

ANDRÉ DANTAS DE MEDEIROS

**FENOTIPAGEM DE SEMENTES COM USO DE RADIAÇÃO
ELETROMAGNÉTICA NÃO-VISÍVEL E SUA RELAÇÃO COM A
QUALIDADE FISIOLÓGICA**

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.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M488f
2019

Medeiros, André Dantas de, 1994-
Fenotipagem de sementes com uso de radiação
eletromagnética não-visível e sua relação com a qualidade
fisiológica / André Dantas de Medeiros. – Viçosa, MG, 2019.
xii, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Laércio Junio da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Cucumis melo* L.. 2. *Brachiaria ruziziensis*. 3. Raios X.
4. Sementes - Qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 583.63

ANDRÉ DANTAS DE MEDEIROS

**FENOTIPAGEM DE SEMENTES COM USO DE RADIAÇÃO
ELETROMAGNÉTICA NÃO-VISÍVEL E SUA RELAÇÃO COM A
QUALIDADE FISIOLÓGICA**

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: 18 de fevereiro de 2019.



Márcio Dias Pereira



Ariadne Morbeck Santos Oliveira



Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias

(Coorientadora)



Laércio Junio da Silva

(Orientador)

À Izaltina, minha querida mãe.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, por toda proteção e força concedida em todos os momentos, principalmente nas horas de dificuldade. Te agradeço meu Deus por se fazer presente em meu coração por onde quer que eu vá.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao professor Laércio Junio de Silva, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, apoio e amizade.

Ao professor Márcio Dias Pereira, pelo incentivo, ensinamentos, apoio, parceria e amizade.

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pelos ensinamentos, oportunidades concedidas e pelas significativas contribuições feitas a este trabalho.

Ao Dionízio Honório, da empresa Agristar do Brasil Ltda, que nos cedeu as sementes de melão. Ao Thiago Pulici, que nos cedeu as sementes de braquiária.

Aos professores do Departamento de Fitotecnia.

A todos os integrantes do GSem (Grupo de Estudos em Tecnologia de Sementes), pela ajuda na condução dos experimentos, companheirismo e amizade.

À minha família, em especial a Izaltina Dantas de Medeiros, Francisco Pereira de Medeiros e Francielio Dantas de Medeiros, pelo incentivo, carinho e apoio.

Aos meus colegas de curso, pelo companheirismo e por me acompanharem nessa jornada.

A todos que acreditam que a educação e a ciência podem mudar vidas.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

André Dantas de Medeiros, filho de Francisco Pereira de Medeiros e Izaltina Dantas de Medeiros, nasceu no dia 05 de fevereiro de 1994, na cidade de Acari, RN.

No ano de 2012 concluiu o ensino médio integrado com o curso de Técnico em Agricultura pela Escola Agrícola de Jundiáí, atual Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Macaíba, RN. Iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônoma em fevereiro de 2013, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, concluindo em julho de 2017. Em agosto do mesmo ano, iniciou na Universidade Federal de Viçosa, MG, o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, na área de Tecnologia e Produção de Sementes.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT -	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	6
CAPÍTULO I. PARÂMETROS BASEADOS EM RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA DE RAIOS X NA AVALIAÇÃO NÃO-DESTRUTIVA DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MELÃO.....	12
RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO II. FENOTIPAGEM DE ALTO RENDIMENTO UTILIZANDO FERRAMENTA DE LIVRE ACESSO PARA AVALIAÇÃO DE RADIOGRAFIAS DE SEMENTES DE BRAQUIÁRIA	44
RESUMO	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAL E MÉTODOS	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS CAPÍTULO I	75
ANEXOS CAPÍTULO II.....	77

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1.** Valores médios dos parâmetros físicos obtidos por meio da análise automatizada de imagens radiográficas de 30 lotes de sementes de melão híbrido com uso da macro PhenoXray.22
- Tabela 2.** Valores médios dos dados obtidos na avaliação do potencial fisiológico de sementes de 30 lotes de melão híbrido.26
- Tabela 3.** Cargas fatoriais, autovalores e proporção de variação associados a cinco componentes principais (PC) da PCA de 15 variáveis associadas à qualidade física e fisiológica de sementes de melão.34

Capítulo II

- Tabela 1.** Valores médios de dados morfométricos obtidos por meio da análise automatizada de imagens radiográficas de sete lotes de sementes de *Brachiaria ruzizienses* com uso da macro PhenoXray.58
- Tabela 2.** Valores médios obtidos para os parâmetros fisiológicos obtidos por meio do teste de germinação de sete lotes de sementes de *Brachiaria ruzizienses*.60
- Tabela 3.** Valores médios obtidos para o comprimento e índices de crescimento e vigor por meio da análise de imagens de plântulas oriundas de sete lotes de sementes de *Brachiaria ruzizienses*.61

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Imagens radiográficas de sementes de melão com indicações das estruturas internas em uma semente bem formada (A), sementes com visível malformação embrionária (B) e com danos físicos (C).20

Figura 2. Correlação de Pearson representada por heatmap (A) e por curvas (B) entre as variáveis geradas da análise automatizada das radiografias e da avaliação da germinação e comprimento de plântulas para cada cultivar de melão híbrido.29

Figura 3. Imagens radiográficas de sementes de melão, combinada à representações coloridas (2D e 3D) da densidade ao longo da semente e suas respectivas plântulas.31

Figura 4. Gráfico biplot obtido pela combinação linear das variáveis relacionadas às características físicas e fisiológicas de 30 lotes de sementes de melão híbrido de três cultivares.33

Capítulo II

Figura 1. Representação esquemática do processamento feito pela macro PhenoXray na análise automatizada de radiografias de sementes de braquiária. Os principais comandos implementados pela macro são indicados nas caixas. A imagem de entrada é aberta (A), sendo em seguida segmentada com ajustes de cor, saturação e brilho (B). Após a segmentação, é realizada a análise de partículas (C), em que são gerados ao final os resultados da análise (D) com várias medições para cada semente individualmente. Para simplificação, apenas uma área representativa de uma das imagens processadas é apresentada.49

Figura 2. Radiografias de sementes de *Brachiaria ruziziensis* cv. *Ruziziensis* com indicações das estruturas básicas que compõem a semente (A) e de malformação embrionária ou danos físicos (B). 1, 2 e 3 - malformação embrionária; 4 – trincas; 5, 6 e 7 - deterioração tecidual.54

Figura 3. Validação estatística da macro PhenoXray para análise de imagens radiográficas de sementes de *Braquiaria ruzizienses*. A – B - Ensaios de reprodutibilidade técnica para a medição da área (A) e densidade relativa (B) das sementes. ns - não indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) conforme determinado pela teste t (n = 1400 sementes para cada réplica técnica). C - Análise de correlação das medições automatizadas (PhenoXray) versus manuais de área, perímetro, circularidade, largura, altura, solidez, densidade relativa, densidade integrada e preenchimento utilizando-se o software ImageJ[®]. Os coeficientes de correlação de Pearson foram determinados por análises de regressão linear (n = 28, correspondente às repetições de todos os lotes).56

Figura 4. Matriz de correlação obtida a partir de sementes de características de plântulas. * significa $P < 0,05$ pelo teste t. VPR = Velocidade de protrusão radicular; IVG= Índice de velocidade de germinação; TMPR= Tempo médio de protrusão radicular; TMG= Tempo médio de germinação; SincPR= Sincronia de protrusão radicular; SincG= Sincronia de germinação.62

Figura 5. Gráfico biplot obtido pela combinação linear das variáveis relacionadas às características físicas e fisiológicas de sete lotes de sementes de *Brachiaria ruzizienses*. PR = Protrusão radicular; G = Germinação; VPR = Velocidade de protrusão radicular; IVG= Índice de velocidade de germinação; TMPR= Tempo médio de protrusão radicular; TMG= Tempo médio de germinação; SincPR= Sincronia de protrusão radicular; SincG= Sincronia de germinação; CP = Comprimento de plântula; IC= Índice de crescimento de plântula; IU = Índice de uniformidade de plântulas; IV = Índice de vigor; IVC = Índice de vigor corrigido; Larg = Largura de sementes; Alt = Altura de sementes; Per = Perímetro de sementes; Sol = Solidez; DR = Densidade relativa; DI = Densidade integrada; Preenc = Preenchimento.64

Figura 6. Imagens representativas de duas sementes de braquiária, com histogramas de nível de cinza (A e F), representações 2D (B e G) e 3D (E e J) em gradiente de cor da densidade ao longo da semente, imagem radiográfica original (D e I) e suas respectivas plântulas ou semente não germinadas (C e H).67

RESUMO

MEDEIROS, André Dantas de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Fenotipagem de sementes com uso de radiação eletromagnética não-visível e sua relação com a qualidade fisiológica.** Orientador: Laércio Junio da Silva. Coorientadora: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

A qualidade das sementes é de grande importância para a otimização do estabelecimento de qualquer cultura propagada via sexuada. Dessa forma, a avaliação da qualidade das sementes de forma rápida e não destrutiva traz muitas vantagens para a indústria sementeira, principalmente na tomada de decisão quanto ao descarte de lotes com sementes de baixa qualidade, sendo possível inferir de modo eficaz sobre o vigor das sementes. Assim, métodos rápidos e não destrutivos de avaliação da qualidade de sementes devem ser aprimorados. O objetivo deste trabalho foi propor um método de fenotipagem de alto rendimento a partir do processamento de imagens radiográficas de sementes de melão e braquiária, utilizando software de livre acesso, relacionando os parâmetros obtidos com a qualidade fisiológica das sementes. Foram conduzidos dois experimentos. No primeiro, foram utilizados 30 lotes de sementes comerciais de melão híbrido, 10 lotes das cultivares Bazuca F1, Goldex F1 e Pampa F1, cada. O segundo experimento foi conduzido com sete lotes de sementes comerciais de *Brachiaria ruziziensis* cv. *Ruziziensis*. Em ambos os experimentos os lotes de sementes apresentavam diferentes níveis de vigor. O estudo foi realizado por meio da análise automatizada de imagens radiográficas das sementes, em que foi desenvolvida uma macro, denominada PhenoXray, para uso no software ImageJ[®]. Com esta macro realizou-se o processamento digital das imagens radiográficas das sementes, a partir das quais foram obtidos diferentes descritores morfométricos e de integridade tecidual. As sementes radiografadas para a obtenção das imagens foram, posteriormente, submetidas ao teste de germinação, obtendo-se variáveis relacionadas à sua qualidade fisiológica. Os dados obtidos foram agrupados pelo teste de Scott-knott, submetidos à análise de correlação linear de Pearson e à análise multivariada, por meio de componentes principais. Os resultados demonstraram que a análise automatizada de imagens radiográficas é eficiente para obtenção de dados morfométricos e de integridade tecidual em sementes de melão e *Brachiaria ruziziensis*; além disso, os parâmetros densidade relativa, densidade integrada e preenchimento apresentaram estreita relação com atributos fisiológicos de qualidade das sementes. Conclui-se que o método de fenotipagem proposto a partir do processamento de imagens radiográficas utilizando a PhenoXray foi

eficiente, apresentando-se como alternativa simples, rápida, robusta e totalmente gratuita. A metodologia também permitiu a obtenção de informações sobre características físicas das sementes e gerar parâmetros capazes de prever sobre a germinação e o comprimento de plântulas.

ABSTRACT

MEDEIROS, André Dantas de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Seed phenotyping through non-visible electromagnetic radiation and its relationship with physiological quality.** Adviser: Laércio Junio da Silva. Co-adviser: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias.

The seed quality is of great importance for the optimization of the establishment of any crop dispersed by sexual propagation. Thus, fast and non-destructive evaluation of seed quality has many advantages for seed industry, mainly in decision making regarding the discarding of lots with low quality seeds. Also, it enables to infer in an effective way the vigor of the seeds. Thus, rapid and non-destructive seed quality assessment methods should be improved. The objective of this work was to propose a method of high yield phenotyping by radiographic image processing of melon and brachiaria seeds using free access software, and to relate the parameters obtained with the seed physiological quality. Two experiments were conducted. In the first one, 30 commercial seed lots of hybrid melon, 10 lots of each of the following cultivars, were used: Bazuca F1, Goldex F1 and Pampa F1. The second experiment was conducted with seven commercial seed lots of *Brachiaria ruziziensis* cv. Ruziziensis. In both experiments, the seed lots had different levels of vigor. The study was performed through the automated analysis of the radiographic images, in which a macro, named PhenoXray, was developed for use in ImageJ® software. With this macro, the digital processing of the radiographic images of the seeds was performed, from which different morphometric descriptors and tissue integrity parameters were obtained. The seeds that were radiographed were subsequently submitted to the germination test, from which were obtained variables related to their physiological quality. The data were grouped by the Scott-knott test, submitted to Pearson's linear correlation analysis and to multivariate analysis, using principal components analysis. The results demonstrated that the automated analysis of radiographic images is efficient to obtain morphometric and tissue integrity data of melon and *Brachiaria ruziziensis* seeds. Among the parameters obtained, relative density, integrated density and fill were closely related to physiological attributes of seeds. It is concluded that the method of phenotyping proposed by processing radiographic images using PhenoXray was efficient. It is a simple, fast, robust and totally free alternative for seed quality assessment. This methodology also allowed to obtain information regarding physical characteristics of the seeds and to generate parameters capable of predicting germination and seedling length.

INTRODUÇÃO GERAL

As culturas do melão e da braquiária apresentam nichos de mercado bem distintos, porém ambos impactam de forma significativa o agronegócio brasileiro. A cultura do melão figura entre as mais importantes olerícolas produzidas na região Nordeste do Brasil, que é responsável por 95,7% da produção nacional, gerando para o país no ano de 2017 uma receita de US \$ 162.916.237 em exportações (MAPA, 2018). Já a produção de gramíneas forrageiras, como a braquiária, movimentava anualmente mais de 250 milhões de dólares, gerando cerca de 50 mil empregos no país, considerando apenas o setor de produção de sementes (Vechiato et al., 2010). Ambas as culturas são propagadas via sexuada, e dependem, portanto, de sementes de boa qualidade.

A qualidade das sementes é essencial para a produção agrícola e a segurança alimentar, uma vez que elas funcionam como sistemas de distribuição de biotecnologias agrícolas e melhoramento das culturas, sendo, portanto, peças-chaves diante de um cenário de crescente incerteza devido às mudanças climáticas globais (Finch-Savage & Bassel, 2016). No contexto agrícola, as sementes utilizadas para semeadura são produzidas e comercializadas na forma de lotes, e cada um representa uma população de sementes produzidas idealmente a partir de muitas plantas, em uma única colheita, em um local específico (Grasso et al., 2018). Cada lote tem suas próprias características e o vigor das sementes dentro de determinado lote pode variar de forma significativa, dependendo do ambiente em que as sementes se desenvolveram e da subsequente colheita e manejo (Dias et al., 2006).

A alta qualidade de sementes é um dos principais requisitos para se obter uma população de plantas adequada no campo, visando com isso alcançar o máximo potencial produtivo de uma cultura (Javorski et al., 2018). Diante disso, os agricultores exigem sementes que garantam o estabelecimento bem-sucedido de suas culturas e, portanto, as empresas devem oferecer sementes de alta qualidade para garantir sua posição competitiva nos mercados agrícolas (Grasso et al., 2018). Essa qualidade pode ser descrita como sendo a soma dos atributos físicos, fisiológicos, genéticos e sanitários, que irão influenciar a capacidade das sementes originarem plantas com alta capacidade produtiva (Marcos-Filho, 2016).

Para a comercialização de sementes, padrões mínimos de qualidade são exigidos no processo de certificação, de maneira a controlar a qualidade das sementes disponíveis no mercado. Para a certificação das sementes, impõe-se que os lotes apresentem padrões

mínimos de pureza física e de germinação. Esses valores variam por espécie e por categoria das sementes, sendo que, para sementes de melão C1, C2, S1 e S2, são de 98% de pureza física e 80% de germinação (Brasil, 2012), e para sementes de braquiária C1 e C2, 80% de pureza física e S1 e S2, 60% de pureza física, ambas com 60% de germinação (Brasil, 2008).

Segundo Silva & Cicero (2014), o teste de germinação é considerado um teste tradicional para avaliação da qualidade fisiológica das sementes, entretanto, seus resultados podem não representar o potencial do lote em condições de campo, por ser realizado sob condições controladas. Em razão disso, as indústrias sementeiras realizam controle de qualidade interno, em que são realizados testes adicionais e mais sensíveis capazes de estimar o potencial de emergência em campo sob condições adversas e identificar estágios menos avançados de deterioração das sementes, os chamados testes de vigor (Marcos Filho, 2015).

A avaliação do vigor das sementes tem muitas implicações importantes para a indústria de sementes, como o monitoramento básico do potencial fisiológico das sementes durante as diferentes fases de produção, servindo de suporte para decisões estratégicas sobre a seleção de lotes de alta qualidade para atender a demanda do consumidor (Marcos Filho, 2015).

De acordo com Marcos-Filho (1999), uma das classificações de métodos para avaliação de vigor mais completa foi a proposta por McDonald (1975). Segundo essa classificação, os testes passaram a ser distribuídos como testes físicos (e.g. tamanho e peso das sementes, densidade das sementes, coloração das sementes, teste de raios X) fisiológicos (e.g. classificação do vigor das plântulas, primeira contagem do teste de germinação, velocidade de germinação, crescimento de plântulas), de resistência ao estresse (e.g. germinação sob baixa temperatura, teste de frio, envelhecimento acelerado) e bioquímicos (e.g. teste de tetrazólio, condutividade elétrica, lixiviação de potássio).

A maioria dessas técnicas exhibe alta precisão e boa confiabilidade; no entanto, apresentam certas limitações, principalmente ligadas às inspeções humanas, que acarretam em dificuldades, como escassez de mão-de-obra qualificada, aumento dos custos trabalhistas, pode ser entediante, trabalhosa, dispendiosa, inconsistente e altamente subjetiva (Mahajan et al., 2018).

Portanto, métodos de avaliação mais rápidos, precisos, não-destrutivos e capazes de eliminar a natureza subjetiva das inspeções visuais, são altamente desejáveis e importantes para programas de controle de qualidade de sementes (Abud et al., 2018;

Medeiros et al., 2018). O contínuo avanço tecnológico tem tornado mais acessível o uso de instrumentos de alta performance, capazes de gerar determinações precisas, rápidas e menos subjetivas da qualidade de produtos agrícolas.

As técnicas ópticas baseadas em radiação eletromagnética, como os raios X, utilizadas predominantemente em aplicações médicas, são uma dessas tecnologias que têm sido exploradas com sucesso na inspeção interna de qualidade de vários produtos agrícolas de forma não-destrutiva, quando as características de qualidade não são visíveis na superfície dos produtos (Kotwaliwale et al., 2014).

Um dos principais fatores de risco a serem considerados durante o uso desta técnica, é que os raios X podem ionizar e, assim, danificar as células e tecidos vivos (Mahajan et al., 2015). Neste sentido, de acordo com Rahman & Cho (2016), sistemas de raios X com comprimentos de onda superiores a 1 nm são os mais indicados para utilização em sementes, pois essa baixa energia é suficiente para revelar alterações na densidade interna e, segundo Santos et al. (2009), não há indução de mutações genéticas, nem comprometimento da capacidade germinativa das sementes.

O uso da técnica de raios X é uma alternativa relativamente recente para a classificação imediata de diversos aspectos relacionados a qualidade física e fisiológica das sementes (Gomes-Junior, 2010). Embora o uso de raios X seja indicado pela International Seed Testing Association (ISTA), desde os anos 80, no Brasil a técnica teve grande impulso há pouco mais de 20 anos, em que várias contribuições científicas foram relatadas com seu uso na avaliação da qualidade de sementes de diversas espécies (Cicero, 2010).

A análise de imagens por meio de raios X apresenta-se como um método simples de executar, reprodutível, não-destrutivo e de resposta rápida (Abud et al., 2018), em que com apenas alguns segundos (3-5s) a imagem radiográfica de uma ou várias sementes pode ser gerada, reduzindo assim, o período de tempo necessário para avaliação de lotes de sementes, agilizando o processo de seleção de materiais com melhor qualidade (Rahman & Cho, 2016).

Pesquisas com uso de métodos baseados em imagens radiográficas demonstraram eficiência da técnica para avaliar a qualidade de sementes de milho (Cicero et al., 1998; Cicero & Banzatto Junior, 2003), soja (Flor et al., 2004; Forti et al., 2010; Pinto et al., 2009, 2012), arroz (Menezes et al., 2012), mamão (Dias et al., 2014; Santos et al., 2009), pimentão (Gagliardi & Marcos-Filho, 2011), berinjela (Silva et al., 2012), pepino (Gomes-Junior et al., 2013), brócolis (Abud et al., 2018), jiló (Prado-Alves et al., 2018),

citrumelo “Swingle” (Arruda et al., 2018), milho (Javorski et al., 2018), sorgo (Javorski & Cicero, 2017), gergelim (Nogueira Filho et al., 2017), caju (Silva et al., 2017), abóbora (Antônio et al., 2016; Silva et al., 2014), crotalária (Arruda et al., 2016), tomate (Silva et al., 2013), leucena (Medeiros et al., 2018), entre outras espécies.

Usualmente trabalhos que fazem uso da técnica de raios X em sementes exploram variáveis como percentual de preenchimento da cavidade interna da semente, tamanho de embrião, identificação de sementes cheias, anormalidades embrionárias, identificação de danos mecânicos, ataque de insetos, além de outras variáveis, sendo elas associadas à qualidade física e fisiológica das sementes. Além dessas variáveis, a técnica permite explorar de forma mais aprofundada as características não-visíveis que podem ser utilizadas para caracterizar fenótipos de indivíduos. No entanto, embora as sementes possam ser examinadas individualmente em imagens ampliadas, as variáveis geradas podem apresentar erros em razão das interpretações subjetivas feitas pelos analistas, dificultando a análise do fenótipo (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018).

O fenótipo de um indivíduo pode ser entendido como um conjunto de características observáveis resultante da interação de seu genótipo com o ambiente. A mensuração dessas características, definida como fenotipagem, é considerado um componente crítico da pesquisa genética de plantas e do melhoramento de culturas (Tello et al., 2018). A coleta precisa de dados fenotípicos, podem contribuir significativamente para criação de modelos de seleção genômica, no mapeamento genético, assim como, para a própria seleção fenotípica direta (Fritsche-Neto e Borém, 2016).

O desenvolvimento de ferramentas que possibilitem mensurar caracteres fenotípicos de interesse para a indústria de semente e atuar simultaneamente com as tecnologias de perfil molecular em programas de melhoramento vegetal, representa um avanço significativo para o setor agrícola. Com o surgimento de novos algoritmos de processamento de imagem e com disponibilidade de softwares modernos, fáceis de usar e com baixo custo, a automatização dessas determinações, se torna possível, permitindo o aumento da agilidade da análise fenotípica e a obtenção de informações com alto nível de confiabilidade e repetibilidade (Medeiros et al., 2018). Contudo, existem poucos softwares capazes de realizar análises de radiografia de sementes, dentre eles destacam-se o Image Pro Plus[®], o Tomato Analyzer[®] e o ImageJ[®].

