



JANAÍNA GUARIEIRO RIBEIRO DE ASSIS

**PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGEM NA
INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM
SEMENTES DE *Urochloa brizantha***

**LAVRAS - MG
2021**

JANAÍNA GUARIEIRO RIBEIRO DE ASSIS

**PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGEM NA INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE
TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Urochloa brizantha***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Everson Reis Carvalho
Orientador

Prof.^a. Dr.^a. Raquel Maria de Oliveira Pires
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Assis, Janaína Guarieiro Ribeiro de.

Processamento digital de imagem na interpretação do teste de tetrazólio em sementes de *Urochloa brizantha* / Janaína Guarieiro Ribeiro de Assis. - 2021.

76 p. : il.

Orientador(a): Everson Reis Carvalho.

Coorientador(a): Raquel Maria de Oliveira Pires.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Porocessamento digital de imagens. 2. Tetrazólio. 3.

Urochloa brizantha. I. Carvalho, Everson Reis. II. Pires, Raquel Maria de Oliveira. III. Título.

JANAÍNA GUARIEIRO RIBEIRO DE ASSIS

**PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGEM NA INTERPRETAÇÃO DO
TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Urochloa brizantha***

**DIGITAL IMAGE PROCESSING IN THE INTERPRETATION OF THE
TETRAZOLIUM TEST IN SEEDS OF *Urochloa brizantha***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de abril de 2021.

Prof.^a Dr.^a Maria Laene Moreira de Carvalho
Prof.^a Dr.^a Denise Cunha Fernandes Dias
Prof.^a Dr.^a Marcela Carlota Nery
Prof.^a Dr.^a Patrícia de Oliveira Alvim Veiga

UFLA
UFV
UFVJM
IFSULMG

Prof. Dr. Everson Reis Carvalho
Orientador

Prof.^a Dr.^a Raquel Maria de Oliveira Pires
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2021**

Aos meus pais José Carlos e Margaret, por todo amor incondicional, dedicação, incentivo e apoio. À minha vizinha, Dona Tina (in memoriam), jamais irei esquecer.

Ao meu esposo, melhor amigo e companheiro Mayko por todo amor, paciência, suporte e por sempre acreditar em mim.

Ao meu filho Ben, minha razão de viver.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todo amor que Ele tem por nós e pela presença constante em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realizar meu grande sonho em fazer Pós-Graduação e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

À minha orientadora Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho, pela orientação, confiança, amizade, conhecimentos transmitidos e exemplo profissional. Obrigada por tudo, sou e serei sempre grata à senhora.

Ao meu orientador Dr. Everson Reis Carvalho pela disponibilidade em orientar e por todo apoio e incentivo.

À minha coorientadora Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires pela confiança, amizade e todo apoio.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), código de financiamento 001, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Denise, Marcela e Patrícia agradeço pela disponibilidade, ajuda e ensinamentos.

Ao meu eterno amigo e companheiro de vida, meu marido Mayko. Sem você esse sonho não teria sido realizado, te dedico essa conquista.

Ao meu filho Ben, que mesmo não compreendendo minhas ausências, soube ficar com o papai pacientemente.

Aos meus pais por todo incentivo, força e exemplo de vida, dedico essa tese principalmente à vocês.

Em especial, à minha amiga e companheira de doutorado e se Deus quiser de vida, Thaísa, pela amizade, apoio, exemplo e força em todos os momentos. Sem você todo o fardo seria muito mais pesado, muito obrigada amiga.

Aos professores aposentados, João Almir e Renato, atuais do setor de sementes e à pesquisadora Stella pelos ensinamentos, pela amizade e pelo exemplo profissional.

À prof. Dra. Heloísa Oliveira Santos pela ajuda, disponibilidade e amizade.

À Dra. Dayliane por toda ajuda e disponibilidade para me orientar com as análises.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Jaque, Dalva, Geraldo, Rafa, Rosi e Vivi, e à secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Marli, pela disposição e auxílio.

