, por 24 h, a 25 °C, foram eficientes para a avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha. As atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) estão relacionadas ao potencial fisiológico das sementes dos diferentes lotes. O comprimento total das plântulas, da raiz primária e da parte aérea e os índices de vigor determinados aos 4 dias após a semeadura pelo SAPL<sup>®</sup> permitiram classificar os lotes de lentilha quanto ao vigor. Os dados obtidos pelo ILASTIK utilizados nos estudos de aprendizagem de máquina permitiram o desenvolvimento de modelos com alta acurácia para classificar os lotes de sementes em níveis de vigor. Os modelos obtidos através dos dados espectrais pelo FT-NIR apresentaram acurácia de 100% na predição dos lotes quanto às classes de vigor.

Palavras-chave: Qualidade fisiológica. Avaliação do vigor. Análise de imagem. Inteligência artificial. FT-NIR.

## ABSTRACT

LIMÃO, Marcelo Augusto Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Vigor tests, enzymatic activity and near infrared spectroscopy in lentil seeds (*lens culinaris medik.*)**. Adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The cultivation and consumption of lentils (*Lens culinaris* Medik.) have gained prominence in recent years due to the high protein and nutritional value of its grains. Thus, studies related to seed technology are important for the crop expansion and to obtain high quality seeds. The objective of this work was to adapt methodologies for the accelerated aging and electrical conductivity tests, computerized analysis of images by SAPL® and ILASTIK software for the evaluation of lentil seed vigor, as well as to evaluate whether the activity of the enzymes of the antioxidant system and FT-NIR near infrared spectroscopy analysis are related to the physiological potential of the seeds. Seeds from seven lots of cultivar Silvina were submitted to tests for characterization of their initial physiological quality. The accelerated aging test was performed by the traditional (100% RH) and alternative methods with saturated saline solution (76% RH), at 41° C, for 24, 36, 48 and 72 h. The electrical conductivity test was carried out using four volumes of water (75, 100, 150 and 250 mL) and four soaking periods (4, 8, 12 and 24 h). The activity of SOD, CAT and APX enzymes were also determined. The shoot length, root length, total seedling length and uniformity, growth and vigor indexes were determined at 3, 4, 5 and 10 days after sowing using SAPL® software. By the ILASTIK software, the probability of the lots generated vigorous and non-vigorous seedlings and dead seeds at 3, 4, 5 and 10 days after sowing was determined. FT-NIR analyzes were also performed, with 200 successive scans of the average spectra of each lot, processed individually for 30 seconds. The seeds submitted to spectral analysis were submitted to the germination test to validate the technique. A completely randomized design was used. For the initial quality assessment tests, antioxidant enzyme activity, seedling analysis by SAPL® and ILASTIK, the means were compared by the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The data obtained in the accelerated aging test were analyzed in a triple factorial scheme 2 (traditional method and method with saturated saline solution) x 7 (lots) x 4 (periods - 24, 36, 48 and 72 h), whereas the data of electrical conductivity were analyzed in a triple factorial scheme 4 (periods: 4, 8, 12 and 24 h) x 7 (lots) x 4 (volumes: 75, 100, 150 and 250 mL), where the quantitative factors were submitted to analysis of regression and the qualitative ones to the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). For the spectral data obtained by FT-NIR, the PLS-DA and PCA techniques were used, separating them into two sets, with 70% of the data obtained for training and 30% for testing and validation. Two approaches were

used, one based on the formation of spectra with automatic scaling and the other through the derivative of the Savitzky-Golay filter. The accelerated aging test conducted at 41°C/48 h by the traditional method (100% RH) and the electrical conductivity test conducted with 50 seeds soaked in 75 mL of water for 24 h at 25 °C were efficient for the evaluation of the physiological potential of lentil seeds. The activities of the enzymes SOD, CAT and APX are related to the physiological potential of seeds from different lots. The total length of the seedlings, the primary root and the shoot length and the vigor indices determined at 4 days after sowing by the SAPL® allowed classifying the lentil lots in vigor levels. The data obtained by ILASTIK used in machine learning studies allowed the development of models with high accuracy to classify seed lots into vigor levels. The models obtained through the spectral data by the FT-NIR showed 100% accuracy in the prediction of the seed lots regarding classes of vigor.

**Keywords:** Physiological quality. Vigor assessment. Image analysis. Artificial intelligence. FT-NIR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Aquisição das imagens fotográficas e processamento individual por meio do software SAPL®.....33
- Figura 2.** Padrão de plântulas vigorosas (PV), plântulas não vigorosas (PNV) e sementes mortas (SM) de lentilha para o treinamento pelo software ILASTIK.....35
- Figura 3.** Esquema representativo das etapas de aprendizado interativo de máquina e classificação da qualidade fisiológica dos diferentes lotes de lentilha aos 3 (a), 4 (b), 5 (c) e 10 dias (d) após a semeadura.....36
- Figura 4.** Porcentagem de germinação de sete lotes de sementes de lentilha, cv. Silvina, após o envelhecimento acelerado tradicional com água (100% UR) e com solução salina saturada (76% UR), nos períodos de 24, 36, 48 e 72 h.....44
- Figura 5.** Análise de componentes principais (PCA) das variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS), teste de frio (TF) e os diferentes procedimentos do teste de envelhecimento acelerado realizados em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina.....45
- Figura 6.** Ilustração dos volumes de solução para sementes de lentilha após 24 h de embebição; para o todos os volumes foram utilizados copos plásticos com capacidade de 300 mL.....47
- Figura 7.** Condutividade elétrica de sete lotes de sementes de lentilha, cv. Silvina, após embebição por 4, 8, 12 e 24 h em 75, 100, 150 e 250 mL de água.....49
- Figura 8.** Coeficientes de correlação simples de Pearson ® estimados entre as variáveis de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS), teste de frio (TF) e os diferentes procedimentos do teste de condutividade elétrica realizados em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina.....50
- Figura 9.** Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão.....51
- Figura 10.** Análise de componentes principais (PCA) das variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS), teste de frio (TF) e a atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e superóxido dismutase (SOD) realizados em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina.....53

<b>Figura 11.</b> Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis de caracterização da qualidade inicial das sementes e dos dados gerados pelo software SAPL®.....	57
<b>Figura 12.</b> Probabilidade dos lotes de sementes gerarem plântulas vigorosas (PV), plântulas não vigorosas (PNV) ou sementes mortas (SM) no 3º (a), 4º (b), 5º (c) e 10º dia (d) após a semeadura, de acordo com dados obtidos pelo software ILASTIK. As barras representam um intervalo de confiança de 95% .....	59
<b>Figura 13.</b> Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis de caracterização da qualidade inicial das sementes e dos dados gerados pelo software ILASTIK.....	61
<b>Figura 14.</b> Germinação de diferentes lotes sementes de lentilha (a) e percentagens de plântulas vigorosas (b), plântulas não vigorosas (c) e sementes mortas (d). Os valores médios com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o intervalo de confiança ao nível de 95% para as médias.....	62
<b>Figura 15.</b> Espectros FT-NIR de diferentes lotes de sementes de lentilha: Espectro pré-processado das classes de sementes (a), espectros médios pré-processados das classes de sementes (b), espectros das sementes transformadas pela derivada de primeira ordem do Savitzky-Golay (c) e a média das classes transformadas pela derivada de primeira ordem do Savitzky-Golay (d). Análise de componentes principais usando os dados FT-NIR de sementes de diferentes lotes de lentilha. Dados dos espectros pré-processados (e) e espectros transformados pela primeira derivada do Savitzky-Golay (f).....	63
<b>Figura 16.</b> Gráfico de pontuação da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os dois primeiros componentes discriminantes de sementes de lentilha com base nos espectros FT-NIR transformados pela primeira derivada Savitzky-Golay, as elipses mostram intervalos de confiança de 95% em cada classe de sementes (a), matriz de confusão das diferentes classes (b), boxplot dos 20 espectros que mais contribuíram para o desenvolvimento do modelo (c).....	67

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Caracterização da qualidade inicial de sete lotes de lentilha, cv. Silvina, analisados pelo grau de umidade (GU), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e teste de frio (TF).....39
- Tabela 2.** Grau de umidade (%) após diferentes períodos de envelhecimento acelerado tradicional (EAT) e com solução salina saturada (EASS) em lotes de sementes de lentilha.....41
- Tabela 3.** Germinação (%) dos lotes de sementes de lentilha após diferentes períodos de envelhecimento acelerado tradicional (EAT) e envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS).....43
- Tabela 4.** Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de lotes de sementes de lentilha em diferentes períodos de embebição e volumes de água.....48
- Tabela 5.** Resultados médios de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento radicular (CR), comprimento total da plântula (CTP), índice de uniformidade (IU), índice de crescimento (IC) e índice de vigor (IV), obtidos pelo SAPL® aos três, quatro, cinco e dez dias após a semeadura de sete lotes de sementes de lentilha.....55
- Tabela 6.** Número de acertos individuais por classe e métricas obtidas com os modelos de classificação PLS-DA, usando os recursos FT-NIR em sementes de diferentes lotes de lentilha.....65

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Avaliação do potencial fisiológico de sementes .....	16
2.2.2. Envelhecimento acelerado.....	17
2.2.3. Condutividade elétrica.....	19
2.2.4. Atividade de enzimas antioxidantes em sementes .....	21
2.2.5. Análise computadorizada de plântulas para avaliação do vigor em sementes .....	23
2.2.6. Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIR) .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.2. Caracterização da qualidade inicial dos lotes .....	27
3.2.1. Determinação do grau de umidade .....	27
3.2.2. Teste de germinação .....	27
3.2.3. Primeira contagem de germinação .....	27
3.2.4. Emergência de plântulas .....	27
3.2.5. Índice de velocidade de emergência (IVE).....	27
3.2.6. Massa seca de plântulas .....	27
3.2.7. Teste de frio .....	28
3.2.8. Delineamento experimental e análise estatística .....	28
3.3. Ensaio I - Adequação do teste de envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha .....	28
3.3.1. Envelhecimento acelerado tradicional - EAT.....	28
3.3.2. Envelhecimento acelerado com solução salina saturada - EASS .....	29
3.3.3. Delineamento experimental e análise estatística .....	29
3.4. Ensaio II - Adequação do teste condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha.....	30
3.4.1. Delineamento experimental e análise estatística .....	30
3.5. Ensaio III – Determinação da atividade de enzimas antioxidantes e sua relação com o potencial fisiológico de sementes .....	30
3.5.1. Obtenção do extrato enzimático para determinação da atividade das enzimas ..	30
3.5.2. Superóxido dismutase (SOD) .....	31
3.5.3. Catalase (CAT) .....	31
3.5.4. Peroxidase do ascorbato (APX).....	32

3.5.5.	Delineamento experimental e análise estatística .....	32
3.6.	Ensaio IV – Análise computadorizada de plântulas pelos softwares SAPL® e ILASTIK para avaliação do potencial fisiológico das sementes .....	32
3.6.1.	Software SAPL® .....	32
3.6.2.	Software ILASTIK .....	34
3.6.3.	Delineamento experimental e análise estatística .....	36
3.7.	Ensaio V – Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR e sua relação com o potencial fisiológico das sementes.....	36
3.7.1.	Aquisição dos espectros FT-NIR.....	36
3.7.2.	Delineamento experimental e análise estatística .....	37
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1.	Caracterização da qualidade inicial dos lotes de lentilha.....	38
4.2.	Ensaio I - Adequação do teste de envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha.....	40
4.3.	Ensaio II - Adequação do teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha.....	46
4.4.	Ensaio III - Determinação de atividade de enzimas antioxidantes e sua relação com o potencial fisiológico de sementes .....	50
4.5.	Ensaio IV – Análise computadorizada de plântulas pelos softwares SAPL® e ILASTIK para avaliação do potencial fisiológico das sementes .....	53
4.5.1.	Análise de plântulas pelo software SAPL® .....	53
4.5.2.	Análise de plântulas pelo software ILASTIK.....	57
4.6.	Ensaio V - Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR e sua relação com o potencial fisiológico das sementes.....	60
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As pulses, sementes secas comestíveis de leguminosas como feijões, ervilhas secas, grão-de-bico e lentilha são ricas em proteínas, fibras, minerais, vitaminas e aminoácidos, e por isto vêm ocupando papel de destaque para a nutrição humana e promoção da segurança alimentar global. São alimentos ideais para as dietas vegetarianas e veganas devido ao alto valor proteico, cujo cultivo e consumo vem sendo incentivados no mundo todo (NASCIMENTO; SILVA, 2019).

A lentilha (*Lens culinaris* Medik.) destaca-se entre as cinco leguminosas mais importantes no mundo e, embora a produção brasileira seja ainda pequena necessitando de importação, o Brasil tem grande potencial para a produção nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, que possuem características de clima e altitude favorável para o cultivo (EMBRAPA, 2019). Por ser considerada espécie rústica, fixadora de nitrogênio e com certa tolerância à seca, a lentilha torna-se alternativa de cultivo para plantio de segunda safra de verão (NASCIMENTO et al., 2016).

Apesar do Brasil apresentar condições favoráveis para o cultivo, só atualmente pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando disponibilizar cultivares adaptadas às condições edafo-climáticas bem como tecnologia adequada para a produção. Neste contexto, pesquisas relacionadas à tecnologia de sementes de lentilha são importantes para a expansão dos cultivos e para disponibilizar no mercado sementes de alta qualidade. Sementes de alta qualidade, com maior germinação, vigor e resistência às adversidades de clima, solo e estresses são fundamentais para se obter emergência elevada e uniforme das plântulas em campo e, conseqüentemente, assegurar produtividade (MARCOS-FILHO, 2015a).

Neste contexto, a avaliação do vigor de sementes é fundamental para se obter informações mais seguras sobre o desempenho dos lotes em no campo e no armazenamento. Atualmente, há várias metodologias disponíveis para a avaliação do vigor, baseadas em resistência a estresses, ao desempenho de plântulas e testes bioquímicos em atributos físicos, fisiológicos e bioquímicos (MARCOS-FILHO, 2020). Nestas categorias destacam-se os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e crescimento de plântulas, dentre outros recomendados pela AOSA (BAALBAKI et al., 2009), cujas metodologias para sementes de lentilha ainda não estão bem estabelecidas. Para as avaliações do crescimento de plântulas tem sido bastante utilizado o processamento computadorizado das imagens, que tem como vantagem a rapidez na obtenção de resultados confiáveis (MARCOS-FILHO, 2015a; GOMES-JUNIOR, 2020). Dentre os softwares disponíveis, destacam-se o Sistema de Análise de

Plântulas (SAPL<sup>®</sup>) e o ILASTIK (MEDEIROS e PEREIRA, 2018; CUADRADRO, 2020; MEDEIROS et al., 2020a), ambos de livre acesso e de baixo custo na aquisição das imagens, que podem ser obtidas utilizando câmera digital.

Considerando que o vigor de sementes diminui com o avanço do processo de deterioração, cuja causa principal tem sido atribuída à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) as quais provocam a peroxidação de lipídios (KUMAR et al., 2015), a determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidativo também pode fornecer informações interessantes sobre o potencial fisiológico. Destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), peroxidases (POX) e a ascorbato peroxidase (APX) que desempenham papel fundamental na neutralização dos efeitos deletérios das EROs (EBONE et al., 2019).

Outra técnica promissora de uso mais recente cujos resultados podem ser relacionados ao potencial fisiológico das sementes é a espectroscopia do infravermelho próximo (FT-NIR). Trata-se do método rápido, não destrutivo, baseado na absorção pelas sementes de radiação eletromagnética nos comprimentos de onda entre 780-2500 nm, permitindo realizar medidas diretas e simultâneas de vários de seus constituintes químicos pela aquisição de grande número de detalhes espectrais (XIA et al., 2019). Portanto, alterações na composição química das sementes podem estar relacionadas com a viabilidade e vigor (XIA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020; MEDEIROS et al., 2020b).

Considerando que as informações sobre metodologias adequadas para a avaliação do vigor das sementes de lentilha ainda são escassas, os objetivos desse trabalho foram: i) adequar metodologias para os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e análise computadorizada de imagens por meio dos softwares SAPL<sup>®</sup> e ILASTIK para a avaliação do vigor de sementes de lentilha; ii) avaliar se a atividade das enzimas do sistema antioxidativo e a análise de espectroscopia no infravermelho próximo FT-NIR estão relacionadas ao potencial fisiológico das sementes.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.2.1. Avaliação do potencial fisiológico de sementes**

O potencial fisiológico das sementes reúne informações sobre a germinação e o vigor e representa a possibilidade de sucesso da semente manifestar suas funções vitais tanto sob condições favoráveis ou não (MARCOS-FILHO, 2015a). A germinação é definida como a capacidade da semente dar origem a plântula normal, sob condições ideais em laboratório, representando o potencial fisiológico máximo de germinação do lote (BRASIL, 2009). No entanto, estes resultados nem sempre são confirmados em campo, principalmente quando as condições de ambiente se desviam das mais adequadas. Por este motivo, a identificação do vigor das sementes como componente do potencial fisiológico, independente da germinação, é cada vez mais relevante (MARCOS-FILHO, 2015b).

O vigor de sementes compreende o conjunto de propriedades que determina o potencial para a rápida e uniforme emergência de plântulas sob ampla diversidade de condições de ambiente (BAALBAKI et al., 2009). Assim, a avaliação do vigor tem como objetivos principais detectar diferenças significativas no potencial fisiológico de lotes com germinação semelhante, classificar lotes em diferentes níveis de qualidade, distinguir lotes de alto dos de baixo vigor, identificar adequadamente lotes com maior potencial de estabelecimento em campo e estimar o potencial de armazenamento (MARCOS-FILHO, 2020).

Fica evidente, portanto, quão essenciais são as informações obtidas na avaliação do vigor das sementes, complementando as informações fornecidas pelo teste de germinação, que rotineiramente é realizado sob condições ótimas de temperatura, luz e umidade, possibilitando a semente expressar seu máximo potencial de germinação. Apesar de fornecer informações que nem sempre refletem o comportamento das sementes em campo, é um teste importante para a comercialização dos lotes, por ser padronizado e permitir a reprodução dos resultados (MARCOS-FILHO, 2009). Contudo, na atualidade, para o controle de qualidade mais eficiente dos lotes durante as etapas de pós-colheita e comercialização, é fundamental obter informações relacionadas ao vigor das sementes.

De acordo com Marcos-Filho (2020) os principais testes de vigor são baseados em eventos que caracterizam o processo de deterioração das sementes, os quais ocorrem antes do declínio da capacidade de germinação e perda da viabilidade da semente (DELOUCHE; BASKIN, 1973). Estes eventos ocorrem em sequência hipotética, iniciando-se com a desestruturação das membranas celulares. A partir daí, ocorre redução da atividade respiratória e biossintética, diminuição da velocidade de germinação, redução do potencial de conservação,

menor taxa de crescimento das plântulas, maior sensibilidade a condições de estresse, redução da emergência de plântulas em campo, aumento da ocorrência de plântulas anormais e, finalmente, morte da semente (DELOUCHE; BASKIN, 1973). Na atualidade, há várias metodologias disponíveis para a avaliação do vigor, baseadas em resistência a estresses, em atributos físicos, fisiológicos e bioquímicos (MARCOS-FILHO, 2020).

McDonald (1975) classificou os testes de vigor em físicos, fisiológicos, bioquímicos e de resistência a estresse. Os testes físicos são aqueles que avaliam as características morfológicas e físicas das sementes, incluindo tamanho, densidade, teste de Raios X. Os testes fisiológicos baseiam-se em atividades fisiológicas específicas das sementes cuja manifestação depende do vigor, destacando-se primeira contagem de germinação, velocidade de germinação ou emergência de plântulas, classificação do vigor de plântulas, crescimento de plântulas, dentre outros. Já os testes bioquímicos avaliam as alterações bioquímicas relacionadas ao vigor das sementes, como os testes de tetrazólio, condutividade elétrica, lixiviação de potássio e respiração. Os testes de resistência a estresses, por sua vez, avaliam o comportamento das sementes quando expostas a condições desfavoráveis de ambiente, tais como teste de frio, envelhecimento acelerado, deterioração controlada e germinação a baixa temperatura.

Considerando que o vigor das sementes é produto do conjunto de características que irão determinar o seu desempenho no campo ou no armazenamento, recomenda-se que a avaliação do vigor deva ser feita com base na combinação de resultados de diferentes testes de vigor, considerando a finalidade do uso dos resultados e as limitações de cada teste (MARCOS-FILHO, 2015b). Assim, recomenda-se que a avaliação do vigor seja feita com base na combinação múltipla dos resultados obtidos em cada teste de vigor utilizado (MARCOS-FILHO, 2015b).

### **2.2.2. Envelhecimento acelerado**

O teste de envelhecimento acelerado é um dos mais conhecidos e aplicados para a avaliação do vigor das sementes, sendo aplicável a várias espécies (TUNES et al., 2011). O teste é de resistência ao estresse que avalia o desempenho das sementes após serem submetidas a condições adversas de temperatura e umidade relativa. Baseia-se no princípio de que a taxa de deterioração das sementes aumenta à medida em que são expostas a condições de alta temperatura e umidade relativa (BAALBAKI et al., 2009; MARCOS-FILHO, 2015b). Sob essas condições, sementes de alto potencial fisiológico apresentarão maior capacidade de produzir plântulas normais após o envelhecimento acelerado em comparação com as de menor vigor (GOMES; LOPES, 2017; ARAÚJO et al., 2021b).

A combinação entre temperatura, umidade relativa e período de exposição às condições do teste são fatores importantes para se definir metodologia adequada para a condução do teste para as diferentes espécies. Em geral, as temperaturas utilizadas no teste de envelhecimento acelerado variam entre 41 e 45 °C (BAALBAKI et al., 2009; MARCOS-FILHO, 2020). Menezes e Nascimento (1988) relataram que a temperatura de 37 °C e o período de envelhecimento de 72 h foram eficientes na avaliação do vigor de sementes de ervilha. Contudo, a temperatura de 41 °C vem sendo recomendada para várias espécies, como lentilha (FREITAS; NASCIMENTO, 2006.), soja (MARCOS-FILHO et al., 1990; MARCOS-FILHO, 2020), feijão (BERTOLIN et al., 2011) e grão-de-bico (ARAÚJO et al., 2021). É importante ressaltar que temperaturas muito elevadas possibilitam a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, drástica redução na viabilidade das sementes (MARCOS-FILHO, 2015a; ALVARENGA et al., 2013; TORRES et al., 2005). Para Tomes et al. (1988), a elevação da temperatura promove efeitos mais drásticos sobre o desempenho das sementes do que o prolongamento do período de envelhecimento artificial.

O teste de envelhecimento acelerado pode ser conduzido pelo método tradicional ou alternativo. Ambos os métodos utilizam caixas gerbox adaptadas funcionando como mini-câmara. A diferença entre os métodos é que no método tradicional utilizam-se 40 mL de água no interior do gerbox com o intuito de se obter 100% de umidade relativa (MARCOS-FILHO, 2020). Já no método alternativo, a água é substituída por solução salina saturada de modo a obter umidade relativa interna mais baixa, resultando em embebição mais lenta (JIANHUA; MCDONALD, 1996). Estes autores indicam a utilização de soluções saturadas de KCl (cloreto de potássio), NaCl (cloreto de sódio) ou NaBr (brometo de sódio), de tal modo a obter umidade relativa de 87%, 76% ou 55%, respectivamente (JIANHUA; MCDONALD, 1996). Neste método, a absorção de água pelas sementes ocorre mais lentamente, resultando na redução da desuniformidade nos teores de água após o envelhecimento (RADKE et al., 2018) e redução da incidência de fungos patogênicos nas sementes (ORO et al., 2012). O método alternativo tem sido utilizado principalmente para sementes pequenas, especialmente de hortaliças, para as quais a desuniformidade na absorção de água entre as amostras no método tradicional pode resultar em deterioração diferenciada, comprometendo os resultados após o envelhecimento (RAMOS et al., 2004).

Freiras e Nascimento (2006) realizaram estudo sobre o teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha pelo método tradicional e pelo método alternativo com solução salina saturada (76% UR) nos períodos de 24, 48 e 72 h a 41 °C, e concluíram que o teste com solução salina saturada por 48 h a 41 °C foi o procedimento mais adequado para a

classificação dos lotes em níveis de vigor. Em sementes de ervilha, Nascimento et al. (2007), ao testarem o método tradicional e alternativo em diferentes períodos, a 41 °C, concluíram que pelo método alternativo com solução saturada (76% UR) por 48 h houve melhor separação dos lotes em níveis de vigor. Araújo et al. (2021) concluíram que o teste de envelhecimento acelerado com NaCl (76% UR), a 41 °C, por 48 h foi eficaz na avaliação do vigor de sementes de grão-de-bico.