O Image Pro Plus[®] é um software comercial, desenvolvido pela Mediacybernetics, em Silver Spring, EUA, e que tem sido utilizado com êxito em análises de radiografias de sementes (Dell’Aquila, 2007; Silva et al., 2012). O Tomato Analyzer[®], desenvolvido

por pesquisadores da Ohio State University, EUA, é um software livre desenvolvido para processar imagens digitais escaneadas de frutos de tomate, calculando parâmetros a partir da identificação de limites periféricos de cada parte constituinte do fruto (Brewer, 2006). No entanto, este software também se mostrou adequado para a avaliação de radiografias de sementes (Gomes-Junior et al., 2013; Marchi & Gomes Junior, 2017; Marcos Filho et al., 2010). O ImageJ[®], por sua vez, desenvolvido no National Institutes of Health, EUA, é apresentado como o software de processamento de imagens mais rápido do mundo, escrito em Java puro e, de código aberto (<https://imagej.nih.gov/ij/features.html>) (Miart et al., 2018; Schneider et al., 2012). Ele suporta uma ampla gama de formatos de arquivos, funciona em muitos sistemas operacionais e, recentemente, tem demonstrado potencial para a aplicação na análise de imagens radiográficas de sementes (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018; Noronha et al., 2018; Prado-Alves et al., 2018; Silva et al., 2013).

O ImageJ[®], dentre os demais softwares, se destaca principalmente devido à sua facilidade de uso, linguagem de macro gravável e arquitetura extensível de plugins (Rueden et al., 2017). O uso do ImageJ[®] para desenvolvimento de algoritmos e posterior criação de macros personalizáveis tem sido reportados com sucesso para quantificação histológica de seções de caule de milho (Legland et al., 2017), fenotipagem simultânea da mucilagem solúvel e parâmetros morfométricos de sementes (Miart et al., 2018), fenotipagem de pólen (Tello et al., 2018), fenotipagem dinâmica de crescimento de *Arabidopsis thaliana* (Vasseur et al., 2018), entre outras pesquisas. No entanto, sua aplicação para processamento de imagens radiográficas de sementes tem se limitado a análises manuais ou semi-automatizadas (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018; Noronha et al., 2018; Silva et al., 2013), o que já pode ser considerado um avanço comparado aos métodos tradicionais de avaliação visual, porém limitantes para a análise em larga escala.

Considerando que metodologias mais eficientes, não-destrutivas e capazes de gerar resultados mais rápidos e precisos sobre a qualidade de sementes representam avanços para melhoria do setor sementeiro, objetivo deste trabalho foi propor um método de fenotipagem de alto rendimento a partir do processamento de imagens radiográficas de sementes de melão e braquiária, utilizando software de livre acesso, relacionando os parâmetros obtidos com a qualidade fisiológica das sementes.

REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F.; CICERO, S. M.; GOMES JUNIOR, F. G. Radiographic images and relationship of the internal morphology and physiological potential of broccoli seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, p. 1–9. 2018. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.34950>.
- ANTÔNIO, L. DO N.; MOREIRA, H. C. R.; CATÃO, H. O. DOS S.; PIRES, R. M. DE O.; RIBEIRO, B. G.; VON, E. V. DE R.; ... CALDEIRA. Efficiency of x- ray test in the identification of damage and its relation with the pumpkin seeds quality. **International Journal of Current Research**, v. 8, p. 26471–26475. 2016. Disponível em <<http://www.journalcra.com>>
- ARRUDA, N.; CICERO, S. M.; GUILHIEN, F.; JUNIOR, G. Radiographic analysis for the evaluation of polyembryony in Swingle citrumelo seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 118–126. 2018. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n2175172>.
- ARRUDA, N.; CICERO, S. M.; GUILHIEN GOMES-JUNIOR, F. Radiographic analysis to assess the seed structure of *Crotalaria juncea* L. **Journal of Seed Science**, v. 38, p. 161–168. 2016. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v38n2155116>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Padrões de identidade e qualidade para a produção e a comercialização de sementes de espécies olerícolas, condimentares, medicinais e aromáticas**. Portaria nº 111, de 4 de setembro de 2012. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2012.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas e padrões para comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical**. (P. Executivo, Ed.). Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2008.
- BREWER, M. T. Development of a Controlled Vocabulary and Software Application to Analyze Fruit Shape Variation in Tomato and Other Plant Species. **Plant Physiology**, v. 141, p. 15–25. 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077867>.
- CICERO, S. M. Aplicação de imagens radiográficas no controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, v. 20, p. 48–51. 2010.
- CICERO, S. M.; BANZATTO JUNIOR, H. L. Avaliação do relacionamento entre danos

- mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, p. 29–36. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222003000100006>.
- CICERO, S. M.; VAN DER HEIJDEN, G. W. A. M.; VAN DER BURG, W. J.; BINO, R. J. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, v. 26, p. 603–612. 1998.
- DELL'AQUILA, A. Pepper seed germination assessed by combined X-radiography and computer-aided imaging analysis. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 777–781. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0159-9>.
- DIAS, D. C. F. S.; RIBEIRO, F. P.; DIAS, L. A. S.; SILVA, D. J. H.; VIDIGAL, D. S. Tomato seed quality harvested from different trusses. **Seed Science and Technology**, v. 34, p. 681–689. 2006. <https://doi.org/10.15258/sst.2006.34.3.14>.
- DIAS, M. A.; DIAS, D. C. F. DOS S.; JUNIOR, F. G. G.; CÍCERO, S. M. Morphological changes and quality of papaya seeds as correlated to their location within the fruit and ripening stages. **Idesia (Arica)**, v. 32, p. 27–34. 2014. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000100004>.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 567–591. 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>.
- FLOR, E. P. O.; CICERO, S. M.; FRANÇA NETO, J. DE B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, p. 68–76. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222004000100011>.
- FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Avaliação da evolução de danos por “umidade” e redução do vigor em sementes de soja, cultivar {TMG}113-{RR}, durante o armazenamento, utilizando imagens de raios x e testes de potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 123–133. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000300014>.
- FRITSCHÉ-NETO, R; BORÉM, A. **Fenômica: como a fenotipagem de próxima geração está revolucionando o melhoramento de plantas**. Editora UFV. 2016. 216 p.

- GAGLIARDI, B.; MARCOS-FILHO, J. Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 411–416. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000400004>.
- GOMES-JUNIOR, F. G. Aplicação da análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes. **Informativo Abrates**, v. 20, p. 33–51. 2010.
- GOMES-JUNIOR, F. G.; CHIQUITO, A. A.; MARCOS-FILHO, J. Semi-automated assessment of the embryonic area of cucumber seeds and its relationship to germination and seedling length. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 183–189. 2013. <https://doi.org/10.1590/S2317-15372013000200007>.
- GRASSO, R.; GULINO, M.; GIUFFRIDA, F.; AGNELLO, M.; MUSUMECI, F.; SCORDINO, A. Non-destructive evaluation of watermelon seeds germination by using Delayed Luminescence. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 187, p. 126–130. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOLOG.2018.08.012>.
- JAVORSKI, M.; CICERO, S. M. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 16, p. 310–318. 2017. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v16n2p310-318>.
- JAVORSKI, M.; OTTE, D.; CASTAN, C.; SANTANNA, S.; GOMES-JUNIOR, F. G.; CICERO, S. M. Image analysis to evaluate the physiological potential and morphology of pearl millet seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 127–134. 2018. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n2176904>.
- KOTWALIWALE, N.; SINGH, K.; KALNE, A.; JHA, S. N.; SETH, N.; KAR, A. X-ray imaging methods for internal quality evaluation of agricultural produce. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1–15. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0485-y>.
- MAHAJAN, S.; DAS, A.; SARDANA, H. K. Image acquisition techniques for assessment of legume quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, p. 116–133. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.01.001>.
- MAHAJAN, S.; MITTAL, S. K.; DAS, A. Machine vision based alternative testing approach for physical purity, viability and vigour testing of soybean seeds (*Glycine max*). **Journal of Food Science and Technology**. 2018. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3320-x>.

- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrostat: Estatísticas de Comercio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. 2018. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>>
- MARCHI, J. L. DE; GOMES JUNIOR, F. G. Use of image analysis techniques to determine the embryo size of *Senna multijuga* (Rich.) seeds and its relation to germination and vigor. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 13–19. 2017. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n1165423>.
- MARCOS-FILHO, J. **Seed Physiology of Cultivated Plants**. Abrates. 2016.
- MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, p. 363–374. 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>.
- MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G.; BENNETT, M. A; WELLS, A. A; STIEVE, S. Using Tomato Analyzer software to determine embryo size in x-rayed seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 146–153. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000200018>.
- MARCOS-FILHO, J. Testes de vigor: Importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, FRANCISCO CARLOS; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. DE B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina, PR: Abrates, 1999. P. 1.1.1-26.
- 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. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/23432547>>
- MEDEIROS, A. D. DE; ARAÚJO, J. DE O.; ZAVALA-LEÓN, M. J.; SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. DOS S. Parameters based on x-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v.42, p. 1-10. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542018426023318>
- MENEZES, N. L. DE; CICERO, S. M.; VILLELA, F. A.; BORTOLOTTI, R. P. Using X rays to evaluate fissures in rice seeds dried artificially. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 70–77. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000100009>.
- NOGUEIRA FILHO, F. P.; OLIVEIRA, A. B.; PEREIRA, M. S.; LOPES, M. F. Q.; SILVA, R. T. Effectivity of X-ray test to evaluate the physiological quality of sesame seeds due to

- fruits position at the plant. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 12, p. 435–440. 2017. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i4a5474>.
- PINTO, T. L. F.; CICERO, S. M.; FRANÇA-NETO, J. B.; FORTI, V. A. An assessment of mechanical and stink bug damage in soybean seed using X-ray analysis test. **Seed Science and Technology**, v. 37, p. 110–120. 2009. <https://doi.org/10.15258/sst.2009.37.1.13>.
- PINTO, T. L. F.; MONDO, V. H. V.; GOMES-JÚNIOR, F. G.; CICERO, S. M. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, p. 310–316. 2012. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632012000300010>.
- PRADO-ALVES, M. V.; PINHO, É. V. DE R. VON; SANTOS, H. O. DOS; PRADO-ALVES, G. C.; CARVALHO, M. L. M. DE; BUSTAMANTE, F. DE O. Image analysis, quality and maturation of jiló (*Solanum gilo*) seeds. **Agrociencia**, v. 52, p. 267–278. 2018. Disponível em <<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2018/feb-mar/art-8.pdf>>
- RAHMAN, A.; CHO, B. K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v. 26, p. 285–305. 2016. <https://doi.org/10.1017/S0960258516000234>.
- SANTOS, S.; DA SILVA, R.; PEREIRA, M.; MACHADO, J.; BÓREM, F.; GOMES, V.; TONETTI, O. X-ray technique application in evaluating the quality of papaya seeds. **Seed Science and Technology**, v. 37, p. 776–780. 2009.
- SILVA, L. A. DA; SALES, J. D. F.; NEVES, J. M. G.; SANTOS, H. O. DOS; SILVA, G. P. Radiographic image analysis of *Anacardium othonianum* Rizz (anacardiaceae) achenes subjected to desiccation. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, p. 235. 2017. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i2.32484>.
- SILVA, P. P.; FREITAS, R. A.; CÍCERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J.; NASCIMENTO, W. M. Análise de imagens no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 210–214. 2014. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362014000200016>.
- SILVA, V. N.; CICERO, S. M.; BENNETT, M. Relationship between eggplant seed morphology and germination. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 597–604. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000400010>.

- SILVA, V. N.; CICERO, S. M.; BENNETT, M. Associations between X-ray visualised internal tomato seed morphology and germination. **Seed Science and Technology**, v. 41, p. 225–234. 2013. <https://doi.org/10.15258/sst.2013.41.2.05>.
- SILVA, V. N.; SARMENTO, M. B.; SILVEIRA, A. C.; SILVA, C. S.; CICERO, S. M. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 1158–1169. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400027>.
- TELLO, J.; MONTEMAYOR, M. I.; FORNECK, A.; IBÁÑEZ, J. A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: Evaluation of inter- and intra-cultivar diversity in grapevine. **Plant Methods**, v. 14, p. 1–17. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0267-2>.
- VECHIATO, M. H.; APARECIDO, C. C.; FERNANDES, C. D. Frequência de fungos em lotes de sementes comercializadas de *Brachiaria* e *Panicum*. **Arquivos Do Instituto Biológico**, p. 1–11. 2010. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24484/1/doc07.pdf>>

CAPÍTULO I

PARÂMETROS BASEADOS EM RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA DE RAIOS X NA AVALIAÇÃO NÃO-DESTRUTIVA DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MELÃO

RESUMO – Métodos avançados para avaliação da qualidade de produtos agrícolas têm sido desenvolvidos e aplicados com sucesso na agroindústria moderna. Por ser um método não-destrutivo e de alta performance, o teste de raios X tem sido indicado para a avaliação da qualidade de sementes de várias espécies. O objetivo deste trabalho foi relacionar parâmetros obtidos a partir da análise gratuita e automatizada de radiografias digitais de sementes de melão híbrido ao potencial fisiológico de suas sementes. Para tanto, foram utilizadas sementes de três cultivares híbridas de melão (Bazuca F1, Goldex F1, Pampa F1). Foram obtidas imagens radiográficas das sementes, a partir das quais foram geradas medidas de área, perímetro, circularidade, densidade relativa, densidade integrada e preenchimento, por meio de uma nova macro desenvolvida em linguagem de programação Java para o software ImageJ[®]. Após o teste de raios X, as sementes foram submetidas ao teste de germinação e crescimento de plântulas, dos quais se extraíram variáveis relacionadas à qualidade fisiológica. Por meio das imagens do teste de raios X foi possível visualizar com detalhes as estruturas internas das sementes de melão e observar diferenças entre as sementes quanto à densidade de seus tecidos. As variáveis obtidas com as radiografias apresentaram correlações significativas com os parâmetros de qualidade das sementes. As densidades relativa e integrada foram, dentre as variáveis obtidas a partir das imagens de raios X, as que se destacaram para predizer sobre o potencial fisiológico das sementes. Conclui-se que a análise automatizada de imagens radiográficas permite de forma simples, gratuita e rápida extrair informações sobre características físicas e gerar parâmetros relacionados com a qualidade fisiológica das sementes.

PALAVRAS-CHAVE: Cucumis melo L.; radiografia de sementes; densidade relativa; análise de imagens automatizada.

PARAMETERS BASED ON X-RAY ELECTROMAGNETIC RADIATION IN THE NON-DESTRUCTIVE EVALUATION OF THE PHYSIOLOGICAL QUALITY OF MELON SEEDS

ABSTRACT - Advanced methods for evaluating the quality of agricultural products have been successfully developed and applied in the modern agroindustry. For being a non-destructive and high-performance method, X-ray testing has been indicated for evaluating the quality of seeds of several species. The objective of this work was to relate parameters obtained from the free and automated analysis of digital radiographs of seeds of hybrids melon to their physiological potential. Seeds samples of three hybrid melon cultivars (Bazuca F1, Goldex F1, Pampa F1) were used. Radiographic images of the seeds were obtained, from which area, perimeter, circularity, relative density, integrated density and fill measurements were generated using a new macro developed in Java programming language for ImageJ[®] software. After the X-ray analysis, the seeds were submitted to germination and seedling growth test, from which variables related to physiological quality were extracted. Through X-ray images was possible to visualize in detail the internal structures of the melon seeds and to observe differences between the seeds, regarding density of their tissues. The variables obtained from the radiographs showed significant correlations with the seed quality parameters. The relative and integrated densities were, among the variables obtained from X-ray images, those that stood out to predict the physiological potential of the seeds. It is concluded that the automated analysis of radiographic images is a simple, free and fast procedure that allows to extract information about the physical characteristics of the seeds and generate parameters related to the physiological quality of the seeds.

KEYWORDS: Cucumis melo L.; seed radiography; relative density; automated image analysis.

INTRODUÇÃO

A introdução de técnicas modernas, de alta performance, capazes de gerar resultados consistentes de forma rápida, menos subjetiva e não-destrutiva, apresenta grande potencial para avaliação segura da qualidade de produtos agrícolas, em especial de sementes.

A qualidade das sementes é de grande importância na otimização do custo do estabelecimento das culturas (Rahman & Cho, 2016), uma vez que contribui de forma significativa para o estabelecimento do estande e o desenvolvimento inicial das mudas no campo (Marcos-Filho, 2016). Assim, a correta avaliação da qualidade de lotes comerciais de sementes torna-se indispensável para o sucesso do empreendimento agrícola.

A cultura do melão gerou para o Brasil, no ano de 2017, uma receita superior a cem milhões dólares em exportações (MAPA, 2018) e, sem dúvida parte desses bons resultados são decorrentes do uso de sementes de boa qualidade na produção das mudas que são levadas ao campo. As sementes de melão híbrido são de alto valor agregado e, assim, a aplicação de tecnologias que permitam a avaliação da sua qualidade de forma não-destrutível são de interesse da indústria de sementes. Essas tecnologias poderiam ser utilizadas em programas de controle de qualidade durante a produção das sementes, sendo importantes para a tomada de decisão quanto ao descarte de lotes com baixa qualidade, o que significaria economia de tempo e recursos.

Dentre as técnicas que atendem a esta proposta está a análise baseada em radiação eletromagnética de raios X. Esta técnica, predominantemente usada em aplicações médicas, tem sido utilizada em várias outras áreas, incluindo inspeção de segurança e qualidade de produtos agrícolas (Mahajan et al., 2015). Com apenas alguns segundos (3-5 s), a imagem radiográfica pode ser gerada, sendo os sistemas de raios X de baixa energia (comprimentos de onda variando de 1 a 10 nm) os mais indicados para utilização em sementes, devido à capacidade de revelar diferenças na densidade interna (Rahman & Cho, 2016) e por não induzir mutações genéticas, nem afetar a germinação (Santos et al., 2009).

Resultados promissores já foram alcançados com uso da densitometria de raios X em sementes de melão (Gomes-Junior et al., 2012), porém, são escassos trabalhos mais robustos que comprovem sua eficiência e que possibilitem maiores avanços do ponto de vista prático para aplicação da técnica nesta cultura. Outras pesquisas recentes com uso de métodos baseados em imagens radiográficas demonstraram eficiência para avaliar a

qualidade de sementes de brócolis (Abud et al., 2018), jiló (Prado-Alves et al., 2018), citrumelo “Swingle” (Arruda et al., 2018), milho (Javorski et al., 2018), gergelim (Nogueira Filho et al., 2017), caju (Silva et al., 2017), abóbora (Antônio et al., 2016; Silva et al., 2014), crotalária (Arruda et al., 2016), tomate (Silva et al., 2013), maracujá (Severiano et al., 2018), entre outras culturas agrícolas.

No entanto, a análise visual das imagens radiográficas são morosas e podem gerar erros de leitura em razão das interpretações subjetivas (Medeiros et al., 2018). O desafio atual consiste em desenvolver métodos capazes de extrair informações relevantes das radiografias de sementes em larga escala de maneira rápida e robusta.

Abordagens baseadas em intensidade de pixels em radiografias foram relatados como promissores em trabalhos anteriores para identificar defeitos em sementes (Mathanker et al., 2013). Na imagem radiográfica digital, os pixels assumem valores numéricos entre 0 (preto absoluto) e 255 (branco absoluto) na escala de cinza. O valor médio de cinza quantificado dentro de uma seleção, chamado também de densidade relativa (Medeiros et al., 2018), foi reportado recentemente como uma variável conexas à integridade tecidual de sementes, relacionando-se com aspectos fisiológicos, como germinação e vigor (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018).

Avanços recentes no campo do processamento digital de imagens, assistidas por computador, têm contribuído para tornar possível esse tipo de abordagem em larga escala. Softwares de domínio público, como o ImageJ[®] têm apresentado perspectivas promissoras para atender a essa finalidade e proporcionar a automatização das análises de radiografias de sementes.

O ImageJ[®] é apresentado como o software de processamento de imagem mais rápido do mundo, escrito em Java puro (<https://imagej.nih.gov/ij/features.html>) (Miart et al., 2018; Schneider et al., 2012). Ele suporta uma ampla gama de formatos de arquivos e funciona em muitos sistemas operacionais. Além disso, o ImageJ[®] permite a criação de macros personalizáveis que contribuem para automatização de determinadas análises (Legland et al., 2017; Miart et al., 2018; Tello et al., 2018; Vasseur et al., 2018). Recentemente, o ImageJ[®] tem sido utilizado para aplicações semi-automatizadas na análise de imagens radiográficas de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg (Silva et al., 2013), *Moringa oleifera* Lam. (Noronha et al., 2018), *Brassica oleracea* L. (Abud et al., 2018) e *Leucaena leucocephala* (Medeiros et al., 2018).

Considerando que o rápido desenvolvimento tecnológico indica maiores oportunidades para a inspeção por raios X no setor agrícola, esta pesquisa teve como

objetivo relacionar parâmetros obtidos a partir da análise gratuita e automatizada de radiografias digitais de sementes de melão híbrido ao potencial fisiológico de suas sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido nos Laboratórios de Análise de Sementes e Análise de Raios X, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas sementes de três híbridos de melão, Bazuca F1 (cantaloupe americano), Goldex F1 (amarelo) e Pampa F1 (cantaloupe italiano), provindas de amostras de lotes, da safra de 2017, produzidos em campos de produção de sementes da empresa AGRISTAR, cada um representado por dez lotes de sementes. As sementes foram submetidas às seguintes análises:

1. Análises Físicas:

1.1. Teor de água: as sementes foram inicialmente submetidas à determinação do teor de água, pelo método da estufa a 105 ± 3 °C durante 24 horas, com base nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009); para esse fim, foram utilizadas duas subamostras de 5 g de sementes para cada lote. Os resultados foram expressos em percentagem (base úmida, b.u.).

1.2. Teste de raios X: para a análise da morfologia interna das sementes, foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes de cada lote. As sementes foram posicionadas com o eixo embrionário voltado para baixo e fixadas de forma ordenada sobre papel adesivo, para possibilitar posterior identificação individual nas análises subsequentes. Em seguida, as sementes foram colocadas no interior do equipamento de raios X digital Faxitron, modelo MX-20 (Faxitron X-ray Corp. Wheeling, IL, U.S.A). Para gerar as imagens radiográficas, o equipamento foi configurado com o tempo de exposição à radiação de 10 segundos, tensão de 23 kV, distância focal de 41,6 cm e contraste da imagem calibrado em 16383 (width) x 3124 (center). As imagens digitais geradas foram salvas em computador no formato TIFF, processadas e analisadas em seguida.