A todos os graduandos de IC que me ajudaram a conduzir o experimento.

A todos que, de alguma forma, me apoiaram durante essa etapa da minha vida.

“Lembre-se de que você é um cisne negro”

(Nassim Nicholas Taleb)

RESUMO

A produção e a utilização de sementes de alta qualidade são fatores de importância para o estabelecimento de plantas de braquiária e formação de pastagens e cobertura adequada. A qualidade das sementes depende do desenvolvimento de técnicas de avaliação precisas e eficientes e o processamento digital de imagens tem sido utilizado para aumentar a acurácia dos resultados e diminuir o tempo e a subjetividade na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de diferentes espécies. Objetivou-se estabelecer processos e metodologias de análise digital de imagens na avaliação da viabilidade de sementes, pelo teste de tetrazólio e no vigor de plântulas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu pelo sistema GroundEye® nas versões S120 e S800. O primeiro experimento foi dividido em três fases, na primeira foi realizado um pré-teste com um lote de semente para desenvolvimento metodológico relacionado à calibração do equipamento por meio da captura e análise de imagem na escolha do melhor plano de fundo para leitura da viabilidade das sementes submetidas ao teste de tetrazólio. Na segunda fase foi feita a avaliação da viabilidade das sementes de nove lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu pelo teste de tetrazólio por análise de imagem e verificado a relação com a qualidade fisiológica das sementes avaliando-se o teor de água, germinação, tetrazólio, emergência, índice de velocidade de emergência e condutividade elétrica de massa. Na terceira fase foi realizado a avaliação do vigor de plântulas, aos 7 e 14 dias após a semeadura, dos nove lotes de sementes, pela análise de imagem e comparado a relação com a qualidade fisiológica, realizada na fase dois. No segundo experimento, 12 lotes de sementes de braquiária foram caracterizados quanto à qualidade fisiológica avaliando-se o teor de água, germinação, primeira contagem de germinação, velocidade de germinação, emergência em condições controladas, velocidade de emergência, condutividade elétrica, sanidade e raio-X. Foi realizada a comparação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio utilizando-se para avaliação dos resultados o método convencional visual e a análise digital de imagens com sementes acondicionadas em placas acrílicas, de diferentes cores, com células individualizadas. Foi possível avaliar a viabilidade de sementes de braquiária submetidas ao teste de tetrazólio por análise digital de imagens, em recipientes acrílicos individualizados de coloração azul escura. A análise digital do vigor de plântulas de braquiária, pelo comprimento da raiz aos sete dias foi possível e se correlaciona com testes de vigor tradicionais. Portanto, o processamento digital de imagens pelo sistema GroundEye® nas versões S120 e S800 com processos e metodologias adequados fornece dados confiáveis sobre a viabilidade e vigor das sementes e plântulas de braquiária e pode ser considerada uma abordagem eficiente, rápida, não subjetiva e com economia de tempo.

Palavras-chave: Processamento digital de imagens. *Urochloa brizantha*. *Brachiaria*. Tetrazólio. Vigor.