Para outras leguminosas como soja (MARCOS-FILHO, 2020), feijão (BERTOLIN et al., 2011) e leucena (ARAÚJO et al., 2017) o teste deve ser conduzido com 100% UR a 41°C por 48 h. A eficiência da aplicação do teste de envelhecimento acelerado pelo método tradicional também foi relatada para sementes de chia (RADKE et al., 2018), azevém (TUNES et al., 2011) e alface (FRANDOLOZO et al., 2017).

Verifica-se, portanto, que as informações sobre a metodologia mais adequada para a condução do teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha ainda não são conclusivas, o que justifica a condução de estudos adicionais para a espécie.

### **2.2.3. Condutividade elétrica**

O teste de condutividade elétrica destaca-se como método rápido, prático e eficiente para a estimativa do vigor de sementes (MOURA et al., 2017; GUOLLO et al., 2017). É classificado como teste bioquímico, baseado na capacidade de reorganização do sistema de membranas celulares (DELOUCHE; BASKIN, 1973). De acordo com estes autores, a degradação do sistema de membranas celulares é uma das primeiras manifestações do processo de deterioração das sementes. Assim, determinar o valor da condutividade elétrica da solução de embebição das sementes permite indiretamente obter informações sobre a intensidade dos danos causados às membranas celulares resultantes do processo de deterioração das sementes (POWELL, 1986). O princípio do teste estabelece que sementes menos vigorosas irão liberar maior quantidade de solutos para o meio exterior, uma vez que a velocidade da reestruturação da integridade das membranas durante o processo de embebição é menor (TORRES et al., 2015; BRZEZINSKI et al., 2015).

Na maturidade fisiológica, a organização das membranas celulares é máxima. Ao final do processo de maturação, com a secagem das sementes, ocorre a desorganização das membranas comprometendo a sua integridade (BEWLEY; BLACK, 1994). Quando as sementes secas são embebidas, a capacidade de reorganização do sistema de membranas é readquirida, e quanto maior o vigor da semente, maior a velocidade deste processo de reestruturação com menor lixiviação (POWELL, 1986).

De acordo com Bewley e Black (1994), a liberação de solutos pelas sementes é mais intensa durante o início da embebição, declinando à medida que ocorre a reorganização do sistema de membranas. Este fato é importante porque permite a obtenção de resultados em período de tempo relativamente curto, de modo que a condutividade elétrica avaliada após 24 h de embebição, se mostra eficiente para a avaliação do vigor de sementes de várias espécies. Além disso, dependendo da espécie, os resultados podem ser obtidos em períodos inferiores a 24 h, permitindo tomadas de decisões importantes de maneira mais rápida para o controle de qualidade das sementes (VIEIRA; MARCOS-FILHO, 2020).

Embora o teste de condutividade elétrica seja simples e de fácil execução, há fatores que influenciam os resultados, tais como o genótipo (PANOBIANCO et al., 1999), danos mecânicos ou injúrias provocadas por insetos, teor de água e tratamento químico das sementes (LOEFFLER et al., 1988). Além destes, há fatores relacionados à própria metodologia como por exemplo volume de água usada para a embebição das sementes, o tempo de embebição, o número de sementes por repetição e a temperatura (FIGUEIREDO et al., 2021; VIEIRA; MARCOS-FILHO, 2020).

A duração do período de embebição das sementes é importante na eficiência do teste de condutividade elétrica para distinguir diferenças de vigor entre os lotes. Esse período pode ser alterado em função das características morfológicas do tegumento, temperatura de embebição e grau de umidade. Para muitas espécies, o teste é realizado com amostras previamente pesadas de 50 sementes, imersas em 75 mL de água destilada ou deionizada e sob temperatura de 25 °C por período de 24 h até a leitura em condutivímetro (KRZYZANOWSKI et al., 1991; VIEIRA, 1994). Este procedimento é indicado principalmente para leguminosas que têm sementes grandes, tais como ervilha, soja e feijão, mostrando-se eficiente na avaliação do vigor (BAALBAKI et al., 2009; MARCOS-FILHO, 2015a).

Contudo, em soja, Dias e Marcos-Filho (1996) observaram que períodos de embebição mais curtos (8 e 12 h) permitiram a identificação de diferenças mais acentuadas de vigor entre os lotes, enquanto avaliações realizadas a partir de 16 h foram mais sensíveis permitindo classificação mais detalhada dos lotes em níveis de vigor. Em sementes de ervilha, Machado et al. (2011) avaliaram as temperaturas de 20 e 25 °C e volumes de 75 e 250 mL de água e concluíram que o teste de condutividade elétrica utilizando 250 mL de água, a 25 °C por 24 h é promissor para a diferenciação dos lotes de sementes.

Mais recentemente, Araújo (2019) testando a adequação do teste de condutividade elétrica para sementes de grão-de-bico, avaliou a imersão em 75, 100, 150 e 250 mL por

períodos de 4, 8, 12 e 24 h, a 25 °C, recomendando o uso de 50 sementes imersas em 150 mL de água, por 24 h.

Já Figueiredo et al. (2021) realizaram a adequação do teste de condutividade elétrica em sementes de linhaça avaliando 25 e 50 sementes embebidas em 25, 50 e 75 mL de água a 25 e 30 °C, por 24 h. Concluíram que o teste deve ser conduzido com 25 sementes em 75 mL de água a 30 °C.

As informações sobre o teste de condutividade elétrica para sementes de lentilha são escassas. Cunha (2018) ao utilizar o teste de condutividade elétrica com 25 sementes de lentilha imersas em 75 mL de água por 16 h identificou diferenças no potencial fisiológico de sementes colhidas em diferentes estádios de maturação; verificou ainda que o teste foi eficiente para monitorar a redução da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento por seis meses. Silva et al. (2020), avaliando quatro repetições com 25, 50, 75 e 100 sementes de cada lote e 5 períodos de embebição (3, 6, 9, 12 e 15 h) em 75 mL a 25 °C, concluíram que a utilização de repetições com 50 sementes e o período de 12 h de embebição foram as condições mais adequadas para a condução do teste em sementes de lentilha. No entanto, os autores não testaram períodos mais longos de embebição, de forma a facilitar as análises em horário comercial em laboratórios de rotina, e também não testaram outros volumes de água para a adequação do teste.

Verifica-se, portanto, que estudos específicos buscando identificar e definir as condições mais adequadas para a condução do teste de condutividade em sementes de lentilha ainda são escassos, sendo necessário testar diferentes combinações entre períodos de embebição e volumes de água.

#### **2.2.4. Atividade de enzimas antioxidantes em sementes**

A deterioração é um dos principais processos que afetam a qualidade de sementes, resultando na redução do vigor e da germinação. Trata-se do processo degenerativo provocado principalmente pela produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas por reações de estresse oxidativo. As EROs são subprodutos naturais do metabolismo formadas a partir da redução parcial do oxigênio, levando à formação de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e outras (MITTLER, 2017). De maneira geral, os principais danos causados pelo estresse oxidativo são a peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, danos a ácidos nucleicos, inibição enzimática e morte celular (DEMIDCHIK et al., 2015; KUMAR et al., 2015).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidativos, que têm a função de neutralizar o excesso de EROs. Assim, a intensidade de danos celulares é determinada pela capacidade das células de neutralizar as EROs. Neste contexto, o sistema enzimático antioxidativo composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), dentre outras, têm papel fundamental na neutralização das EROs (SHARMA et al., 2012). Cardoso et al. (2015) avaliaram parâmetros antioxidativos em sementes de soja submetidas à deterioração constatando alto nível de superóxidos, além da redução da atividade da SOD em sementes de baixa qualidade fisiológica.

A superóxido dismutase (SOD) é considerada a enzima antioxidativa da primeira linha de defesa contra as formas reativas de oxigênio promovendo a remoção do ânion superóxido, produzindo hidrogênio e água (GILL et al., 2015). É encontrada no citoplasma e na matriz mitocondrial, sendo produzida nas primeiras horas de embebição em sementes viáveis, e sua redução tem sido associada com a queda do vigor de sementes (BORGES et al., 2015). O decréscimo na atividade da SOD está associado ao processo de redução do potencial fisiológico das sementes de diversas espécies (BAILLY, 2004; SAHU et al., 2017).

A catalase (CAT) é a enzima que atua principalmente em altas concentrações de peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e liberando oxigênio, desempenhando importante papel na detoxificação das células (KIBINZA et al., 2011). As enzimas SOD, CAT e APX atuam integradas como agentes antioxidantes neutralizando e mantendo os compostos tóxicos à célula sob níveis controlados (MITTLER, 2017). O decréscimo na atividade da CAT ocasiona redução na capacidade de prevenção de danos oxidativos e perda mais acelerada da viabilidade. Assim, com a redução do vigor espera-se que a atividade da CAT também diminua (MARCOS-FILHO, 2015a; BAILLY, 2004).

Semelhantemente à CAT, a peroxidase do ascorbato (APX) faz parte do grupo de enzimas que reduzem o peróxido de hidrogênio, e diferencia-se por utilizar o ascorbato como agente redutor e atuar nos peroxissomos (MITTLER, 2017). A redução na atividade da APX foi relatada por Xin et al. (2014) em sementes de soja deterioradas.

Sementes mais deterioradas e, conseqüentemente, menos vigorosas apresentam menor eficiência na remoção de EROs, o que favorece o estresse oxidativo. Esta menor eficiência pode estar relacionada à redução da atividade ou inativação de enzimas antioxidantes (BAILLY, 2004).

A redução da atividade de enzimas antioxidativas como a SOD e CAT tem sido associada à redução do potencial fisiológico das sementes durante a deterioração de sementes

de feijão mungo-verde (SHARMA et al., 2018). Estudos com sementes de milho (BORBA et al., 2014), soja (BANDEIRA et al., 2014) e feijão (SHARMA et al., 2018) demonstraram relação entre atividade de enzimas antioxidantes e vigor dos lotes.

### **2.2.5. Análise computadorizada de plântulas para avaliação do vigor em sementes**

Nos últimos anos, tem se intensificado os estudos sobre análises computadorizadas de imagens de plântulas para avaliação do desempenho das sementes. O processamento computadorizado de imagens de plântulas tem se mostrado eficiente para distinguir lotes quando ao potencial fisiológico. Tem como principais vantagens a rapidez na avaliação das plântulas, obtenção de resultados confiáveis, além de gerar um banco de dados e imagens que podem ser armazenados e consultados quando necessário (GOMES-JUNIOR, 2020; MARCOS-FILHO, 2015a). Diversos trabalhos já foram realizados mostrando a eficiência dessa ferramenta para a avaliação do vigor de sementes como feijão (ABUD et al., 2022), grão-de-bico (ARAÚJO et al., 2021a), milho (FERREIRA et al., 2020; CASTAN et al., 2018), soja (ANTUNES-NETO et al., 2020), amendoim (BARBOSA et al., 2016) e trigo (BRUNES et al., 2016).

Os recentes avanços em tecnologias de análise de imagem de sementes e plântulas têm possibilitado o desenvolvimento de novos métodos rápidos, com alta acurácia e muitas vezes não destrutivos, de modo que a partir da criação de modelos de aprendizado de máquina, atributos físicos, fisiológicos e sanitários de lotes de sementes podem ser analisados em tempo real de forma objetiva (GOMES-JUNIOR, 2020).

Na atualidade, diversos sistemas estão disponíveis para auxiliar na análise computadorizada de sementes e plântulas, destacando-se o *Seed Vigor System* (SVIS®), o Sistema automatizado do vigor de sementes (Vigor-S®), o *GroundEye*®, o ImageJ, o Sistema de análise de plântulas (SAPL®) e o ILASTIK (SAKO et al., 2001; CASTAN et al., 2018; TBIT, 2015; COLLINS, 2007; MEDEIROS; PEREIRA, 2018; BERG et al., 2019).

O SAPL®, desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, se destaca em relação aos demais por ser software gratuito e com baixo custo na aquisição das imagens que podem ser obtidas utilizando uma câmera digital ou até mesmo *smartphones*. É um software que utiliza o processamento digital de imagens para a avaliação do vigor de sementes a partir do desempenho de plântulas. Este sistema permite obter informações sobre o comprimento total de plântulas, comprimento radicular e do hipocótilo, além de obter alguns índices interessantes como índices de vigor, de crescimento e de uniformidade de plântula (MEDEIROS; PEREIRA,

2018). Diversos estudos confirmam a eficiência do SAPL® na avaliação do potencial fisiológico de sementes como soja (MEDEIROS e PEREIRA, 2018), moringa (PEREIRA et al., 2020), milho (MEDEIROS et al., 2019), arroz (CUADRADO, 2020) e grão-de-bico (ARAÚJO et al., 2021a).

Uma abordagem promissora de aprendizado de máquina orientada ao usuário é o *Interactive Machine Learning* (IML). As abordagens IML são definidas como modelos interativos de aprendizagem automático que permitem ao usuário classificar e analisar imagens (BERG, 2019). Nesta categoria destaca-se o ILASTIK, que é o software de processamento de imagens de autoaprendizado, de fácil manipulação e que permite a segmentação e classificação de dados com base em rótulos fornecidos pelo usuário (SOMMER et al., 2011). O software é de código aberto que possibilita o desenvolvimento de modelos baseados em aprendizagem interativa de máquinas com imagens, considerado fácil e ideal para usuários com pouco conhecimento computacional (BERG et al., 2019).

Existem alguns trabalhos publicados acerca da aplicação desse software como, por exemplo, na triagem de alto rendimento para quantificar danos causados por tripes (Thysanoptera: Thripidae) em folhas de pimenta (*Capsicum*) (VISSCHERS et al., 2018), quantificação e análise espacial de características em imagens histológicas de cérebro de roedores (YATES et al., 2019), e na classificação de vigor de sementes de soja (MEDEIROS et al., 2020a) e arroz (CUADRADO, 2020). Medeiros et al. (2020b) estudando a aplicação do aprendizado de máquina interativa utilizando o software ILASTIK, constatou que o método foi eficiente na classificação do vigor de sementes de soja a partir de sua aparência, sendo possível também identificar sementes com danos e classificar as plântulas em diferentes níveis de vigor.

Levando em consideração os avanços tecnológicos do uso das análises de imagem para a ciência e tecnologia de sementes visando a avaliação da qualidade de sementes e plântulas, é de suma importância a aplicação de softwares de acesso livre baseados em análise de imagem, bem como o uso de inteligência artificial que conferem eficiência e precisão nas avaliações garantindo confiabilidade no processo de tomada de decisões para o controle de qualidade das sementes (MEDEIROS et al., 2020b).

#### **2.2.6. Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIR)**

A aplicação da tecnologia de Espectroscopia do Infravermelho Próximo (NIR) foi inserida na indústria de alimentos, medicamentos e outras áreas desde a década de 70, contribuindo para o avanço da ciência e tecnologia moderna por ser uma técnica rápida, eficiente, de fácil aplicação e não destrutiva (WANG et al., 2020).

Tal técnica tem como vantagem permitir determinar propriedades qualitativas e quantitativas de materiais orgânicos, fornecendo informações baseadas na correlação entre a vibração molecular de molécula orgânica e suas interações com a quantidade de radiação infravermelha absorvida e refletida pela estrutura química contendo grupos funcionais C-H, N-H e O-H que estão presentes em material biológico como, por exemplo, nas sementes (XIA et al., 2019). O FT-NIR tem demonstrado grande potencial para detectar tais compostos em sementes pela aquisição de grande número de detalhes espectrais. Basicamente, essa técnica baseia-se na absorção em comprimentos de onda e de radiação eletromagnética nas faixas entre 780-2500 nm, absorvidos pela água e por compostos químicos como carboidratos, lipídios e proteínas, possibilitando assim a formação de espectros correspondentes à absorção de energia entre os grupos funcionais (XIA et al., 2019). Portanto, oferece versatilidade para detecção direta e simultânea de diversos constituintes do material analisado (PASQUINI, 2018; LI et al., 2017; SEO et al., 2016).

Em análise de sementes, a aplicabilidade desta técnica visa identificar, a partir dos espectros obtidos, os picos de comprimentos de onda de compostos químicos que são alterados de acordo com a qualidade da semente. Estudos pioneiros mostram que, sementes com vigor reduzido e não viáveis apresentam intensa produção de radicais livres e peroxidação de lipídios (HARMAN; MATTICK, 1976). Logo, a quantificação e determinação dessas bandas espectrais associadas aos diferentes grupos funcionais é a estratégia eficaz na aferição da qualidade das sementes (ELAMRANI et al., 1992).

O NIR é uma técnica promissora que auxilia na avaliação da qualidade física dos lotes, ao passo que possibilita diferenciar sementes vazias ou malformadas daquelas com preenchimento adequado (FARHADI et al., 2015) e na determinação de pureza física, como observado em sementes de arroz (ZHANG et al., 2019). Dessa forma, a técnica vem sendo estudada para a predição da qualidade e viabilidade de sementes de diversas espécies, tais como grão de bico (RIBEIRO et al., 2020), soja (WANG et al., 2017), trigo (XIA et al., 2019; ZHU et al., 2019), milho (QIU et al., 2018), melão (KANDPAL et al., 2016) e outras. Essa técnica também se mostrou eficiente na avaliação do vigor de sementes de milho (ANDRADE et al., 2020) e melancia (YASMIN et al., 2019) envelhecidas artificialmente.

A utilização da espectroscopia NIR permite quantificar além de teor de óleos, proteínas, açúcares, ácidos graxos, a presença de infestação fúngica ou patógenos nas sementes (SERSON et al., 2020; TAO et al., 2018; XU et al., 2020; VREŠAK et al., 2016; FARHADI et al., 2015).

Alguns estudos relatam a eficiência da utilização do NIR na verificação de possível contaminação genética em lotes de sementes e identificação da presença de sementes de outras espécies (SHRESTHA et al., 2016; VREŠAK et al., 2016 e NIE et al., 2019).

Na determinação de qualidade de sementes, faz-se necessário a aplicação combinada dos diferentes métodos matemáticos e estatísticos, como as análises multivariadas, por meio de análise de componentes principais (PCA) e a regressão parcial de mínimos quadrados (PLS-DA), que permite modelar a relação entre os dados espectrais e a composição química das sementes (BURNS; CIURCZAK, 2007). Além destas, os resultados obtidos pelo FT-NIR quando combinados com algoritmos de aprendizado de máquina, como a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), podem se constituir em ferramenta valiosa para separar os dados em classes baseadas na distância entre elas (MEDEIROS et al., 2020a).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Pesquisa de Sementes do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. Foram utilizados sete lotes de sementes de lentilha da cultivar Silvina para todos os testes. No entanto, para a análise espectral no FT-NIR adicionou-se mais um lote, no total de oito, fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Unidade descentralizada Hortaliças. As sementes de cada lote foram acondicionadas em sacos de papel kraft e mantidas em câmaras fria a  $10\pm 2$  °C e a 50% UR durante todo o período experimental.

Inicialmente, as sementes de cada lote foram submetidas aos testes para a caracterização da sua qualidade inicial e, em seguida foram realizados cinco ensaios. O primeiro ensaio foi empregado a adequação da metodologia do teste de envelhecimento acelerado (EA) e o segundo foi realizado a adequação da metodologia do teste de condutividade elétrica (CE). Esses primeiros ensaios foram realizados com o objetivo de determinar o método mais adequado para a avaliação do vigor das sementes. No terceiro ensaio, foi realizada a avaliação de enzimas do sistema oxidativo, com o propósito de evidenciar a relação da atividade enzimática com o potencial fisiológico das sementes dos diferentes lotes de lentilha. O quarto ensaio constituiu-se da análise computadorizada de plântulas pelo software SAPL® e ILASTIK, com o objetivo de definir a metodologia eficiente para a avaliação do potencial fisiológico em sementes de lentilha. No quinto ensaio, empregou-se a análise por meio da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (FT-NIR), na tentativa de realizar a predição e separação de diferentes classes de vigor de sementes de lentilha.

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

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

Foi utilizado o método de estufa a  $105\pm 3$  °C, por período de 24 h, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram utilizadas duas repetições com 25 sementes para cada lote e os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida).

### **3.2.2. Teste de germinação**

Este teste foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, que foram distribuídas em papel do tipo germitest umedecido com a quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Após a sementeira, foram confeccionados rolos que foram mantidos em germinador à temperatura de 20 °C. As avaliações foram realizadas no quinto e décimo dia após a sementeira e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais obtidas no oitavo dia, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### **3.2.3. Primeira contagem de germinação**

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

### **3.2.4. Emergência de plântulas**

O teste foi realizado em sala de crescimento vegetal em bandejas plásticas contendo mistura de solo e areia na proporção de 1:1, com quatro repetições de 50 sementes semeadas na profundidade de 1,0 cm. A porcentagem de emergência foi calculada computando-se o total de plântulas emergidas, com as plúmulas acima da superfície do substrato, após a completa estabilização do estande.

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

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

### **3.2.6. Massa seca de plântulas**

Foi realizado com as plântulas obtidas ao final do teste de crescimento. Com o auxílio de bisturi, os cotilédones foram removidos e as plântulas de cada repetição foram colocadas em

sacos de papel e mantidas em estufa com circulação de ar forçada a 65 °C, durante 72 h. Após a secagem, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador. Em seguida, foi realizada a pesagem em balança com precisão de quatro casas decimais (0,0001g) e o peso obtido foi dividido pelo número de plântulas da respectiva repetição, sendo o resultado expresso em mg.plântula<sup>-1</sup> (NAKAGAWA, 2020).

### **3.2.7. Teste de frio**

Foi utilizado como substrato papel germitest umedecido conforme descrito para o teste de germinação, no entanto, mantido à temperatura de 10 °C durante 24 h, antes da sementeira. O teste foi realizado com quatro repetições de 50 sementes distribuídas sobre duas folhas de papel germitest. Em seguida, foram adicionados 60 mL de solo sobre as sementes que foram cobertas com mais uma folha de papel para confecção dos rolos. Os rolos confeccionados foram colocados em sacos plásticos e mantidos em câmara tipo BOD a 10 °C por sete dias. Após esse período, foram removidos os sacos plásticos e os rolos foram transferidos para o germinador a 20 °C por mais cinco dias, para então proceder a avaliação da porcentagem de plântulas normais (MARCOS-FILHO, 2015a).

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

Os testes foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete lotes e quatro repetições para todos os testes. Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância para significância do teste F, e as médias obtidas para cada lote foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para todas as análises, foi utilizado o software estatístico R 4.1.1. (R CORE TEAM, 2020).

## **3.3. Ensaio I - Adequação do teste de envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha**

Para o teste de envelhecimento acelerado, foram adotados dois procedimentos: o método tradicional e o método alternativo conforme descrito a seguir. Ambos os procedimentos foram realizados pelo método do gerbox de acordo com a metodologia descrita por Baalbaki et al. (2009) e Marcos-Filho (2020).

### **3.3.1. Envelhecimento acelerado tradicional - EAT**

Utilizaram-se 250 sementes de cada lote que foram distribuídas em camada uniforme sobre a tela metálica acoplada em caixa plástica tipo gerbox contendo ao fundo 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas de modo a se obter 100% UR em seu interior e mantidas em câmara tipo BOD a 41 °C por 24, 36, 48 e 72 h. Decorridos esses períodos, foi conduzido o teste de germinação com quatro repetições de 50 sementes cada, conforme descrito acima para o teste de germinação, obtendo-se a porcentagem de plântulas normais no quinto dia após a semeadura.

### **3.3.2. Envelhecimento acelerado com solução salina saturada - EASS**

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

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

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

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), analisado em esquema fatorial triplo, sendo 2 (métodos de envelhecimento) x 7 (lotes) x 4 (períodos de envelhecimento – 24, 36, 48 e 72 h). Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett.

Os dados foram submetidos à análise de variância para significância do teste F. As médias dos fatores qualitativos foram comparadas para cada lote pelo teste de Tukey (métodos de envelhecimento e lotes) a 5% de probabilidade de erro, e os fatores quantitativos (períodos) foram submetidos à análise de regressão.