1.2.1. Análise automatizada das radiografias: para a análise automatizada das imagens foi desenvolvida uma macro (análise sequencial automática), denominada de PhenoXray (anexo I), para software ImageJ[®]. A macro permitiu processar as imagens de forma automática, sendo necessário apenas indicar a pasta contendo todas as imagens, devidamente identificadas (lote e repetição), no software ImageJ[®]. A análise consistiu na segmentação das imagens utilizando-se o modo Threshold do ImageJ[®]. O limite (threshold) foi definido automaticamente utilizando o método automatic multilevel thresholding de Yen (Yen et al., 1995) para segmentar as imagens nas regiões correspondentes às sementes de melão. As regiões de interesse foram então analisadas a

partir do comando Analyze Particles, que integra o software ImageJ®. Apenas partículas com uma área de superfície entre 594 e 2.376 pixels² foram consideradas, o que foi suficiente para selecionar as áreas correspondentes às sementes e ignorar áreas com ruídos nas imagens.

Os parâmetros obtidos a partir das imagens foram:

Área - área de seleção obtida em pixels quadrados e convertidas posteriormente em unidades de milímetros quadrados (mm²).

Perímetro - o comprimento em milímetros do limite externo da seleção.

Circularidade - obtida por meio da equação: $C = 4\pi * \frac{\text{área}}{(\text{perímetro})^2}$. Nesta equação, valores iguais a 1,0 indicam um círculo perfeito e à medida que os valores tendem a 0 sugerem uma forma alongada.

Densidade relativa (cinza médio): definida como a soma dos valores cinza de todos os pixels na área selecionada dividida pelo número de pixels da seleção, expressa em cinza.pixel⁻¹.

Densidade Integrada: a soma dos valores dos pixels na imagem ou seleção, isto é equivalente ao produto de área e densidade relativa, expressa em cinza.mm².pixel⁻¹.

Preenchimento: percentagem de área da semente efetivamente preenchida por material de alta densidade.

Após o processamento das imagens, os resultados das medições foram salvos em um arquivo no formato TXT. Além disso, arquivos no formato JPEG correspondentes à análise das imagens foram criados no mesmo diretório, o que permitiu checar o desempenho da macro no processamento das imagens.

2. Análises Fisiológicas:

2.1. Teste de germinação: conduzido em rolos de papel para germinação com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco e mantidos em germinador com temperatura constante de 25°C (Brasil, 2009). Foram utilizadas as mesmas sementes submetidas ao teste de raios X, mantendo-se o mesmo arranjo de sementes originalmente utilizado no teste anterior. Foram realizadas contagens diárias do número de sementes apresentando protrusão radicular e de sementes germinadas (plântulas normais) até o oitavo dia após a montagem do teste. A partir desses dados foram calculados o índice de velocidade de germinação (IVG), a velocidade de protrusão radicular (VPR) e a sincronia, conforme fórmulas descritas em Silva et al. (2019). Todas as variáveis obtidas com base no teste de germinação foram calculadas por meio da

utilização da função Germcalc, contida no pacote SeedCalc do software R (Silva et al., 2018).

2.2. Análise de plântulas: após a última contagem do teste de germinação, as plântulas e sementes não germinadas de cada repetição foram escaneadas e as imagens geradas foram avaliadas no software ImageJ[®]. As imagens foram utilizadas para medir o comprimento da parte aérea e da raiz primária das plântulas, expressos em mm.plântula⁻¹. Os dados de comprimento foram processados com o pacote SeedCalc do R (Silva et al., 2018), por meio da função Plantcalc, sendo calculados os parâmetros: comprimento total das plântulas e os índices de uniformidade (Castan et al., 2018), vigor (Sako et al., 2001) e vigor corrigido (Medeiros e Pereira, 2018).

Delineamento e análise estatística: o experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Depois de confirmar a distribuição normal dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). Posteriormente, os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) foram calculados para todas as combinações entre os testes de avaliação da qualidade fisiológica e física das sementes, em que a significância dos valores de r foi determinada pelo teste t ($P \leq 0,05$). Foi realizada também a análise de componentes principais. O software utilizado nas análises estatísticas foi o R, versão 3.5.1 (R Core Team, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As configurações do equipamento de raios X adotadas neste estudo combinada à baixa variação do teor de água entre os lotes avaliados de cada cultivar (cv. Bazuca F1: 8,1 a 8,8%; cv. Goldex F1: 8,0 a 8,9%; cv. Pampa F1: 7,8 a 8,7%), possibilitaram boa visualização das principais estruturas internas das sementes, assim como a identificação de malformação embrionária e danos físicos (Figura 1).

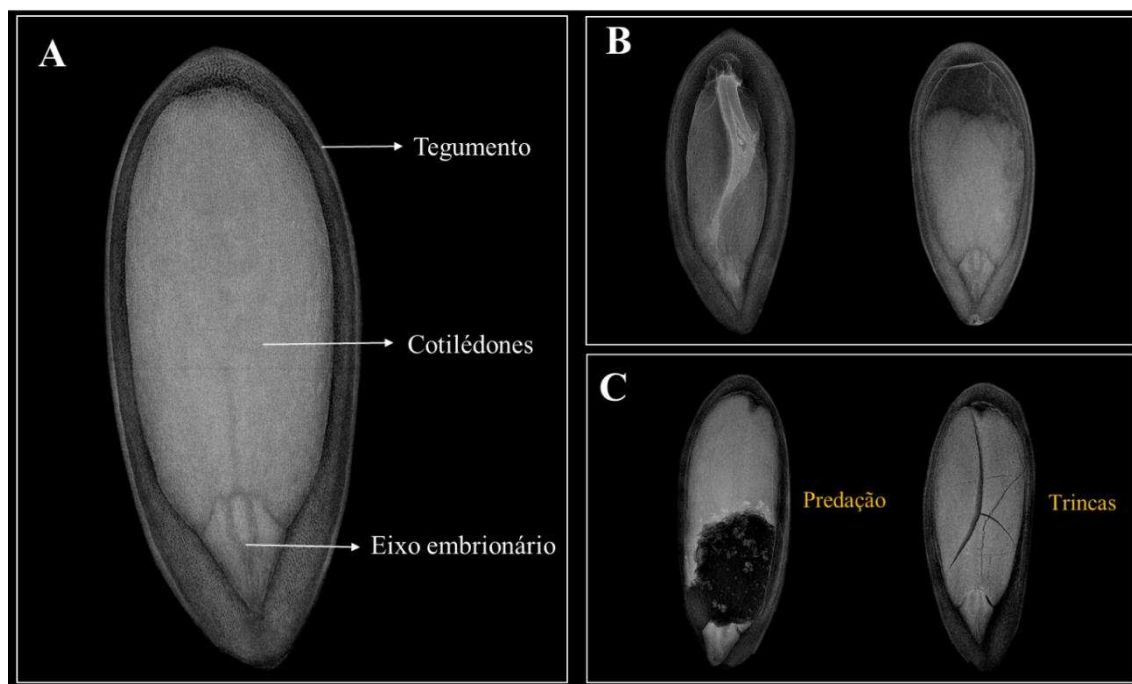


Figura 1. Imagens radiográficas de sementes de melão com indicações das estruturas internas em uma semente bem formada (A), sementes com visível malformação embrionária (B) e com danos físicos (C).

O teor de água das sementes tem alta relação com a densidade óptica da radiografia, uma vez que, teores de água elevados nas sementes diminuem a absorção de radiação pelos tecidos, dificultando a visualização detalhada da morfologia interna (Simak, 1991). Portanto, a uniformidade no teor de água das sementes entre lotes é necessária para comparação de parâmetros relacionados à densidade tecidual em níveis de cinza das radiografias, sem que esta seja comprometida por este fator. Estudos realizados com análise de raios X em sementes de abóbora (Silva et al., 2014), pimentão (Gagliardi & Marcos-Filho, 2011), maracujá (Severiano et al., 2018), melancia e melão (Gomes-Junior et al., 2012) demonstraram a possibilidade de visualização adequada da morfologia interna das sementes com teores de água entre 6,5% e 12%.

Além do teor de água, o nível de detalhamento das estruturas internas das sementes na imagem radiográfica pode ser afetado por outros fatores intrínsecos de cada espécie, como a sua constituição química (Arruda et al., 2016; Simak, 1991). Em sementes de gergelim, o teste de raios X não permitiu a determinação do nível de desenvolvimento das estruturas internas de sementes, o que, de acordo com os autores se deve ao seu elevado teor de óleo, típico de sementes oleaginosas (Nogueira Filho et al., 2017). No entanto, como demonstrado na Figura 1, em sementes de melão, cujo teor de óleo situa-se dentro dos limites de 25,2 a 44,8% (Bouazzaoui & Mulengi, 2018; Ibeto et al., 2012; Malacrida et al., 2007; Petkova & Antova, 2015), foi possível a visualização com alto grau de detalhamento da morfologia interna das sementes, com fácil identificação visual de sementes com preenchimento incompleto e malformação embrionária (Figura 1B), bem como danos físicos ocasionados por predação por insetos e trincas, possivelmente decorrentes do processo de beneficiamento ou secagem (Figura 1C). Assim, é possível constatar que o teste de raios X por si só é uma ferramenta adequada para estudos com sementes oleaginosas, como o melão, permitindo uma análise acurada sobre a qualidade física das sementes pela simples avaliação visual das imagens por parte do analista.

Embora a avaliação pelo analista da radiografia seja a abordagem mais simples e mais sensível, é um processo trabalhoso, demorado e sujeito a erros inerentes à sua subjetividade. Na Tabela 1 são apresentadas as variáveis obtidas com o uso da macro PhenoXray do ImageJ[®], que permitiu a total automatização da análise das radiografias das sementes dos 30 lotes de melão híbrido utilizados. Foram observadas diferenças estatísticas para maioria das variáveis analisadas, exceto para densidade relativa e perímetro, entre os lotes das cultivares Goldex F1 e Pampa F1, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros físicos obtidos por meio da análise automatizada de imagens radiográficas de 30 lotes de sementes de melão híbrido com uso da macro PhenoXray.

Lote	Área mm ²	Perímetro mm	Circularidade	Densidade Relativa cinza.pixel ⁻¹	Densidade Integrada cinza.mm ² .pixel ⁻¹	Preenchimento %
Bazuca F1						
1	34.56 b	29.69 d	0.496 a	94.29 a	3261 b	99.03 a
2	35.29 b	31.28 c	0.460 b	92.15 a	3254 b	98.85 a
3	30.18 c	31.92 c	0.401 c	88.63 b	2678 c	98.52 a
4	30.79 c	39.14 b	0.295 d	85.73 b	2637 c	96.51 b
5	39.50 a	32.50 c	0.474 b	97.04 a	3833 a	98.88 a
6	38.12 a	41.35 a	0.309 d	87.27 b	3328 b	95.27 c
7	38.05 a	42.38 a	0.302 d	85.72 b	3263 b	95.04 c
8	37.34 a	40.07 b	0.317 d	89.58 b	3344 b	95.69 c
9	38.35 a	41.05 a	0.314 d	88.61 b	3399 b	95.50 c
10	30.97 c	33.11 c	0.389 c	80.00 c	2479 c	94.06 d
Fc	46.60*	52.08*	65.51*	10.01*	28.60*	78.53*
CV	3.28	4.23	5.78	3.83	5.55	0.49
Goldex F1						
11	43.11 a	37.04 c	0.408 a	95.1	4102 a	98.23 a
12	41.67 b	38.18 c	0.395 a	88.76	3706 b	97.99 a
13	43.50 a	36.67 c	0.420 a	91.19	3970 a	97.54 a
14	43.37 a	35.84 c	0.441 a	93.69	4062 a	98.37 a
15	43.80 a	36.07 c	0.445 a	89.28	3914 a	98.06 a
16	42.50 b	49.80 b	0.254 b	88.31	3762 b	94.26 c
17	41.93 b	50.32 b	0.243 b	86.32	3622 b	93.56 c
18	42.46 b	49.88 b	0.266 b	87.01	3707 b	93.97 c
19	43.89 a	46.89 b	0.287 b	92.89	4081 a	96.28 b
20	42.51 b	53.60 a	0.234 b	84.54	3603 b	93.83 c
Fc	4.11*	30.40*	25.24*	1.50 ^{ns}	2.27*	84.26*
CV (%)	1.99	6.76	11.71	6.95	7.5	0.52
Pampa F1						
21	29.19 d	37.17	0.349 b	90.78 b	2665 b	95.82 a
22	34.26 b	37.38	0.333 b	91.43 b	3136 a	94.43 b
23	32.52 c	34.67	0.356 b	97.97 a	3195 a	95.77 a
24	34.25 b	34.4	0.376 a	102.15 a	3502 a	96.44 a
25	35.17 b	35.03	0.382 a	99.89 a	3531 a	96.12 a
26	37.31 a	35.5	0.399 a	88.69 b	3313 a	96.57 a
27	36.67 a	34.59	0.409 a	89.66 b	3291 a	96.8 a
28	37.27 a	35.13	0.403 a	89.01 b	3324 a	96.85 a
29	38.00 a	35.9	0.399 a	89.40 b	3402 a	96.83 a
30	32.10 c	40.6	0.288 b	78.80 c	2532 b	95.01 b
Fc	42.50*	1.04 ^{ns}	3.69*	4.54*	9.54*	5.39*
CV(%)	2.77	11.58	12.06	7.7	7.62	0.82

Letra minúscula = agrupamento dentro de cada coluna para cada avaliação pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05); *, ^{ns} = significativo e não significativo pelo teste de F (P < 0,05), respectivamente; Fc = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação.

Pela análise do tamanho e forma (área, perímetro e circularidade) ficou evidente as diferentes características observadas entre as sementes dos lotes da mesma cultivar, o que foi confirmado pela diferença significativa entre os valores obtidos. Para a cultivar Bazuca F1, os valores de área, perímetro e circularidade variaram de 30,2 a 39,5 mm², 29,7 a 42,4 mm e 0,30 a 0,50, respectivamente. As sementes da cultivar Goldex F1 apresentaram maiores áreas em valor absoluto em relação às demais cultivares, com variação observada de 41,7 a 43,9 mm², o perímetro e a circularidade, por sua vez, variaram de 35,8 a 53,6 mm², 0,23 a 0,45, respectivamente. Por fim, a cultivar Pampa F1 apresentou variação de 29,2 a 38,0 mm² de área, 34,4 a 40,6 mm de perímetro (os lotes não diferiram quanto a este parâmetro) e 0,29 a 0,41 de circularidade.

De acordo com Tanabata et al. (2012), as informações da avaliação quantitativa da forma e tamanho das sementes, quando obtidas por metodologia confiáveis e de alta produtividade, podem beneficiar diversos campos de pesquisa de plantas, como programas de melhoramento genético, atuando paralelamente em estudos de análise funcional e melhoramento de culturas assistidas por genômica. Além disso, estudos têm demonstrado estreita relação entre essas características e o vigor de plântulas (Abud et al., 2018; Javorski et al., 2018; Lafond & Baker, 1986; Medeiros et al., 2018), pois a variabilidade de tamanho e forma das sementes pode estar relacionada ao ambiente em que foram produzidas e com a maturação.

As variáveis densidade relativa, densidade integrada e preenchimento permitiram estratificar de dois a quatro grupos os dez lotes de cada cultivar avaliada. As densidades relativa e integrada são variáveis utilizadas apenas recentemente em pesquisas com sementes, ainda pouco reportadas, porém com grande potencial para avaliação de lotes (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018). Por outro lado, a variável preenchimento já foi avaliada em um maior número de trabalhos (Gomes-Junior et al., 2013; Silva et al., 2013), porém não de forma totalmente automatizada por meio do uso do software ImageJ[®]. Essas variáveis, calculadas por meio dos valores de cinza de cada pixel da imagem, oferecem uma ideia da resistência que um determinado tecido apresenta à passagem dos raios X, uma vez que os fótons em um feixe de raios X, podem ser transmitidos, espalhados (dispersão de Compton) ou absorvidos (colisão fotoelétrica) quando colidem sobre um objeto (Kotwaliwale et al., 2014). Assim, maiores densidades de cinza indicam tecidos mais densos, ou seja, há maior impedimento a passagens dos raios X.

Diversos autores ressaltam que a avaliação de aspectos como a cavidade interna ocupada pelo embrião, a presença de danos mecânicos, manchas que indicam

deterioração tecidual ou malformações das sementes é necessária em estudos com raios X em sementes (Forti et al., 2010; Gomes-Junior et al., 2013; Gomes et al., 2014; Marchi & Gomes Junior, 2017; Noronha et al., 2018). No entanto, de acordo com Medeiros et al. (2018), todas essas características são de certa forma representadas pela densidade relativa, uma vez que, sementes deterioradas ou com menor preenchimento, conferem menores níveis de cinza na imagem radiográfica. Assim, a imagem apresenta menores níveis de radiopacidade (claro) e maiores níveis de radioluminescência (escuro), que podem ser quantificados por meio da densidade relativa.

É importante frisar que para uma comparação entre densidades relativas nas sementes advindas de diferentes radiografias, o contraste utilizado pelo equipamento na calibração da imagem (ajuste de width e center) precisa ser padronizado em todas elas. Além disso, a densidade relativa é influenciada por outros objetos com maior densidade que estejam inseridos com as sementes na aquisição da imagem, como resquícios de frutos, pedras e outros tipos de impurezas. Outro ponto importante, é que diferentes sistemas de raios X, mesmo utilizando configurações análogas de energia e corrente elétrica podem não produzir resultados semelhantes, em razão dos tipos de detectores de raios X utilizados (Kotwaliwale et al., 2014).

Com a variável preenchimento, que representa a percentagem de área da semente efetivamente preenchida por material de alta densidade, notamos que o menor valor médio observado foi de 93,6, o que indica alta uniformidade de preenchimento embrionário das sementes dos lotes estudados. Silva et al. (2013) também utilizaram a variável preenchimento para quantificar a área vazia de sementes de *Acca sellowiana*, e com isso observaram estreita relação entre o espaço vazio das sementes com sua qualidade fisiológica. Outros softwares como Tomato Analyzer[®] e o Image Pro Plus[®] também foram utilizados com êxito para quantificar o preenchimento de sementes de outras espécies (Gomes-Junior et al., 2013; Marcos Filho et al., 2010; Silva et al., 2012).

Embora os parâmetros físicos gerados a partir da análise das imagens de raios X sejam, a princípio, interessantes e eficientes em diferenciar os lotes, é necessário checar os dados de qualidade fisiológica das sementes dos respectivos lotes para realizar uma inferência precisa sobre uma possível relação dessas variáveis com o potencial fisiológico.

Na Tabela 2 estão apresentadas as variáveis obtidas por meio da avaliação do potencial fisiológico das sementes de melão. Foram detectadas diferenças estatísticas para

maioria das variáveis, exceto para variável sincronia de germinação, entre os lotes da cultivar Pampa F1.

Tabela 2. Valores médios dos dados obtidos na avaliação do potencial fisiológico de sementes de 30 lotes de melão híbrido.

Lote	Germinação %	Protrusão radicular	IVG	VPR	Sincronia	Comprimento de plântula mm	Uniformidade	Vigor Índice	Vigor corrigido
Bazuca F1									
1	95 a	100 a	6.33 a	11.8 b	1.00 a	9.24 c	892 a	770 b	731 b
2	94 a	100 a	6.27 a	14.2 a	1.00 a	9.50 c	871 a	768 b	722 b
3	95 a	97 a	6.18 a	12.0 b	0.90 b	9.41 c	868 a	763 b	725 b
4	86 b	90 b	5.54 b	10.9 b	0.84 b	8.08 d	790 b	678 c	583 c
5	97 a	98 a	6.30 a	11.4 b	0.88 b	9.47 c	882 a	772 b	749 b
6	94 a	99 a	5.97 a	11.2 b	0.69 c	12.56 a	835 b	857 a	806 a
7	85 b	100 a	5.23 b	10.6 b	0.60 c	11.45 b	817 b	809 b	688 b
8	95 a	99 a	5.90 a	10.0 b	0.61 c	12.35 b	856 a	860 a	817 a
9	93 a	99 a	5.57 a	11.0 b	0.54 d	11.86 a	866 a	848 a	789 a
10	64 c	76 c	3.75 c	7.4 c	0.47 d	8.96 c	660 c	644 c	412 d
Fc	9.15*	23.38*	16.44*	13.73*	17.67*	28.30*	12.46*	14.05*	52.51*
Cv (%)	8.15	3.65	7.55	9.3	13.8	6.53	5.2	5.58	5.36
Goldex F1									
11	98 a	100 a	6.45 a	19.3 a	0.91 a	13.36 a	864 a	899 a	881 a
12	98 a	99 a	6.14 a	18.5 a	0.67 b	10.83 b	864 a	811 b	795 b
13	96 a	100 a	6.19 a	17.4 b	0.82 a	12.41 a	857 a	863 a	828 b
14	99 a	100 a	6.26 a	18.2 a	0.69 b	12.66 a	874 a	880 a	871 a
15	93 a	98 a	5.77 b	17.4 b	0.60 b	12.00 b	816 b	828 b	770 b
16	89 b	99 a	5.62 b	14.1 c	0.65 b	11.36 b	795 b	795 b	708 c
17	89 b	98 a	5.75 b	12.4 d	0.79 a	11.79 b	813 b	819 b	729 c
18	85 b	100 a	5.47 b	14.6 c	0.75 b	11.23 b	748 c	767 b	652 d
19	91 b	97 a	6.02 a	12.0 d	0.94 a	11.93 b	806 b	820 b	747 c
20	84 b	93 b	5.30 b	9.1 e	0.65 b	10.84 b	747 c	753 b	633 d
Fc	4.18*	3.89*	4.48*	57.22*	4.88*	3.45*	4.66*	3.87*	15.54*
Cv (%)	7.11	2.26	7.31	6.51	15.49	8.28	5.86	6.44	6.32
Pampa F1									
21	96 a	100 a	6.24 a	19.4 a	0.88	11.77 c	849 b	836 b	803 b
22	94 a	97 b	5.98 b	18.4 b	0.78	11.50 d	809 b	807 c	759 c
23	97 a	100 a	6.29 a	19.7 a	0.86	12.96 b	816 b	861 b	836 b
24	100 a	100 a	6.61 a	20.0 a	0.94	14.54 a	917 a	967 a	967 a
25	98 a	100 a	6.44 a	18.0 b	0.92	13.93 a	898 a	936 a	918 a
26	91 b	99 a	5.88 b	19.0 a	0.78	12.11 c	778 c	813 c	740 c
27	87 b	99 a	5.55 b	19.2 a	0.71	11.41 d	758 c	778 c	677 d
28	97 a	100 a	6.28 a	18.8 a	0.79	12.43 c	825 b	848 b	822 b
29	97 a	100 a	6.35 a	17.6 b	0.87	12.25 c	840 b	849 b	823 b
30	92.5 b	100 a	6.00 b	10.7 c	0.81	10.70 d	815 b	782 c	719 c
Fc	4.05*	2.69*	4.93*	62.49*	1.83 ^{ns}	11.93*	6.40*	9.32*	21.18*
Cv (%)	4.51	1.33	5.05	4.22	14.07	6.14	5.2	5.35	5.34

Letra minúscula = agrupamento dentro de cada coluna para cada avaliação pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); *, ^{ns} = significativo e não significativo pelo teste de F ($P < 0,05$); Fc = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação.

Pela porcentagem de germinação, sendo esta considerada o percentual de plântulas normais no final de oito dias após a montagem do teste, foi possível constatar que todos os lotes, exceto o lote 10, apresentaram valores maiores que 80% de germinação, sendo este o valor mínimo estabelecido para comercialização de sementes de melão no Brasil (Brasil, 2012), o que indica alta viabilidade dos lotes utilizados nesta pesquisa. Para protrusão radicular, foi observado o mesmo padrão obtido para os dados de germinação, no entanto, os valores foram em geral maiores em razão da avaliação considerar apenas a emissão da radícula ($> 2\text{mm}$), não culminando necessariamente na formação de uma plântula normal.

Para os dados dos índices de velocidade de germinação (IVG), velocidade de protrusão radicular (VPR) e sincronia, observa-se agrupamento em três, três e quatro níveis para a cultivar Bazuca F1, dois, cinco e dois níveis para a cultivar Goldex F1 e dois, quatro e um níveis para a cultivar Pampa F1, respectivamente. Esses resultados indicam diferenças significativas no sincronismo de germinação e nas taxas de velocidade de germinação e protrusão radicular entre os lotes. De acordo com Marcos-Filho (2016) essa é uma informação importante, uma vez que a emergência irregular de plântulas pode levar a atrasos no desenvolvimento e variações no crescimento das plantas em vários estágios fenológicos, afetando também a colheita.

A análise de imagem de plântulas utilizando-se o software ImageJ[®] possibilitou a identificação de diferenças no crescimento e uniformidade das plântulas dos diferentes lotes, expressa por meio do comprimento de plântula e índices de uniformidade, vigor e vigor corrigido (Tabela 2). Para a cultivar Bazuca F1 e Pampa F1 foi observado que a variável comprimento de plântula foi mais sensível que o teste de germinação para detectar diferenças entre os lotes. Nota-se ainda que para alguns lotes que apresentaram alta porcentagem de germinação (e.g. lote 1, 2, 3, 5), foram observados menores valores de comprimento médio de plântula, o que demonstra alta viabilidade dos lotes, porém esse menor crescimento pode ser um indicativo de baixo vigor.

Por meio do índice de uniformidade de plântulas (Tabela 2) foi observado que alguns lotes com menor desempenho no comprimento médio de plântula apresentaram elevada uniformidade no seu desenvolvimento, ou vice-versa, i.e. lote 1 e lote 6, respectivamente. Outros autores destacaram que a uniformidade do desenvolvimento de plântulas é uma característica que deve ser levada, em consideração na avaliação de lotes de sementes, pois pode fornecer informações úteis sobre o grau de deterioração, potencial

de crescimento inicial e uniformidade de emergência de plântulas (Leão-araújo et al., 2017; Medeiros et al., 2018; Silva et al., 2017).

Para o índice de vigor (Tabela 2), que leva em consideração a taxa de crescimento e uniformidade de plântulas, foram confirmados os resultados acima que destacaram diferenças de potencial fisiológico em pelo menos dois níveis para cultivar Goldex F1 e em três níveis para as demais cultivares. O índice de vigor corrigido, que consiste no produto do índice de vigor com a porcentagem de germinação, foi suficientemente sensível para detectar diferenças em pelo menos quatro níveis de vigor entre os lotes das três cultivares estudadas. Para Medeiros e Pereira (2018), o índice de vigor corrigido faz um balizamento mais eficiente dos resultados do índice de vigor proposto por Sako et al. (2001), uma vez que realiza um ajuste baseado na germinação, oferecendo um resultado mais representativo do potencial fisiológico das sementes.

De forma geral, os dados obtidos para os diferentes lotes e cultivares indicam diferenças na qualidade fisiológica das sementes, ou seja, diferenças na porcentagem de germinação e no vigor (Tabela 2). Também foram observadas diferenças significativas entre os lotes, das três cultivares, quando considerados os parâmetros físicos obtidos a partir das imagens de raios X, como densidade relativa, densidade integrada e preenchimento (Tabela 1). No entanto, visando verificar possíveis relações entre as variáveis físicas, obtidas pela análise automatizada de radiografias, com as variáveis de ordem fisiológica, obtidas por meio do teste de germinação e de crescimento de plântulas, foi realizada uma análise de correlação, apresentada na Figura 2.

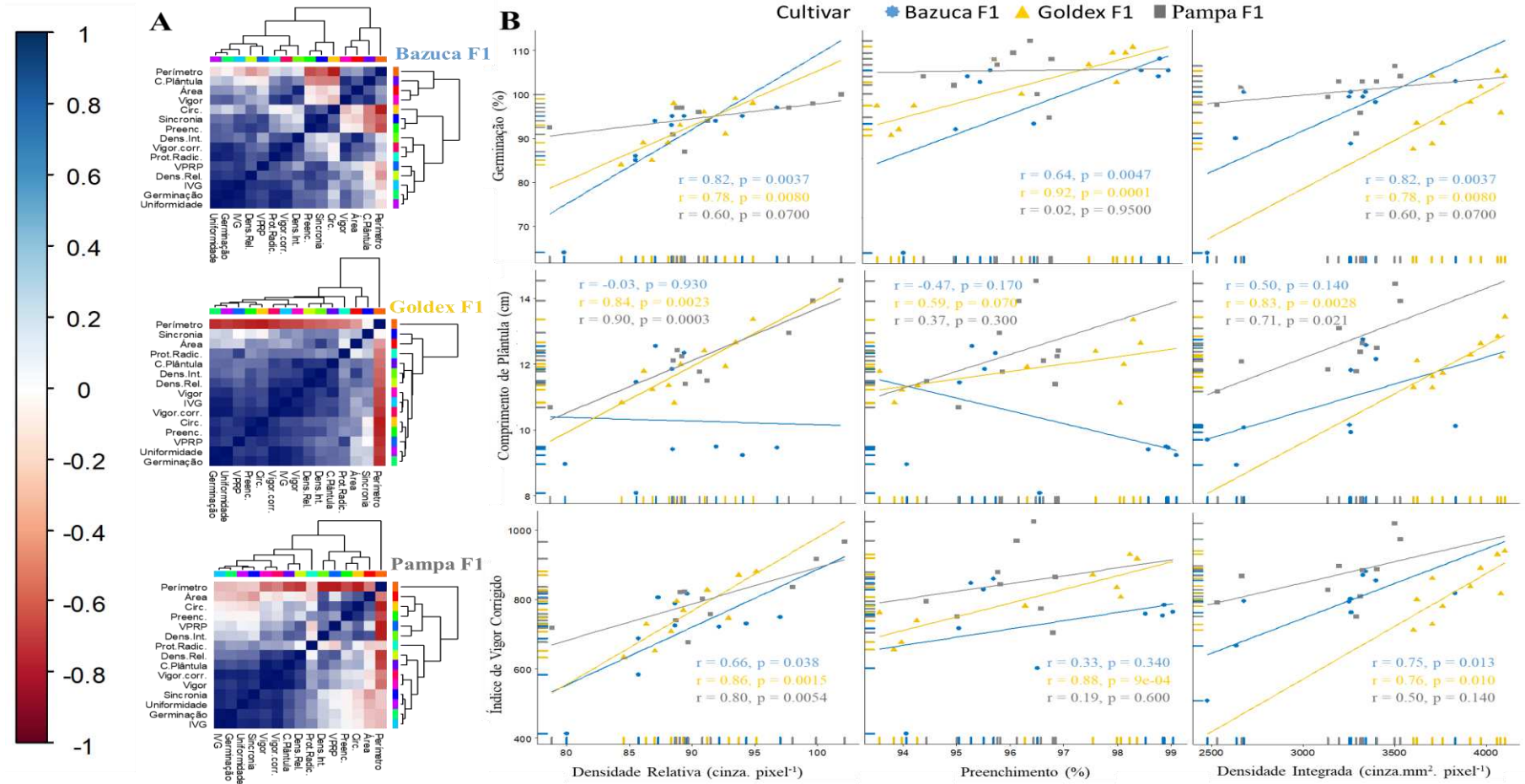


Figura 2. Correlação de Pearson representada por heatmap (A) e por curvas (B) entre as variáveis geradas da análise automatizada das radiografias e da avaliação da germinação e comprimento de plântulas para cada cultivar de melão híbrido.

Foram observadas correlações significativas ($P < 0,05$) de alguns descritores de tamanho e forma com a qualidade fisiológica. Para cultivar Bazuca F1, a área da semente apresentou correlação com o comprimento de plântula ($r = 0,71$), índice de vigor ($r = 0,77$) e vigor corrigido ($r = 0,67$). Já o perímetro e a circularidade correlacionaram-se apenas com a sincronia de germinação ($r = -0,65$ e $r = 0,67$, respectivamente). Para a cultivar Goldex F1, apenas o perímetro e a circularidade apresentaram correlações com as variáveis de qualidade fisiológica (e.g. germinação: $r = -0,92$ e $r = 0,87$; IVG: $r = -0,82$ e $r = 0,75$; VPR: $r = -0,91$ e $r = 0,88$; uniformidade: $r = -0,86$ e $r = 0,80$; vigor: $r = -0,81$ e $r = 0,76$; vigor corrigido: $r = -0,89$ e $r = 0,85$, respectivamente). Por fim, para a cultivar Pampa F1 houve correlação significativa apenas da VPR com o perímetro e a circularidade ($r = -0,86$ e $r = 0,68$, respectivamente).

Evidencia-se também fortes e significativas correlações entre as variáveis relacionadas à densidade tecidual e o preenchimento das sementes com as variáveis de qualidade fisiológica (Figura 2). Em geral, as respostas para as cultivares não seguiram a mesma tendência, que pode ser explicada pelas diferentes características dos lotes utilizados de cada cultivar. Para Pampa F1, por exemplo, os lotes apresentaram reduzida variação na porcentagem de germinação e uma ampla variação no vigor, constatado por diferenças mais evidentes no comprimento de plântulas, o que pode ter levado a menor correlação das variáveis do raios X com a germinação ($r < 0,60$) e maiores correlações com as variáveis relacionadas ao comprimento de plântula (e.g. densidade relativa: $r = 0,90$).

As altas correlações observadas para os parâmetros densidade relativa, densidade integrada e preenchimento com as variáveis fisiológicas são importantes indicadores para a validação da metodologia de análise automatizada de imagens de raios X para avaliar a qualidade das sementes. Abud et al. (2018) e Medeiros et al. (2018) também observaram elevadas correlações entre a variável densidade relativa, obtidas a partir de radiografias de sementes de brócolis e leucena, respectivamente, com variáveis de qualidade fisiológica, em especial o comprimento de plântula, indicando que o uso desse parâmetro é promissor para estimar o potencial fisiológico dessas sementes.

Na Figura 3 é possível observar exemplos da associação entre características físicas e a qualidade fisiológica de algumas sementes. Observa-se que tecidos mais íntegros geraram imagens mais opacas, com zonas de alta densidade (representada nas cores verde, amarelo e vermelho), pois a resistência à passagem dos raios X foi maior. Quando essas zonas de alta densidade foram uniformes por toda semente, a densidade

relativa permaneceu elevada e culminou no surgimento de plântulas mais vigorosas (Figura 3A). Por outro lado, sementes com tecidos de baixa integridade apresentaram densidades relativas menores, em razão da baixa resistência aos raios X, o que gerou zonas mais translúcidas ou escurecidas na radiografia (representadas nas cores azul e roxo), e que podem estar relacionados às plântulas menos desenvolvidas (Figura 3B). Em outros casos pode-se detectar danos físicos, como trincas ou predação por insetos, representados por faixas ou centros de baixa densidade, que levam a queda nos valores de densidade relativa. Porém, desde que esse dano não comprometa o eixo embrionário, a germinação pode ocorrer e levar ao desenvolvimento de plântulas normais (Figura 3C e 3D).

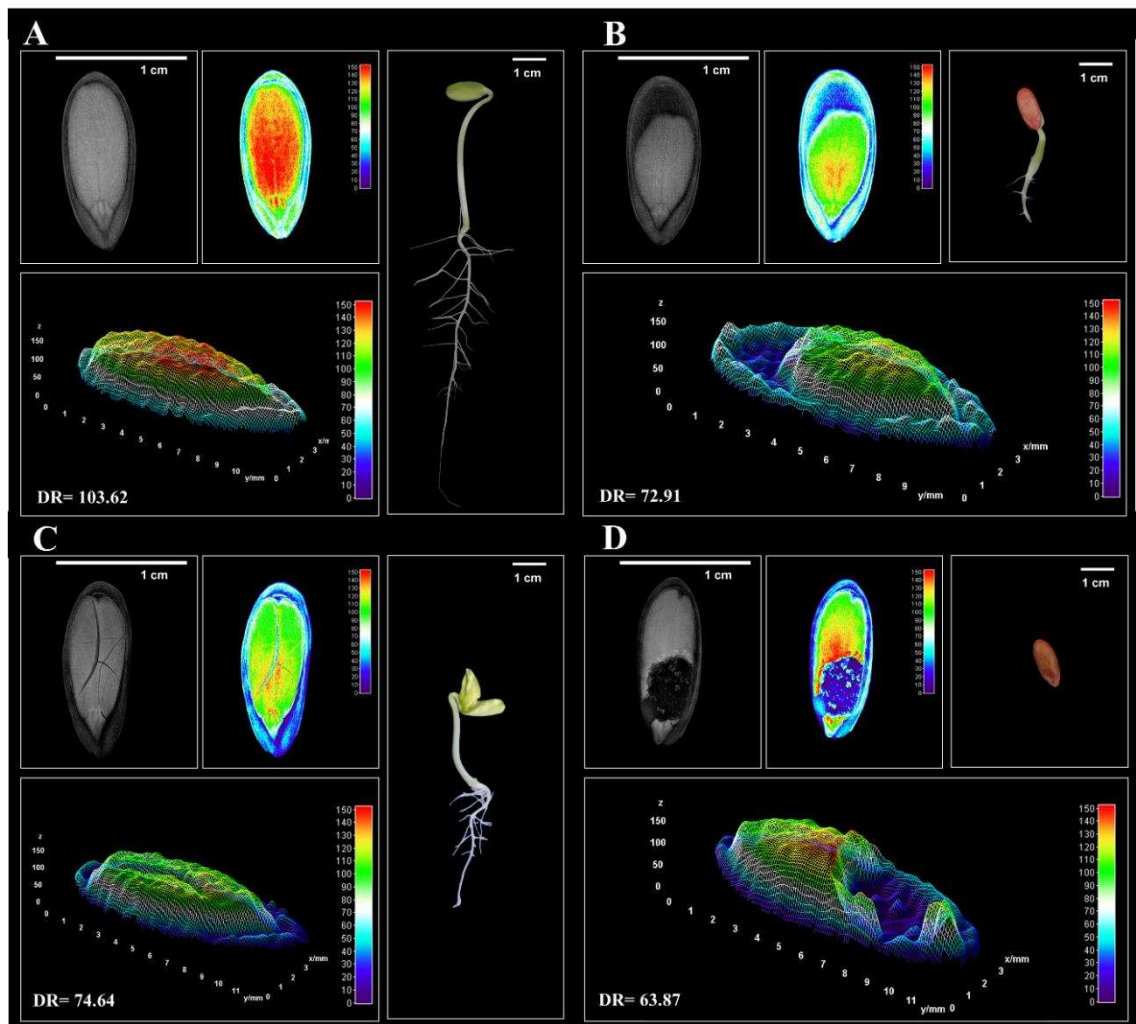


Figura 3. Imagens radiográficas de sementes de melão, combinadas a representações coloridas (2D e 3D) da densidade ao longo da semente e suas respectivas plântulas.

Segundo alguns autores, como Silva et al. (2014) e Severiano et al. (2018), essa relação observada na Figura 3 nem sempre é verdadeira, uma vez que sementes classificadas como bem formadas pela técnica de raios X podem dar origem a plântulas anormais e até mesmo consistirem em sementes mortas, já que a radiografia permite verificar se há ou não malformação do tecido, mas não estabelece necessariamente uma relação direta com os processos fisiológicos. Porém, neste trabalho foi possível inferir que mesmo que as variáveis físicas e fisiológicas não sejam 100% correlacionadas, ainda assim, existe uma forte associação entre elas, o que pode levar a avanços em procedimentos de pré-seleção de lotes por agricultores e pela própria indústria de sementes.

É importante destacar que o tempo gasto para análise de uma radiografia contendo 20 sementes, por meio da macro PhenoXray, foi de apenas 0,5 segundos (processador Intel Core i5-4200U CPU 1.60GHz). Com isso, percebe-se claramente que é um método rápido, reproduzível, padronizável, fácil e barato de se mensurar características físicas das sementes, o que segundo Huang et al. (2015) contribui para garantia de sementes de qualidade durante a semeadura.

A partir da análise multivariada de componentes principais (PCA), realizada utilizando-se o conjunto de dados obtidos para as três cultivares e as quinze características avaliadas, nota-se que os dois primeiros componentes (CP1 e CP2) explicaram 71,2% da variabilidade total dos dados. Assim, por meio de várias combinações lineares, foi possível reduzir de quinze dimensões para apenas duas, que explicaram um percentual significativo das observações (Figura 4).

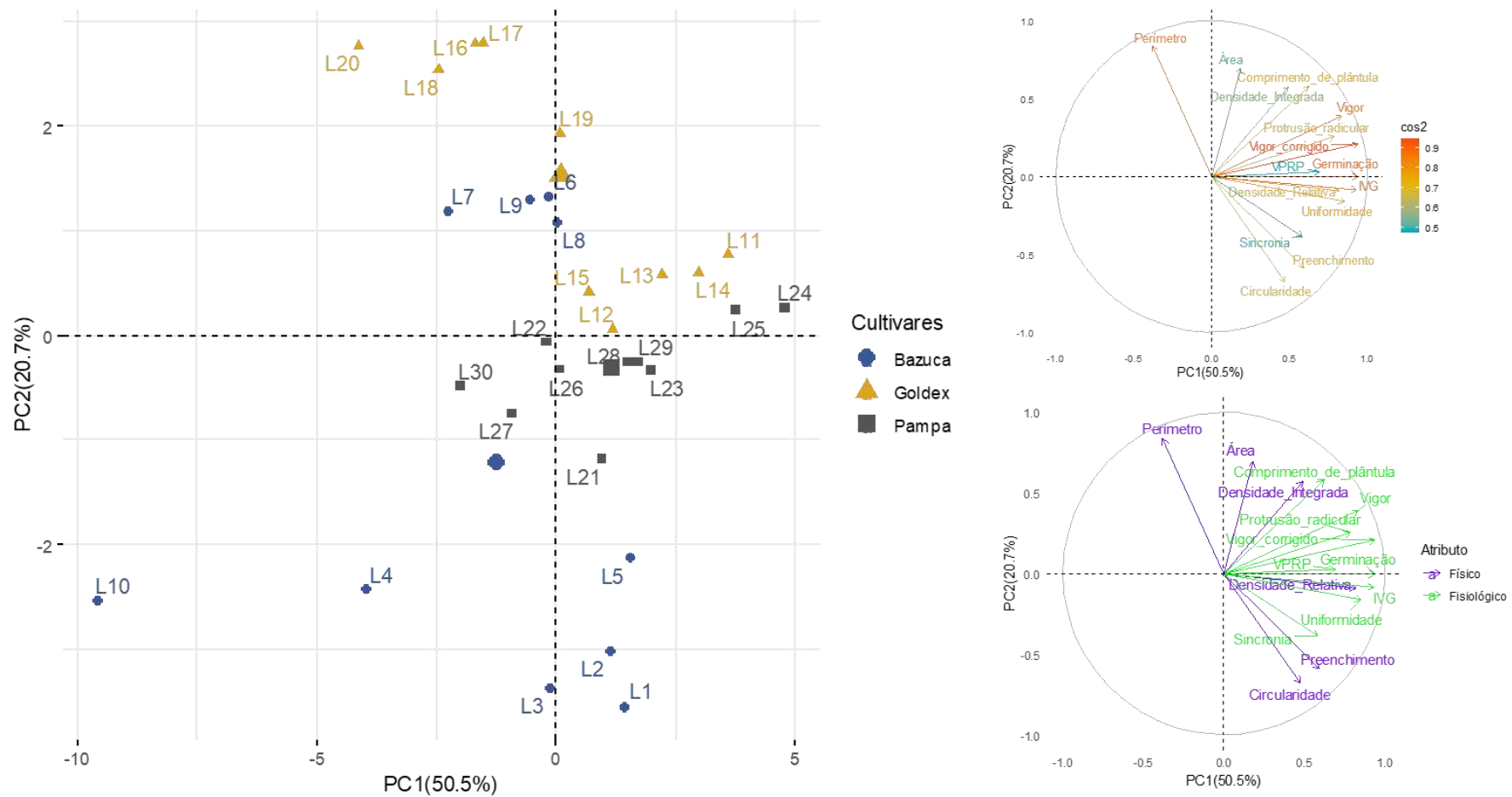


Figura 4. Gráfico biplot obtido pela combinação linear das variáveis relacionadas às características físicas e fisiológicas de 30 lotes de sementes de melão híbrido de três cultivares.

Observa-se que houve maior dispersão dos lotes da cultivar Bazuca F1 pelo diagrama de ordenação central, indicando a alta variabilidade entres os lotes para as características que constituíram a PCA. Em contraste, observou-se maior agrupamento dos lotes da cultivar Pampa F1, confirmando os resultados anteriores relacionados à uniformidade dos lotes desse híbrido, como observado para os dados obtidos nas análises físicas e fisiológicas (Tabelas 1 e 2). Em geral, os lotes que se situaram distantes e em posição oposta aos vetores de qualidade física e fisiológica (representados no círculo de correlações centrados no lado direito do diagrama de ordenação central), foram os que apresentaram menores valores para essas características.

No círculo de correlações (Figura 4) observa-se que os vetores que compreendem as variáveis obtidas da análise automatizada das radiografias situaram-se próximos dos vetores de qualidade fisiológica, apresentando, por sua vez, cargas fatoriais com distribuição semelhante nos componentes (Tabela 3). Esses resultados indicam alta correlação entre as características, como já demonstrado na matriz de correlações (Figura 3). Assim, estas variáveis foram eficientes para determinar o nível de integridade física das sementes, além de estarem associadas à qualidade fisiológica, como viabilidade e vigor.

Tabela 3. Cargas fatoriais, autovalores e proporção de variação associados a cinco componentes principais (PC) da PCA de 15 variáveis associadas à qualidade física e fisiológica de sementes de melão.