Foi empregada a análise de componentes principais (PCA) para todas as combinações de envelhecimento acelerado e os dados dos demais testes da avaliação da qualidade fisiológica inicial dos lotes. Para todas as análises, foi utilizado o software estatístico R 4.1.1. (R CORE TEAM, 2020).

### **3.4. Ensaio II - Adequação do teste condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha**

Foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Baalbaki et al. (2009) e Vieira e Marcos-Filho (2020). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada lote pesadas em balança de precisão (0,001 g). Em seguida, as sementes de cada repetição foram colocadas em copos plásticos contendo 75, 100, 150 e 250 mL de água destilada. Os copos foram mantidos em incubadora BOD regulada a 25 °C por períodos de 4, 8, 12 e 24 h. Após cada período, os copos foram retirados da incubadora, os exsudatos foram agitados com bastão de vidro e a condutividade elétrica das soluções de embebição foi determinada em condutivímetro (Digimed modelo CD 21) devidamente calibrado. Os resultados obtidos foram divididos pelo peso das sementes das respectivas repetições e o resultado final expresso em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}\cdot^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de sementes.

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

O teste foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), para tanto, empregou-se o esquema fatorial 7 (lotes) x 4 (volumes de água - 75, 100, 150 e 250 mL) x 4 (períodos de embebição - 4, 8, 12 e 24 h). Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett.

Em seguidas, foram submetidos a análise de variância para significância do efeito do teste F. As médias dos fatores qualitativos foram comparadas para cada lote pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, e os fatores quantitativos (períodos e volumes) foram submetidos a análise de regressão.

No entanto, para as combinações do teste de condutividade elétrica, foi calculada os coeficientes de correlação de Pearson (r). Para todas as análises, foi utilizado o software estatístico R 4.1.1 (R CORE TEAM, 2020).

### **3.5. Ensaio III – Determinação da atividade de enzimas antioxidantes e sua relação com o potencial fisiológico de sementes**

#### **3.5.1. Obtenção do extrato enzimático para determinação da atividade das enzimas**

Inicialmente foi realizada a embebição das sementes dos diferentes lotes de lentilha para remoção do tegumento para a realização das determinações enzimáticas. Para tanto, foram utilizadas 4 repetições com 50 sementes de cada lote, colocadas para embeber em rolo de papel toalha umedecido com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco e mantidos em germinador a 20 °C no período de 16 h, conforme a curva de embebição

proposta por Cunha (2018). Após esse período, o tegumento das sementes foi retirado com o auxílio do bisturi.

Posteriormente, o material vegetal foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. Em seguida, o material liofilizado foi macerado em moinho de bolas e armazenado em tubos do tipo eppendorf, mantidos dentro de um dessecador para não ocorrer perda de umidade até o momento de quantificação da atividade enzimática.

Para a obtenção dos extratos enzimáticos brutos para a determinação da atividade das enzimas antioxidativas, foi realizada a pesagem de 0,1 g do material vegetal. Foram então adicionados 2 mL de meio de extração, tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999). Em seguida, foi feita a centrifugação a 15.000 xg por 15 minutos, a 4 °C, para retirada da camada de óleo do sobrenadante.

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. 2,5 µL do extrato enzimático, que foi adicionado a 1 mL do reagente de Bradford, seguido de agitação. Após 20 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 595 nm.

### **3.5.2. Superóxido dismutase (SOD)**

Foi determinada de acordo com o protocolo proposto por Del Longo et al. (1993) por meio da adição do extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM, e uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático. A reação foi procedida e a atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). Os resultados foram expressos em  $U \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  proteína.

### **3.5.3. Catalase (CAT)**

Foi determinada de acordo com o protocolo proposto por Havir e Mchale (1987), por meio da adição do extrato enzimático bruto ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM, e uma alíquota de 100 µL do extrato enzimático. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (ANDERSON et al., 1995) e os resultados expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

### **3.5.4. Peroxidase do ascorbato (APX)**

Foi determinada a partir da adição de 150  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 3 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, ácido ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 mM. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente e extinção molar  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (NAKANO; ASADA, 1981) e o resultado expresso em  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

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

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas para cada lote foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Também foi empregada a análise de componentes principais (PCA) utilizando-se os dados obtidos para todas as enzimas avaliadas do sistema antioxidativo das sementes (CAT, SOD e APX) e os dados dos demais testes da avaliação da qualidade fisiológica inicial dos lotes. Para todas as análises, foi utilizado o software estatístico R 4.1.1. (R CORE TEAM, 2020).

## **3.6. Ensaio IV – Análise computadorizada de plântulas pelos softwares SAPL® e ILASTIK para avaliação do potencial fisiológico das sementes**

### **3.6.1. Software SAPL®**

Inicialmente, foi realizado o teste de comprimento de plântulas com oito repetições de 10 sementes de cada lote. As sementes foram distribuídas em linha traçada no terço superior do papel de germinação, no sentido longitudinal e posicionadas de forma que o hilo estivesse direcionado para a parte inferior do papel. Foram confeccionados rolos que foram acondicionados em sacos plásticos e colocados verticalmente em germinador por três, quatro, cinco e dez dias a 20 °C. Ao final de cada período, as plântulas foram transferidas do papel de germinação para a base fotográfica, feita de folha de espuma vinílica acetinada (E.V.A) de coloração azul, contendo onze células de cinco centímetros de largura, divididas por faixas brancas e, em seguida, fotografadas.

A aquisição das imagens foi feita por meio de fotografias, utilizando-se a câmera digital Nikon, modelo Coolpix P510, configurada em 16 Megapixels, com 1/15 segundos de

velocidade de disparo do obturador e  $f/3.3$  de abertura do diafragma. A câmera foi mantida na altura de 40 cm e angulação de  $90^\circ$  em relação à base fotográfica, utilizando o suporte do tipo *copystand*. A intensidade luminosa incidente sobre a base fotográfica foi de 260 lux (Figura 1.).



**Figura 1.** Aquisição das imagens fotográficas e processamento por meio do software SAPL®.

As imagens foram armazenadas e, posteriormente, inseridas no arquivo *default* selecionado do software SAPL®. Os índices fornecidos pelo software foram definidos por Sako et al. (2001). Na sequência, foi selecionado o valor de referência para o índice de crescimento e uniformidade (70 e 30%, respectivamente) para o cálculo do índice de vigor resultando na seguinte equação:  $IV = (0,70 * C + 0,30 * U)$ , onde IV é o índice de vigor, C o índice de crescimento, U o índice de uniformidade.

Após registro dos valores iniciais, foi realizado o carregamento e processamento das imagens das plântulas por repetição de cada lote.

O software forneceu medições do comprimento da parte aérea - CPA (mm plântula<sup>-1</sup>), comprimento radicular - CR (mm plântula<sup>-1</sup>) e comprimento total da plântula - CTP (mm plântula<sup>-1</sup>). Posteriormente, os valores de comprimento de plântulas obtidos pelo SAPL® foram inseridos no pacote SeedCalc do software R (SILVA et al., 2019) para gerar índices mais

ajustados de uniformidade (CASTAN et al., 2018), crescimento (MEDEIROS et al., 2019) e vigor (MEDEIROS; PEREIRA, 2018), conforme as fórmulas descritas abaixo:

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

$$IC = (\text{médiaCT}/X_{\text{máx}}) \times 100$$

Em que:

IC= índice de crescimento;

mediaCT= media do comprimento total de plântula da repetição; e

Xmáx= media do comprimento total de 5% das maiores plântulas do experimento.

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

Em que:

IU= índice de uniformidade;

X<sub>i</sub>= comprimento da plântula analisada;

X= comprimento médio de plântulas do lote de sementes analisado;

n= variável número de plântulas totais avaliadas;

n<sub>dead</sub>= número de sementes não germinadas ou mortas presentes no lote avaliado; e

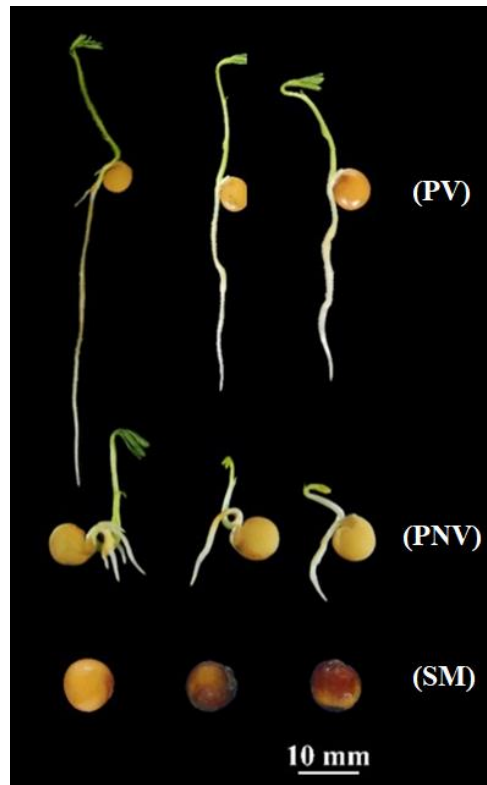
n<sub>total</sub>= número total de plântulas.

### 3.6.2. Software ILASTIK

O ILASTIK apresenta uma interface dinâmica, permitindo que o usuário manipule de forma livre e arbitrária, apenas com o mouse, a segmentação das classes. O usuário tem a autonomia de treinar classificadores aleatórios baseados nos recursos de imagens, de acordo com o objetivo proposto. O software é acoplado em módulo CellProfiler (gratuito e de acesso livre), que possibilita a classificação de bioimagens de forma interativa.

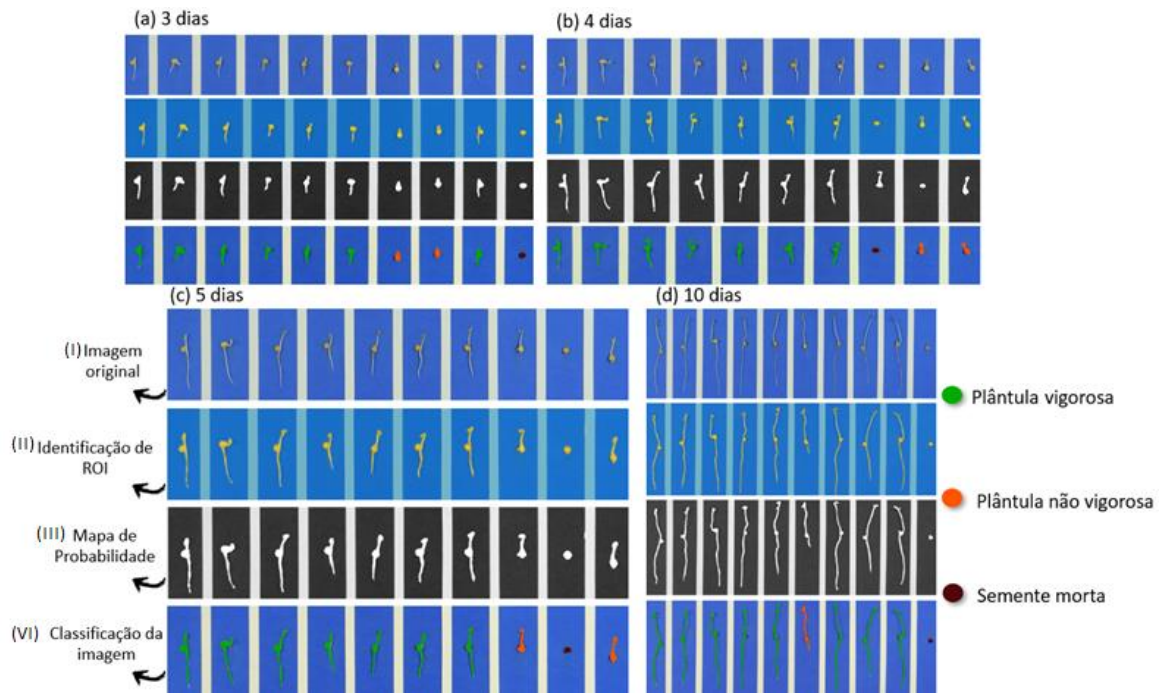
As imagens obtidas conforme descrito acima para o software SAPL® foram carregadas no software ILASTIK, de tal forma que no pré-processamento e na segmentação foi utilizada a ferramenta de classificação de pixels, definindo duas classes de segmentação “semente ou plântula” e “fundo”, baseadas na intensidade de cores e pixels. Para criar os mapas de probabilidade, os pixels pertencentes às regiões de cada classe de segmentação foram treinados diretamente nos dados de entrada para a identificação das plântulas conforme as cores das classes de segmentação. A probabilidade de o pixel pertencer às classes de segmentação foi estimada para cada pixel da imagem. O software foi treinado para o reconhecimento de três classes de plântulas, as vigorosas e fortes (V), plântulas morfológicamente bem formadas

mostrando crescimento vigoroso de hipocótilo e raízes; plântulas não vigorosas e fracas (NV), as quais mostraram ausência, subdesenvolvimento ou deformação de alguma estrutura essencial, ou eram fracas e subdesenvolvidas; e sementes mortas (SM). O classificador treinado foi aplicado a todas as imagens, e os mapas de probabilidade foram exportados para cada imagem, gerando dados de número de plântulas vigorosas (PV), número de plântulas não vigorosas (PNV) e sementes mortas (SM) (Figura 2).



**Figura 2.** Padrão de plântulas vigorosas (PV), plântulas não vigorosas (PNV) e sementes mortas (SM) de lentilha para o treinamento pelo software ILASTIK.

Breve resumo das principais etapas do método interativo de classificação de sementes e plântulas de lentilha é ilustrado na Figura 3. Inicialmente, tem-se as imagens das plântulas do teste de germinação no fundo azul (I). Em seguida, foi aplicado a renderização para a segmentação e melhoria da região de interesse (ROI) para a aquisição do mapa de probabilidade (II). Após a renderização do ROI, o software identifica as plântulas e sementes individuais com o mapa de probabilidade (III), e por fim é realizada a previsão da classificação de cada semente ou plântula a partir das cores de treinamento dos respectivos grupos de classificadores (IV).



**Figura 3.** Esquema representativo das etapas de aprendizado interativo de máquina e classificação da qualidade fisiológica dos diferentes lotes de lentilha aos 3 (a), 4 (b), 5 (c) e 10 dias (d) após a semeadura.

### 3.6.3. Delineamento experimental e análise estatística

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância para significância do teste F, e as médias obtidas para cada lote foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Empregou-se também a análise de componentes principais (PCA) para todas as combinações de dados procedidas nos testes para avaliação do potencial fisiológico pelo software SAPL® e ILASTIK, bem como os dados dos demais testes da avaliação da qualidade fisiológica inicial dos lotes. Para todas as análises, foi utilizado o software estatístico R 4.1.1. (R CORE TEAM, 2020).

## 3.7. Ensaio V – Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR e sua relação com o potencial fisiológico das sementes

### 3.7.1. Aquisição dos espectros FT-NIR

Neste ensaio, foram utilizadas sementes de oito lotes que foram submetidas à análise do infravermelho próximo; para tanto, foram selecionadas aleatoriamente 200 sementes por lote, totalizando 1600 sementes. As sementes foram analisadas individualmente, sendo depositadas

em suporte circular com tamanho e formato adequado para as sementes de lentilha. O suporte com a semente foi sobreposto com um cilindro de ouro para que os feixes de luz não interferissem nos resultados espectrais. Os dados espectrais de cada semente foram obtidos por meio do espectrômetro de transformada de Fourier – FT-NIR (Thermo Scientific Antaris II). Os espectros de refletância NIR foram expressos como  $\log(1/R)$ , sendo o R a refletância. Para cada semente, foram coletados 3.111 pontos por espectro, dentro de uma faixa de comprimento de onda que varia de 1000 a 2500 nm e resolução de 12500 nm. Foram realizadas 200 varreduras sucessivas dos espectros médios de cada lote, sendo as varreduras realizadas em 30 segundos para cada semente.

Após a obtenção dos espectros, as sementes de cada lote foram submetidas ao teste padrão de germinação com quatro repetições de 50 sementes, distribuídas em papel toalha (Germitest®) umedecidos com água destilada, na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco. Após a semeadura, foram confeccionados rolos que foram mantidos em germinador à temperatura de 20 °C. As avaliações foram realizadas no quinto e no décimo dia após a semeadura e os resultados foram expressos em percentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas (BRASIL, 2009).

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

Para o teste de germinação, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas para cada lote foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Já os dados espectrais foram submetidos à análise de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para extração dos componentes principais dos dados espectrais e classificação de acordo com a variância mais explicada. Após o treinamento do modelo PLS-DA, foi avaliada a influência dos preditores medindo a importância das variáveis a partir de pontuações derivadas dos coeficientes gerados pela PLS-DA para o modelo ideal de predição. O algoritmo extrai valores de covariância entre as diferentes classes e os preditores são classificados a partir dessas pontuações (KOSMOWSKI; WORKU, 2018). Assim, as classes de treinamento foram: sementes de alto vigor (n=600), médio vigor (n=600) e baixo vigor (n=400), conforme os resultados do teste de germinação.

Para a remoção dos ruídos existentes nos espectros obtidos no FT-NIR, foi utilizado o pacote “nira” (MEDEIROS, 2020) e funções cooptadas do software R (R Core Team, 2020).

Para a validação do algoritmo, os espectros foram divididos de forma aleatória para o treinamento (70%) e teste/validação (30%) (KOSMOWSKI; WORKU, 2018). Foram testadas duas abordagens para tratar os dados decorrentes dos espectros do treinamento e validação dos algoritmos, resultando na formação de dois bancos de dados.

A composição do primeiro banco de dados baseou-se na formação de espectros após a aplicação do escalonamento automático pela técnica de pré-processamento, onde foi empregada a função de escala embutida do software R. A composição do segundo banco de dados resultou na formação de espectros após a primeira derivada de Savitzky – Golay (polinômio de terceiro grau, tamanho da janela = 5) (RIBEIRO et al., 2020). Foi realizada ainda a Análise de Componentes Principais (PCA) com o objetivo de detectar padrões resultantes dos dados obtidos da análise do FT-NIR. Logo, foram montadas duas matrizes com os dados obtidos de cada semente, sendo a primeira relacionada aos espectros escalonados (3112 x 1200) e a segunda aos espectros suavizados a partir da primeira derivada do Savitzky – Golay (3108 x 1200).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Caracterização da qualidade inicial dos lotes de lentilha**

Observa-se que o grau de umidade dos diferentes lotes de lentilha foram uniformes, variando de 13,1 a 13,4 (Tabela 1). Tal característica é extremamente importante, uma vez que, é imprescindível a uniformização da umidade para que as avaliações sejam padronizadas, com resultados consistentes (MARCOS-FILHO et al., 2015a; WORMA et al., 2019).

A germinação das sementes do lote 5 foi superior à dos demais lotes, seguida pelos lotes 1, 2, 4, 6 e 7 enquanto o lote 3 destaca-se como o de menor percentual de germinação (Tabela 1). O teste de germinação possibilita que as sementes expressem seu máximo potencial fisiológico, uma vez que fornece condições ótimas de umidade, temperatura e luz, resultando em informações importantes sobre o desempenho das sementes nestas condições (QUEIRÓZ et al., 2019). Todos os lotes apresentaram germinação superior a 80%, o que é o valor mínimo estabelecido pela legislação para a comercialização de sementes de lentilha no Brasil (BRASIL, 2012).

Ao se avaliar a primeira contagem de germinação, verifica-se que os lotes 6 e 5 obtiveram os maiores percentuais (acima de 80%), seguidos pelos lotes 4 e 7, e os lotes 1 e 3 com os menores valores, embora não diferindo do lote 2. A primeira contagem é considerada como teste complementar ao de germinação, sendo indicativo para classificação dos lotes

quanto ao vigor, expressando diferenças de velocidade de germinação entre os lotes (NAKAGAWA, 2020). Desta forma, diferenças no desempenho dos lotes 1, 2, 4, 6 e 7 não observadas pelo teste de germinação puderam ser detectadas quando se avaliou a velocidade de germinação (Tabela 1).

Os resultados de emergência de plântulas quanto à classificação do potencial fisiológico dos lotes foram semelhantes aos do índice de velocidade de emergência (IVE), sendo os lotes 1, 4, 5 e 7 seguidos pelos lotes 2 e 6, considerados como intermediários, e o lote 3 apresentando o pior desempenho (Tabela 1). Os testes de emergência de plântulas e IVE possibilitaram a classificação ainda maior dos lotes quanto ao vigor. O teste de emergência de plântulas visa identificar as sementes vigorosas por meio do seu desempenho nas condições de campo, ou seja, condições não controladas. Portanto, as informações obtidas nesse teste são fundamentais para prever o verdadeiro potencial fisiológico das sementes (MEDEIROS; PEREIRA, 2018; MARCOS-FILHO, 2015b).

**Tabela 1.** Caracterização da qualidade inicial de sete lotes de lentilha, cv. Silvina, analisados pelo grau de umidade (GU), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS) e teste de frio (TF).

Lotes	GU (%)	G (%)	PCG (%)	E (%)	IVE (índice)	MS (mg.plântulas <sup>-1</sup> )	TF (%)
1	13,16	95 b	53 c	91 a	10,43 a	0,12 ab	91 ab
2	13,09	92 b	63 bc	88 b	9,66 b	0,11 ab	89 ab
3	13,19	83 c	58 c	72 c	8,08 c	0,08 c	74 c
4	13,39	94 b	70 b	91 a	10,84 a	0,10 b	92 ab
5	13,15	99 a	86 a	92 a	10,13 a	0,13 a	99 a
6	13,41	94 b	89 a	85 b	9,29 b	0,10 b	94 a
7	13,20	91 b	71 b	92 a	10,29 a	0,11 ab	87 b
F	-	34,29*	22,29*	8,9*	17,73*	88,39*	21,73*
CV (%)	-	1,82	8,09	5,44	4,45	8,5	3,67

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

Em relação à massa seca das plântulas dos diferentes lotes, observa-se que maior valor foi obtido para o lote 5 e menor valor para o lote 3, ficando os lotes 4 e 6 em posição intermediária (Tabela 1). Lotes cujas plântulas apresentam maior conteúdo de massa seca possuem maior vigor, indicando maior transferência de massa seca do tecido de reserva das sementes para o eixo embrionário (NAKAGAWA, 2020). Por outro lado, os lotes que não apresentam essa eficiência são caracterizados como lotes de menor vigor (PEDÓ et al., 2018).

Os resultados do teste de frio possibilitaram separar os lotes 5 e 6 com os melhores desempenhos sob estresse provocado por baixas temperaturas, os quais foram superiores aos lotes 7 e 3 (Tabela 1).

Em síntese, a partir dos testes utilizados para a caracterização inicial dos diferentes lotes quanto ao potencial fisiológico, pode-se afirmar, de modo geral, que em todos os testes aplicados, o lote 5 esteve entre os de melhor desempenho, enquanto o lote 3 esteve entre os de pior desempenho, havendo algumas variações quando aos lotes de médio vigor, dependendo do teste. A utilização de lotes com diferentes níveis de potencial fisiológico é fundamental em estudos sobre avaliação do vigor de sementes, principalmente quando se pretende definir ou testar novas metodologias para tal finalidade. É importante que as novas metodologias que estão sendo testadas permitam obter a classificação dos lotes quando ao vigor semelhante à obtida em testes já consagrados para a espécie em estudo.

#### **4.2. Ensaio I - Adequação do teste de envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha**

A diferença entre os valores obtidos para o grau de umidade das sementes de cada lote, após cada período de envelhecimento acelerado pelo método tradicional e com solução salina saturada, não ultrapassou o valor limite tolerável de 4 p.p (MARCOS-FILHO, 2020). Isto indica que os resultados obtidos foram consistentes e uniformes.

É importante observar para as sementes de lentilha submetidas ao envelhecimento acelerado pelo método tradicional, que houve aumento do grau de umidade com o aumento do período de envelhecimento, com maiores valores no período de 72 h, apresentando diferença de quase 2 p.p. em relação ao período inicial de 24 h (Tabela 2). Esse fenômeno ocorre devido ao baixo potencial mátrico das sementes secas que possuem forte retenção de água. Dessa forma, quando entram em contato com ambiente úmido, ocorre a rápida hidratação nas primeiras horas de contato (MARCOS-FILHO, 2015a). Ao comparar com o teor de água das sementes após o envelhecimento pelo método com solução salina saturada, é possível notar que os valores obtidos foram inferiores ao método tradicional, o que pode ser explicado pela UR menor (76%) (ARAÚJO et al., 2021b).