Variáveis	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Área	0.185	0.696	0.677	0.105	0.028
Perímetro	-0.380	0.837	-0.07	0.348	0.120
Circularidade	0.474	-0.679	0.457	-0.268	-0.058
Densidade Relativa	0.822	-0.092	0.034	-0.126	0.257
Densidade Integrada	0.491	0.574	0.630	0.04	0.128
Preenchimento	0.594	-0.590	0.483	0.104	-0.093
Germinação	0.939	-0.004	-0.104	0.198	-0.137
Protrusão radicular	0.787	0.256	-0.116	0.287	-0.094
IVG	0.933	-0.085	-0.135	0.271	0.059
VPRP	0.694	0.029	-0.066	-0.466	0.337
Sincronia	0.584	-0.386	-0.195	0.396	0.512
Comprimento de plântula	0.623	0.577	-0.223	-0.437	-0.019
Uniformidade	0.855	-0.162	-0.06	0.271	-0.313
Vigor	0.838	0.389	-0.200	-0.234	-0.143
Vigor corrigido	0.944	0.207	-0.168	-0.079	-0.146
Autovalores	7.57	3.10	1.51	1.12	0.65
Variância (%)	50.53	20.71	10.07	7.51	4.37
Variância acumulada (%)	50.53	71.24	81.31	88.83	93.20

Diante disso, evidencia-se que o uso da macro PhenoXray, desenvolvida no ImageJ[®] para análise automatizada de radiografias de sementes, permite a análise em larga escala de maneira rápida e robusta com a obtenção de parâmetros promissores relacionados com a integridade física da semente e com o seu potencial fisiológico. O uso do ImageJ[®] para desenvolvimento de algoritmos e posterior criação de macros personalizáveis tem sido reportados com sucesso em outras pesquisas (Legland et al., 2017; Miart et al., 2018; Tello et al., 2018; Vasseur et al., 2018) e representa um avanço significativo tanto para automatização da análise, quanto para a livre difusão de tecnologias em nível global, pelo caráter opensource do software.

Ainda, os parâmetros densidade relativa, densidade integrada e preenchimento, obtidos a partir da análise automatizada de radiografias de sementes de melão, são promissores para a inferir sobre a qualidade fisiológica dos lotes e podem ser recomendados para a avaliação preliminar e tomada de decisão quanto ao descarte de lotes de sementes, otimizando este processo e reduzindo os custos de produção.

CONCLUSÕES

A análise automatizada de imagens radiográficas permite de forma simples, gratuita e rápida extrair informações sobre características físicas das sementes e gerar parâmetros relacionados com a qualidade fisiológica das sementes. As densidades relativa e integrada foram, dentre as variáveis obtidas a partir das imagens de raios X, as que se destacaram para prever sobre o potencial fisiológico das sementes.

REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F.; CICERO, S. M.; GOMES JUNIOR, F. G. Radiographic images and relationship of the internal morphology and physiological potential of broccoli seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, p. 1–9. 2018. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.34950>.
- ANTÔNIO, L. DO N.; MOREIRA, H. C. R.; CATÃO, H. O. DOS S.; PIRES, R. M. DE O.; RIBEIRO, B. G.; VON, E. V. DE R.; ... CALDEIRA. Efficiency of x- ray test in the identification of damage and its relation with the pumpkin seeds quality. **International Journal of Current Research**, v. 8, p. 26471–26475. 2016. Retrieved from <http://www.journalcra.com>
- ARRUDA, N.; CICERO, S. M.; GUILHIEN, F.; JUNIOR, G. Radiographic analysis for the evaluation of polyembryony in Swingle citrumelo seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 118–126. 2018. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n2175172>.
- ARRUDA, N.; CICERO, S. M.; GUILHIEN GOMES-JUNIOR, F. Radiographic analysis to assess the seed structure of *Crotalaria juncea* L. **Journal of Seed Science**, v. 38, p. 161–168. 2016. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v38n2155116>.
- BOUAZZAOUI, N.; MULENGI, J. K. Fatty acids and mineral composition of melon (*Cucumis melo*) and pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 00, p. 1–8. 2018. <https://doi.org/10.1080/10496475.2018.1485125>.
- BRASIL. . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Padrões de identidade e qualidade para a produção e a comercialização de sementes de espécies olerícolas, condimentares, medicinais e aromáticas**. Portaria nº 111, de 4 de setembro de 2012. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2012.
- CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 167–172. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0401>.
- FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Avaliação da evolução de danos por

- “umidade” e redução do vigor em sementes de soja, cultivar {TMG}113-**{RR}**, durante o armazenamento, utilizando imagens de raios x e testes de potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 123–133. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000300014>.
- GAGLIARDI, B.; MARCOS-FILHO, J. Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 411–416. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000400004>.
- GOMES-JUNIOR, F. G.; CHIQUITO, A. A.; MARCOS-FILHO, J. Semi-automated assessment of the embryonic area of cucumber seeds and its relationship to germination and seedling length. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 183–189. 2013. <https://doi.org/10.1590/S2317-15372013000200007>.
- GOMES-JUNIOR, F. G.; YAGUSHI, J. T.; BELINI, U. L.; CICERO, S. M.; TOMAZELLO-FILHO, M. X-ray densitometry to assess internal seed morphology and quality. **Seed Science and Technology**, v. 40, p. 102–107. 2012. <https://doi.org/10.15258/sst.2012.40.1.11>.
- GOMES, K. B. P.; MARTINS, R. DE C. C.; MARTINS, I. S.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Terminalia argentea* (Combretaceae) pelo teste de raios X. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 752–759. 2014. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400013>.
- IBETO, C. N.; OBIJULU, C.; OKOYE, B.; OFOEFULE, A. U. Comparative study of the physicochemical characterization of some oils as potential feedstock for biodiesel production. **ISRN Renewable Energy**, v. 2012. 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/621518>.
- JAVORSKI, M.; OTTE, D.; CASTAN, C.; SANTANNA, S.; GOMES-JUNIOR, F. G.; CICERO, S. M. Image analysis to evaluate the physiological potential and morphology of pearl millet seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 127–134. 2018. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n2176904>.
- KOTWALIWALE, N.; SINGH, K.; KALNE, A.; JHA, S. N.; SETH, N.; KAR, A. X-ray imaging methods for internal quality evaluation of agricultural produce. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1–15. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0485-y>.

- LAFOND, G. P.; BAKER, R. J. Effects of genotype and seed size on speed of emergence and seedling vigor in nine spring wheat cultivars. **Crop Science**, v. 26, p. 341. 1986. <https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183X002600020027x>.
- LEÃO-ARAÚJO, E. F.; FARIA, J.; BARBOZA, C.; MARCOS-FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Controlled deterioration test and use of the Seed Vigor Imaging System (SVIS[®]) to evaluate the physiological potential of crambe seeds. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 393–400. 2017. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n4177911>.
- LEGLAND, D.; EL-HAGE, F.; MÉCHIN, V.; REYMOND, M. Histological quantification of maize stem sections from FASGA-stained images. **Plant Methods**, v. 13, p. 1–11. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0225-z>.
- MAHAJAN, S.; DAS, A.; SARDANA, H. K. Image acquisition techniques for assessment of legume quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, p. 116–133. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.01.001>.
- MATHANKER, S. K.; WECKLER, P. R.; BOWSER, T. J. X-Ray Applications in Food and Agriculture: A Review. **Transactions of the ASABE**, v. 56, p. 1227–1239. 2013. <https://doi.org/10.13031/trans.56.9785>.
- MAHAJAN, S.; MITTAL, S. K.; DAS, A. Machine vision based alternative testing approach for physical purity, viability and vigour testing of soybean seeds (Glycine max). **Journal of Food Science and Technology**. 2018. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3320-x>.
- MALACRIDA, C. R.; ANGELO, P. M.; ANDREO, D. Chemical composition and antioxidants potential of extracts of yellow melon seeds in Soybean oil Material e Métodos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, p. 372–376. 2007.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrostat: Estatísticas de Comercio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. 2018. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>>
- MARCHI, J. L. DE; GOMES JUNIOR, F. G. Use of image analysis techniques to determine the embryo size of Senna multijuga (Rich.) seeds and its relation to germination and vigor. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 13–19. 2017. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n1165423>.

- MARCOS-FILHO, J. **Seed Physiology of Cultivated Plants**. Abrates. 2016.
- MARCOS FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F. G.; BENNETT, M. A.; WELLS, A. A.; STIEVE, S. Using Tomato Analyzer software to determine embryo size in x-rayed seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 146–153. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000200018>.
- MEDEIROS, A. D. DE; ARAÚJO, J. DE O.; ZAVALA-LEÓN, M. J.; SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. DOS S. Parameters based on x-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v.42, p. 1-10. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542018426023318>
- MEDEIROS, A. D. DE; PEREIRA, M. D. SAPL ® : a free software for determining the physiological potential in soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, p. 222–228. 2018. <https://doi.org/10.1590/1983-40632018v4852340>.
- MEDEIROS, A. D. DE; SILVA, L. J.; CAPOBIANGO, N. P.; FIALHO, C. A.; DIAS, D. C. F. DOS S. Assessing the physiological quality of common bean seeds using the Vigor-S® system and its relation with the accelerated aging test. **Journal of Seed Science**, PRELO. 2019.
- MIART, F.; FONTAINE, J.-X.; PINEAU, C.; DEMAILLY, H.; THOMASSET, B.; VAN WUYTSWINKEL, O.; PAGEAU, K.; MESNARD, F. MuSeeQ, a novel supervised image analysis tool for the simultaneous phenotyping of the soluble mucilage and seed morphometric parameters. **Plant Methods**, v. 14, p. 112. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0377-5>.
- NOGUEIRA FILHO, F. P.; OLIVEIRA, A. B.; PEREIRA, M. S.; LOPES, M. F. Q.; SILVA, R. T. Effectivity of X-ray test to evaluate the physiological quality of sesame seeds due to fruits position at the plant. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 435–440. 2017. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i4a5474>.
- NORONHA, B. G. DE; MEDEIROS, A. D. DE; PEREIRA, M. D. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Moringa oleifera* Lam. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 393. 2018. <https://doi.org/10.5902/1980509831615>.
- PETKOVA, Z.; ANTOVA, G. Proximate composition of seeds and seed oils from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated in Bulgaria. **Cogent Food & Agriculture**, v. 9, p. 1–15. 2015. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1018779>.

- PRADO-ALVES, M. V.; PINHO, É. V. DE R. VON; SANTOS, H. O. DOS; PRADO-ALVES, G. C.; CARVALHO, M. L. M. DE; BUSTAMANTE, F. DE O. Image analysis, quality and maturation of jiló (*Solanum gilo*) seeds. **Agrociencia**, v. 52, p. 267–278. 2018. Disponível em <<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2018/feb-mar/art-8.pdf>>
- R CORE TEAM. R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. 2018. Disponível em <<http://www.R-project.org>>
- RAHMAN, A.; CHO, B.-K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v. 26, p. 285–305. 2016. <https://doi.org/10.1017/S0960258516000234>.
- 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. Disponível em <<https://www.eurofinsus.com/media/162083/seed-vigor-imaging-system>>
- SANTOS, S.; DA SILVA, R.; PEREIRA, M.; MACHADO, J.; BÓREM, F.; GOMES, V.; TONETTI, O. X-ray technique application in evaluating the quality of papaya seeds. **Seed Science and Technology**, v. 37, p. 776–780. 2009.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671–675. 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- SEVERIANO, R. L.; PINHEIRO, P. R.; GOMES JUNIOR, F. G.; MEDEIROS, A. D. DE; PEREIRA, M. D. X-ray test on passion fruit seeds submitted to different aryl removal methods. **Comunicata Scientiae**, v. 9, p. 356–362. 2018. <https://doi.org/10.14295/cs.v9i3.2706>.
- SILVA, C. B. DA; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, R. D.; SILVA, C. B. DA; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, R. D. Accelerated aging as vigor test for sunn hemp seeds. **Ciência Rural**, v. 47, p. 1–6. 2017. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151527>.
- SILVA, L. A. DA; SALES, J. D. F.; NEVES, J. M. G.; SANTOS, H. O. DOS; SILVA, G. P. Radiographic image analysis of *Anacardium othonianum* Rizz (anacardiaceae) achenes subjected to desiccation. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, p. 235. 2017. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i2.32484>.

- SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. **SeedCalc: Seed Germination and Seedling Growth Indexes**. R package version 1.0.0. 2018.
- SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D. DE; OLIVEIRA, A. S. SeedCalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, PRELO. 2019.
- SILVA, P. P.; FREITAS, R. A.; CÍCERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J.; NASCIMENTO, W. M. Análise de imagens no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 210–214. 2014. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362014000200016>.
- SILVA, V. N.; CICERO, S. M.; BENNETT, M. Relationship between eggplant seed morphology and germination. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 597–604. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000400010>.
- SILVA, V. N.; CICERO, S. M.; BENNETT, M. Associations between X-ray visualised internal tomato seed morphology and germination. **Seed Science and Technology**, v. 41, p. 225–234. 2013. <https://doi.org/10.15258/sst.2013.41.2.05>.
- SILVA, V. N.; SARMENTO, M. B.; SILVEIRA, A. C.; SILVA, C. S.; CICERO, S. M. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 1158–1169. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400027>.
- SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: ISTA. 1991.
- TANABATA, T.; SHIBAYA, T.; HORI, K.; EBANA, K.; YANO, M. SmartGrain: High-Throughput Phenotyping Software for Measuring Seed Shape through Image Analysis. **Plant Physiology**, v. 160, p. 1871–1880. 2012. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205120>.
- TELLO, J.; MONTEMAYOR, M. I.; FORNECK, A.; IBÁÑEZ, J. A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: Evaluation of inter- and intra-cultivar diversity in grapevine. **Plant Methods**, v. 14, p. 1–17. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0267-2>.
- VASSEUR, F.; BRESSON, J.; WANG, G.; SCHWAB, R.; WEIGEL, D. Image-based methods for

phenotyping growth dynamics and fitness components in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Methods, v. 14, p. 1–11. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0331-6>.

CAPÍTULO II

FENOTIPAGEM DE ALTO RENDIMENTO UTILIZANDO FERRAMENTA DE LIVRE ACESSO PARA AVALIAÇÃO DE RADIOGRAFIAS DE SEMENTES DE BRAQUIÁRIA

RESUMO – Novas abordagens baseadas em análise de imagens podem auxiliar na fenotipagem de características biológicas servindo de suporte para tomada de decisões da agroindústria moderna. O teste de raios X já é utilizado na área de sementes, porém a análise visual e subjetiva das radiografias pode levar a erros ou baixa correlação com os dados obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes. O objetivo deste trabalho foi propor um método de fenotipagem de alto rendimento e de livre acesso de sementes de braquiária pelo processamento de imagens radiográficas, bem como relacionar os parâmetros obtidos com o potencial fisiológico das sementes. Para tanto, foram utilizadas sementes de *Brachiaria ruziziensis* cv. *Ruziziensis*. O estudo foi realizado por meio da análise automatizada de imagens radiográficas das sementes, em que foi desenvolvida uma macro, denominada PhenoXray, responsável pelo processamento digital das imagens, para as quais foram obtidas medidas de área, perímetro, circularidade, largura, altura, solidez, densidade relativa, densidade integrada e preenchimento das sementes. Após o teste de raios X, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, a partir do qual foram obtidas variáveis relacionadas à qualidade fisiológica das sementes. Foi observada variabilidade entre os lotes quanto às características físicas e fisiológicas. Os resultados obtidos com a macro desenvolvida apresentaram alta correlação com os dados obtidos de forma manual. Assim, a utilização da macro PhenoXray permitiu a fenotipagem em larga escala de sementes de forma simples, rápida, robusta e totalmente gratuita. Foi comprovado que a metodologia é eficiente para obtenção de dados morfométricos e de integridade tecidual em sementes de *Brachiaria ruziziensis* e que parâmetros como densidade relativa, densidade integrada e preenchimento apresentam estreita relação com atributos fisiológicos de qualidade de sementes.

PALAVRAS-CHAVE: *Brachiaria ruziziensis*; imagens de raios X; qualidade de sementes; PhenoXray; ImageJ; análise de imagens automatizada.

HIGH YIELD PHENOTYPING USING A FREE ACCESS TOOL TO EVALUATE RADIOGRAPHS OF BRACHIARIA SEEDS

ABSTRACT - New approaches based on image analysis can help in the phenotyping of biological characteristics serving as support for the decision-making of modern agroindustry. The X-ray test is already used in the seed area, but the visual and subjective analysis of the radiographs can lead to errors or low correlation with the data obtained in the evaluation of the physiological quality of the seeds. The objective of this work was to propose a high-yield and free-access phenotyping method for brachiaria seeds by radiographic image processing, as well as to relate the parameters obtained to the seed physiological potential. Seeds of *Brachiaria ruziziensis* cv. Ruziziensis were used. The study was carried out by means of the automated analysis of radiographic images of the seeds. A macro, named PhenoXray, was developed and it enabled the digital image processing, for which measurements of area, perimeter, circularity, width, height, relative density, integrated density and seed filling were obtained. After the X-ray test, the seeds were submitted to germination test, from which variables related to the physiological quality of the seeds were assessed. Variability between lots was observed for both physical and physiological characteristics. The results obtained with the macro showed a high correlation with the data obtained manually. Thus, the use of the PhenoXray macro allows large-scale phenotyping of seed in a simple, fast, robust and totally free way. It has been proven that the methodology is efficient to obtain morphometric and tissue integrity data in *Brachiaria ruziziensis* seeds, and that parameters such as relative density, integrated density and fill present a close relationship with physiological attributes of seed quality.

KEYWORDS: *Brachiaria ruziziensis*; X-ray image; seed quality; PhenoXray; ImageJ; automated image analysis.

INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é um dos maiores desafios enfrentados hoje no mundo (Godfray et al., 2010). Portanto, abordagens inovadoras são necessárias para resolver problemas de produção e sustentabilidade de alimentos, nunca antes vivenciados (Foley et al., 2011).

As sementes utilizadas para a instalação dos campos de produção constituem peça fundamental nessa problemática e, em muitas culturas agrícolas, sua estabilidade e uniformidade tem estreita relação com a produtividade no final do ciclo. Assim, informações fenotípicas de caracteres morfométricos de sementes podem ser valiosas do ponto de vista do melhoramento genético (Tanabata et al., 2012), além de muitas vezes apresentarem relação com atributos fisiológicos, como o vigor (Whan et al., 2014), essenciais para o desenvolvimento inicial das plantas no campo (Finch-Savage & Bassel, 2016).

Recentemente, tecnologias ópticas não invasivas, baseadas em radiação eletromagnética têm sido adaptadas para a grande área de ciências de plantas e fornecido uma gama de possibilidades para aplicações em estudos com sementes (Hughes et al., 2017; Rolletschek et al., 2015; Rousseau et al., 2015). Dentre essas tecnologias, o teste de raios X tem sido aplicado com êxito para avaliação não destrutiva de indicadores não visíveis em sementes (Huang et al., 2015; Kotwaliwale et al., 2014; Rahman & Cho, 2016). Diversos trabalhos têm recomendado o uso da técnica de raios X para análise da morfologia interna de sementes, visando à obtenção de diagnósticos mais rápidos e precisos sobre características físicas de interesse, muitas vezes relacionadas com a germinação e vigor das sementes (Abud et al., 2018; Arruda et al., 2018; Medeiros et al., 2018; Nielsen et al., 2017; Noronha et al., 2018; Silva et al., 2017).

Neste sentido, diversas características das sementes, em especial as relacionadas à morfologia interna, podem oferecer importantes contribuições para programas de controle de qualidade de empresas produtoras de sementes, bem como, para a área de melhoramento de plantas, como por exemplo para seleção genômica. O desafio atual consiste em desenvolver ferramentas robustas, de baixo custo e de alta produtividade capazes de gerar dados fenotípicos confiáveis para medir características das sementes em larga escala (Hughes et al., 2017).

Progressos recentes no campo do processamento digital de imagens têm permitido o desenvolvimento de algoritmos de análise de imagem com uso de técnicas estocásticas

e avançadas para realização da fenotipagem de alta produtividade (Kotwaliwale et al., 2014). Para tanto, softwares do tipo open-source, como o ImageJ[®], têm sido utilizados para o processamento automatizado de imagens em plantas (Costa & Yang, 2009; Dhondt et al., 2014; Legland et al., 2017; Miart et al., 2018; Shamir et al., 2010; Tello et al., 2018; Vasseur et al., 2018).

O ImageJ[®] tem se destacado entre as ferramentas capazes de fornecer soluções para a prototipagem rápida de algoritmos de processamento de imagem (Schneider et al., 2012), principalmente devido à sua facilidade de uso, linguagem de macro gravável e arquitetura extensível de plugins (Rueden et al., 2017). O uso do ImageJ[®] para desenvolvimento de algoritmos e posterior criação de macros personalizáveis tem sido reportados com sucesso para quantificação histológica de seções de caule de milho (Legland et al., 2017), fenotipagem simultânea da mucilagem solúvel e parâmetros morfométricos de sementes (Miart et al., 2018), fenotipagem de pólen (Tello et al., 2018), fenotipagem dinâmica de crescimento de *Arabidopsis thaliana* (Vasseur et al., 2018), entre outras pesquisas. No entanto, sua aplicação para processamento de imagens radiográficas de sementes tem se limitado à análises manuais ou semi-automatizadas (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018; Noronha et al., 2018; Silva et al., 2013), que já pode ser considerado um avanço comparado aos métodos tradicionais de avaliação visual, porém limitantes para a análise em larga escala.

A *Brachiaria ruziziensis* é uma gramínea forrageira de alto valor nutricional e promissora para programas de melhoramento genético (Moreira et al., 2018). No entanto, estudos sobre técnicas avançadas de monitoramento de qualidade de sementes para esta espécie são escassos. Assim, novas metodologias, menos subjetivas e que possibilitem a automatização das análises contribuiriam para seleção de sementes de maior qualidade, o que leva à avanços significativos para o setor forrageiro e, garante uma resposta mais rápida aos investimentos.

Considerando que o uso combinado de múltiplas tecnologias de análise de imagens para a descrição de caracteres de interesse em sementes é um ponto chave para modernização da agricultura, esta pesquisa teve como objetivo propor um método de fenotipagem de alto rendimento, utilizando ferramentas de livre acesso, para o processamento de imagens radiográficas de sementes de braquiária, bem como relacionar os parâmetros obtidos à qualidade fisiológica das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios de Análise de Sementes e Análise de raios X, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados sete lotes de sementes de *Brachiaria ruziziensis* cv. Ruziziensis, produzidas na safra de 2017 e 2018 em campos de produção de sementes da empresa Sementes Mineirão. Foram utilizadas para cada análise 200 sementes por lote, divididas em quatro repetições de 50 sementes.

Inicialmente o grau de umidade das sementes foi determinado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C durante 24 horas, com base nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009); para esse fim, foram utilizadas duas subamostras de 5 g de sementes para cada lote. Os resultados foram expressos em percentagem (base húmida, b.u.).

Preparação das amostras e aquisição das imagens radiográficas: As sementes foram posicionadas e fixadas de forma ordenada sobre papel adesivo do tipo contact, para possibilitar posterior identificação individual nas análises subsequentes. Em seguida, as sementes foram colocadas no interior do equipamento de raios X digital Faxitron, modelo MX-20 (Faxitron X-ray Corp. Wheeling, IL, U.S.A), para gerar as imagens radiográficas. Foi ajustado previamente o tempo de exposição de 10 segundos à radiação, com uma tensão de 23 kV, distância focal de 27,8 cm, e contraste da imagem calibrado em 13915 (width) x 5374 (center). As imagens digitais geradas foram salvas em computador e analisadas em seguida de forma automatizada pelo protocolo descrito a seguir.

Análise automatizada de imagens radiográficas: O software para processamento de imagens ImageJ[®] (Schneider et al., 2012) foi utilizado para desenvolvimento de uma macro (análise sequencial automática), denominada de PhenoXray, e subsequente análise das imagens. O ImageJ[®] foi escolhido para hospedar a macro por ser um software de domínio público e comumente utilizado pela comunidade científica. O ImageJ[®] é apresentado como o programa de processamento de imagem mais rápido do mundo, escrito em Java puro (<https://imagej.nih.gov/ij/features.html>). Ele suporta e trabalha com ampla gama de formatos de arquivos e funciona em muitos sistemas operacionais. Além disso, a plataforma de código aberto Fiji (Fiji is just ImageJ) (Schindelin et al., 2012) fornece muitas soluções de análise de imagem e uma seleção com diversos plugins. A PhenoXray foi escrita na linguagem de macro Java do ImageJ[®] para ser facilmente implementada na plataforma Fiji como um módulo. O fluxo de trabalho projetado para a análise das radiografias das sementes é apresentado na Figura

1. Essa análise sequencial foi executada em modo batch em todo o conjunto de imagens armazenadas em um diretório predefinido.

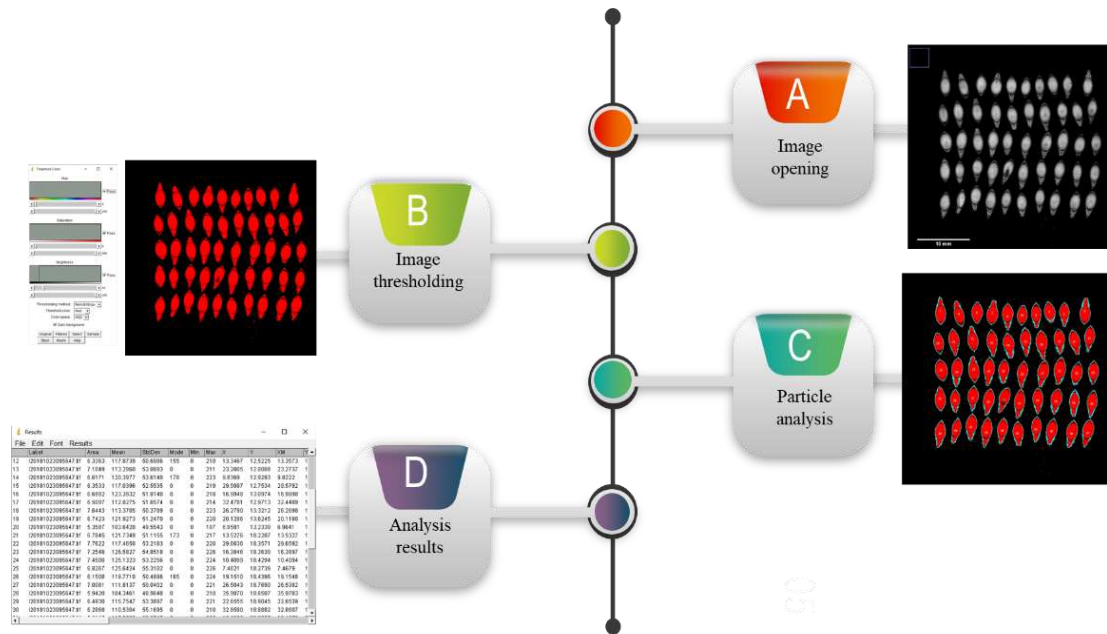


Figura 1. Representação esquemática do processamento feito pela macro PhenoXray durante a análise automatizada de radiografias de sementes de braquiária. Os principais comandos implementados pela macro são indicados nas caixas. A imagem de entrada é aberta (A), sendo em seguida segmentada automaticamente (B). Após a segmentação, é realizada a análise de partículas (C), em que são gerados ao final os resultados da análise (D) com várias medições para cada semente individualmente. Para simplificação, apenas uma área representativa de uma das imagens processadas é apresentada.

Resumidamente, cada imagem monocromática de entrada (Figura 1A) foi duplicada e apenas uma foi segmentada no modo Threshold do ImageJ® (Figura B). O limite (threshold) das imagens foi definido automaticamente utilizando o método automatic multilevel thresholding de Yen (Yen et al., 1995) para segmentar imagens em regiões individuais de interesse (neste caso, as sementes de braquiária). Em seguida, a seleção da imagem binarizada foi redirecionada para a imagem original. As regiões de interesse foram então medidas utilizando o comando Analyze Particles (Figura 1C). Apenas partículas com uma área de superfície entre 3 e 12 mm² foram consideradas nas imagens. Após o processamento, os resultados das medições automáticas foram armazenados em uma tabela dinâmica e salva automaticamente em um arquivo no formato TXT (Figura 1D). As imagens processadas foram criadas no mesmo diretório em

arquivos no formato JPEG. Nestas imagens, as sementes detectadas e analisadas são mostradas com contorno em ciano.

A macro desenvolvida para análise automática das radiografias de sementes de braquiária, e um conjunto de imagens estão disponíveis nos anexos.

As variáveis obtidas a partir da análise das imagens e utilizadas neste trabalho foram as seguintes:

Área: superfície delimitada da seleção, expressa em mm².

Perímetro: o comprimento em milímetros do limite externo da seleção, expresso em mm.

Circularidade: obtida por meio da equação: $C = 4\pi * \frac{\text{área}}{(\text{perímetro})^2}$. Nesta equação, valores iguais a 1,0 indicam um círculo perfeito e à medida que os valores tendem a 0 sugerem uma forma alongada.

Largura: A largura do menor retângulo que envolve a seleção, expresso em mm.

Altura: A altura do menor retângulo que envolve a seleção, expresso em mm.

Solidez: obtida por meio da equação: $\text{Solidez} = \frac{\text{Área do objeto}}{\text{Área do fecho convexo}}$. Nesta equação, valores iguais a 1,0 indicam que o objeto é sólido; e menor que 1,0, objetos com bordas irregulares ou com buracos.

Densidade relativa ou média de cinza: definida como a média dos valores de cinza de todos os pixels na área selecionada. É expressa em unidade de cinza.pixel⁻¹. Esta variável expressa a resistência que um tecido apresentou à passagem de raios X. A escala de cinza varia entre o preto absoluto (0) e o branco absoluto (255). Todos os valores intermediários são considerados níveis de cinza.

Densidade integrada: É a soma dos valores dos pixels na imagem ou seleção, isto é equivalente ao produto de área e densidade relativa, expressa em cinza.mm².pixel⁻¹. Esta variável também representa a densidade dos tecidos da semente, mas o valor é ponderado pela área.

Preenchimento ou área fracionada: percentagem de área da semente efetivamente preenchida por material de alta densidade.

Análise manual das imagens radiográficas: Foram realizadas análises manuais, ou semi-automatizadas, das radiografias utilizando-se a plataforma Fiji (Schindelin et al., 2012), com intuito de validar a segmentação do processo automatizado. O processo iniciou com a abertura individual das imagens, sendo realizado o ajuste da escala. Foi utilizado o cursor do computador para fazer a seleção individual de cada semente utilizando a ferramenta wand do ImageJ®, sendo necessário clicar em cada semente para

definir o limite da seleção e em seguida foi aplicado o comando “Ctrl + M” para análise das partículas. Ao final do processo, as tabelas dinâmicas geradas, contendo as variáveis analisadas, foram salvas individualmente.

Avaliação da qualidade fisiológica: As sementes foram submetidas ao teste de germinação, sendo utilizadas as mesmas sementes que foram submetidas ao teste de raios X, mantendo-se o mesmo arranjo de sementes originalmente utilizado anteriormente. O teste de germinação foi conduzido em rolos de papel para germinação (Germitest®) umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco e mantidos em germinador sob temperatura alternada de 15°C e 35°C, por quatorze e oito horas, respectivamente (Brasil, 2009). Foram realizadas contagens diárias de germinação (protrusão radicular) e de plântulas normais até o vigésimo primeiro dia após a montagem do teste. A partir desses dados foram calculados os percentuais de protrusão radicular (radícula maior que 2 mm) e germinação (plântulas normais), a velocidade de protrusão radicular, o índice de velocidade de germinação, o tempo médio para protrusão radicular, o tempo médio de germinação, e a sincronização de protrusão radicular e germinação, conforme fórmulas descritas em Silva et al. (2019). Todas as variáveis de germinação foram calculadas por meio da utilização da função Germcalc do pacote SeedCalc do software R (Silva et al., 2018).

Após a última contagem, as plântulas e sementes não germinadas de cada repetição foram escaneadas e as imagens geradas foram avaliadas no software ImageJ®. As imagens foram utilizadas para aferição do comprimento de plântula, expresso em mm.plântula⁻¹. Os dados de comprimentos foram inseridos no pacote SeedCalc do R, em que foi aplicada a função Plantcalc para gerar o comprimento total das plântulas, os índices de crescimento (adaptado de Sako et al. (2001)), uniformidade (Castan et al., 2018), vigor (Sako et al., 2001), e vigor corrigido (Medeiros & Pereira, 2018), conforme as fórmulas descritas abaixo:

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

Em que: IC, o índice de crescimento; médiaCT, a média do comprimento total de plântulas da repetição; X_{máx}, a média do comprimento total de 5% das maiores plântulas do experimento.

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

Em que: IU, o índice de uniformidade; Xi, o comprimento da plântula analisada; X, o comprimento médio de plântulas do lote de sementes analisado; n, a variável número de plântulas totais avaliadas; n_{dead}, o número de sementes não germinadas ou mortas presentes no lote avaliado; e n_{total}, o número total de plântulas.

$$IV = (IC \times 50) + (IU \times 50)$$

Em que: IV, o índice de vigor; IC, índice de crescimento; IU, índice de uniformidade.

$$IVC = \frac{[(IC \times 50) + (IU \times 50)] \times Ger}{100}$$

Em que: IVC, índice de vigor corrigido; IC, índice de crescimento; IU, índice de uniformidade; Ger, percentual de germinação do lote.

A adaptação do índice de crescimento descrito acima consistiu na alteração da fórmula originalmente proposta por Sako et al. (2001), em que se levava em consideração as médias de parte aérea e radicular, sendo atribuído pesos específicos a essas variáveis como descrito na fórmula abaixo:

$$IC = \min(w_h * l_h + w_r * l_r, 1000)$$

Em que: IC, o índice de crescimento; l_h, a média do comprimento do hipocótilo; l_r, a média do comprimento do radicular; w_h, peso específico atribuído ao hipocótilo; w_r, peso específico atribuído a radícula.

Essa adaptação foi necessária, uma vez que os pesos específicos utilizados na fórmula original não são padronizados para todas as espécies e dependendo do tamanho das plântulas esses pesos generalizam de forma não adequada o índice, tornando-o menos sensível na diferenciação de lotes, principalmente quando as plântulas são maiores. Assim, com a adaptação, seria levado em conta o comprimento total das plântulas, sendo o índice balizado pela seleção de 5 % das maiores plântulas do experimento. Com isso o índice tende a ser mais sensível e adequado para os dados específicos do experimento, permitindo uma comparação mais refinada entre os lotes.

Delineamento experimental e análise estatística:

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para validar a segmentação automatizada das imagens radiográficas das sementes de braquiária com a macro PhenoXray foram utilizadas medições manuais realizadas na plataforma Fiji, sendo aplicada posteriormente regressões lineares e gráficos de pontos de dispersão para obtenção da correlação entre as metodologias. Para validar a reprodutibilidade técnica, as imagens radiográficas foram processadas três vezes e os resultados foram comparados pelo teste t. Posteriormente, os dados obtidos com a análise automatizada das radiografias e com a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias

foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). Os dados foram submetidos à análise de correlação linear de Pearson (r), em que a significância dos valores de r foi determinada pelo teste t ($P \leq 0,05$). Foi efetuada ainda a análise multivariada de componentes principais utilizando-se todas as variáveis avaliadas. A normalidade e a homocedasticidade dos conjuntos de dados foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. O software utilizado nas análises estatísticas foi o R 3.5.1 (R Core Team, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pequena variação do grau de umidade entre os lotes avaliados (8,2 a 8,9%), combinada às configurações de tensão, tempo de exposição, distância focal e contraste do equipamento de raios X adotadas neste estudo, permitiram a formação de imagens radiográficas de alta qualidade (Figura 2). As radiografias das sementes possibilitaram a visualização das suas principais estruturas internas (Figura 2A), assim como a identificação de malformação embrionária (Figura 1B^{1,2,3}) e danos físicos, como trincas (Figura 2B⁴), possivelmente decorrentes do processo de colheita, beneficiamento ou secagem. Além disso, foi visualizada deterioração tecidual em diferentes estágios, possivelmente ocasionadas por agentes patogênicos (Figura 2B^{5,6,7}).

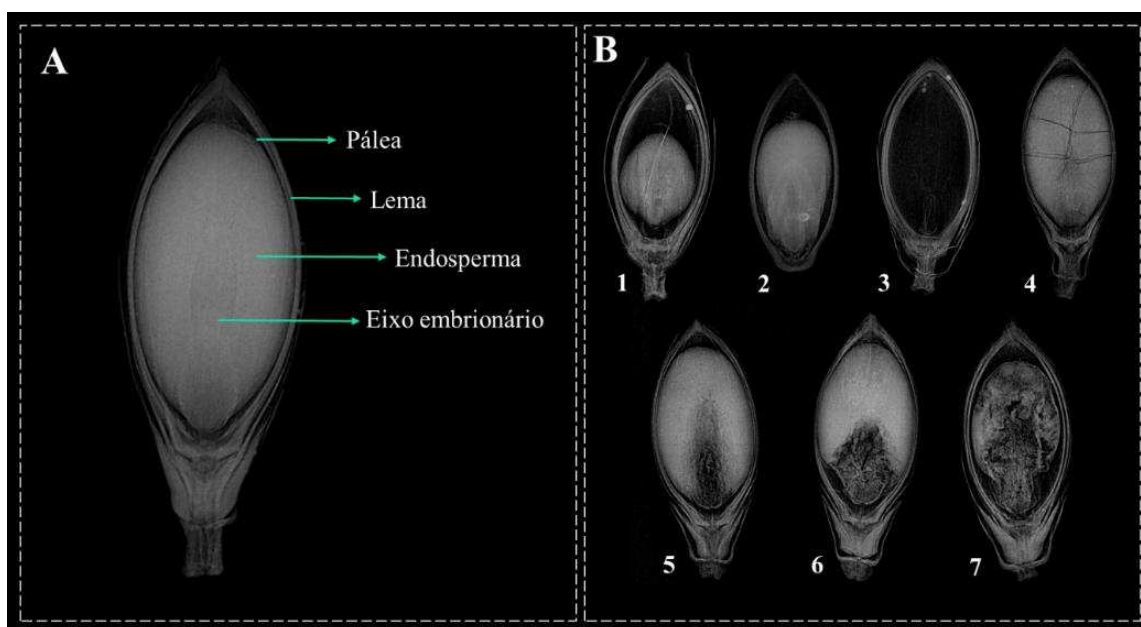


Figura 2. Radiografias de sementes de *Brachiaria ruziziensis* cv. *Ruziziensis* com indicações das estruturas básicas que as compõem (A) e de malformação embrionária ou danos físicos (B). 1, 2 e 3 - malformação embrionária; 4 - trincas; 5, 6 e 7 - deterioração tecidual.

De acordo com Berry et al. (2018), um grande desafio associado à análise de imagem automatizada é a variação na qualidade da imagem que pode, inadvertidamente, influenciar os resultados. Nesse sentido, as configurações do equipamento de raios X utilizadas nessa pesquisa se mostraram adequadas e padronizáveis para experimentos futuros com esse equipamento. No entanto, é sabido que diferentes sistemas de raios X

podem não produzir resultados semelhantes, em razão dos tipos de detectores de raios utilizados (Kotwaliwale et al., 2014), sendo necessário adequações para gerar imagens de boa qualidade.

Outras pesquisas tem evidenciado que as informações geradas pela simples avaliação visual das radiografias são muito valiosas para análise da qualidade física das sementes, sendo uma boa ferramenta para monitoramento de germinação (Nielsen et al., 2017), seleção de lotes de sementes mais vigorosas (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018; Silva et al., 2017) e identificação de poliembrionia (Arruda et al., 2018). Nessa pesquisa, a capacidade do teste em identificar deterioração tecidual ocasionadas por agentes patogênicos em diferentes níveis, é outro resultado promissor, que pode contribuir para fortificação de barreiras sanitárias, evitando a contaminação de cultivos por sementes infestadas (Figura 2).

No entanto, embora a avaliação visual da radiografia feita por um analista seja a abordagem mais simples e mais sensível, é um processo moroso, sujeito a erros e impraticável em grande escala. Portanto, a automatização das análises apresenta grande potencial para otimizar todo o processo de extração de informações das radiografias e, simultaneamente, oferecer diagnósticos mais imediatos e precisos sobre características de interesse. Para tanto, foi desenvolvida a macro PhenoXray no ImageJ® (anexos).

A fim de demonstrar estatisticamente a reprodutibilidade técnica da PhenoXray, o procedimento de processamento foi realizado três vezes nas mesmas imagens e os resultados foram comparados, não tendo apresentado entre si diferenças em nenhum parâmetro, como exemplificado na Figura 3A e 3B para os parâmetros representativos área e densidade relativa, respectivamente. Essa é uma informação importante, uma vez que demonstra a capacidade de padronização e reprodutibilidade da técnica, o que muitas vezes não é possível em análises manuais ou semi-automatizadas, que dependem de seleção e ajustes manuais do analista, o que leva muitas vezes à impossibilidade de reproduzir os mesmos resultados em análises posteriores da imagem, levando a conflitos de interesse entre laboratórios, por divergências entre pareceres.

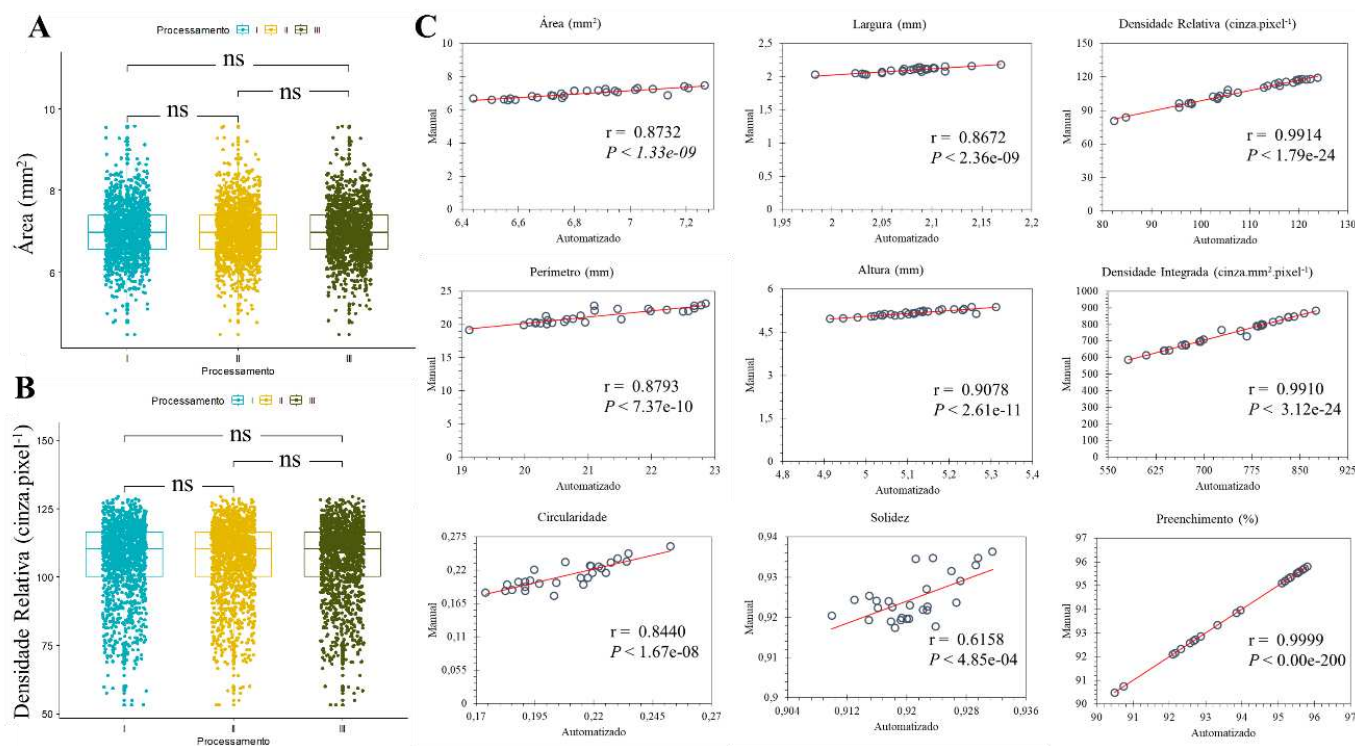


Figura 3. Validação estatística da macro PhenoXray para análise de imagens radiográficas de sementes de *Brachiaria ruziziensis*. **A – B** - Ensaios de reprodutibilidade técnica para a medição da área (**A**) e densidade relativa (**B**) das sementes. ^{ns} - não indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste t ($n = 1400$ sementes para cada réplica técnica). **C** - Análise de correlação das medições automatizadas (PhenoXray) versus manuais de área, perímetro, circularidade, largura, altura, solidez, densidade relativa, densidade integrada e preenchimento utilizando-se o software ImageJ[®]. Os coeficientes de correlação de Pearson foram determinados por análises de regressão linear ($n = 28$, correspondente às repetições de todos os lotes).

Para validar a eficiência da PhenoXray para a segmentação automatizada precisa das imagens radiográficas das sementes, todos os parâmetros foram medidos em todas as sementes dos sete lotes utilizando a macro e correlacionados com medições manuais utilizando a plataforma Fiji (Figura 3C). Observa-se correlações significativas para todos os parâmetros ($P < 0,001$), com fortes correlações entre os métodos para densidade relativa, preenchimento, densidade integrada ($r = 0,99$), área ($r = 0,87$), perímetro ($r = 0,87$), circularidade ($r = 0,84$), largura ($r = 0,86$) e altura ($r = 0,90$), porém uma correlação moderada para solidez ($r = 0,68$), variável essa que indica como as bordas das sementes são curvas. A correlação moderada entre os métodos manual e automatizado para avaliação da solidez pode ser explicada em razão do ajuste de threshold variável pelo método manual, que pode levar a maiores variações de curvatura de bordas para este método.

As altas correlações entre a metodologia manual e automatizada é um resultado importante, visto que o uso da técnica manual ou semi-automatizada no ImageJ[®] já tem sido reportado com êxito em pesquisas recentes com análise de imagens radiográficas (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018; Noronha et al., 2018; Silva et al., 2013).