**Tabela 2.** Grau de umidade (%) após diferentes períodos de envelhecimento acelerado tradicional (EAT) e com solução salina saturada (EASS) em lotes de sementes de lentilha.

Lotes	Umidade inicial (%)	EAT (100% UR)				EASS (76% UR)			
		24 h	36 h	48 h	72 h	24 h	36 h	48 h	72 h
1	13,16	32,4	39,6	45,1	50,0	15,7	16,0	16,0	16,5
2	13,09	33,2	40,8	45,4	49,4	15,9	15,4	15,2	16,3
3	13,19	33,5	41,5	46,5	50,2	15,6	15,9	15,9	16,2
4	13,39	33,3	41,4	46,8	50,5	15,6	15,8	15,8	15,9
5	13,15	33,1	40,6	45,2	50,7	15,5	16,0	15,9	16,2
6	13,41	33,6	39,6	45,2	50,8	15,3	15,9	16,0	15,6
7	13,20	32,6	40,4	45,0	50,1	15,6	15,9	16,1	16,6

Ao se comparar os dois métodos de envelhecimento acelerado (Tabela 2), é possível observar que o envelhecimento com solução salina saturada (76% UR) resultou em menor absorção de água pelas sementes de lentilha, o que refletiu em menor deterioração. Isso pode ser observado pelos maiores valores de germinação após envelhecimento quando comparados com aqueles obtidos no envelhecimento acelerado tradicional (100% UR).

Pode-se observar que o método de envelhecimento acelerado tradicional (100% UR) possibilitou o agrupamento dos lotes em diferentes níveis de vigor nos quatro períodos avaliados (Tabela 3). No período de 24 h, o lote 5 apresentou o maior vigor não diferindo do lote 1. Já o lote 3 foi inferior aos demais, ficando os lotes 2, 4, 6 e 7 em posição intermediária, mas também não diferindo do lote 1. No entanto, os períodos de 36 e 48 h possibilitaram a distinção ainda maior em relação ao vigor dos lotes, sendo o lote 5 o mais vigoroso, seguido pelos lotes 1 e 7, sendo estes, de modo geral superiores aos lotes 2, 4 e 6 intermediários, destacando-se o lote 3 como inferior ao de menor vigor. No período de 72 h, a classificação dos lotes foi semelhante à obtida com 36 e 48 h, mas os valores foram inferiores aos obtidos nos demais tempos. Isso indica que nesse tempo a deterioração das sementes foi mais drástica com o lote 2 sendo semelhante ao lote 3, com menor vigor.

Os resultados obtidos no envelhecimento acelerado pelo método tradicional foram similares aos obtidos nos demais testes utilizados para a caracterização inicial dos lotes em todos os períodos testados, possibilitando separar os lotes em diferentes níveis de vigor. Em geral, observa-se que o lote 5 (maior vigor) no período de 24 h não diferiu do lote 1, que por sua vez foi semelhante aos demais lotes, exceto o lote 3 que se destacou como o de menor vigor (Tabela 3). Nos períodos a partir de 36 h, a separação dos lotes em níveis de vigor foi mais nítida, com maior vigor para o lote 5 e menor vigor para o lote 3. Observa-se que a classificação dos lotes quanto ao vigor foi mais nítida com 48 h de envelhecimento, onde o lote 5 foi superior

aos demais, seguido pelos lotes 1 e 7, que por sua vez tiveram melhor desempenho que os lotes 4, 6 e 2, destacando-se o lote 3 como o de pior desempenho. Classificação semelhante foi observada com 72 h de envelhecimento, mas observa-se que os valores absolutos obtidos foram inferiores aos de 48 h, principalmente para os lotes de menor potencial fisiológico que se mostraram bastante sensíveis ao maior tempo de envelhecimento. É importante ressaltar que embora os períodos de 36, 48 e 72 h tenham sido eficientes para a classificação dos lotes quanto ao vigor, o período de 48 h pode ser considerado mais adequado devido à praticidade, permitindo que o teste seja conduzido dentro do horário comercial de funcionamento de laboratórios de análise de sementes.

O teste de envelhecimento acelerado possibilita avaliar o potencial fisiológico das sementes com base no princípio de que a taxa de deterioração das sementes aumenta de forma considerável quando submetidas as altas condições de temperatura e umidade relativa (BAALBAKI, 2009; MARCOS-FILHO, 2009). Portanto, diferentemente de lotes de baixo vigor, lotes de alto vigor apresentam tolerância e tem capacidade de germinar e produzir plântulas normais quando submetidos às condições do teste. Lotes de baixo vigor, ao serem colocados para germinar após o envelhecimento acelerado poderão ter maior infestação por microrganismos, maior liberação de exsudatos durante a embebição, redução da germinação com maior porcentagem de plântulas anormais e sementes mortas (ARAÚJO et al., 2021b).

Pelo método de envelhecimento acelerado com solução salina saturada (76% UR), na qual apresenta a umidade relativa menor em relação ao método tradicional com o objetivo de minimizar o estresse, também foi possível obter a separação dos lotes em diferentes níveis de vigor com pequenas variações. Vale ressaltar que os resultados foram semelhantes em todos os períodos, havendo separação em apenas três níveis de vigor. No entanto, foi menos eficiente do que a classificação obtida pelo método tradicional. De maneira geral, o lote 5, (maior vigor pelo método tradicional) pelo método alternativo não diferiu significativamente dos lotes 1, 4 e 7 na maioria dos períodos testados. Apenas no tempo de 72 h, houve classificação de lotes de forma mais detalhada, com os lotes 1 e 5 como mais vigorosos e o lote 3 como o de pior desempenho, ficando os demais lotes em posição intermediária (Tabela 3).

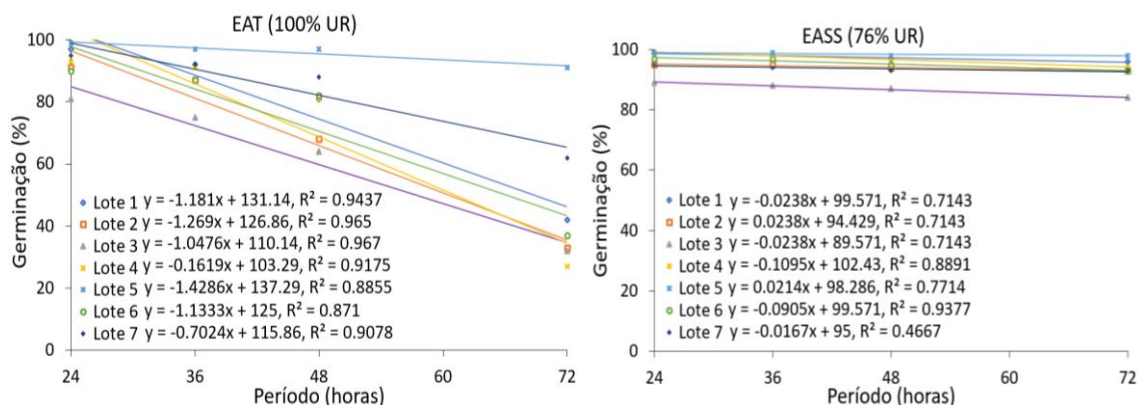
**Tabela 3.** Germinação (%) dos lotes de sementes de lentilha após diferentes períodos de envelhecimento acelerado tradicional (EAT) e envelhecimento acelerado com solução salina saturada (EASS).

Lotes	EAT (100% UR)				EASS (76% UR)			
	24 h	36 h	48 h	72 h	24 h	36 h	48 h	72 h
1	97 abA	92 bB	85 bB	42 cB	99 aA	98 abA	97 abA	96 abA
2	91 bcB	87 cB	68 dB	33 deB	94 bA	95 bA	94 bA	93 bA
3	81 dB	75 dB	64 eB	32 eB	89 cA	88 cA	87 cA	84 cA
4	93 bcB	90 bcB	81 cB	37 dB	99 aA	98 abA	97 abA	94 bA
5	99 aB	97 aB	97 aB	91 aB	99 aA	99 aA	98 abA	98 aA
6	90 bcB	87 cB	82 cB	37 dB	97 abA	94 bA	93 bA	93 bA
7	95 bB	92 bB	88 bB	62 bB	98 aA	97 abA	96 abA	93 bA
CV (%)	2.1							

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

É possível observar que o envelhecimento acelerado pelo método tradicional possibilitou a classificação mais eficiente dos lotes quanto ao vigor a partir de 36 h, mas principalmente nos períodos de 48 e 72 h, onde a separação dos lotes em níveis de vigor foi mais nítida. Contudo, vale reforçar que com 72 h os valores obtidos para os lotes de pior desempenho demonstraram deterioração mais acentuada das sementes, resultando em valores mais baixos de germinação após envelhecimento em relação ao período de 48 h.

Estas informações podem ser confirmadas ao se comparar os diferentes períodos de envelhecimento acelerado (Figura 4). Observa-se para o método tradicional em água (100% UR) decréscimo linear acentuado nos valores obtidos com o aumento do tempo de envelhecimento, possibilitando a separação mais nítida dos lotes com 48 h, com o lote 5 como o mais vigoroso, seguido do lote 7, ficando os lotes 1, 2, 4 e 6 numa posição intermediária e o lote 3 como o de menor vigor. No entanto, com o envelhecimento acelerado pelo método com solução salina saturada de NaCl (76% UR) não foi possível observar separação muito nítida entre os lotes quanto ao vigor, uma vez que os lotes 1, 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram desempenho similar para os diferentes períodos de envelhecimento, destacando-se o lote 3 como o de pior desempenho em todos os períodos testados. Observa-se ainda que não houve reduções acentuadas na germinação após o envelhecimento pelo método da solução salina saturada (76%), ocasionando assim menor estresse por umidade e menor deterioração, principalmente quando comparado pelo método tradicional (100% UR) (ARAÚJO et al., 2021b).

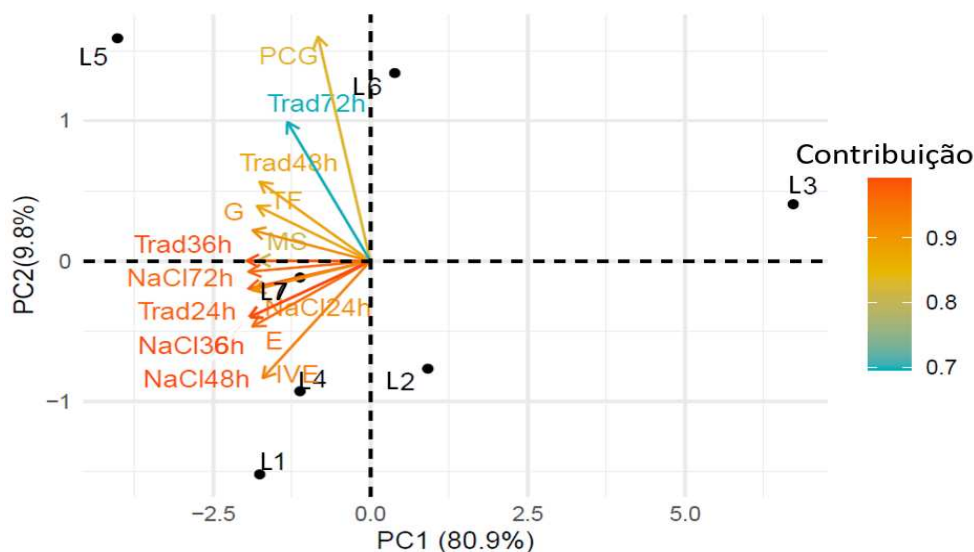


**Figura 4.** Porcentagem de germinação de sete lotes de sementes de lentilha, cv. Silvina, após o envelhecimento acelerado tradicional com água (100% UR) e com solução salina saturada (76% UR), nos períodos de 24, 36, 48 e 72 h.

No envelhecimento acelerado tradicional por 72 h houve redução drástica na germinação dos diferentes lotes (Figura 4). Isso reforça o que foi discutido ao se analisar a Tabela 3, principalmente do lote 3, 2, 4, 6 e 1, o que não ocorreu para o lote 5, o mais vigoroso. Em sementes de lentilha (MARINKE et al., 2019; FREITAS; NASCIMENTO, 2006) e grão-de-bico (ARAÚJO et al., 2021b), também foi constatado que o período de 72 h de envelhecimento foi muito drástico para as sementes de diferentes lotes.

Em sementes de soja e feijão, o teste de envelhecimento acelerado vem sendo conduzido na temperatura de 41 °C por 48 h pelo método tradicional (BAALBAKI, 2009). No entanto, para sementes de grão-de-bico, nestas condições, observou-se alta incidência de microrganismos e mortalidade de sementes nessas mesmas condições, indicando deterioração excessiva provocada principalmente pela alta umidade relativa e temperatura (ARAÚJO, 2019), sendo mais indicado o método alternativo com 76% UR.

A análise de componentes principais (PCA) permitiu explicar 90.7% da variabilidade total dos dados (Figura 5). É possível observar que os lotes 5, 1, 7 e 4 estão localizados nos scores negativos do componente 1 (PC1), associados aos melhores desempenhos. Em contrapartida, pode-se observar que o lote 3 está localizado nos scores positivos do PC1, no entanto, com correlação negativa devido o lote apresentar baixo potencial fisiológico conforme observado nas variáveis de vigor.



**Figura 5.** Análise de componentes principais (PCA) das variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS), teste de frio (TF) e os diferentes procedimentos do teste de envelhecimento acelerado realizados em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina.

A PCA (Figura 5) nos possibilita observar a separação do vigor dos diferentes lotes submetidos aos testes de envelhecimento acelerado e relacionar o com os demais testes de vigor. É nítida a relação do método tradicional em água (100% UR) nos períodos de 36 e 48 h com as variáveis de germinação e vigor para o lote 5, seguidos dos lotes 7, 1 e 4 observada nos scores negativos do PC1. Quanto mais afastado o vetor da variável estiver do lote, menor será o desempenho desse lote em relação a esta variável. Assim, observa-se que o lote 3 localizado no quadrante oposto aos vetores das variáveis referentes ao vigor reforça os resultados apresentados Tabela 3, que evidenciam menor vigor para as sementes deste lote. Nota-se também, que pelo método de solução salina saturada (76% UR), todos os períodos de envelhecimento estão situados nos scores negativos do PC1 juntamente com os lotes que apresentaram os melhores desempenhos fisiológicos nos testes submetidos. Dessa forma, é possível afirmar que, o uso do período de 48 h pode fornecer resultados mais concretos em relação ao potencial fisiológico dos diferentes lotes, além da praticidade e otimização no tempo de execução dos testes realizados em laboratórios de rotina de sementes. A eficácia dos testes de envelhecimento acelerado tradicional e com solução salina saturada foi comprovada em estudos com sementes de grão-de-bico (ARAÚJO et al., 2021) e feijão mungo-verde (SILVA et al., 2018), onde ambas espécies citadas apresentaram o melhor desempenho no período de 48 h a 41 °C.

### **4.3. Ensaio II - Adequação do teste de condutividade elétrica para avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha**

Ao se comparar o desempenho dos diferentes lotes de sementes de lentilha nos diferentes períodos de embebição e volume de água (Tabela 4), observa-se que no volume de 75 mL foi possível realizar a separação dos lotes em relação ao seu potencial fisiológico já no período de 4 h de embebição, sendo possível identificar com clareza o lote 3 como o de menor vigor, conforme observado também pelos testes de caracterização do potencial fisiológico inicial (Tabela 1) e envelhecimento acelerado (Tabela 3). Com relação aos lotes de melhor desempenho, a classificação dos lotes não foi tão nítida ocorrendo variação dependendo do tempo utilizado até 12 h de embebição. No entanto, com 24 h foi possível observar o melhor desempenho para o lote 5, seguido pelos lotes 1, 7 e 4. Resultados semelhantes foram observados também para o volume de 100 mL. Tanto no volume de 75 mL como 100 mL, o lote 3 apresentou pior desempenho em todos os tempos testados, com valores de condutividade elétrica significativamente superiores aos dos demais lotes. Isso indica maior desorganização do sistema de membranas celulares, conforme o princípio deste teste descrito por Vieira e Marcos-Filho (2020). Neste contexto, pode-se afirmar que os volumes de água de 75 e 100 mL se mostraram eficientes para separar os diferentes níveis de vigor. Além disso, com 4 h de embebição há a possibilidade de se identificar lotes de sementes de lentilha de baixo vigor pelo teste de condutividade elétrica.

Quando foram utilizados 150 e 250 mL de água (Tabela 4), a identificação do lote 3 como de pior desempenho só ocorreu nos tempos de 12 e 24 h. Com relação aos lotes de maior vigor, nas combinações de 150 mL por 12 h e 250 mL por 24 h não se observou separação detalhada, uma vez que os lotes 1, 4, 5 e 7 não diferiram entre si. Por outro lado, nas combinações de 150 mL por 24 h e 250 mL por 24 h, a diferenciação foi mais nítida, com maior vigor para as sementes do lote 5, conforme também verificado nos resultados do teste de envelhecimento acelerado (Tabela 3).

Conforme já citado, o teste de condutividade elétrica se baseia na perda da integridade das membranas celulares que tem sido relacionada como um dos eventos iniciais do processo de deterioração e, conseqüentemente, da redução do potencial fisiológico em sementes. Portanto, quando colocadas para beber água exsudam íons, açúcares, sais e outros compostos elevando a condutividade elétrica da solução de embebição. A reorganização das membranas pode ser maior e mais rápida dependendo do nível de deterioração das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994). Dessa forma, em sementes deterioradas e com baixo vigor, o mecanismo de

reorganização das membranas pode ser ineficiente ou ausente, provocando maior lixiviação de eletrólitos (FESSEL et al., 2010; FESSEL et al., 2006). Por se basear em evento típico do início da deterioração, o teste pode ser utilizado para detectar a deterioração das sementes em sua fase inicial além de permitir obter resultados em curto período de tempo, agilizando as tomadas de decisão quanto ao manejo dos lotes.

Ao se comparar os diferentes volumes de água dentro de cada período de embebição (Tabela 4), observa-se redução significativa nos valores de condutividade elétrica com o aumento do volume de água para todos os lotes estudados. De acordo com Dalanhó et al. (2014), maiores volumes de embebição possibilitam a maior diluição dos exsudatos e, conseqüentemente há redução dos valores de condutividade elétrica, conforme observado em trabalhos com sementes de lentilha (CONTIN, 2018) e grão-de-bico (ARAÚJO, 2019).

Assim, nota-se maior concentração de exsudatos e lixiviados pelas sementes de lentilha no volume de 75 mL, conseqüentemente os maiores valores de condutividade elétrica, e menores concentrações de exsudatos e lixiviados no volume de 250 mL, resultando em menores valores de condutividade. Esta tendência pode ser confirmada pela Figura 6, onde é possível observar a diferença na concentração de cor da solução nos diferentes volumes utilizados.

O aumento do período de embebição resultou no aumento da condutividade elétrica em todos os volumes avaliados (Figura 7). Em todos os volumes analisados, os maiores valores de condutividade elétrica (que indicam menor vigor devido a maior liberação de lixiviados) foram obtidos para as sementes do lote 3 enquanto os menores valores foram observados para as sementes do lote 5, ficando os demais lotes em posição intermediária. O aumento da condutividade elétrica com o aumento do período de embebição também foi constatado em sementes lentilha (SILVA et al., 2020), grão-de-bico (ARAÚJO, 2019) e aveia branca (SPONCHIADO et al., 2014).



**Figura 6.** Ilustração dos volumes de solução para sementes de lentilha após 24 h de embebição; para o todos os volumes foram utilizados copos plásticos com capacidade de 300 mL.

**Tabela 4.** Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de lotes de sementes de lentilha em diferentes períodos de embebição e volumes de água.

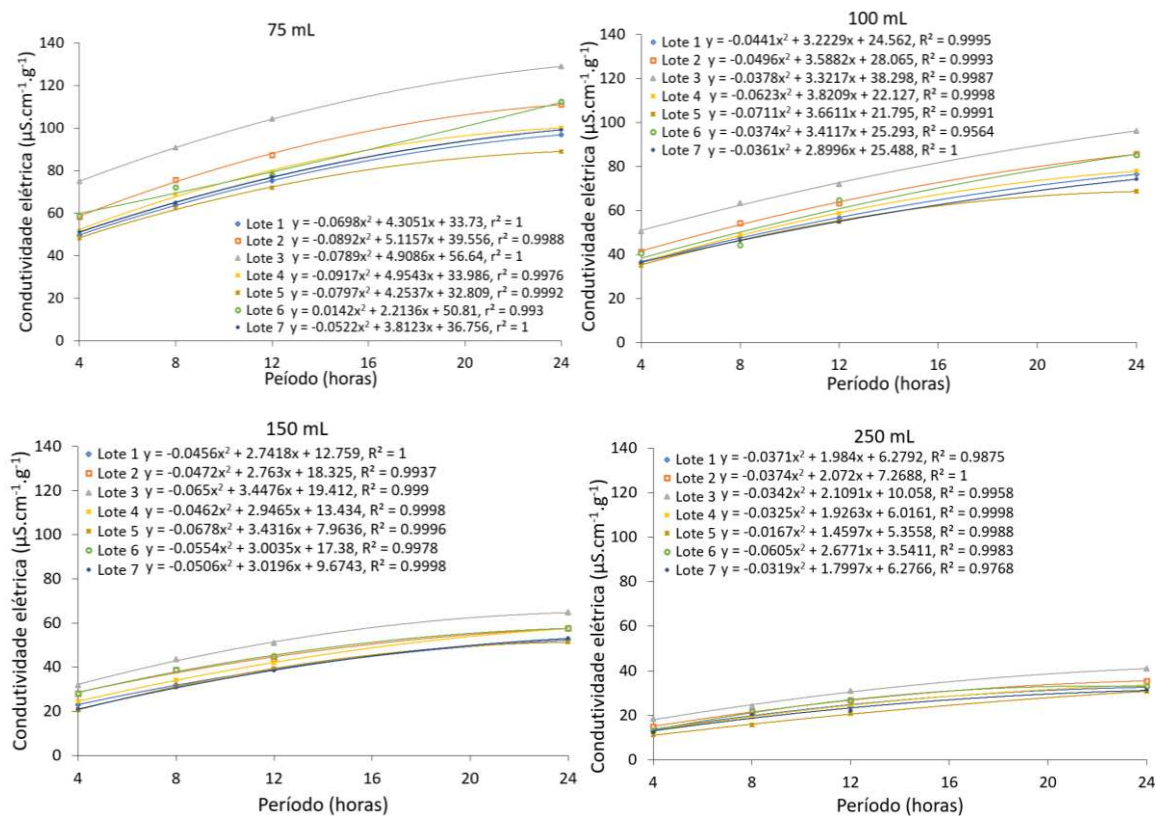
Período de embebição	Lotes	Volume de água (mL)			
		75	100	150	250
4 h	1	49.77 Ac	36.55 Bc	22.97 Cc	13.13 Db
	2	58.17 Ab	41.35 Bb	28.09 Cab	14.95 Dab
	3	75.05 Aa	50.60 Ba	31.92 Ca	18.29 Da
	4	51.80 Ac	36.28 Bc	24.38 Cb	13.26 Db
	5	48.28 Ac	35.07 Bc	21.47 Cc	12.09 Dc
	6	58.85 Ab	40.69 Bb	28.19 Cab	13.09 Db
	7	51.21 Ac	36.47 Bc	22.84 Cc	13.32 Db
8 h	1	63.86 Ad	48.02 Bc	31.84 Cc	20.24 Db
	2	75.83 Ab	54.28 Bb	38.74 Cab	21.47 Dab
	3	90.76 Aa	63.40 Ba	43.44 Ca	23.88 Da
	4	69.09 Ac	49.04 Bc	34.30 Cb	19.20 Db
	5	62.41 Ad	47.11 Bc	31.42 Cc	15.56 Dc
	6	72.03 Ab	44.32 Bb	38.66 Cab	21.56 Dab
	7	63.81 Ad	47.47 Bc	31.85 Cc	20.25 Db
12 h	1	75.23 Ad	56.56 Bcd	39.05 Cc	23.93 Dc
	2	87.40 Ab	63.52 Bb	43.80 Cb	26.73 Db
	3	104.24 Aa	72.08 Ba	51.02 Ca	31.01 Da
	4	79.34 Ac	58.78 Bc	41.97 Cbc	24.55 Dbc
	5	71.93 Ae	55.10 Bd	39.16 Cc	20.74 Dd
	6	87.68 Ab	64.76 Bb	44.92 Cb	26.63 Db
	7	75.05 Ad	56.22 Bcd	39.85 Cc	23.21 Dc
24 h	1	96.84 Ac	76.56 Bc	52.30 Cc	32.63 Dbc
	2	111.04 Ab	85.64 Bb	57.55 Cb	35.44 Db
	3	128.97 Aa	96.30 Ba	64.76 Ca	40.90 Da
	4	100.16 Abc	77.95 Bc	57.55 Cb	33.52 Dbc
	5	89.04 Ad	68.73 Bd	51.32 Cd	30.75 Dc
	6	112.28 Ab	85.23 Bb	57.63 Cb	33.95 Dbc
	7	98.16 Ac	76.29 Bc	53.01 Cc	32.23 Dbc
CV (%)		3.23			