Na Tabela 1 são apresentadas as variáveis obtidas com a utilização da macro PhenoXray na avaliação das imagens radiográficas das sementes dos sete lotes. Observa-se que foram formados diferentes grupos para todas as variáveis avaliadas.

Tabela 1. Valores médios de dados morfométricos obtidos por meio da análise automatizada de imagens radiográficas de sete lotes de sementes de *Brachiaria ruzizienses* com uso da macro PhenoXray.

Lote	Área mm ²	Perímetro mm	Largura mm	Altura mm	Circ	Solidez	Densidade Relativa cinza.pixel ⁻¹	Densidade Integrada cinza.mm ² . pixel ⁻¹	Preenc %
1	6.80 b	19.82 c	2.11 a	5.00 c	0.243 a	0.930 b	115.31 a	784.87 a	95.29 a
2	7.12 a	22.50 a	2.11 a	5.26 a	0.186 c	0.921 c	111.16 a	793.35 a	95.34 a
3	6.66 b	20.54 b	2.05 b	5.11 b	0.216 b	0.919 c	101.70 b	677.66 b	93.5 b
4	6.70 b	20.87 b	2.05 b	5.11 b	0.214 b	0.920 c	98.88 b	664.23 b	92.51 c
5	7.33 a	22.15 a	2.14 a	5.30 a	0.202 c	0.924 c	88.28 c	647.49 b	91.43 d
6	7.12 a	20.47 b	2.11 a	5.14 b	0.228 a	0.935 a	117.41 a	836.93 a	95.57 a
7	7.19 a	22.62 a	2.13 a	5.25 a	0.191 c	0.922 c	114.11 a	821.08 a	95.61 a
FV	18.59 *	33.12*	9.58*	14.66 *	15.56*	35.57*	27.36*	17.12*	60.47*
CV (%)	1.75	1.83	1.13	1.05	4.88	0.21	3.84	5.2	0.46

Letra minúscula = agrupamento dentro de cada coluna para cada avaliação pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); * = significativo pelo teste de F ($P < 0,05$); Fc = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação. Circ = Circularidade; Preenc = Preenchimento.

Para as variáveis relacionadas ao tamanho e forma das sementes (área, perímetro, largura, altura, circularidade e solidez) nota-se diferentes características entre os lotes com agrupamento em dois ou três níveis (Tabela 1). Essas variações podem ser uma resposta às condições ambientais, visto que os lotes foram advindos de diferentes campos de produção. Descritores de tamanho e forma das sementes são componentes importantes das pesquisas básicas de plantas, uma vez que a formação e desenvolvimento de sementes é um aspecto fundamental da reprodução de plantas (Whan et al., 2014). A possibilidade de realizar a fenotipagem dessas características com segurança e em grande escala representa um avanço significativo para programas de melhoramento de espécies forrageiras, tendo potencial para atuar simultaneamente com as tecnologias de perfil molecular.

A integração de ferramentas de imagem com abordagens e modelagem genômica tem possibilitado a criação de modelos mais abrangentes dos padrões de expressão gênica, contribuindo para o entendimento de processos de desenvolvimento de plantas (Sozzani et al., 2014). Ao usar fenótipos de tamanho e formato de sementes derivados da análise

de imagens, Tanabata et al. (2012) e Moore et al. (2013) mapearam locus de características quantitativas (QTL) em arroz e Arabidopsis, respectivamente. Assim, a fenotipagem de características das sementes por meio da análise de imagem abre uma gama de possibilidades para análises mais profundas como as anatômicas, metabolômicas ou genômicas (Jahnke et al., 2016).

Para os parâmetros relacionados à densidade tecidual foram observados agrupamentos dos lotes em três níveis para densidade relativa, dois níveis para densidade integrada e quatro níveis para o preenchimento. Em geral, o lote 5 foi o que apresentou menores valores de densidade tecidual quando comparado aos demais lotes, exceto para densidade integrada (não diferiu dos lotes 3 e 4), sendo um indicativo de sementes de baixa qualidade.

As variáveis densidades relativa, integrada e preenchimento oferecem uma ideia de quão integro estão os tecidos da semente, uma vez que, tecidos bem formados e sem danos apresentam maior resistência à passagem de fótons de raios X através da semente, assim como o contrário também é observado. Esses parâmetros têm sido ainda pouco reportados em pesquisas com sementes, porém nos poucos trabalhos disponíveis eles proporcionaram resultados promissores, muitas vezes relacionados com atributos fisiológicos, como germinação e comprimento de plântulas (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018; Noronha et al., 2018; Silva et al., 2013).

Visando observar uma possível associação das características obtidas da análise automatizada de radiografias de sementes de braquiária ao seu potencial fisiológico, as respectivas sementes utilizadas na análise anterior foram submetidas ao teste de germinação, em foram obtidas algumas variáveis de ordem fisiológica. Foram detectadas diferenças estatísticas para maioria das variáveis fisiológicas, exceto para variável tempo médio de germinação (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios obtidos para os parâmetros fisiológicos obtidos por meio do teste de germinação de sete lotes de sementes de *Brachiaria ruzizienses*.

Lote	Protrusão radicular	Germinação %	VPR índice	IVG índice	TMPR dias	TMG dias	SincPR índice	SincG índice
1	70 a	64 a	7.54 a	5.01 a	5 b	7	0.28 a	0.40 b
2	68 a	58 a	6.24 b	4.17 b	6 a	7	0.28 a	0.36 b
3	30 b	23 b	3.87 c	1.68 c	4 b	7	0.27 a	0.46 b
4	34 b	28 b	3.45 c	2.05 c	5 b	7	0.32 a	0.48 b
5	11 c	6 c	0.93 d	0.38 d	7 a	7	0.10 b	0.18 b
6	76 a	68 a	8.28 a	5.46 a	5 b	6	0.35 a	0.72 a
7	72 a	60 a	6.85 b	4.42 a	6 a	7	0.34 a	0.34 b
Fc	52.58*	46.42*	36.57*	45.02*	7.44*	0.89 ^{ns}	5.7*	4.23*
CV (%)	14.05	16.43	16.44	17.36	11.11	11.17	25.6	37.75

Letra minúscula = agrupamento dentro de cada coluna para cada avaliação pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); *,^{ns} = significativo e não significativo pelo teste de F ($P < 0,05$); Fc = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação. VPR = Velocidade de protrusão radicular; IVG= Índice de velocidade de germinação; TMPR= Tempo médio de protrusão radicular; TMG= Tempo médio de germinação; SincPR= Sincronia de protrusão radicular; SincG= Sincronia de germinação.

Para protrusão radicular foi observado maior desempenho dos lotes 1, 2, 6 e 7, desempenho intermediário dos lotes 3 e 4, e baixo desempenho do lote 5. O mesmo padrão foi obtido para os dados de germinação (plântulas normais), no entanto, apenas os lotes 1, 6 e 7 estariam aptos a serem comercializados no Brasil de acordo os padrões oficiais de produção e comercialização de sementes de gramíneas forrageiras (Brasil, 2008).

Pelos resultados obtidos para velocidade de protrusão radicular (VPR) e para os índices de velocidade de germinação (IVG), observa-se agrupamento dos lotes em quatro níveis, o que demonstra a maior sensibilidade em relação ao teste de germinação na diferenciação desses materiais. O tempo médio para protrusão radicular (TMPR) variou de quatro a sete dias e os lotes 2, 5 e 7 foram os que tiveram maior tempo médio para protrusão radicular, enquanto que para o tempo médio de germinação (TMG) não foi observada diferença entre os lotes, variando de seis a sete dias. Para a sincronia de protrusão radicular (SincPR), o lote 5 diferiu dos demais, apresentando o menor desempenho, enquanto que para sincronia de germinação, o lote 7 se destacou com maior desempenho, diferenciando-se dos demais lotes.

Todas essas variáveis relacionadas à velocidade, sincronismo e tempo de

germinação ou para protrusão radicular são consideradas manifestações de vigor de sementes e, na prática, lotes de sementes com germinação rápida e uniforme trazem maiores vantagens para o estabelecimento da cultura no campo (Finch-Savage & Bassel, 2016).

Por meio da análise de plântulas, as diferenças observadas entre os lotes nos testes anteriores foram confirmadas. Observa-se que o comprimento de plântula e os índices de crescimento, uniformidade e vigor ranquearam os lotes em três grupos, de alto (Lote 1, 2, 6 e 7), intermediário (Lote 3 e 4) e baixo (Lote 5) qualidade fisiológica. O índice de vigor corrigido, constituído a partir do produto do índice de vigor com a germinação (Medeiros & Pereira, 2018), foi a variável mais sensível no ranqueamento dos lotes, diferenciando-os em quatro níveis de vigor, em que apenas os lotes 1, 6 e 7 obtiveram maior desempenho (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios obtidos para o comprimento total e índices de crescimento e vigor por meio da análise de imagens de plântulas oriundas de sete lotes de sementes de *Brachiaria ruzizienses*.

Lote	Comprimento Total cm.plântula ⁻¹	Crescimento	Uniformidade	Vigor	Vigor Corrigido
1	3.25 a	386 a	610 a	498 a	319 a
2	3.42 a	406 a	562 a	484 a	278 b
3	0.99 b	118 b	238 b	178 b	40 c
4	1.39 b	165 b	292 b	229 b	63 c
5	0.51 c	61c	59 c	60 c	4 d
6	3.62 a	430 a	613 a	522 a	352 a
7	3.62 a	429 a	612 a	521 a	312 a
Fc	44.02*	44.02*	49.34*	50.12*	119.15*
CV (%)	17.23	17.23	15.17	15.43	14.26

Letra minúscula = agrupamento dentro de cada coluna para cada avaliação pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05); * = significativo pelo teste de F (P < 0,05); Fc = valor de F calculado; CV = coeficiente de variação.

Nesta pesquisa, todos os índices foram eficientes na diferenciação dos lotes, incluindo a nova fórmula para o índice de crescimento adaptada de Sako et al. (2001). Os índices de desempenho de plântulas utilizados neste trabalho foram indicados em outras pesquisas por permitir o acesso à informações úteis sobre aspectos de crescimento inicial e uniformidade de emergência de plântulas, tendo capacidade de distinguir lotes quanto

ao seu potencial fisiológico (Castan et al., 2018; Medeiros & Pereira, 2018; Sako et al., 2001).

Perante os resultados obtidos para as características físicas (Tabela 1), avaliadas por meio da análise automatizada das radiografias, e para as características fisiológicas, germinação (Tabela 2) e crescimento de plântulas (Tabela 3), fica evidente que os lotes apresentaram diferenças entre si quanto aos parâmetros físicos e fisiológicos. A fim de verificar possíveis associações entre os diferentes parâmetros, foi realizada uma análise de correlação (Figura 4).

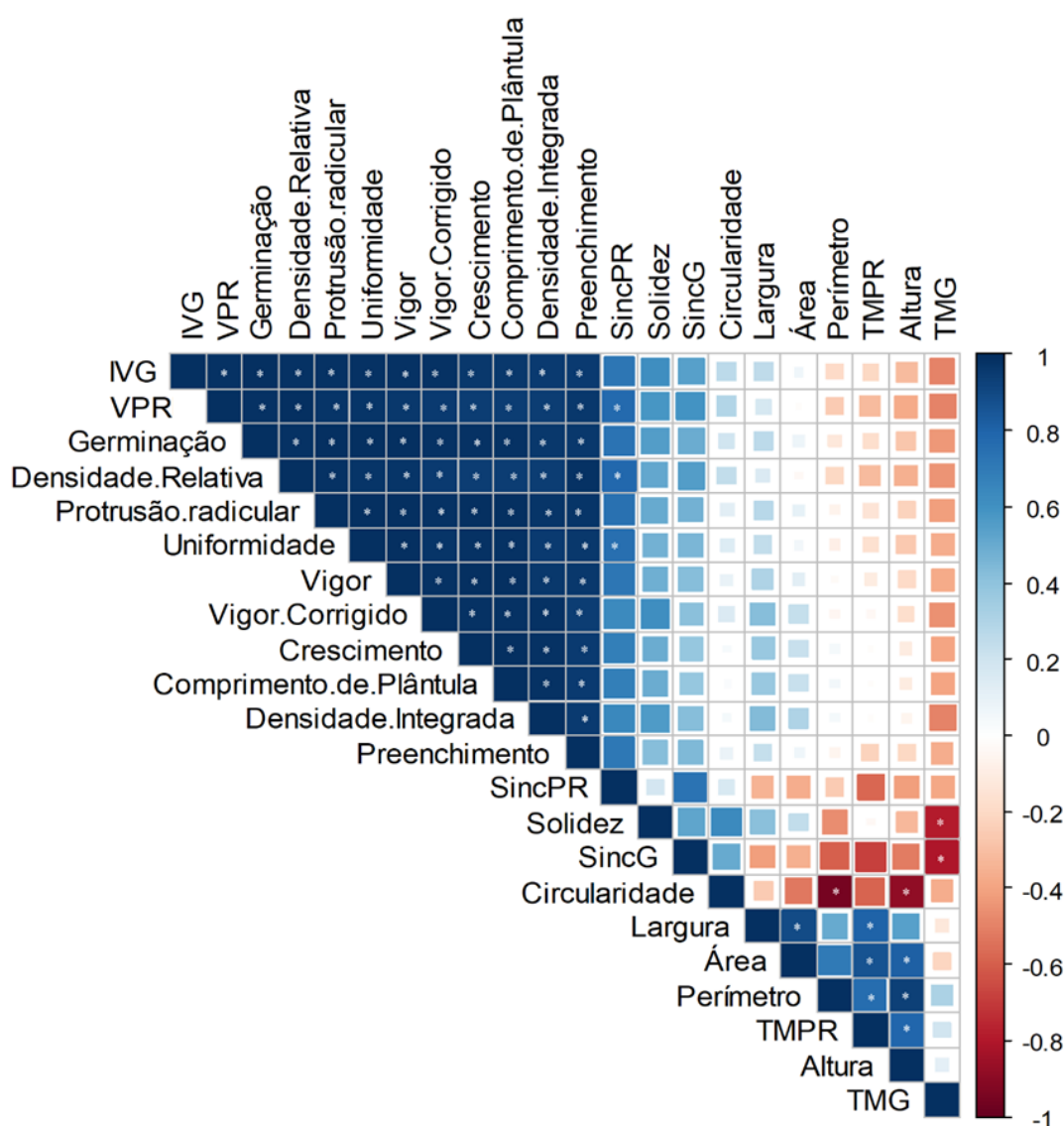


Figura 4. Matriz de correlação obtida a partir de características físicas e fisiológicas de sementes e características de plântulas de *Brachiaria ruziziensis*. * significativo ($P < 0,05$) pelo teste t. VPR = Velocidade de protrusão radicular; IVG = Índice de velocidade de germinação; TMPR= Tempo médio de protrusão radicular; TMG = Tempo médio de

germinação; SincPR = Sincronia de protrusão radicular; SincG = Sincronia de germinação.

Observa-se que os descritores de tamanho e forma (largura, altura e perímetro) tiveram pouca associação com as variáveis fisiológicas, evidenciada pelas baixas correlações, o que demonstra a limitação dessas características na predição de dados de geminação ou comprimento de plântula para sementes de braquiária. Em contraste, Abud et al. (2018) identificaram fortes correlações entre a área e a circularidade das sementes de Brassica oleraceae com o comprimento de plântulas, assim como Medeiros et al. (2018) que observaram correlações do perímetro e da circularidade de sementes de *Leucaena leucocephala* com a germinação. Assim, esta resposta é dependente das características das sementes de cada espécie e, para a braquiária, a predição da qualidade fisiológica das sementes utilizando-se descritores de forma parece não ser viável.

Por outro lado, foram observadas correlações positivas, fortes e significativas ($r > 0,94$; $P < 0,05$) de todos os parâmetros relacionados à densidade tecidual (densidade relativa, densidade integrada e preenchimento), obtidos da análise automatizada das radiografias, com a maioria das variáveis de qualidade fisiológica. Esse resultado demonstra a eficiência da técnica de análise automatizada de imagens radiográficas para estimar a qualidade fisiológica de sementes de braquiária.

É válido ressaltar que as metodologias atualmente em uso para avaliação da qualidade de sementes no Brasil vêm sendo aperfeiçoadas ao longo dos anos e são indiscutivelmente boas ferramentas. Os testes de germinação e comprimento de plântulas, por exemplo, são rotineiramente utilizados nos processos decisórios de empresas produtoras para estabelecer estratégias de comercialização de lotes de sementes (Marcos Filho, 2015). No entanto, essas metodologias apresentam limitações relacionadas ao tempo gasto para o fornecimento dos resultados, erros inerentes à subjetividade das avaliações, além do caráter destrutivo dos testes (Huang et al., 2015; Kotwaliwale et al., 2014; Rahman & Cho, 2016). Para sementes de braquiária foram necessários 21 dias para realização do teste de germinação conduzido de acordo com a RAS (Brasil, 2009). Recentemente, Jeromini et al. (2018) propôs a avaliação do vigor de sementes de braquiária em sete dias por meio da análise computadorizada de plântulas, no entanto, os resultados foram pouco promissores.

Com o uso da técnica proposta neste trabalho, foram necessários apenas 10 segundos para gerar a imagem radiográfica de 50 sementes de braquiária e mais 0,5 segundos para processar a imagem e obter os resultados. Assim, fica evidente que é uma

radicular; SincG= Sincronia de germinação; CP = Comprimento de plântula; IC = Índice de crescimento de plântula; IU = Índice de uniformidade de plântulas; IV = Índice de vigor; IVC = Índice de vigor corrigido; Larg = Largura de sementes; Alt = Altura de sementes; Per = Perímetro de sementes; Sol = Solidez; DR = Densidade relativa; DI = Densidade integrada; Preenc = Preenchimento.

A projeção de traços individuais como vetores no plano dos dois primeiros eixos é dada no diagrama de ordenação central, em que vetores em azul e verde representam variáveis físicas e fisiológicas, respectivamente. O diagrama localizado no canto superior direito representa o círculo de correlações indicando em um gradiente de cores a qualidade representativa de cada variável para a PCA. Cada vetor aponta para a direção na qual o valor da característica tem o aumento máximo através desse diagrama de ordenação. Como o cosseno do ângulo entre quaisquer dois vetores é proporcional ao coeficiente de correlação linear entre esses dois vetores (e, portanto, também entre os dois caracteres de sementes) (Abdi & Williams, 2010), pode-se deduzir que as características de densidade tecidual estão muito correlacionadas com as atributos fisiológicos como germinação, velocidade de germinação, uniformidade e vigor de plântulas, confirmando mais uma vez o que foi observado para os dados de correlação (Figura 4). Em contraste, correlações fracas de vetores, como observadas entre as variáveis descritoras de forma e os atributos fisiológicos, indicam que são independentes um do outro e trazem, cada um, uma porção substancial de novas informações, que podem ser aplicadas futuramente em outras pesquisas.

Destaca-se que neste trabalho as correlações entre as características físicas e fisiológicas foram feitas a partir das médias obtidas para os lotes para todas as características, não sendo uma correlação em nível unitário de semente a semente. Portanto, são necessários trabalhos futuros que façam esse tipo de associação mais aprofundada, visando o estabelecimento de uma possível relação direta dessas características físicas com os processos fisiológicos.

Ainda na PCA, visualiza-se claramente um agrupamento entre os lotes com características semelhantes. Em geral, lotes que se situaram mais próximos dos vetores de qualidade (e.g. germinação, uniformidade, densidade relativa e outros), como os lotes 1, 2, 6 e 7, apresentaram melhor desempenho para aquelas características, ou seja, apresentaram maiores médias. Por outro lado, lotes que se situaram distantes e em posição oposta aos vetores de qualidade podem ser considerados materiais de menor qualidade

(lote 5).

Esse tipo de abordagem multivariada em dados de qualidade fisiológica de sementes ainda é pouco difundido e explorado, porém como visto nesta pesquisa, pode contribuir para compreensão e interpretação de resultados de forma mais objetiva e precisa, já que pode haver diferentes respostas quando são comparados lotes de sementes utilizando-se vários testes de vigor simultaneamente. Outras pesquisas na área de sementes têm recomendado esse tipo de análise por permitir identificar padrões em dados de qualidade de semente e expressá-los de tal forma que as semelhanças e diferenças possam ser observadas, reduzindo a dimensionalidade sem perder muita informação (Abud et al., 2018; Medeiros et al., 2018).

Na Figura 6 observa-se as imagens radiográficas de duas sementes de braquiária contrastantes quanto à sua densidade tecidual. A semente localizada à esquerda da imagem, aparentemente bem formada (Figura 5D), apresenta-se com distribuição de seus pixels localizados em regiões de níveis de cinza mais elevados do histograma (Figura 5A), sendo um indicativo da alta integridade tecidual da semente, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento de uma plântula bem formada (Figura 5C). Em contraste, observa-se que a semente localizada ao lado direito da imagem apresenta ausência de embrião e endosperma, como evidenciado na Figura 5I, em que é possível observar a região central mais escura. Nesta semente nota-se que a maioria dos picos do histograma situaram-se em zonas de baixo nível de cinza (Figura 5F), evidenciando a baixa densidade relativa da semente (< 35) (Figura 5G e 5J).

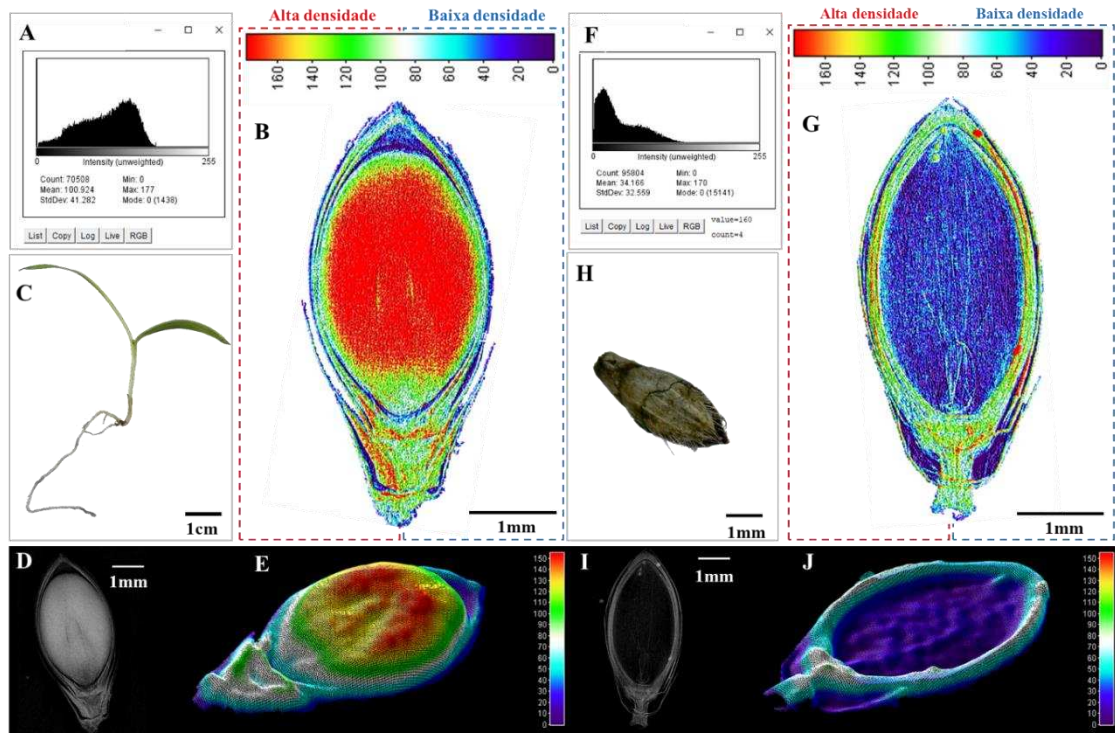


Figura 6. Imagens representativas de duas sementes de *Brachiaria ruziziensis*, com histogramas de nível de cinza (A e F), representações 2D (B e G) e 3D (E e J) em gradiente de cor da densidade ao longo da semente, imagem radiográfica original (D e I) e suas respectivas plântulas ou semente não germinadas (C e H).

Pesquisas recentes com uso de outros tipos de tecnologias ópticas baseadas em ondas eletromagnéticas para análise de sementes, como ressonância magnética nuclear, tomografia de projeção óptica e tomografia por absorção de raios X (Rolletschek et al., 2015; Rousseau et al., 2015) também tem demonstrado excelentes resultados em determinar com precisão atributos fisiológicos das sementes. Essas metodologias, por não serem destrutivas, tornam-se muito valiosas, uma vez que ensaios destrutivos são inadequados se houver necessidade de aumentar a pós-análise do material e são especialmente indesejáveis em situações em que a quantidade de semente disponível é limitada (Rolletschek et al., 2015), ou as sementes são de custo elevado, à exemplo dos híbridos. Assim, o caráter não-destrutivo do teste de raios X é uma importante característica adicional no contexto das tecnologias funcionais de análise de sementes. No entanto, para que o teste atinja o seu máximo de eficiência é necessário que as análises das radiografias geradas sejam adequadas (Abud et al., 2018).

Enquanto os métodos atuais utilizados para acessar informações em imagens radiográficas são demorados ou ineficientes em grande escala, a macro PhenoXray,

desenvolvida neste trabalho, possibilitou a fenotipagem em alta produtividade de sementes de *Brachiaria ruzizienses*, gerando medições de parâmetros morfométricos e parâmetros relacionados à densidade tecidual das sementes de maneira rápida e totalmente automatizada. A PhenoXray propõe uma maneira intuitiva de validar processos de segmentação, atribuindo uma identificação numérica específica à cada semente analisada, o que permite ao usuário pesquisar facilmente os parâmetros constantes nas tabelas de resultados. Além disso, a macro é personalizável, podendo ser adaptada para qualquer outro tipo de semente. A fim de ajudar pesquisadores a incorporar o PhenoXray em suas estratégias de fenotipagem, análises genéticas e funcionais, ela foi desenvolvida como uma ferramenta de fácil utilização e pode ser baixada gratuitamente por toda comunidade científica no site dedicado (<https://seedsciencebrazil.wixsite.com/seedscience>).

Diante dos resultados apresentados, foi demonstrado que a metodologia proposta fornece uma solução rápida, barata e confiável para a avaliação de radiografias de sementes de braquiária a partir de imagens digitais, sendo uma ferramenta altamente aplicável, que permite ainda a predição rápida de atributos fisiológicos ligados à viabilidade e vigor de sementes, por meio dos parâmetros densidade relativa, integrada e preenchimento.

CONCLUSÕES

A análise automatizada de sementes de *Brachiaria ruzizienses* é eficiente para obtenção de dados morfométricos e de integridade dos tecidos internos. Parâmetros como densidade relativa, densidade integrada e preenchimento apresentam estreita relação com atributos fisiológicos de qualidade das sementes. O uso da macro PhenoXray permite a fenotipagem em larga escala de radiografias de sementes de forma simples, rápida, robusta e totalmente gratuita.

REFERÊNCIAS

- ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, p. 433–459. 2010. <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- ABUD, H. F.; CICERO, S. M.; GOMES JUNIOR, F. G. Radiographic images and relationship of the internal morphology and physiological potential of broccoli seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, p. 1–9. 2018. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.34950>.
- ARRUDA, N.; CICERO, S. M.; GUILHIEN, F.; JUNIOR, G. Radiographic analysis for the evaluation of polyembryony in Swingle citrumelo seeds. **Journal of Seed Science**, v. 40, p. 118–126. 2018. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n2175172>.
- BERRY, J. C.; FAHLGREN, N.; POKORNY, A. A.; BART, R. S.; VELEY, K. M. An automated, high-throughput method for standardizing image color profiles to improve image-based plant phenotyping. **PeerJ**, v. 6, p. e5727. 2018. <https://doi.org/10.7717/peerj.5727>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS. 2009.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas e padrões para comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical**. (P. Executivo, Ed.). Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2008.
- CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 167–172. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0401>.
- COSTA, C. M.; YANG, S. Counting pollen grains using readily available, free image processing and analysis software. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1005–1010. 2009. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp186>.
- DHONDT, S.; GONZALEZ, N.; BLOMME, J.; DE MILDE, L.; VAN DAELE, T.; VAN AKOLEYEN, D.; ... INZÉ, D. High-resolution time-resolved imaging of in vitro Arabidopsis rosette growth. **Plant Journal**, v. 80, p. 172–184. 2014. <https://doi.org/10.1111/tpj.12610>.

- FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 567–591. 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>.
- FOLEY, J. A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K. A.; CASSIDY, E. S.; GERBER, J. S.; JOHNSTON, M.; ... ZAKS, D. P. M. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v. 478, p. 337–342. 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10452>.
- GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; ... TOULMIN, C. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**, v. 327, p. 812–818. 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>.
- HUANG, M.; WANG, Q. G.; ZHU, Q. B.; QIN, J. W.; HUANG, G. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. **Seed Science and Technology**, v. 43, p. 337–366. 2015. <https://doi.org/10.15258/sst.2015.43.3.16>.
- HUGHES, N.; ASKEW, K.; SCOTSON, C. P.; WILLIAMS, K.; SAUZE, C.; CORKE, F.; ... NIBAU, C. Non-Destructive, high-Content analysis of wheat grain traits using X-ray micro computed tomography. **Plant Methods**, v. 13, p. 1–16. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0229-8>.
- JAHNKE, S.; ROUSSEL, J.; HOMBACH, T.; KOCHS, J.; FISCHBACH, A.; HUBER, G.; SCHARR, H. pheno Seeder - A Robot System for Automated Handling and Phenotyping of Individual Seeds. **Plant Physiology**, v. 172, p. 1358–1370. 2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01122>.
- JEROMINI, T. S.; BARROS, R. T.; SILVA, G. Z.; MARTINS, C. C. Análise computadorizada de plântulas na avaliação do vigor de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, p. 1–5. 2018. <https://doi.org/10.5039/agraria.v13i4a5570>.
- KOTWALIWALE, N.; SINGH, K.; KALNE, A.; JHA, S. N.; SETH, N.; KAR, A. X-ray imaging methods for internal quality evaluation of agricultural produce. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1–15. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0485-y>.
- LEGLAND, D.; EL-HAGE, F.; MÉCHIN, V.; REYMOND, M. Histological quantification of maize stem sections from FASGA-stained images. **Plant Methods**, v. 13, p. 1–11. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0225-z>.

- MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, p. 363–374. 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>.
- MEDEIROS, A. D. DE; ARAÚJO, J. DE O.; ZAVALA-LEÓN, M. J.; SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. DOS S. Parameters based on x-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v.42, p. 1-10. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542018426023318>
- MEDEIROS, A. D. DE; PEREIRA, M. D. SAPL[®]: a free software for determining the physiological potential in soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, p. 222–228. 2018. <https://doi.org/10.1590/1983-40632018v4852340>.
- MIART, F.; FONTAINE, J.-X.; PINEAU, C.; DEMAILLY, H.; THOMASSET, B.; VAN WUYTSWINKEL, O.; PAGEAU, K.; MESNARD, F. MuSeeQ, a novel supervised image analysis tool for the simultaneous phenotyping of the soluble mucilage and seed morphometric parameters. **Plant Methods**, v. 14, p. 112. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0377-5>.
- MOORE, C. R.; GRONWALL, D. S.; MILLER, N. D.; SPALDING, E. P. Mapping Quantitative Trait Loci Affecting *Arabidopsis thaliana* Seed Morphology Features Extracted Computationally From Images. **G3; Genes|Genomes|Genetics**, v. 3, p. 109–118. 2013. <https://doi.org/10.1534/g3.112.003806>.
- MOREIRA, E. DE A.; SOUZA, S. M. DE; FERREIRA, A. L.; TOMICH, T. R.; AZEVÊDO, J. A. G.; SOUZA SOBRINHO, F. DE; ... PEREIRA, L. G. R. Nutritional diversity of *Brachiaria ruziziensis* clones. **Ciência Rural**, v. 48, p. 1–8. 2018. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160855>.
- NIELSEN, M. S.; DAMKJÆR, K. B.; FEIDENHANS'L, R. Quantitative in-situ monitoring of germinating barley seeds using X-ray dark-field radiography. **Journal of Food Engineering**, v. 198, p. 98–104. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.011>.
- NORONHA, B. G. DE; MEDEIROS, A. D. DE; PEREIRA, M. D. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Moringa oleifera* Lam. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 393. 2018. <https://doi.org/10.5902/1980509831615>.
- R CORE TEAM. R Development Core Team. **R: A Language and Environment for**

- Statistical Computing**. 2018. <https://doi.org/http://www.R-project.org>.
- RAHMAN, A.; CHO, B.-K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v. 26, p. 285–305. 2016. <https://doi.org/10.1017/S0960258516000234>.
- ROLLETSCHKE, H.; FUCHS, J.; FRIEDEL, S.; BÖRNER, A.; TODT, H.; JAKOB, P. M.; BORISJUK, L. A novel noninvasive procedure for high-throughput screening of major seed traits. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 188–199. 2015. <https://doi.org/10.1111/pbi.12245>.
- ROUSSEAU, D.; WIDIEZ, T.; TOMMASO, S.; ROSITI, H.; ADRIEN, J.; MAIRE, E.; ... ROGOWSKY, P. Fast virtual histology using X-ray in-line phase tomography: Application to the 3D anatomy of maize developing seeds. **Plant Methods**, v. 11, p. 1–10. 2015. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0098-y>.
- RUEDEN, C. T.; SCHINDELIN, J.; HINER, M. C.; DEZONIA, B. E.; WALTER, A. E.; ARENA, E. T.; ELICEIRI, K. W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, p. 1–26. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>.
- 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. Disponível em <<https://www.eurofinsus.com/media/162083/seed-vigor-imaging-system>>
- SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; ... CARDONA, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 676–682. 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671–675. 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- SHAMIR, L.; DELANEY, J. D.; ORLOV, N.; ECKLEY, D. M.; GOLDBERG, I. G. Pattern recognition software and techniques for biological image analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 6. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000974>.
- SILVA, L. A. DA; SALES, J. D. F.; NEVES, J. M. G.; SANTOS, H. O. DOS; SILVA, G. P.

- Radiographic image analysis of *Anacardium othonianum* Rizz (anacardiaceae) achenes subjected to desiccation. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, p. 235. 2017. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i2.32484>.
- SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. **SeedCalc: Seed Germination and Seedling Growth Indexes**. R package version 1.0.0. 2018.
- SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D. DE; OLIVEIRA, A. S. SeedCalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, PRELO. 2019.
- SILVA, V. N.; SARMENTO, M. B.; SILVEIRA, A. C.; SILVA, C. S.; CICERO, S. M. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 1158–1169. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400027>.
- SOZZANI, R.; BUSCH, W.; SPALDING, E. P.; BENFEY, P. N. Advanced imaging techniques for the study of plant growth and development. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 304–310. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.003>.
- TANABATA, T.; SHIBAYA, T.; HORI, K.; EBANA, K.; YANO, M. SmartGrain: High-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. **Plant Physiology**, v. 160, p. 1871–1880. 2012. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205120>.
- TELLO, J.; MONTEMAYOR, M. I.; FORNECK, A.; IBÁÑEZ, J. A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: Evaluation of inter- and intracultivar diversity in grapevine. **Plant Methods**, v. 14, p. 1–17. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0267-2>.
- VASSEUR, F.; BRESSON, J.; WANG, G.; SCHWAB, R.; WEIGEL, D. Image-based methods for phenotyping growth dynamics and fitness components in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Methods**, v. 14, p. 1–11. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0331-6>.
- WHAN, A. P.; SMITH, A. B.; CAVANAGH, C. R.; RAL, J.-P. F.; SHAW, L. M.; HOWITT, C. A.; BISCHOF, L. GrainScan: a low cost, fast method for grain size and colour measurements. **Plant Methods**, v. 10, p. 23. 2014. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-23>.

ANEXOS CAPÍTULO I

Anexo I. Macro PhenoXray – adaptada para melão

```
//Macro PhenoXray - adaptada para melão

run("Set Scale...", "distance=39.6045 known=1 pixel=1 unit=mm
global");

run("8-bit");

sourceTitle=getTitle();

run("Duplicate...", " ");

setAutoThreshold("Yen dark");

//run("Threshold...");

run("Convert to Mask");

run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid
center perimeter bounding fit shape feret's integrated median skewness
kurtosis area_fraction stack limit display add redirect=["+
sourceTitle
+"] decimal=3");

run("Analyze Particles...", "size= 15-60 show=[Overlay Masks] display
exclude clear include");

IJ.renameResults(getTitle());

saveAs("Results", "C:\\Users\\Usuario\\Desktop\\2\\"+getTitle+".txt");
```

Anexo II. Correlação numérica entre as variáveis.

Bazuca F1

	Área	Perímetro	Circ.	Dens.Rel.	Dens.Int.	Preenc.	Germinação	Prot.Radic.	IVG	VPR	Sincronia	C.Plântula	Uniformidade	Vigor
Área														
Perímetro	0.42													
Circ.	-0.08	-0.94****												
Dens.Rel.	0.47	-0.41	0.64*											
Dens.Int.	0.93****	0.13	0.21	0.75*										
Preenc.	-0.07	-0.73*	0.78**	0.83**	0.29									
Germinação	0.47	-0.02	0.19	0.82**	0.67*	0.64*								
Prot.Radic.	0.62	0.16	0.08	0.70*	0.72*	0.47	0.91****							
IVG	0.33	-0.20	0.35	0.86**	0.58	0.78**	0.97****	0.86**						
VPRP	0.17	-0.28	0.39	0.68*	0.39	0.77**	0.77**	0.74*	0.84**					
Sincronia	-0.18	-0.65*	0.67*	0.70*	0.15	0.94****	0.58	0.43	0.76*	0.80**				
C.Plântula	0.71*	0.70*	-0.52	-0.03	0.50	-0.47	0.30	0.48	0.11	-0.07	-0.52			
Uniformidade	0.47	-0.11	0.31	0.86**	0.69*	0.70*	0.97****	0.93****	0.95****	0.79**	0.61	0.25		
Vigor	0.77**	0.49	-0.26	0.38	0.71*	-0.03	0.69*	0.81**	0.53	0.32	-0.11	0.89****	0.66*	
Vigor.corr.	0.67*	0.24	-0.02	0.66*	0.75*	0.33	0.92****	0.92****	0.82**	0.59	0.25	0.65*	0.89****	0.92****

Goldex F1

	Área	Perímetro	Circ.	Dens.Rel.	Dens.Int.	Preenc.	Germinação	Prot.Radic.	IVG	VPR	Sincronia	C.Plântula	Uniformidade	Vigor
Área														
Perímetro	-0.43													
Circ.	0.46	-0.99****												
Dens.Rel.	0.62	-0.71*	0.66*											
Dens.Int.	0.81**	-0.67*	0.65*	0.96****										
Preenc.	0.49	-0.97****	0.96****	0.77**	0.74*									
Germinação	0.26	-0.92****	0.87****	0.78**	0.66*	0.92****								
Prot.Radic.	0.07	-0.58	0.52	0.55	0.43	0.45	0.59							
IVG	0.33	-0.82**	0.75*	0.89****	0.77**	0.84**	0.94****	0.60						
VPRP	0.18	-0.91****	0.88****	0.64*	0.54	0.84**	0.86**	0.80**	0.77**					
Sincronia	0.30	-0.03	-0.05	0.56	0.52	0.10	0.17	0.21	0.49	0.01				
C.Plântula	0.60	-0.62	0.59	0.84**	0.83**	0.59	0.62	0.50	0.75*	0.56	0.53			
Uniformidade	0.19	-0.86**	0.80**	0.73*	0.60	0.84**	0.98****	0.58	0.94****	0.80**	0.21	0.63		
Vigor	0.46	-0.81**	0.76*	0.88****	0.81**	0.77**	0.87**	0.60	0.92***	0.74*	0.43	0.92***	0.88***	
Vigor.corr.	0.37	-0.89****	0.85**	0.86**	0.76*	0.88****	0.97****	0.61	0.96****	0.83**	0.31	0.80**	0.96****	0.97****

Pampa F1

	Área	Perímetro	Circ.	Dens.Rel.	Dens.Int.	Preenc.	Germinação	Prot.Radic.	IVG	VPRP	Sincronia	C.Plântula	Uniformidade	Vigor
Área														
Perímetro	-0.47													
Circ.	0.74*	-0.85**												
Dens.Rel.	-0.01	-0.75*	0.36											
Dens.Int.	0.73*	-0.85**	0.79**	0.67*										
Preenc.	0.61	-0.69*	0.89****	0.20	0.58									
Germinação	-0.19	-0.21	-0.03	0.60	0.27	0.02								
Prot.Radic.	-0.14	-0.12	0.12	0.11	-0.02	0.51	0.44							
IVG	-0.17	-0.22	0.00	0.60	0.29	0.10	0.99****	0.53						
VPRP	0.18	-0.86**	0.68*	0.72*	0.61	0.43	0.21	-0.13	0.18					
Sincronia	-0.34	-0.15	-0.10	0.62	0.18	0.03	0.88****	0.54	0.92***	0.13				
C.Plântula	0.12	-0.69*	0.39	0.90****	0.71*	0.37	0.73*	0.37	0.77**	0.53	0.74*			
Uniformidade	-0.24	-0.16	-0.06	0.63	0.27	0.03	0.87****	0.44	0.91****	0.11	0.93****	0.78**		
Vigor	-0.01	-0.52	0.24	0.84**	0.58	0.26	0.83**	0.42	0.87**	0.39	0.86**	0.97****	0.91***	
Vigor.corr.	-0.07	-0.44	0.16	0.80**	0.50	0.19	0.92****	0.44	0.94****	0.36	0.90***	0.93****	0.93****	0.98****

p < .0001 '****'; p < .001 '***', p < .01 '**', p < .05 '*'

ANEXOS CAPÍTULO II

Anexo I. Macro PhenoXray – adaptada para *Brachiaria ruzizensis*

```
//Macro PhenoXray - adaptada para Brachiaria ruzizensis
run("Set Scale...", "distance=59.4013 known=1 pixel=1 unit=mm
global");

run("8-bit");

sourceTitle=getTitle();

run("Duplicate...", " ");

setAutoThreshold("Yen dark");

//run("Threshold...");

run("Convert to Mask");

run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid
center perimeter bounding fit shape feret's integrated median skewness
kurtosis area_fraction stack limit display add redirect=["+
sourceTitle
+"] decimal=3");

run("Analyze Particles...", "size=3.00-12.00 show=[Overlay Masks]
display exclude clear include");

IJ.renameResults(getTitle());

saveAs("Results", "C:\\Users\\Usuario\\Desktop\\2\\"+getTitle+".txt");
```

Anexo II. Correlação numérica entre as variáveis.

	PR	G	VPR	IVG	TMPR	TMG	Z	SincG	CP	IC
PR										
G	1.00****									
VPR	0.98***	0.98****								
IVG	0.99****	1.00****	0.99****							
TMPR	-0.15	-0.17	-0.31	-0.2						
TMG	-0.41	-0.44	-0.5	-0.49	0.19					
SincPR	0.74	0.73	0.77*	0.73	-0.57	-0.38				
SincG	0.47	0.5	0.59	0.54	-0.68	-0.80*	0.74			
CT	0.99****	0.98****	0.94**	0.97***	-0.02	-0.39	0.68	0.39		
IC	0.99****	0.98****	0.94**	0.97***	-0.02	-0.39	0.68	0.39	1.00****	
IU	1.00****	0.99****	0.97***	0.98****	-0.17	-0.36	0.76*	0.45	0.98****	0.98****
Vigor	1.00****	0.99****	0.97***	0.98****	-0.11	-0.38	0.73	0.43	0.99****	0.99****
IVC	0.98****	0.99****	0.96***	0.98****	-0.03	-0.45	0.63	0.41	0.99****	0.99****
Área	0.1	0.08	-0.02	0.06	0.87*	-0.22	-0.36	-0.36	0.22	0.22
Perímetro	-0.07	-0.13	-0.25	-0.19	0.77*	0.32	-0.25	-0.59	0.05	0.05
Largura	0.27	0.26	0.17	0.26	0.81*	-0.12	-0.34	-0.41	0.38	0.38
Altura	-0.22	-0.28	-0.37	-0.32	0.80*	0.11	-0.42	-0.52	-0.1	-0.11
CI	0.12	0.19	0.3	0.26	-0.59	-0.36	0.17	0.5	0.03	0.03
Solidez	0.51	0.55	0.59	0.62	-0.04	-0.79*	0.18	0.53	0.49	0.5
DR	0.98****	0.98****	1.00****	0.98****	-0.32	-0.44	0.78*	0.56	0.95**	0.95**
DI	0.97***	0.96***	0.94**	0.96***	-0.02	-0.5	0.64	0.42	0.98****	0.98****
Preenchimento	0.97***	0.96***	0.97***	0.95***	-0.22	-0.36	0.72	0.44	0.96***	0.96***

	IU	Vigor	VC	Área	PE	Largura	Altura	CIR	Solidez	DR
PR										
G										
VPR										
IVG										
TMPR										
TMG										
SincPR										
SincG										
CT										
IC										
IU										
Vigor	1.00****									
IVC	0.98***	0.98****								
Área	0.06	0.13	0.23							
Perímetro	-0.09	-0.03	-0.05	0.71						
Largura	0.25	0.3	0.42	0.90**	0.5					
Altura	-0.26	-0.2	-0.17	0.81*	0.94**	0.54				
CI	0.14	0.1	0.15	-0.52	-0.96***	-0.26	-0.88**			
Solidez	0.48	0.49	0.61	0.25	-0.47	0.41	-0.33	0.64		
DR	0.98****	0.97***	0.95****	-0.03	-0.21	0.16	-0.35	0.24	0.52	
DI	0.95****	0.97***	0.98****	0.3	0.05	0.44	-0.06	0.04	0.56	0.94**
Preenchimento	0.97***	0.97***	0.95**	0.07	-0.05	0.24	-0.21	0.09	0.43	0.98****