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

Em sementes de grão-de-bico, diferenças entre os valores de condutividade de diferentes lotes já puderam ser observada nos períodos iniciais de embebição (4 e 8 h) se mantendo até 24 h, permitindo a separação dos lotes em diferentes níveis de potencial fisiológico, independente do volume de água utilizado (ARAÚJO, 2019). No entanto, a autora salienta que é importante levar em consideração que, os períodos de 8 e 12 h não são tão práticos para a realização do teste como o de 24 h, considerando-se os horários mais adequados para a realização das leituras. Este período tem sido recomendado para a maioria das sementes de Fabaceae como ervilha (MACHADO et al., 2011), feijão-mungo (SILVA et al., 2014), *Vigna unguiculata* (MOURA et al., 2017), soja (VIEIRA e MARCOS-FILHO, 2020) e grão-de-bico (ARAÚJO, 2019). Em sementes de soja, períodos de embebição mais curtos (4 e 8 h) permitiram a identificação de

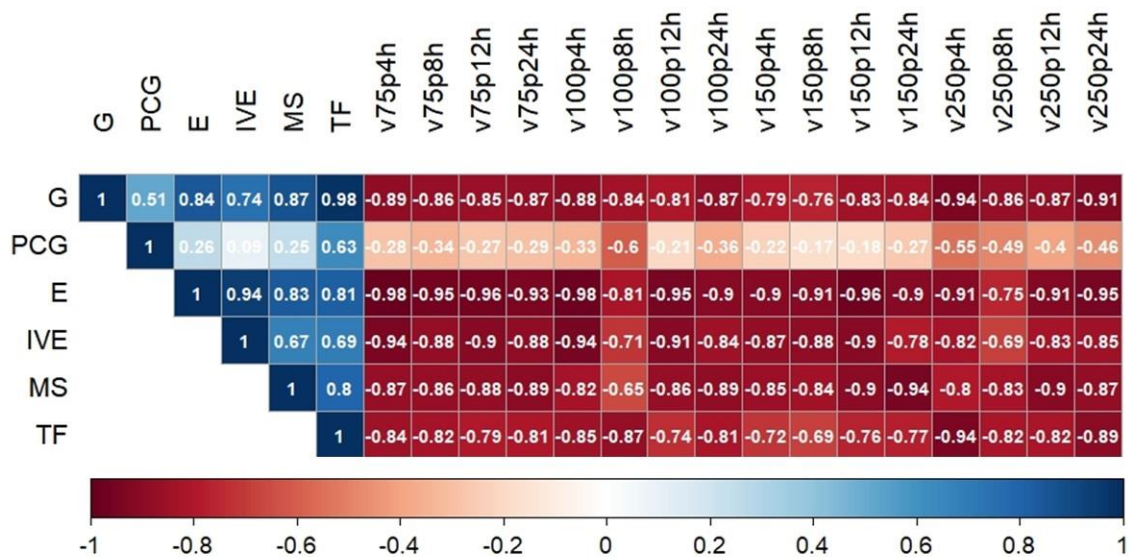
diferenças mais acentuadas de vigor entre os lotes, enquanto avaliações realizadas a partir de 16 h mostraram-se mais sensíveis às variações de vigor das sementes (DIAS; MARCOS-FILHO, 1996). Em sementes de feijão-mungo (*Vigna radiata*), o teste de condutividade elétrica permitiu a separação dos lotes quanto ao vigor a partir de 3 h de embebição (ARAÚJO et al., 2011), mostrando-se adequado para a avaliação do potencial fisiológico destas sementes utilizando-se 50 sementes em 75 mL de água.

Vale a pena ressaltar que para o volume de 75 mL, houve distinção dos lotes em relação aos diferentes níveis de vigor, destacando-se o lote 3 com os maiores valores em todas os períodos de avaliação, diferença está também visível com 100 mL (Figura 7). No entanto, nos volumes de 150 e principalmente no de 250 mL essa separação não aparece de forma tão nítida, o que reforça os comentários feitos acima para os dados da Tabela 4 referentes a estes períodos. Contin (2018) avaliou o teste de condutividade elétrica para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de lentilha e também constatou que o volume de 75 mL foi o mais eficiente para a separação dos lotes em diferentes níveis de vigor. Para sementes de ervilha, este volume também foi o mais adequado para a avaliação do vigor das sementes desde as primeiras horas de embebição (8 e 16 h), até 24 h (MACHADO et al., 2011).



**Figura 7.** Condutividade elétrica de sete lotes de sementes de lentilha, cv. Silvina, após embebição por 4, 8, 12 e 24 h em 75, 100, 150 e 250 mL de água.

É possível observar correlações negativas entre os resultados dos testes de qualidade inicial e os de condutividade elétrica nos diferentes procedimentos testados. É importante ressaltar que, as correlações negativas indicam que quanto maior a quantidade de lixiviados liberados pelas sementes menor o vigor. De modo geral, a análise de correlação confirma os resultados obtidos com os testes de comparação de médias (Tabela 4), onde na maioria dos tratamentos de condutividade elétrica houve distinção entre o potencial fisiológico dos lotes, com algumas variações entre eles quanto à sensibilidade. Conforme observado na Tabela 4, para o volume de 75 mL desde as primeiras horas de embebição (4, 8 e 12 h) estendendo-se até 24 h, houve separação eficiente dos lotes quanto ao vigor, que pode ser confirmada pelas altas correlações obtidas (Figura 8).



**Figura 8.** Coeficientes de correlação linear de Pearson ® estimados entre as variáveis de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS), teste de frio (TF) e os diferentes procedimentos do teste de condutividade elétrica realizados em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina.

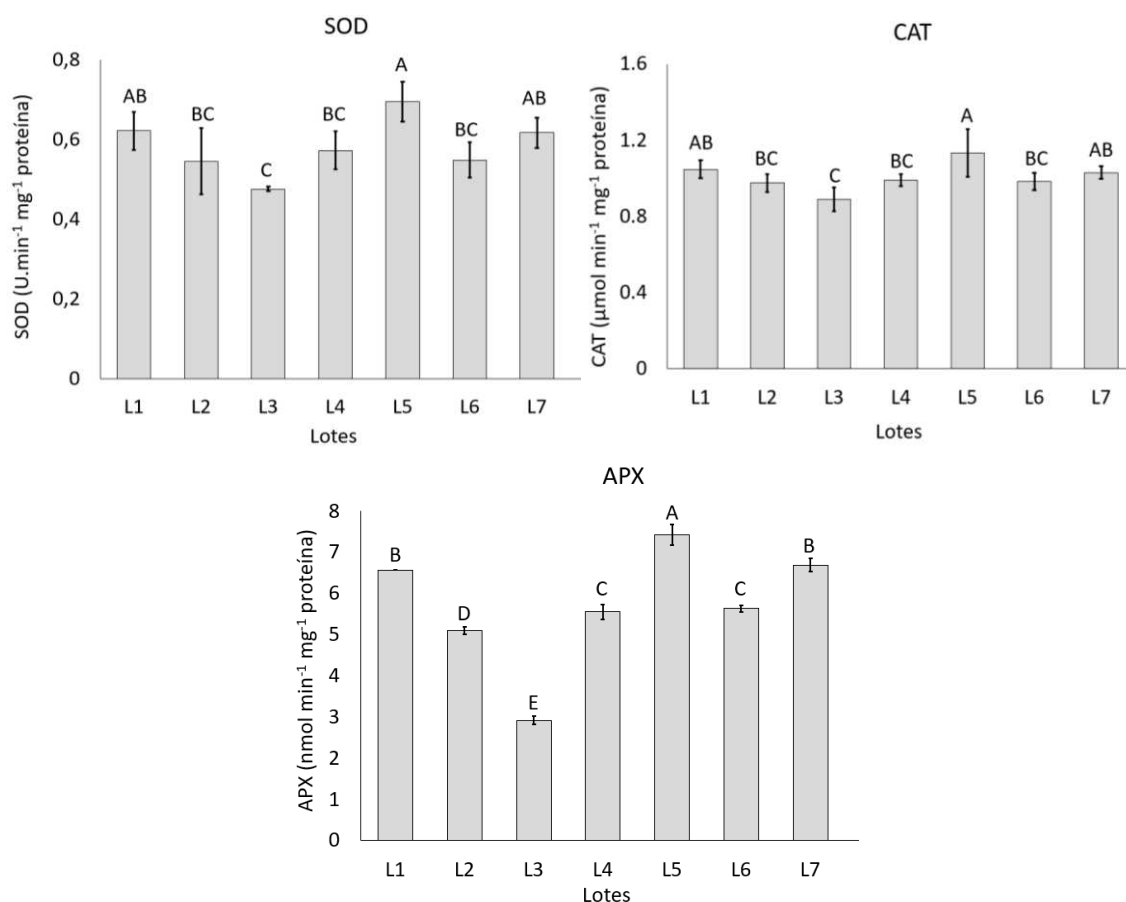
Os resultados obtidos confirmam a eficiência do teste de condutividade elétrica na separação dos diferentes lotes de sementes de lentilha quanto ao potencial fisiológico. Este teste é indicado para sementes da família Fabaceae como ervilha (FERREIRA et al., 2017), grão-de-bico (ARAÚJO, 2019), soja (PRADO et al., 2019; FESSEL et al., 2010; VIEIRA et al., 2002; DIAS; MARCOS-FILHO, 1996), feijão-mungo (SILVA et al., 2014), e diferentes variedades *Vigna unguiculata* (MOURA et al., 2017).

#### 4.4. Ensaio III - Determinação de atividade de enzimas antioxidantes e sua relação com o potencial fisiológico de sementes

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram semelhantes, permitindo observar maior atividade nas sementes do lote 5, que não diferiram significativamente das do lote 1 e menor atividade nas sementes do lote 3 quando comparadas a dos lotes 5 e 1. O lote 3 foi estatisticamente semelhante aos lotes 2, 4 e 6, que por sua vez não diferiram do lote 1 (Figura 9).

As diferenças entre a atividade da peróxidase do ascorbato (APX) nas sementes dos diferentes lotes foram ainda mais nítidas, com maior atividade para o lote 5, seguido dos lotes 1 e 7 que foram superiores aos lotes 4 e 6, seguidos pelo lote 2, destacando-se o lote 3 com menor atividade (Figura 9).

Estes resultados referentes à atividade enzimática estão coerentes com aqueles obtidos na maioria dos testes utilizados para a caracterização da qualidade fisiológica inicial dos lotes (Tabela 1), onde os lotes 5 e 1 foram, de modo geral, superiores ao lote 3. Pode-se observar ainda que, a maior estratificação dos lotes quanto à atividade enzimática foi obtida com a determinação da APX.



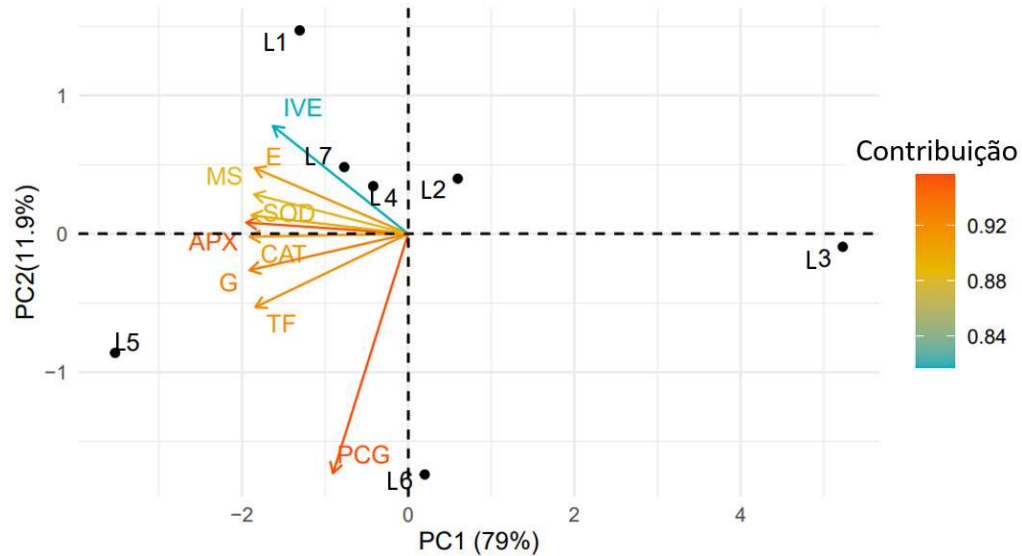
**Figura 9.** Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e peroxidase do ascorbato (APX) em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão.

A atividade de enzimas antioxidantes pode ser ferramenta interessante para ser correlacionada com resultados dos testes de vigor, uma vez que pode se constituir em um indicativo do nível de deterioração dos lotes. Araújo et al. (2021b) verificaram que a atividade da CAT e APX foi relacionada aos resultados de vigor obtidos nos testes de avaliação do potencial fisiológico das sementes de grão-de-bico. A determinação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX foi eficiente para diferenciar lotes com pequenas diferenças de vigor em sementes de feijão *Vigna unguiculata* (DEUNER et al., 2011), soja (BANDEIRA et al., 2014) e milho (BORBA et al., 2014; MARINI et al., 2013). Em sementes de soja, Bandeira et al. (2014) verificaram que a atividade da SOD, CAT e APX foi mais sensível do que os testes de germinação, primeira contagem e crescimento de plântulas para a diferenciação do potencial fisiológico de lotes. Para Araújo et al. (2018), a redução da atividade da CAT foi relacionada à perda da qualidade das sementes de pimenta *Capsicum chinense* e *Capsicum frutescens* L.

Contudo, é importante ressaltar que embora alguns autores tenham afirmado que atividade das enzimas antioxidantes mostrou-se eficiente para diferenciar lotes quanto ao vigor, os resultados referentes a tais enzimas devem ser interpretados com cuidado quando se refere à sua utilização isolada para a avaliação do vigor. Considera-se mais adequado relacionar a atividade destas enzimas aos resultados de testes específicos para avaliação do vigor, como informação complementar e não como um método de avaliação do potencial fisiológico. A maior atividade de enzimas antioxidantes nas sementes de determinado lote é um indicativo de menor deterioração e, conseqüentemente, menor vigor (MORAIS et al., 2021).

Portanto, pode-se supor que o balanço entre a produção e a remoção intracelular de EROs, especialmente de peróxido de hidrogênio, está diretamente relacionado à capacidade das células de manterem alta atividade da SOD, CAT e APX. A atuação eficiente do sistema de defesa antioxidante é importante para manter a homeostase celular, evitando o dano oxidativo (KUMAR et al., 2015) e pode estar diretamente relacionada ao potencial fisiológico das sementes (GOMES; GARCIA, 2013).

A partir da análise de componentes principais (PCA) é possível notar pelos scores negativos do componente 1 (PC1), que o lote 5 está diretamente relacionado com as variáveis de maior vigor da caracterização inicial dos lotes e da atividade enzimática, seguidos dos lotes 1, 7 e 4. Entretanto, o lote 3 encontra-se no sentido oposto ao das variáveis que apresentaram relação com o vigor das sementes, situadas nos scores positivos do componente 1, destacando-se, como o lote de menor vigor. Já os lotes 2 e 6 apresentaram desempenho intermediário entre os scores positivos e negativos da PCA (Figura 10).



**Figura 10.** Análise de componentes principais (PCA) das variáveis germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca de plântula (MS), teste de frio (TF) e a atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX) e superóxido dismutase (SOD) realizados em sementes de sete lotes de lentilha, cv. Silvina.

#### 4.5. Ensaio IV – Análise computadorizada de plântulas pelos softwares SAPL® e ILASTIK para avaliação do potencial fisiológico das sementes

##### 4.5.1. Análise de plântulas pelo software SAPL®

Os resultados da análise computadorizada de plântulas pelo software SAPL® possibilitaram observar diferença significativa no comprimento da parte aérea (CPA) das plântulas dos diferentes lotes a partir do terceiro dia de germinação, sendo o lote 5 com melhor desempenho e o lote 3 com o menor crescimento da parte aérea, ficando os lotes 1, 2, 4, 6 e 7 com valores intermediários. No entanto, observa-se que no quarto, quinto e décimo dia de germinação, houve separação ainda maior dos lotes quanto ao comprimento da parte aérea, mantendo-se destaque para os lotes 5 e 3 como os de maior e menor CPA, respectivamente, conforme já havia sido observado também na avaliação feita no terceiro dia, mas sendo possível detectar diferenças entre os demais lotes (1, 2, 4, 6 e 7), que no terceiro dia não haviam diferido entre si. Dessa forma, de maneira geral, observa-se no quarto dia de germinação que os lotes 1, 2 e 7 não diferiram entre si e foram superiores aos lotes 4 e 6; já aos 5 dias, os lotes 1 e 7 foram superiores ao lote 2. É importante observar que no décimo dia também foi possível classificar todos os lotes em níveis distintos de vigor, mas considerando-se o tempo necessário para a obtenção dos resultados ser maior, as avaliações feitas com 4 e 5 dias são mais

interessantes por possibilitarem a obtenção de informações mais rápidas quanto ao potencial fisiológico das sementes (Tabela 5).

Para o comprimento radicular (CR), pode-se observar que apenas o lote 5 foi superior aos demais que não diferiram entre si no terceiro dia de germinação. No quarto dia, foi possível observar o melhor desempenho para o lote 5 e o pior desempenho para o lote 3; contudo, não foi possível diferenciar os demais lotes quanto ao CR, o que só ocorreu aos 5 e 10 dias de germinação. No quinto dia, observa-se separação mais detalhada dos lotes 1, 2, 4, 6 e 7 quanto ao CR, semelhante à obtida para o CPA, com os lotes 4 e 6 mostrando-se inferiores aos lotes 1, 2 e 7. Para estes lotes, no décimo dia observam-se diferenças mais expressivas no crescimento radicular, com menores valores para os lotes 2, 4 e 6, seguidos pelo lote 1 sendo este inferior ao lote 7 (Tabela 5).

Em relação ao comprimento total das plântulas (CTP), é possível observar diferenças significativas entre os diferentes lotes ao terceiro dia, semelhante ao observado para o CR, obtendo-se três classes, ou seja, maior CT para o lote 5 e menor para o lote 3, ficando os demais lotes em posição intermediária (Tabela 5). No quarto, quinto e décimo dia de germinação, os resultados foram semelhantes, destacando-se o lote 5 com melhor desempenho, seguido pelos lotes 1 e 7, com pior desempenho para o lote 3, ficando os lotes 2, 4 e 6 com desempenhos intermediários. Considerando que a rapidez na obtenção de resultados dos testes de vigor é o aspecto relevante para a tomada de decisão quanto ao manejo e destino dos lotes, recomenda-se a realização das avaliações de CPA, CR e CT aos 4 dias após a semeadura, uma vez que permitiram a classificação dos lotes em diferentes níveis de potencial fisiológico.

A eficiência do SAPL® na classificação de lotes de soja (MEDEIROS; PEREIRA, 2018) e grão-de-bico (ARAÚJO et al., 2021a) quanto ao potencial fisiológico foi constatada quando a análise das plântulas foi realizada no quarto dia após a semeadura.

A aplicação do software SAPL® para análise computadorizada de plântulas baseada em dados de crescimento possibilitou classificar os diferentes lotes quanto ao potencial fisiológico, permitindo identificar com clareza os melhores e os piores lotes quanto à capacidade de transferir as reservas das sementes necessárias para o pleno desenvolvimento das plântulas (ARAÚJO et al., 2021a; FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016).

**Tabela 5.** Resultados médios de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento radicular (CR), comprimento total da plântula (CTP), índice de uniformidade (IU), índice de crescimento (IC) e índice de vigor (IV), obtidos pelo SAPL® aos três, quatro, cinco e dez dias após a semeadura de sete lotes de sementes de lentilha.

Lote	CPA	CR	CTP	IU	IC	IV
	(mm. plântula-1)				Índices	
3 dias						
1	4,73 b	9,1 b	13,83 b	430,96 b	620,66 b	517,09 ab
2	4,57 b	8,78 b	13,35 b	422,13 b	617,37 b	521,01 ab
3	3,59 c	8,09 b	11,67 c	385,66 c	537,41 c	448,69 c
4	4,61 b	8,29 b	12,90 b	420,52 b	613,92 b	554,79 ab
5	6,97 a	15,95 a	22,95 a	484,84 a	734,84 a	564,59 a
6	4,41 b	8,43 b	12,85 b	419,5 b	612,22 b	546,06 ab
7	4,63 b	8,59 b	13,22 b	424,61 b	620,54 b	531,89 ab
F	55,95*	141,87*	246,01*	46,29*	38,51*	33,52*
CV (%)	5,80	4,94	3,39	2,03	3,00	2,89
4 dias						
1	9,08 b	18,34 b	27,42 b	452,71 ab	643,71 b	541,07 ab
2	9,10 b	18,14 b	27,24 b	431,32 ab	635,38 b	529,65 b
3	7,2 d	12,77 c	19,97 d	403,84 c	574,45 c	460,70 c
4	8,86 c	17,37 b	26,25 bc	427,53 ab	630,39 b	548,17 ab
5	11,74 a	26,48 a	38,22 a	510,84 a	751,10 a	565,67 a
6	7,93 cd	17,24 b	25,18 c	421,81 ab	622,15 b	546,67 ab
7	9,01 b	18,1 b	27,11 b	441,07 ab	647,92 b	555,13 ab
F	42,10*	153,69*	143,82*	39,51*	26,47*	11,56*
CV (%)	4,84	3,58	3,33	2,47	3,22	5,07
5 dias						
1	15,14 b	25,73 b	40,87 b	529,81 ab	753,62 b	588,70 ab
2	14,41 c	25,24 b	39,65 bc	511,75 ab	720,79 b	572,96 b
3	12,89 d	16,23 d	29,12 d	456,04 b	614,07 c	496,05 c
4	14,27 c	24,43 c	38,70 bc	517,96 ab	724,40 b	583,87 ab
5	19,95 a	34,10 a	54,08 a	554,90 a	822,67 a	634,91 a
6	13,33 cd	24,11 c	37,44 c	511,95 ab	712,17 b	584,56 ab
7	14,94 b	25,06 b	40,00 b	534,39 ab	728,29 b	596,59 ab
F	57,32*	255,75*	186,94*	11,33*	53,55*	19,96*
CV (%)	4,12	2,60	2,70	3,54	2,33	3,51
10 dias						
1	55,33 bc	62,50 c	117,84 b	667,68 a	755,92 b	709,91 ab
2	57,38 b	58,83 d	116,21 bc	631,88 ab	738,54 b	705,47 ab
3	38,59 e	46,32 e	84,91 d	610,33 b	663,14 c	596,42 c
4	54,29 c	60,46 d	114,76 c	624,85 ab	731,82 b	698,69 b
5	61,95 a	66,77 a	128,72 a	678,62 a	845,36 a	717,46 a
6	54,04 c	60,27 d	114,31 c	618,61 b	729,33 b	692,06 b
7	48,25 d	64,34 b	117,34 b	628,93 ab	750,52 b	704,83 ab
F	247,53*	316,02*	739,96*	31,92*	19,95*	29,25*
CV (%)	1,80	1,24	0,87	1,43	3,23	2,53

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

Os resultados gerados pelo SAPL® para o índice de uniformidade (IU), índice de crescimento (IC) e índice de vigor (IV), no terceiro dia de germinação, foram semelhantes aos de CTP quanto à classificação do potencial fisiológico dos lotes. Nas avaliações realizadas no quarto e quinto, observa-se que pelo IU e IV o lote 5, que havia se destacado como superior aos demais não diferiu estatisticamente dos lotes classificados como intermediários no terceiro dia de germinação (Tabela 5). Araújo et al. (2021a) não obtiveram êxito na classificação de lotes de sementes de grão-de-bico quanto à qualidade fisiológica utilizando o IU, ao contrário do que foi constatado com as variáveis IC e IV. Já aos 10 dias de germinação, os resultados para IC e IV foram semelhantes permitindo a classificação dos lotes em três níveis de vigor.

Pereira et al. (2020) classificaram diferentes lotes de moringa (*Moringa oleífera*) quanto ao vigor a partir dos dados fornecidos pelo software SAPL®. Este software também se mostrou eficiente para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de feijão (MEDEIROS et al., 2019), arroz (CUADRADO, 2020) e crambe (RIBEIRO et al., 2021), fornecendo resultados correlacionados com os obtidos em outros testes de vigor.

Os resultados referentes ao IC e IV são fundamentais na estimativa do vigor e demonstraram maior sensibilidade para a caracterização dos lotes em relação à qualidade fisiológica das sementes de diversas espécies (PEREIRA et al., 2020; BENNET, 2002). Os índices gerados a partir das avaliações de crescimento de plântulas são importantes para aplicação em programas de controle de qualidade de sementes (SILVA et al., 2017).

O índice de uniformidade (IU) baseado no cálculo do coeficiente de uniformidade de Christiansen (CHRISTIANSEN, 1942) é um indicador importante a ser observado em relação à qualidade de sementes, uma vez que a desuniformidade na emergência de plântulas pode ocasionar atrasos no desenvolvimento e crescimento das plantas nos estágios fenológicos pós-emergência, gerando desuniformidade durante o florescimento e maturação afetando, conseqüentemente, o processo de colheita (MARCOS-FILHO, 2015a).

Pela Tabela 5, de modo geral, observa-se maior estratificação dos lotes quanto ao potencial fisiológico ao se avaliar o CTP aos 4, 5 e 10 dias após a semeadura. Tais dados apresentam semelhança com os resultados obtidos nos testes de caracterização fisiológica inicial (Tabela 1). Essa semelhança se dá principalmente para as variáveis de emergência, o que torna esses resultados importantes, uma vez que, a introdução de novas metodologias para a avaliação do vigor de forma mais rápida, sensível e eficiente são importantes para a tomada de decisão sobre o manejo dos lotes nas etapas de pós-colheita e comercialização. (MEDEIROS; PEREIRA, 2018; GOMES-JUNIOR et al., 2014).



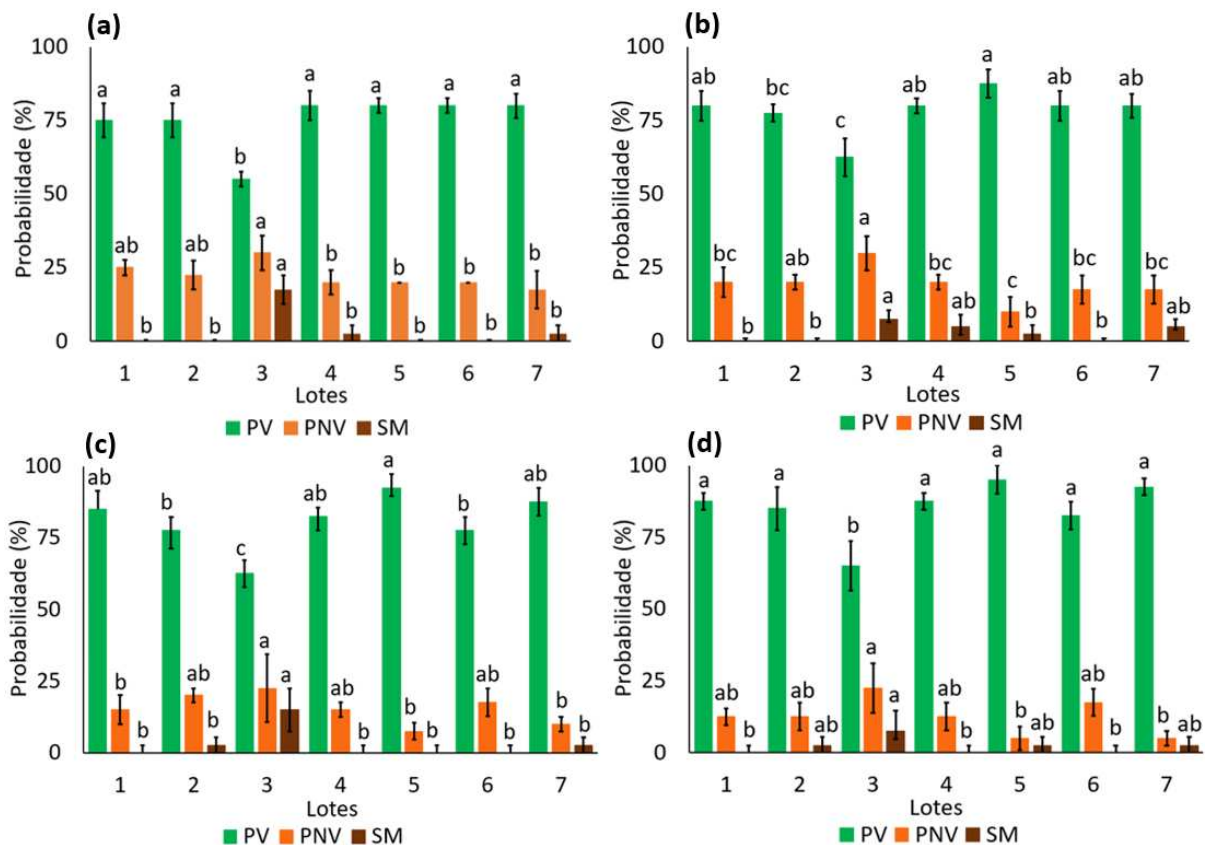
no quinto dia, indicando precisão de acertos quanto ao vigor das sementes. Dessa forma, o software ILASTIK permitiu classificar o lote 5 como o mais vigoroso baseando-se na maior probabilidade de gerar plântulas vigorosas e menor probabilidade de gerar plântulas não vigorosas e sementes mortas. Por outro lado, o lote 3 apresentou menor probabilidade de gerar plântulas vigorosas e maior probabilidade de gerar plântulas não vigorosas e sementes mortas, sendo indicado como o de menor vigor. De maneira geral, os lotes 1, 4 e 7 apresentaram vigor intermediário, seguidos dos lotes 2 e 6 (Figura 12).

Ao décimo dia, houve agrupamento dos lotes de alto e médio vigor que não diferiram entre si (lotes 1, 2, 4, 5, 6 e 7), o que pode ser atribuído ao maior tempo de germinação, dando chances para que plântulas menos desenvolvidas aos 4 e 5 dias, atingissem o padrão de crescimento das demais aos 10 dias. Assim, com 10 dias não foi possível obter informações relevantes sobre o desempenho inicial das sementes, principalmente velocidade de germinação e de crescimento das plântulas. Provavelmente, plântulas não vigorosas na fase inicial de germinação conseguiram alcançar padrão de desenvolvimento próximo ao das plântulas vigorosas após período maior de germinação. O menor vigor inicial das plântulas é característica relevante quando se considera o estabelecimento em campo, uma vez que plântulas menos vigorosas ou que se desenvolvem mais lentamente ficam mais predispostas às condições de estresse, caso ocorram, podendo comprometer o estande final. Entretanto, o ILASTIK permitiu identificar o lote 3 como o menos vigoroso e com maior probabilidade de gerar plântulas não vigorosas e sementes mortas quando comparado com os demais (Figura 12).

A aplicação de tecnologias por meio de softwares de código aberto como o ILASTIK, sinaliza outras soluções valiosas para os diversos ramos da pesquisa científica com bioimagens, atuando de forma flexível e com reprodutibilidade de resultados (DIETZ et al., 2020; BERG et al., 2019). O uso de análises de imagem vem gerando avanços científicos e tecnológicos cada vez mais significativos para a avaliação da qualidade de sementes. Medeiros et al. (2020) avaliaram a aplicação de aprendizagem de máquina com dados gerados pelo software ILASTIK para a classificação da qualidade fisiológica de sementes e plântulas de soja e concluíram que esta ferramenta é precisa, uma vez que permitiu identificar as sementes quanto aos danos e classificar as plântulas quanto ao vigor. Van Tol et al. (2018), testando softwares baseados em CellProfiler como o Ilastik e MeioSeed na contagem de sementes fluorescentes para análise de frequência cruzada em *Arabidopsis thaliana* e concluíram que ambos foram eficientes facilitando a triagem de novos moduladores abióticos e bióticos de frequência de cruzamento.

Cuadrado (2020) relatou que os softwares SAPL® e ILASTIK foram eficientes para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de arroz, apresentando resultados

correlacionados com os obtidos nos demais testes de vigor utilizados. Além disso, verificou que os modelos desenvolvidos mostraram alto desempenho na identificação de cultivares arroz, principalmente com uso das características de cor e textura das imagens, obtendo-se acurácia de 78% e 80% com os algoritmos PLS-DA e SVM-R, respectivamente. Esta alta precisão mostrou que os métodos de visão computacional com algoritmos de aprendizagem de máquina têm potencial para serem utilizados na identificação de sementes de cultivares de arroz.



**Figura 12.** Probabilidade dos lotes de sementes gerarem plântulas vigorosas (PV), plântulas não vigorosas (PNV) ou sementes mortas (SM) no 3° (a), 4° (b), 5° (c) e 10° dia (d) após a semeadura, de acordo com dados obtidos pelo software ILASTIK. As barras representam um intervalo de confiança de 95%

É importante ressaltar que os modelos desenvolvidos podem ser melhorados e treinados no software ILASTIK, podendo ser realizados por meio do aumento do número de imagens, aumento na quantidade de lotes e tratamentos. O software fornece todas as ferramentas necessárias como, por exemplo, recursos rápidos de classificadores, modelos probabilísticos e gráficos, que são acoplados em interface prática de manipulação pelos usuários para o treinamento interativo rápido, extraindo informações precisas a partir de bioimagens (BERG et al., 2019).

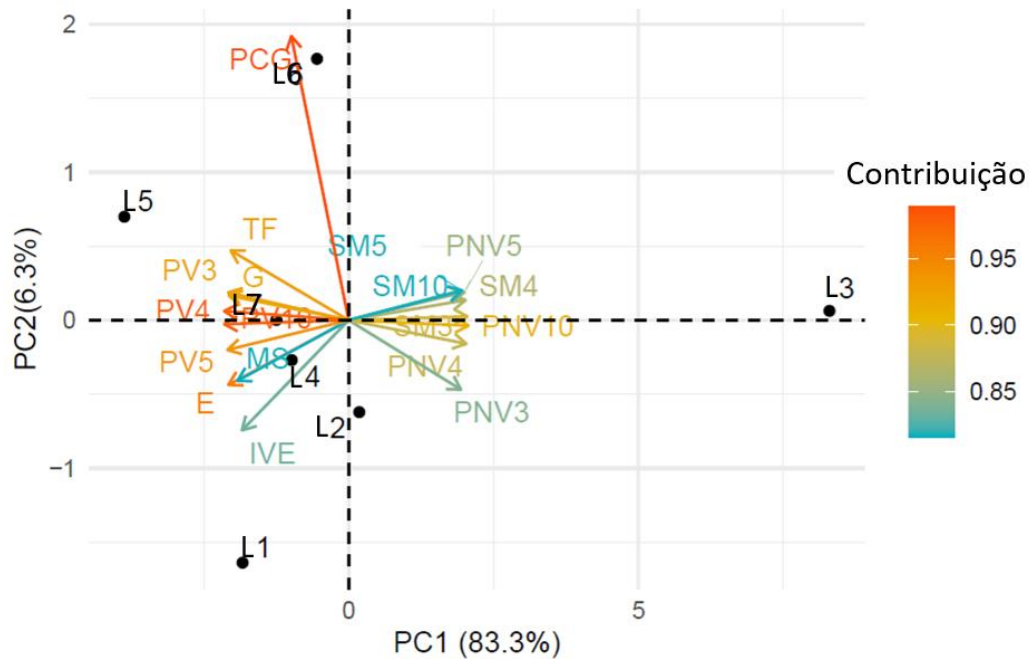
A aplicação de tecnologias com softwares de código aberto para realização de análises de imagem possibilita muitas perspectivas para o campo da pesquisa em qualidade de sementes, possibilitando a separação de lotes em diferentes níveis de vigor. O desenvolvimento de softwares de livre acesso como o SVIS, VIGOR-S, SAPL® e ImageJ possibilitam avaliar a qualidade de sementes por meio de análises de imagens, bem como dados de comprimento de plântulas e outros parâmetros, (MEDEIROS et al., 2020a). Neste contexto, o ILASTIK mostrou-se como sendo outra alternativa gratuita e eficiente, que embora ainda pouco testada para as diferentes espécies, foi adequada para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de lentilha.

A análise de componentes principais (PCA) explicou 89,6% da variabilidade dos dados, com todos os lotes concentrados nos scores negativos do componente 1 (PC1) relacionados com as variáveis que representam os melhores resultados de qualidade fisiológica e probabilidade de originarem plântulas vigorosas. Por outro lado, observa-se que o lote 3 está concentrado do lado oposto, ou seja, nos scores positivos do componente 1, que estão diretamente associados com as variáveis plântulas não vigorosas e sementes mortas. (Figura 13).

Assim, pode-se afirmar que os parâmetros obtidos por meio da classificação das imagens geradas por ambos os sistemas computadorizados, SAPL® e ILASTIK podem ser utilizados nos programas de controle de qualidade destas sementes para a classificação dos lotes quanto ao potencial fisiológico.

#### **4.6. Ensaio V - Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR e sua relação com o potencial fisiológico das sementes**

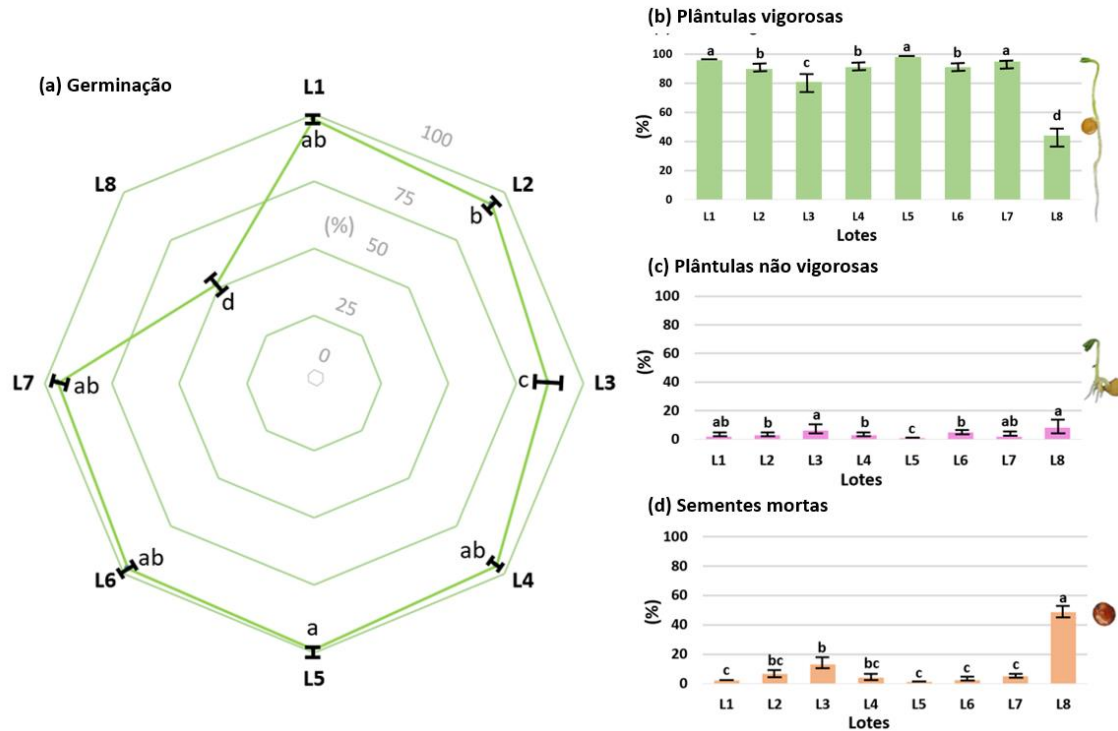
Os dados de germinação obtidos com as sementes submetidas à espectroscopia do FT-NIR mostram que houve diferença significativa entre os lotes de sementes de lentilha, uma vez que o lote 5, com 99% de germinação, foi superior aos lotes 2, 3 e 8, mas não diferiu significativamente dos lotes 1, 4, 6 e 7, sendo o lote 8 inferior a todos os demais com 52% de germinação (Figura 14a). Ao se avaliar a porcentagem de plântulas vigorosas (Figura 14b), observa-se que o lote 5 se destacou dos demais com melhor desempenho, apresentando as menores porcentagens de plântulas não vigorosas (Figura 14c) e de sementes mortas (Figura 14d), seguido pelos lotes 1 e 7, já os lotes, 2, 4 e 6, que foram superiores aos lotes 3 e 8, com pior desempenho para o lote 8 (52%). Neste lote observa-se alta proporção de sementes mortas (Figura 14d).



**Figura 13.** Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis de caracterização da qualidade inicial das sementes e dos dados gerados pelo software ILASTIK.

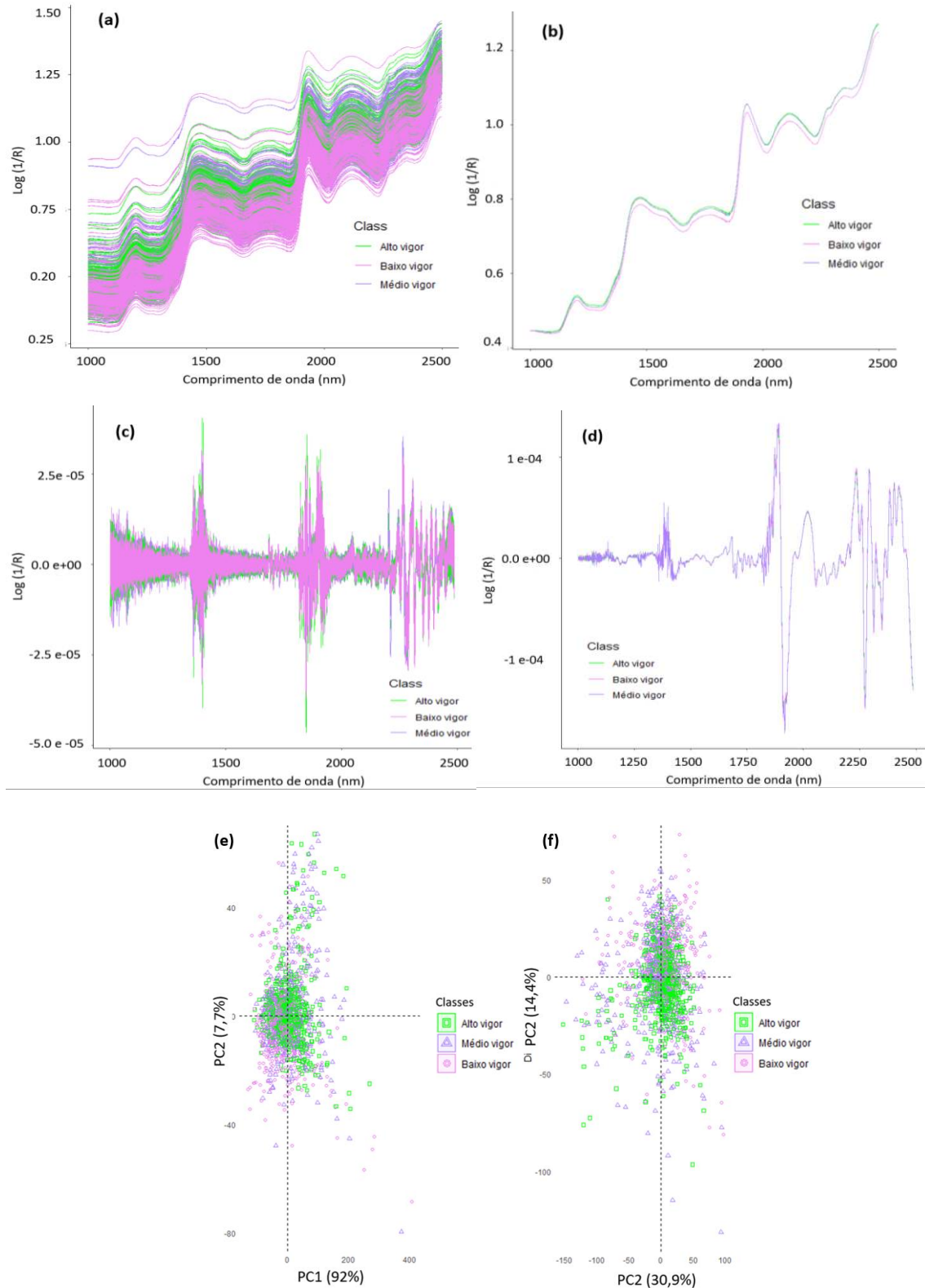
Alta germinação e vigor são características essenciais para assegurar o adequado estabelecimento de plântulas e, conseqüentemente, uniformidade de estande e das plantas em campo (FINCH-SAVAGE; BASSEL, 2016). O vigor compreende o conjunto de características que incluem uniformidade de germinação, desenvolvimento inicial das plântulas, rapidez na emergência sob diferentes condições de campo, potencial de armazenamento, dentre outras (ISTA, 2019). A classificação do vigor das plântulas é característica importante que pode ser obtida durante a condução do teste de germinação, sem a necessidade de condução de testes adicionais com metodologias mais complexas ou que demandam maior tempo para a obtenção dos resultados. Portanto, pode fornecer uma estimativa relativamente rápida do potencial fisiológico dos lotes (ZHANG et al., 2018). Neste contexto, tecnologias que permitam identificar sementes capazes de gerar plântulas vigorosas ou não, são de grande relevância para a avaliação rápida e segura do potencial fisiológico dos lotes, agilizando as tomadas de decisões sobre o destino dos lotes a serem comercializados.

Nesse estudo, foi realizada a caracterização inicial dos lotes em relação à germinação e ao vigor das plântulas para testar a eficiência da espectroscopia no infravermelho próximo FT-NIR na classificação dos lotes quanto ao potencial fisiológico das sementes, atuando como indicador de eficiência da aplicabilidade dos modelos testados.



**Figura 14.** Germinação de diferentes lotes sementes de lentilha (a) e percentagens de plântulas vigorosas (b), plântulas não vigorosas (c) e sementes mortas (d). Os valores médios com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o intervalo de confiança ao nível de 95% para as médias.

A Figura 15a ilustra os 1600 dados resultantes dos espectros após o pré-processamento dos lotes de sementes de lentilha e os espectros médios dos 8 lotes, respectivamente (Fig. 15a e 15b). É importante observar também o comportamento dos espectros com a primeira derivada do Savitzky-Golay (Fig. 15c) bem como a média dos espectros após a aplicação da primeira derivada do Savitzky-Golay (Fig. 15d). A análise de componentes principais (PCA) dos espectros pré-processados explicaram 99,7% das variações espectrais (Figura 15e), não sendo possível observar diferença entre os lotes conforme as pontuações que compreendem a análise de componentes principais. A PCA a partir da primeira derivada do Savitzky-Golay (Figura 15f) explica 45,3% das variações espectrais, não sendo possível observar distinção entre os lotes estudados.



**Figura 15.** Espectros FT-NIR de diferentes lotes de sementes de lentilha: Espectro pré-processado das classes de sementes (a), espectros médios pré-processados das classes de sementes (b), espectros das sementes transformadas pela derivada de primeira ordem do Savitzky-Golay (c) e a média das classes transformadas pela derivada de primeira ordem do Savitzky-Golay (d). Análise de componentes principais usando os dados FT-NIR de sementes de diferentes lotes de lentilha. Dados dos espectros pré-processados (e) e espectros transformados pela primeira derivada do Savitzky-Golay (f).

O processo de predição e classificação de sementes quanto ao vigor por meio da espectroscopia no infravermelho próximo possibilita um avanço tecnológico importante para o setor sementeiro, pois permite obter resultados de forma rápida, não-destrutiva e precisa sobre o potencial fisiológico de diferentes lotes de sementes. Trata-se, portanto, de um método interessante para utilização nos programas de controle de qualidade de sementes. Os resultados demonstraram que a análise de componentes principais dos espectros NIR não foram eficientes ao ponto de rastrear qualquer interferência nas diferentes classes de sementes quanto ao vigor. Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro et al. (2020) em sementes de grão-de-bico ao constatarem que as análises de componentes principais não foram sensíveis para a visualização de possíveis diferenças de qualidade fisiológica entre os lotes. Por outro lado, podem ser empregados outros tipos de transformações para a obtenção de respostas e informações mais precisas sobre essas classes.

Para classificar as sementes de lentilha dos diferentes lotes de acordo com o vigor, desenvolvemos e comparamos dois modelos baseados em PLS-DA. O primeiro modelo baseado nos dados espectrais pré-processados mais o escalonamento automático, resultou em 3112 preditores de bandas padronizadas dos espectros do infravermelho próximo, alcançando acurácia de 0,817, 0,858 e 0,829 para o treinamento, validação independente e validação cruzada, respectivamente. Os espectros pré-processados mais o escalonamento resultaram em taxa de acerto para as classes de sementes com alto vigor superior a 90%, e para as classes de sementes de médio e baixo vigor superior a 75%, tanto no treinamento como na validação (Tabela 6).

No segundo modelo, suavizamos os espectros a partir da derivada de primeira ordem pelo filtro Savitzky-Golay, com 3102 preditores. Esse modelo possibilitou os melhores resultados de acurácia para o treinamento (0,967), validação independente (0,933) e validação cruzada (0,957) quando comparado ao modelo dos dados pré-processados mais escalonamento. Nesse modelo, a classe de sementes de alto vigor resultou em taxa de acerto de quase 100%, e as classes de médio e baixo vigor acima de 90% para o treinamento e validação (Tabela 6).

A aplicação combinada realizada com análises multivariadas e tratamentos de pré-processamentos são fundamentais para otimização da acurácia e coeficientes kappa do modelo baseado nos espectros FT-NIR, uma vez que os espectros resultam em várias combinações de tons e sobretons ocasionando ruídos e mascarando resultados que ficam sobrepostos (WU et al., 2009). Portanto, a aplicação de técnicas de pré-processamento são fundamentais para a redução desses ruídos e eficiência na escolha do modelo, extraindo assim resultados de classificação eficientes e precisos (RIBEIRO et al., 2020; BAUM et al., 2012). Acurácias

superiores a 90% foram obtidas em estudos realizados com sementes de soja (AMANAH et al., 2020), feijão preto (YANG et al., 2015), trigo (FAN et al., 2020), uva (ZHAO et al., 2018) e milho (AMBROSE et al., 2016).

No presente estudo foram obtidos resultados importantes acerca da confiabilidade e precisão dos modelos testados baseados no coeficiente Kappa, uma vez que o primeiro modelo (pré-processamento mais escalonamento automático) resultou nos menores coeficientes para o treinamento (0,721), validação independente (0,782) e validação cruzada (0,739). No entanto, após a aplicação da derivada de primeira ordem mais o escalonamento (segundo modelo) observamos resultados ainda mais precisos sobre a aplicação da técnica, com coeficientes Kappa de 0,949, 0,897 e 0,934 para o treinamento, validação independente e validação cruzada, respectivamente. Foi possível confirmar o emprego do modelo de classificação de PLS-DA a partir da primeira derivada como o mais eficiente para a classificação do vigor de sementes de lentilha (Tabela 6). O Kappa é importante na determinação do modelo ideal de classificação, na qual esse índice indica a concordância e a confiabilidade do modelo (COHEN, 1968). Ribeiro et al. (2020) observaram que os modelos PLS-DA desenvolvidos usando dados de espectroscopia do FT-NIR foram eficientes para identificar diferenças na qualidade de sementes de grão-de-bico submetidas à aplicação de diferentes herbicidas em pré-colheita.

**Tabela 6.** Número de acertos individuais por classe e métricas obtidas com os modelos de classificação PLS-DA, usando os recursos FT-NIR em sementes de diferentes lotes de lentilha.

Classes	Pré-processamento + escalonamento automático			Derivada de primeira ordem + escalonamento automático		
	Conjunto de treinamento (n= 420, 420, 280)	Conjunto de validação (n= 180, 180, 120)	Validação o cruzada	Conjunto de treinamento (n= 420, 420, 280)	Conjunto de validação (n= 180, 180, 120)	Validação cruzada
	Acertos (Total)			Acertos (Total)		
Alto vigor	383 (420)	172 (180)	-	418 (420)	173 (180)	-
Médio vigor	314 (420)	143 (180)	-	400 (420)	163 (180)	-
Baixo vigor	218 (280)	95 (120)	-	262 (280)	110 (120)	-
Acurácia	0.817	0.858	0.829	0.967	0.933	0.957
Kappa	0.721	0.782	0.739	0.949	0.897	0.934
Sensibilidade	0.813	0.850	0.824	0.964	0.932	0.955
Especificidade	0.906	0.925	0.912	0.983	0.965	0.977

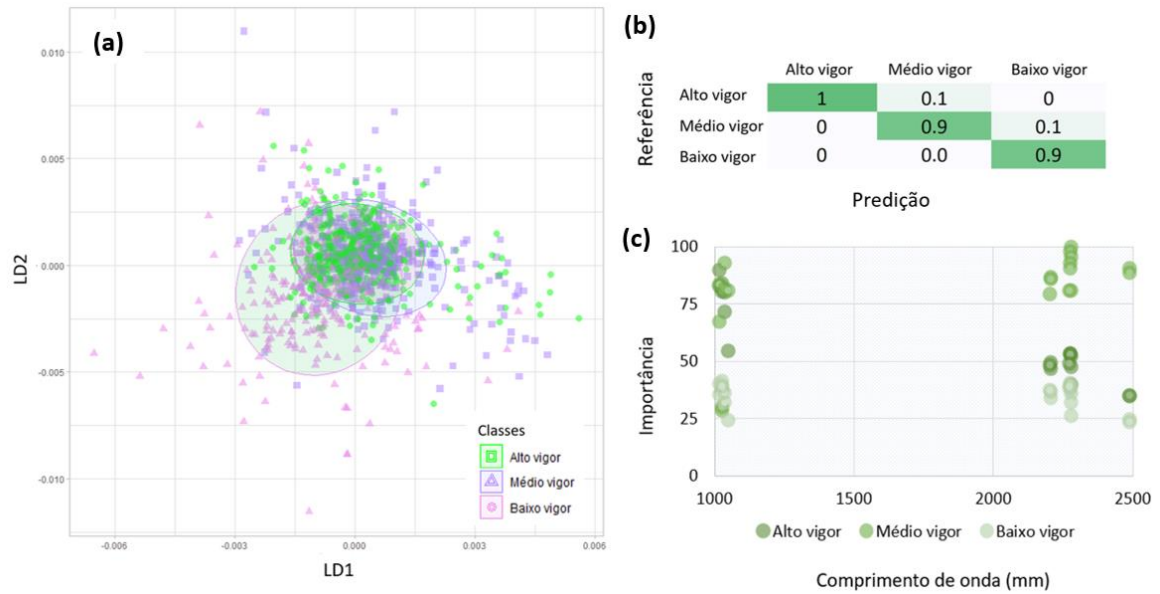
Os primeiros dois componentes da segunda função discriminante linear para os espectros FT-NIR desenvolvidos após a suavização da segunda derivada pelo filtro Savitzky-Golay explicaram 45,3% da variabilidade dos respectivos dados (Fig. 16a). A Figura 16b nos mostra a matriz de confusão em relação à eficiência e viabilidade dos modelos de classificação a partir de validação cruzada dos espectros FT-NIR por meio da primeira derivada Savitzky-Golay, ilustrando ótimas predições, principalmente para as classes de sementes de alto, médio

e baixo vigor. Vale ressaltar que na matriz de confusão cada linha da matriz representa as instâncias em classe real, e a coluna representa as instancias em classe prevista. Dentre os comprimentos de onda que mais contribuíram para o desenvolvimento do modelo de PLS-DA e classificação do vigor das sementes, destacam-se a faixa de 1000 nm, 2275 e 2500 nm (Fig. 16c)

Os picos de 1000 nm representam as ligações harmônicas dos grupos funcionais do terceiro sobretom N-H e segundo sobretom C-H e possuem relação com o teor de proteínas existentes nas sementes (MUKASA et al., 2019; AMBROSE et al., 2016). Em geral, sementes mais vigorosas possuem maiores quantidades de proteínas que aquelas menos vigorosas o que pode ter relação direta com a sua qualidade fisiológica (DELARMELINO-FERRARESI et al., 2014; HENNING et al., 2010; WILCOX e CAVINES, 1992). Ocorre que, durante o processo de deterioração das sementes há o decréscimo do conteúdo e da síntese de proteínas, como também ocorre desnaturação das mesmas, o que contribui para a redução do vigor dos lotes (MARCOS-FILHO, 2020). Trabalhos envolvendo a determinação do teor de proteínas para diferenciar lotes em diferentes classes de vigor e relacionados com os dados de emergência em campo foram publicados em sementes de feijão comum (EHRHARDT-BROCARD; COELHO, 2022), soja (HENNING et al., 2010) e arroz (BORTOLOTTI et al., 2008).

Já os picos de 2275 e 2500 nm resultaram em combinações de vibrações harmônicas dos grupos funcionais de O-H (ligação direta com o conteúdo de carboidratos), N-H (corresponde ao conteúdo de proteínas existente nas sementes) e C-H (alongamento de proteínas CH<sub>2</sub>) (AMBROSE et al., 2016; HE et al., 2019; BRITO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2020; ZHANG et al., 2018). Durante o desenvolvimento das sementes elas acumulam reservas ricas em carboidratos, incluindo açúcares, amido e celulose, essas reservas são acumuladas nos estádios médios e tardios da maturação, sendo importantes durante a nutrição do embrião no processo germinativo das sementes, vigor e crescimento das plântulas, assim como as proteínas (ERBAŞ et al., 2016). Logo, sementes ricas em reservas como proteínas e carboidratos apresentam maior potencial fisiológico e melhor desempenho durante o estabelecimento no campo (GU et al., 2016). Estudos sobre a eficiência da espectroscopia no infravermelho próximo FT-NIR mostraram-se eficientes para avaliar a relação de carboidratos e proteínas na distinção de sementes viáveis e não viáveis de milho super doce (QIU et al., 2018).

Com isso, evidencia que os espectros FT-NIR são eficientes para detectar diferenças em compostos químicos presentes nas sementes de lentilha, sendo uma alternativa para classificação de lotes de sementes viáveis ou não.



**Figura 16.** Gráfico de pontuação da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com os dois primeiros componentes discriminantes de sementes de lentilha com base nos espectros FT-NIR transformados pela primeira derivada Savitzky-Golay, as elipses mostram intervalos de confiança de 95% em cada classe de sementes (a), matriz de confusão das diferentes classes (b), boxplot dos 20 espectros que mais contribuíram para o desenvolvimento do modelo (c).

Os resultados do presente estudo apontam a série de aplicações práticas dessa metodologia, podendo ser inseridos em laboratórios de análise de sementes, organizações de pesquisa científica e programas de controle de qualidade. As análises para aferição da qualidade fisiológica e vigor de sementes são fundamentais para o desenvolvimento da agricultura moderna, uma vez que tais métodos possibilitam resultados rápidos e precisos para a classificação de sementes quanto ao vigor.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que os testes de envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, as análises da atividade de enzimas antioxidantes e a análise computadorizada de plântulas pelo software SAPL® e ILASTIK permitiram detectar diferenças na qualidade fisiológica dos diferentes lotes de sementes de lentilha.

O teste de envelhecimento acelerado tradicional (100% UR) permitiu a separação dos lotes em diferentes níveis de vigor e apresentou relação mais estreita com os demais testes da caracterização do potencial fisiológico inicial. Observou-se classificação mais eficiente dos lotes quanto ao vigor a partir de 36 h, mas principalmente nos períodos de 48 e 72 h a separação dos lotes foi mais nítida (Tabela 3, Figura 4). Contudo, vale destacar novamente que com 72 h os valores obtidos para os lotes de pior desempenho demonstraram deterioração mais acentuada das sementes, resultando em valores mais baixos de germinação após envelhecimento em relação ao período de 48 h. Os períodos de 36 e 48 h pelo método tradicional permitiram obter resultados similares aos obtidos nos testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio e massa seca de plântulas (Tabela 1). Contudo, o período de 48 h pode ser considerado mais adequado para a condução do teste, devido à praticidade para a sua realização considerando o horário comercial.

É importante ressaltar que, no teste de envelhecimento acelerado pelo método alternativo com solução salina saturada (76% UR) obteve classificação dos lotes menos eficiente do que a observada pelo método tradicional, principalmente porque não houve distinção muito nítida entre os lotes de melhor desempenho como ocorreu pelo método tradicional (Tabela 3, Figura 4).

No teste de condutividade elétrica (Tabela 4 e Figura 7), a utilização dos volumes de 75 e 100 mL permitiram a separação dos lotes quanto ao potencial fisiológico correspondente à separação obtida nos demais testes de avaliação da qualidade fisiológica (Tabela 1). Já com 4 h de embebição há a possibilidade de se identificar lotes de sementes de lentilha de baixo vigor. Contudo, a classificação mais eficiente dos lotes, principalmente com relação aos de melhor desempenho, diferenças significativas foram observadas com 24 h. Quando foram utilizados 150 e 250 mL de água, a identificação do lote de pior desempenho só ocorreu nos tempos de 12 e 24 h. Com relação aos lotes de maior vigor, nas combinações de 150 mL por 24 h e 250 mL por 24 h, a diferenciação foi mais nítida. Contudo, conforme ilustrado na Figura 7, nestes volumes a separação entre os lotes não aparece de forma tão nítida como observado

principalmente para o volume de 75 mL. É importante considerar que diferenças mais nítidas entre os valores absolutos de condutividade elétrica são mais perceptíveis pelos analistas de sementes em laboratórios de rotina, onde nem sempre as comparações são realizadas utilizando-se análises estatísticas. No caso do teste de condutividade elétrica, os valores absolutos obtidos com 75 mL por 24 h variaram entre 128,97 e 89,04  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  enquanto com a combinação 250 mL por 24 h a variação foi de 40,90 a 30,75 entre os sete lotes (Tabela 4).

As atividades das enzimas CAT, SOD e APX (Figura 9) foram relacionadas aos resultados obtidos nos testes de vigor tanto aqueles utilizados para a caracterização inicial dos lotes (Tabela 1) quanto envelhecimento acelerado (Tabela 3), condutividade elétrica (Tabela 4) e crescimento de plântulas (Tabela 5 e Figura 12). Portanto, a determinação da atividade de enzimas antioxidantes, que fornece informações sobre o nível de deterioração das sementes, pode ser uma ferramenta interessante para ser relacionada aos resultados dos testes de avaliação do potencial fisiológico, podendo ser considerada uma informação complementar relevante.

A análise computadorizada de plântulas baseadas no processamento de imagens pelo software SAPL® mostrou-se eficiente na classificação dos lotes quanto ao vigor já com quatro dias de germinação para todas as variáveis de crescimento extraídas pelo software (comprimento da parte aérea, da raiz, comprimento total, índice de uniformidade, crescimento e vigor). Com 5 e 10 dias também foi possível constatar diferenças detalhadas quanto aos parâmetros de crescimento de plântulas analisados, exceto para a variável índice de uniformidade. Considerando a tempo necessário para a obtenção de resultados, quanto mais rápido for possível ter acesso às informações sobre o desempenho das sementes mais interessante para as tomadas de decisão sobre o manejo dos lotes.

Também a análise computadorizada de plântulas baseadas no processamento de imagens e aprendizagem interativa de máquina pelo software ILASTIK possibilitaram classificar os lotes quanto ao potencial fisiológico a partir do quarto dia após a semeadura estendendo-se até o quinto dia. Foi possível observar também que, no terceiro e décimo dia, foi possível apenas identificar o lote de pior desempenho.

Por sua vez, a análise de espectroscopia do infravermelho próximo (FT-NIR), foi eficiente na predição do potencial fisiológico das sementes de lentilha, resultando em dados confiáveis e com alta acurácia. O primeiro modelo testado com os dados pré-processados mais o escalonamento automático resultou em 85% de acurácia, com taxa de acerto para a classe de sementes de alto vigor superior a 90%, e superior a 75% para as classes de médio e baixo vigor, tanto no treinamento como na validação. No entanto, o segundo modelo testado, que se baseou na derivada de primeira ordem pelo filtro Savitzky-Golay, pode-se comprovar maior eficácia

do FT-NIR, com acurácia de 97% e taxa de acerto para sementes de alto vigor de quase 100%; já a taxa de acerto para as classes de médio e baixo vigor foram superiores a 90%, tanto para o treinamento como para a validação. Ainda com base nos espectros NIR, é importante ressaltar que os comprimentos de onda que mais contribuíram para o desenvolvimento do modelo de PLS-DA e posterior classificação do vigor das diferentes classes de sementes, concentravam-se na faixa de 1000, 2275 e 2500 nm, faixas espectrais estas que têm relação direta com o teor de proteínas das sementes de lentilha, baseados nos princípios quimiométricos das ligações dos grupos funcionais.

Os resultados encontrados nesse estudo apontam diferentes metodologias eficientes para a avaliação do potencial fisiológico das sementes de lentilha que podem ser utilizadas em laboratórios de análise de sementes, organizações de pesquisa científica e programas de controle de qualidade. Testes para aferição da qualidade fisiológica e vigor de sementes são fundamentais para o desenvolvimento da agricultura moderna, principalmente quando possibilitam obter resultados rápidos e precisos para a classificação dos lotes quanto ao vigor. Neste contexto, destacam-se o teste de condutividade elétrica e a análise computadorizada de plântulas pelo SAPL e ILASTIK.

Destaca-se ainda o aprimoramento de metodologias rápidas e não destrutivas, como a espectroscopia do infravermelho próximo (FT-NIR) que permitiu identificar com maior agilidade e precisão diferenças no potencial fisiológico de lotes de sementes, características estas essenciais para agilizar as tomadas de decisões relacionadas ao controle de qualidade de sementes.

## 6. CONCLUSÕES

O teste de envelhecimento acelerado utilizando-se o método tradicional (100% UR) a 41°C por 48 h é eficiente para a avaliação do vigor de sementes de lentilha.

O teste de condutividade elétrica conduzido com 50 sementes imersas em 75 mL de água, a 25 °C, por 24 h permite a separação dos lotes em níveis de vigor.

A atividade das enzimas CAT, SOD e APX pode ser relacionada ao potencial fisiológico das sementes de lentilha.

O comprimento total das plântulas, da raiz primária e da parte aérea e os índices de vigor determinados aos 4 dias de germinação pelo SAPL<sup>®</sup> permitem classificar os lotes quanto ao vigor.

Os dados obtidos pelo ILASTIK aos 4 dias de germinação, utilizados nos estudos de aprendizagem de máquina, permitem o desenvolvimento de modelos com alta acurácia para avaliação do vigor das sementes.

Os dados obtidos pelo NIR combinados com os modelos PLS-DA indicam que esta técnica é sensível para estimar, de maneira rápida e não destrutiva, o potencial fisiológico dos lotes de lentilha com cerca de 100% de acurácia, principalmente quando submetidos à primeira derivada pelo filtro Savitzky-Golay.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, H. F.; MESQUISA, C. M. S.; SARMENTO, E. C. S.; MELO, R. S.; LIMA, K. A. P.; SILVA, A. K. F. Análise de imagens de sementes e plântulas de *Vigna radiata* L. **Revista Ciência Agronômica**, v.53, e20207303, 2022.

ALVARENGA, R.O.; MARCOS-FILHO, J.; TIMÓTEO, T.S. Assessment of the physiological potential of super sweet corn seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v.35, n.3, p.340-346, 2013.

AMANA, H. Z.; JOSHI, R.; MASITHOH, R. E.; CHOUNG, M-G.; KIM, K. H.; CHO, B. K. Nondestructive measurement of anthocyanin in intact soybean seed using Fourier Transform Near-Infrared (FT-NIR) and Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy. **Infrared Physics & Technology**, v. 111, e103477, 2020.

AMBROSE, A.; KANDPAL, L. M.; KIM, M. S.; LEE, W. H.; CHO, B. K. High speed measurement of corn seed viability using hyperspectral imaging. **Infrared Physics & Technology**, v.75, p.173–179, 2016.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K., STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.

ANDRADE, G. C., MEDEIROS COELHO, C. M.; UARROTA, V. G. Modelling the vigour of maize seeds submitted to artificial accelerated ageing based on ATR-FTIR data and chemometric tools (PCA, HCA and PLS-DA). **Heliyon**, v.6, n.2, e03477, 2020.

ANTUNES-NETO, A.; MATIAS, F. I.; PASSOS, A. M. A.; ROCHA, N. M. Determinação de sementes de soja esverdeadas por meio de análise de imagens. **Boletim técnico** (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 212). 21p, 2020. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1126547>> Acesso em: 28 janeiro 2022.

ARAÚJO, F. S.; FÉLIX, F. C.; FERRARI, C.; S.; BRUNO, R. L., A.; PACHECO, M. V. Adequação do teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de sementes de leucena. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.12, n.1, p.92-97, 2017.

ARAÚJO, J. O. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de grão-de-bico (*cicer arietinum* L.): testes de vigor e atividade de enzimas antioxidantes. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

ARAÚJO, J. O.; DIAS, D. C. F. S.; MEDEIROS, A. D.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, W. M. Chickpea seed vigor evaluated by computerized seedling analysis. **Semina: Ciências Agrárias**, v.42, n.1, p.71-86, 2021 (a).

ARAÚJO, J. O.; DIAS, D. C. F. S.; NASCIMENTO, W. M.; MARTINS, A. O.; LIMÃO, M. A. R. Accelerated aging test and antioxidant enzyme activity to assess chickpea seed vigor. **Journal of Seed Science**, v.43, e202143038, 2021 (b).

ARAÚJO, R. F.; ABUD, H. F.; SILVA, L. J.; ARAÚJO, E. F.; PINTO, C. M. F.; SILVA, F. W. S. Physiological changes and antioxidant enzymes activity in Biquinho and Malagueta pepper seeds during the maturation process. **Revista Ceres**, v.65, n.06, p.534-545. 2018.

ARAÚJO, R. F.; ZONTA, J. B.; FONTES, E. Teste de condutividade elétrica para sementes de feijão-mungo-verde. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1 p.123 - 130, 2011.

BAALBAKI, R.; ELIAS, S.; MARCOS-FILHO, J.; McDONALD, M.B. **Seed vigor testing handbook**. Ithaca, NY: AOSA, 2009. 345p. (Contribution 32).

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v.14, n.2, p.93-107, 2004.

BANDEIRA, J. M.; MARINI, P.; BORBA, I. C. G.; MARTINS, A. B. N.; AMARANTE, L.; MORAES, D.M. Antioxidative metabolism: a tool to detect small differences in the vigor of soybean seeds. **Iheringia**, v.69, n.2, p.285-292, 2014.

BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; GOMES-JUNIOR, F. G.; VIEIRA, R. D. Image analysis and peanut seeds performance during the production process. **Científica**, v.44, n.3, p.412- 420, 2016.

BAUM, A.; AGGER, J.; MEYER, A. S.; EGOBO, M.; MIKKELSEN, J. D. Rapid near infrared spectroscopy for prediction if enzymatic hydrolysis of corn bran after various pre-treatments. **New Biotechnology**, v.29, p.293-301, 2012.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.

BENNETT, M. A. Saturated salt accelerated aging (SSAA) and other vigor tests for vegetable seeds. In: INTERNATIONAL SEED SEMINAR, 2002. **Proceedings**, p.188-193, 2002.

BERG, S.; KUTRA, D.; KROEGER, T.; STRAELE, B. X.; KAUSLER, B. X.; HAUBOLD, C.; SCHIEGG, M.; ALES, J.; RUDY, M.; EREN, K.; CERVANTES, J. I.; XU, B.; BEUTTENMUELLER, F.; WOLNY, A.; ZHANG, C.; KOETHE, U.; HAMPRECHT, F. A.; KRESHUK, A. Ilastik: Interactive machine learning for (bio)image analysis. **Nature Methods**, v.16, p1226–1232, 2019.

BERTOLIN, D.C.; SÁ, M.E.; MOREIRA, E.R.; Parâmetros do teste de envelhecimento acelerado para determinação do vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.35, n.1, p.104-112, 2011.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. New York, **Plenum Press**. 445p. 1994.

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

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

BORTOLOTTI, R. P.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; MATTIONI, N. M. Teor de proteína e qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Bragantia**, v.67, n.2, p.513-520, 2008.

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

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

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

BRITO, A. L. B.; BRITO, L. V.; HONORATO, F. A.; PONTES, M. J. C.; PONTES, L. V. L. B. Classification of cereal bars using near infrared spectroscopy and linear discriminant analysis. **Food Research International**, v.51, p.924-928, 2008.

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

BRZEZINSKI, C. R., ABATI, J., ZUCARELI, C., HENNING, F. A., HENNING, A. A., COLOMBO, R. C., & KRZYZANOWSKI, F. C. **Teste de condutividade elétrica para a determinação do vigor em sementes de soja tratadas e armazenadas**. In: Embrapa Soja. Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA. MERCOSOJA, 2015, Florianópolis. Tecnologia e mercado global: perspectivas para soja. Londrina: Embrapa Soja, 2015.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. Handbook of Near-Infrared Analysis (D. A. Burns & E. W. Ciurczak (3eds.)). Boca Raton, **CRC Press**, p.834, 2007.

CARDOSO, J.; MACHADO, I.; IRIGOYEN, J. O.; ARRUDA, M. A. Z.; VIERA, I.; PISTÓN, M.; TORRE, M. H. Oxidative stress parameters, related trace elements levels and proteomics in soybean seeds in order to get a better assessment of their quality. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26, n.10, p.2022–2028, 2015.

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.5, n.2, p.167- 172, 2018.

CHRISTIANSEN, J.E. Irrigation by sprinkling. University of California, Berkeley, California, USA (**California Agricultural Experimental Station Bulletin 670**). 1942. Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=COLPOS.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=032293>>. Acesso em: 02 janeiro 2022.

COHEN, J. Weighted kappa: Nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. **Psychological Bulletin**, v.70, n.4, p.213–220, 1968.

- COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**, v.43, n.1, p.25–30, 2007.
- CONTIN, R. F. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de lentilha. **Monografia** (Especialização em Agronomia) - Fundação Educacional Miguel Mofarrej Faculdades Integradas de Ourinhos, Ourinhos, 2018.
- CUADRADO, J. B. G. Análise de imagem e aprendizagem de máquina na avaliação da qualidade de sementes de arroz. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020.
- CUNHA, P.T. Alterações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em sementes de lentilha em diferentes estádios de maturação e submetidas ao armazenamento. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- DALANHOL, S. J.; REZENDE, E. H.; ABREU, D. C. A.; NOGUEIRA, A. C. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Floresta e Ambiente**, v.21, n.1, p.69-77, 2014.
- DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1023- 1028, 1993.
- DELARMELINO-FERRARESI, L. M.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Desempenho fisiológico e composição química de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.9, n.1, p.14-18, 2014.
- DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, v.1, n.2, p.427-452, 1973.
- DEMIDCHIK, Vadim. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, p.212-228, 2015.
- DEUNER, C., MAIA, M. S., DEUNER, S., ALMEIDA, A.; MENEGHELLO, G. E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.711-720, 2011.
- DIAS., D. C. F. S.; MARCOS-FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill). **Scientia Agricola**, v.53 n.1, 1996.

DIETZ, C.; RUEDEN, C. T.; HELFRICH, S.; DOBSON, E. T. A.; HORN, M.; EGLINGER, J.; EVANS, E. L.; MCLEE, D. T.; NOVITSKAYA, T.; RICKE, W. A.; SHERER, N. M.; ZIJLSTRA, A.; BERTHOOLD, M. R.; ELICEIRI, K. W. Integration of the ImageJ ecosystem in the KNIME analytics platform. **Frontiers of Computer Science**, v.2, n.8, 2020.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA, G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.145, n.19, p. 34-42, 2019.

EHRHARDT-BROCARD, N. C. M; COELHO, C. M. M. Mobilization of seed storage proteins is crucial to high vigor in common bean seeds. **Ciência Rural**, v.52, n.2, e20200894, 2022.

ELAMRANI, A.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P. Nature and utilization of seed reserves during germination and heterotrophic growth of young sugar beet seedlings. **Seed Science Research**, v.2, n.1, p.1–8, 1992.

EMBRAPA. Artigo - Lentilhas: muito além do Réveillon. In: **Embrapa Hortaliças**. Brasília. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/49159157/artigo---lentilhas-muito-alem-do-reveillon>>. Acesso em: 03 fevereiro 2022.

ERBAŞ, S.; TONGUÇ, M.; SANLI, A. Mobilization of seed reserves during germination and early seedling growth of two sunflower cultivars. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.89, p.217–222, 2016.

FAN, Y; MA, S.; WU, T. Individual wheat kernels vigor assessment based on NIR spectroscopy coupled with machine learning methodologies. **Infrared Physics & Technology**, v.105, e103213, 2020.

FAO. The state of the world's biodiversity for food and agriculture. In: J. Bélanger & D. Pilling (Eds.), **FAO Commission on genetic resources for food and agriculture assessments**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/CA3129EN/CA3129EN.pdf>> Acesso em: 13 janeiro 2022.

FARHADI, M.; TIGABU, M.; ODÉN, P. Near Infrared Spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. **Silva Fennica**, v.49, n.5, 2015.

FERREIRA, L. B. S.; FERNANDES, N. A.; AQUINO, L. C.; SILVA, A. R.; NASCIMENTO, W. M.; LEÃO-ARAÚJO, E. F. Temperature and seed moisture content affect electrical conductivity test in pea seeds. **Journal of Seed Science**, v.39, n.4, p.410-416, 2017.

FERREIRA, O. J. M.; ROCHA, L. A. S.; SILVA-MANN, R.; TORRES, M. F. O.; SOUZA, J. L.; DANTAS, S. J.; SANTO, R. C.; SANTOS, J. P. F. Tecnologia de análise de imagens para a seleção de sementes crioulas de milho. **Global Science and Technology**, v.13, n.02, p.28-38. 2020.

FESSEL, S. A.; PANOBIANCO, M.; SOUZA, C. R.; VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica em sementes de soja armazenadas sob diferentes temperaturas. **Bragantia**, v.69, n.1, p.207-214, 2010.

FESSEL, S. A.; VIEIRA, R. D.; CRUZ, M. C. P.; PAULA, R. C.; PANOBIANCO, M. Electrical conductivity testing of corn seeds as influenced by temperature and period of storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.10, p.1551-1559, 2006.

FIGUEIREDO, J. C.; DAVID, A. M. S. S.; SILVA, C. D.; SOARES, L. M.; PEREIRA, K. K. G.; SILVA, R. A.; ALVES, R. A. Teste de condutividade elétrica em sementes de linho. **Investigacion Agraria**, v.23, n.2, pp.81-85, 2021.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v.67, n.3, p.567–591, 2016.

FRANDOLOZO, D. C. L.; RODRIGUES, D. B.; ROSA, T. D. A.; ALMEIDA, A. S.; SOARES, V. N.; BRUNES, A. P.; TUNES, L. V. N. Qualidade de sementes de alface avaliada pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista de Ciências Agrárias**, v.40, n. 4, p.703-713, 2017.

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

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

GOMES, D; LOPES, J. C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliar o potencial fisiológico de sementes de canudo-de-pito. **Ciência Florestal**, v.27, n.04, p.1105-1115. 2017.

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

GOMES-JUNIOR, F. G.; CHAMMA, H. M. C. P.; CÍCERO, 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.

GOMES-JUNIOR; F. G. Análise computadorizada de imagens de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARCOS-FILHO, J. (ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, p.139-181, 2020.

GU, J.; CHAO, H.; GAN, L.; GUO, L.; ZHANG, K.; LI, Y.; LI, M. Proteomic dissection of seed germination and seedling establishment in *Brassica napus*. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1–19, 2016.

GUOLLO, K.; POSSENTI, J. C.; FELIPPI, M.; DEL QUIQUI, E. M.; LOIOLA, T. M. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes florestais através do teste de condutividade elétrica. **Colloquium Agrariae**, v.13, n.1, p.86-92, 2017.

HARMAN, G. E.; MATTICK, L. R. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. **Nature**, v.260, n.5549, p.323–324, 1976.

HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, n.2, p.450–455, 1987.

HE, X.; FENG, X.; SUN, D.; LIU, F.; BAO, Y.; HE, Y. Rapid and nondestructive measurement of rice seed vitality of different years using near-infrared hyperspectral imaging. **Molecules**, v.24, n.12, p.2227, 2019.

HENNING, F. A.; MERTZ, L. M.; JACOB-JUNIOR, E. A.; MACHADO, R. D.; FISS, G.; ZIMMER, P. D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, v.69, n.3, p.727-734, 2010.

ISTA. **International rules for seed testing**. International Seed Testing Association, Cambridge, United Kingdom, 2019.

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

KANDPAL, L. M.; LOHUMI, S.; KIM, M. S.; KANG, J. S.; CHO, B.-K. Near-infrared hyperspectral imaging system coupled with multivariate methods to predict viability and vigor in muskmelon seeds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.229, p.534–544, 2016.

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

KOSMOWSKI, F.; WORKU, T. Evaluation of a miniaturized NIR spectrometer for cultivar identification: the case of barley, chickpea and sorghum in Ethiopia. **Plos One**, v.13, n.3, e0193620, 2018.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **ABRATES**, Londrina, n.1, v.2, p.15-53, 1991.

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

LI, C.; ZHAO, T.; LI, C.; MEI, L.; YU, E.; DONG, Y.; CHEN, J.; ZHU, S. Determination of gossypol content in cottonseeds by near infrared spectroscopy based on Monte Carlo uninformative variable elimination and nonlinear calibration methods. **Food Chemistry**, v.221, p.990–996, 2017.

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

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

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

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

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

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p.182-244, 2020.

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

MARINI, P., BANDEIRA, J. M., BORBA, I. C. G., MARTINS, A. B. N., MORAES, D. M., AMARANTE, L. & VILLELA, F. A. Antioxidant activity of corn seeds after thermal stress. **Ciência Rural**, v.43, n.6, p.951-956, 2013.

MARINKE, L. S.; CATÃO, H. C. R. M.; MARTINS, G. Z.; CASTILHO, I. M.; CAIXETA, F. Vigor of lentil seeds evaluated by the tests of accelerated aging and controlled deterioration. **Brazilian Journal of Development**, v.5, n.12, p.30846-30858, 2019.

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

MEDEIROS, A. D.; CAPOBIANGO, N. P.; SILVA, J. M.; SILVA, L. J.; SILVA, C. B.; DIAS, D. C. F. S. Interactive machine learning for soybean seed and seedling quality classification. **Scientific Reports**, v.10, n.1, p.11267, 2020 (a).

MEDEIROS, A. D.; PINHEIRO, D. T.; XAVIER, W. A.; SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. S. Classificação de qualidade de sementes de pinhão manso utilizando imagens radiográficas e aprendizado de máquina. **Industrial Crops and Production**, v.146, e112162, 2020 (b).

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

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

- 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, n.2, p.187-195, 2019.
- MENEZES, J. E.; NASCIMENTO, W. M. Teste de envelhecimento precoce em sementes de ervilha (*Pisium sativum* L.). **Horticultura Brasileira**, v.6, n.1, p.63, 1988.
- MITTLER R. ROS Are Good. **Trends Plant Science**, v.22, n.1, p.11-19, 2017.
- MORAIS, T. C.; DIAS, D. C. F. S.; PINHEIRO, D. T.; GAMA, G. F. V.; SILVA, L. J. Physiological quality and antioxidant enzymatic action in sunflower seeds exposed to deterioration. **Revista Caatinga**, v.34, n.3, p.570-579, 2021.
- MOURA, M. C. F.; LIMA, L. K. S.; SANTOS, C. C.; DUTRA, A. S. Teste da condutividade elétrica na avaliação fisiológica em sementes de *Vigna unguiculata*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.40, n.4, p.714-721, 2017.
- MUKASA, P.; WAKHOLI, C.; MO, C.; OH, M.; JOO, H. J.; SUH, H. K.; CHO, B. K. Determination of viability of *Retinispora (Hinoki cypress)* seeds using FT-NIR spectroscopy. **Infrared Physical Technolofy**, v.98, p.62–68, 2019.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados em desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 2020.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.867–880, 1981.
- NASCIMENTO, W. M.; FREITAS R. A.; GOMES E. M. L.; SOARES A. S. Metodologia para o teste de envelhecimento acelerado em sementes de ervilha. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.2, p.205-209, 2007.
- NASCIMENTO, W. M.; SILVA, P. P. Grão-de-bico: nova aposta do agronegócio brasileiro. **Seed News**, v.23, 2019.
- NASCIMENTO, W. M.; SILVA, P. P.; ARTIGA, O. P.; SUINAGA F. A. Grão-de-Bico. In: **Hortaliças Leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p.89–118, 2016.
- NIE, P.; ZHANG, J.; FENG, X.; YU, C.; HE, Y. Classification of hybrid seeds using near-

infrared hyperspectral imaging technology combined with deep learning. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.296, e.126630, 2019.

ORO, P.; VILLA, F.; DARTORA, J.; MARINI, D.; MARTIELLO, V. D.; FAVORITO, P. A. Metodologia para teste de envelhecimento acelerado em sementes de fisális (*Physalis peruviana*). **Cultivando o saber**, v.5, n.3, p.167-175, 2012.

PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B. Electrical conductivity of soybean seed and correlation with seed coat lignin content. **Seed Science and Technology**, v.27, p.945-949, 1999.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives—A review. **Analytica. Chimica Acta**, v.1026, p.8–36, 2018.

PEDÓ, T.; MARTINAZZO, E. G.; BACARIN, M. A.; ANTUNES, I. F.; KOCH, F.; MONTEIRO, M. A.; PIMENTEL, J. R.; TROYJACK, C.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Crescimento de plantas e vigor de sementes de feijão em resposta à aplicação exógena de ácido giberélico. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.3, p.757-770, 2018.

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

PEREIRA, M. D.; REIS, J. A.; FERRARI, C. S.; VALE, A. M. P. G. Processamento digital de imagens de plântulas na avaliação do vigor de sementes de *Moringa oleifera* Lam. **Ciência Florestal**, v.30, n.2, p.291, 2020.

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

PRADO, J. P.; KRZYZANOWSKI, F. C.; MARTINS, C. C.; VIEIRA, R. D. Physiological potential of soybean seeds and its relationship to electrical conductivity. **Journal of Seed Science**, v.41, n.4, p.407-415, 2019.

QIU, G.; LÜ, E.; LU, H.; XU, S.; ZENG, F.; SHUI, Q. Single-kernel FT-NIR spectroscopy for detecting supersweet corn (*Zea mays* L. *Saccharata* sturt) seed viability with multivariate data analysis. **Sensors**, v.18, n.4, e.1010, 2018.

QUEIRÓZ, T. N.; VALIGUZSKI, A. L.; BRAGA, C. DOS S.; SOUZA, S. A. M.; DA ROCHA, A. M. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de variedades tradicionais de milho. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.17, n.1, 2019.

R CORE TEAM. **R Development Core TeamR: A Language and Environment for Statistical Computing**, 2020.

RADKE, A. K.; XAVIER, F. M.; EBERHARDT, P. E. R.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. Methodological adjustment of the accelerated aging test to evaluate the vigor of chia seeds. **Journal of Seed Science**, v.40, n.2, p.173-178, 2018.

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

RIBEIRO, A. da S.; NERI, T. F. S.; MEDEIROS, A. D.; MILAGRES, C. C.; SILVA, L. J. Use of radiographic images for rapid and non-destructive assessment of crambe seed quality. **Journal of Seed Science**, v.43, p.43-55, 2021.

RIBEIRO, J. P. O.; MEDEIROS, A. D.; CALIARI, I. P.; TRANCOSO, A. C. R.; MIRANDA, R. M.; FREITAS, F. C. L.; SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. dos S. FT-NIR and linear discriminant analysis to classify chickpea seeds produced with harvest aid chemicals. **Food Chemistry**, v.341, e.128324, 2020.

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

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, p.625-636, 2001.

SEO, Y. W.; AHN, C. K.; LEE, H.; PARK, E.; MO, C.; CHO, B. K. Non-destructive sorting techniques for viable pepper (*Capsicum annuum* L.) Seeds using fourier transform near-infrared and raman spectroscopy. **Journal of Biosystem Engineering**, v.41, p.51–59, 2016.

SERSON, W.; ARMSTRONG, P.; MAGHIRANG, E.; AL-BAKRI, A.; PHILLIPS, T.; AL-AMERY, M.; SU, K.; HILDEBRAND, D. Development of whole and ground seed near-infrared spectroscopy calibrations for oil, protein, moisture, and fatty acids in salvia hispanica. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.97, n.1, p.3–13, 2020.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1–26, 2012.

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

SHRESTHA, S.; DELEURAN, L.; GISLUM, R. Classification of different tomato seed cultivars by multispectral visible-near infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Spectral Imaging**, v.5, p.1-9, 2016.

SILVA, E. C.; OLIVEIRA, L. A. B.; FERREIRA, N. C. F. Adequação da metodologia do teste de envelhecimento acelerado para sementes de feijão mungo-verde. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.17, n.4, p.451-455, 2018.

SILVA, E. C.; MENECHINI, W.; GALVÃO, C. S.; OLIVEIRA, L. A. B.; FERREIRA, N. C. F.; SILVA, L. S. Adequacy of electrical conductivity test for lentil seeds. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.19, n.3, p.307-311, 2020.

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

SILVA, P. P.; BARROS, A. C. S. A.; MARCOS-FILHO, J.; GOMES-JUNIOR, F. G.; NASCIMENTO, W. M. Assessment of squash seed vigor using computerized image analysis. **Journal of Seed Science**, v.39, n.2, p.159-165, 2017.

SILVA, V. N.; CICERO, S. M. Image seedling analysis to evaluate tomato seed physiological potential. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.2, p.327-334, 2014.

SILVA, V. N.; ZAMBIASI, C. A.; TILLMANN, M. A. A.; MENEZES, N. L. & VILLELA, F. A. Condução do teste de condutividade elétrica utilizando partes de sementes de feijão. **Revista de Ciências Agrárias**, v.37, n.2, p.206-213, 2014.

SOMMER, C.; STRAEHLE, C.; KOTHE, U.; HAMPRECHT, F. A. Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. **International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro**. v.978, n.1, p.4244, 2011.

SPONCHIADO, J. C.; SOUZA, C. A.; COELHO, C. M. M. Teste de condutividade elétrica para determinação do potencial fisiológico de sementes de aveia branca. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.4, p.2405-2414, 2014.

TAO, F.; YAO, H.; HRUSKA, Z.; BURGER, L. W.; RAJASEKARAN, K.; BHATNAGAR, D. Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural products. **Trends in Analytical Chemistry**, v.100, p.65–81, 2018.

TOMES, L. J.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Factors influencing the tray accelerated aging test for soybean seed. **Journal of Seed Technology**, v.12, n.1, p.2436, 1988.

TORRES, S. B.; PAIVA, E. P.; ALMEIDA, J. P. N.; BENEDITO, C. P., CARVALHO; S. M. C. Teste de condutividade elétrica na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de coentro. **Revista Ciência Agrônômica**, v.46, n.3, p.622-629, 2015.

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

TUNES, L. M.; PEDROSO, D. C.; BADINELLI, P. G.; TAVARES, L. C.; RUFINO, C. A.; BARROS, A. C. S. A.; MUNIZ, M. F. B. Envelhecimento acelerado em sementes de azevém com e sem solução salina saturada. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p.33-37, 2011.

VAN TOL, N.; ROLLOOS, M.; VAN LOON, P.; ZAAL, B. J. V, D. MeioSeed: a cellprofiler-based program to count fluorescent seeds for crossover frequency analysis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Methods**, v.14, n.1, p.14-32, 2018.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: Vieira, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.103-132, 1994.

VIEIRA, R. D.; MARCOS-FILHO, J. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p.333-389, 2020.

VIEIRA, R. D.; PENARIOL, A. L.; PERECIN, D.; PANOBIANCO, M. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.9, p.1333-1338, 2002.

VISSCHERS, I. G. S.; VAN D. A. M.; PETERS, J. L. Um método objetivo de triagem de alto rendimento para quantificação de danos por tripes usando Ilastik e ImageJ. **Entomologia. Experimentalis Applicata**, v.166, p.508-515, 2018.

VREŠAK, M.; HALKJAER OLESEN, M.; GISLUM, R.; BAVEC, F.; RAVN JØRGENSEN, J. The use of image-spectroscopy technology as a diagnostic method for seed health testing and variety identification. **PLOS ONE**, v.11, n.3, e0152011, 2016.

WANG, Q.; LIU, H.; SHI, A.; HU, H.; LIU, L.; WANG, L.; YU, H. Review on the processing characteristics of cereals and oilseeds and their processing suitability evaluation technology. **Journal of Integrative Agriculture**, v.16, n.12, p.2886–2897, 2017.

WANG, Y.; PENG, Y.; ZHUANG, Q.; ZHAO, X. Feasibility analysis of NIR for detecting sweet corn seeds vigor. **Journal of Cereal Science**, v.93, e102977, 2020.

WILCOX, J. R.; CAVINES, J. F. Normal and low linolenic acid soybean strains. Response to planting date. **Crop Science**, v.32, p.1248-1251, 1992.

WORMA, M.; SEGATTO, C.; STEFEN, C.; BUBA, G. P.; LEOLATO, L. S. Qualidade fisiológica de sementes de milho produzidas com adubação biológica e bioestimulante em diferentes preparos de solo. **Revista Engenharia na Agricultura - Reveng**, v.27, n.3, p.187-194, 2019.

WU, D.; CHEN, X.; SHI, P.; WANG, S.; FENG, F.; HE, Y. Determination of a linolenic acid and linoleic acid in edible oils using near-infrared spectroscopy improved by wavelet transform and uninformative variable elimination. **Analytica Chimica Acta**, v.634, p.166-171, 2009.

XIA, Y.; XU, Y.; LI, J.; ZHANG, C.; FAN, S. Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v.1, p.35–47, 2019.

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

XU, R.; HU, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, S.; GUO, Q.; QI, P.; CHEN, L.; YANG, X.; ZHANG, F.; LIU, L.; QIU, L.; WANG, J. Use of near-infrared spectroscopy for the rapid evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merri.] water soluble protein content. **Spectrochimica**

**Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.224, e117400, 2020.

YANG, X.; HONG, H.; YOU, Z.; CHENG, F. Spectral and image integrated analysis of hyperspectral data for waxy corn seed variety classification. **Sensors**, v.15, n.7, p.15578–94, 2015.

YASMIN, J.; RAJU AHMED, M.; LOHUMI, S.; WAKHOLI, C.; KIM, M.; CHO, B. K. Classification method for viability screening of naturally aged watermelon seeds using ft-nir spectroscopy. **Sensors**, v.19, n.5, e.1190, 2019.

YATES, S. C.; GROENEBOOM, N. E.; COELLO, C.; LICHTENTHALER, S.; KUHN, P. H.; DEMUTH, H. U.; RUBSAMEN, M. H.; ROBNER, S.; LEERGAARD, T.; KRESHUK, A.; PUCHADES, M. A.; BJAALIE, J. G. QUINT: Fluxo de trabalho para quantificação e análise espacial de características em imagens histológicas do cérebro de roedores. **Frontier Neuroinformatic**, v.13, p.1-14, 2019.

ZHANG, J.; LI, M.; PAN, T.; YAO, L.; CHEN, J. Purity analysis of multi-grain rice seeds with non-destructive visible and near-infrared spectroscopy. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.164, e104882, 2019.

ZHANG, T.; WEI, W.; ZHAO, B.; WANG, R.; LI, M.; YANG, L.; WANG, J.; SUN, Q. A reliable methodology for determining seed viability by using hyperspectral data from two sides of wheat seeds. **Sensors**, v.18, n.3, 2018.

ZHAO, Y.; ZHANG, C.; ZHU, S.; GAO, P.; FENG, L.; HE, Y. Non-destructive and rapid variety discrimination and visualization of single grape seed using near-infrared hyperspectral imaging technique and multivariate analysis. **Molecules**, v.23, n.6, p.1352, 2018.

ZHU, S.; ZHANG, J.; CHAO, M.; XU, X.; SONG, P.; ZHANG, J.; HUANG, Z. A rapid and highly efficient method for the identification of soybean seed varieties: hyperspectral images combined with transfer learning. **Molecules**, v.25, n.1, p.152, 2019.