ABSTRACT

The production and use of high quality seeds are important factors for the field establishment of brachiaria plants and the formation of pastures and adequate cover. The seed quality depends on the development of accurate and efficient evaluation techniques and the digital image processing has been used to increase the accuracy of the results and to decrease the time and subjectivity in the evaluation of physiological quality of seeds of different species. The aim of this research was to establish methodologies for digital image analysis in the evaluation of seed viability, by the tetrazolium test and in the vigor of seedlings of *Urochloa brizantha* cv. Marandu by the GroundEye® system in the S120 and S800 versions. The first experiment was divided into three phases, in the first, a pre-test was carried out with a seed lot for methodological development related to the calibration of the equipment through the capture and analysis of the image in the choice of the best background for reading the viability of the seeds submitted to the tetrazolium test. In the second phase, seed viability was evaluated for nine seed lots of *Urochloa brizantha* cv. Marandu by the tetrazolium test by image analysis and verified the relationship with the physiological quality of the seeds by evaluating the moisture content, germination, tetrazolium, emergence under controlled conditions, emergence speed index and mass electrical conductivity. In the third phase, the seedling vigor evaluation was carried out, at 7 and 14 days after sowing, of the nine seed lots by image analysis and compared the relationship with the physiological quality, carried out in phase two. In the second experiment, 12 lots of brachiaria seeds were characterized for physiological quality and measured the moisture content, germination, first germination count, germination speed, emergence under controlled conditions, emergence speed, mass electrical conductivity, seed health and X-ray images. A comparison of the viability of the seeds was performed by the tetrazolium test using the conventional, visual method and digital image analysis with seeds packed in acrylic plates with individualized cells in different colors to evaluate the results. It was possible to evaluate the viability of brachiaria seeds submitted to the tetrazolium test by digital image analysis, in individualized acrylic containers of dark blue color. Digital analysis of the brachiaria seedlings vigor, by the length of the root at seven days was possible and correlates with traditional vigor tests. Therefore, digital image processing by the GroundEye® system in versions S120 and S800 with appropriate processes and methodologies provides reliable data on the viability and vigor of brachiaria seeds and seedlings and can be considered an efficient, fast, non-subjective and time-saving approach.

Keywords: Digital image processing. *Urochloa brizantha*. *Brachiaria*. Tetrazolium. Vigor

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Placas acrílicas na cor azul escuro (A), azul claro (B) e preta (C) utilizadas como suporte de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu para avaliação da viabilidade em tetrazólio por meio da análise de imagem..... 31
- Figura 2 - Configurações da primeira ferramenta de inteligência artificial, área de interesse por cor, na morfologia das sementes de braquiária. A- semente de braquiária considerada inviável, com o endosperma de tonalidade branca e o tegumento de tonalidade marrom. B- semente de braquiária considerada viável com o embrião de tonalidade avermelhada.. 33
- Figura 3 - Imagens digitalizadas de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu obtidas pelo sistema Groundeye após reagirem com a solução de tetrazólio e avaliadas como sementes viáveis (A) e inviáveis (B)..... 34
- Figura 4 - Tela de configuração do sistema GroundEye® da análise de calibração do plano de fundo, com utilização de E.V.A. de cor azul (A) e separação do plano de fundo da semente braquiária submetidas ao teste de tetrazólio (B). 37
- Figura 5- Tela de configuração do sistema GroundEye® da análise de calibração do plano de fundo, com utilização de E.V.A de cor preta (A) e separação do plano de fundo da semente braquiária submetidas ao teste de tetrazólio (B). 38
- Figura 6 - Sementes inviáveis de braquiária (A e B) e viáveis (C e D) submetidas ao teste de tetrazólio e à análise digital de imagens obtida pelo sistema GroundEye®.....39
- Figura 7 - Configuração de análise de imagem obtida pelo sistema GroundEye® utilizando a ferramenta de Inteligência Artificial, área de interesse por cor, com seleção da área demarcada de vermelho colorida com a solução de tetrazólio..... 40
- Figura 8 - Porcentagem dos testes de germinação (G), germinação mais sementes dormentes (G+R) e sementes viáveis (TZ) dos nove lotes de sementes de braquiária..... 43
- Figura 9 - Porcentagem de sementes viáveis avaliadas pelo teste de tetrazólio para os nove lotes de sementes de *U. brizantha* analisadas por análise visual e computadorizada de imagens (A) e a média dos nove lotes da análise computadorizada de imagem e visual (B). 44
- Figura 10 - Plântulas normais de braquiária obtidas de sementes submetidas ao teste de germinação em rolo de papel germitest por sete dias (A) e avaliadas por análise de imagens (B). 46
- Figura 11 - Valores de comprimento da Raiz (A), da Razão Hipocótilo-Raiz (B), do hipocótilo (C) e plântulas (D) de *Urochloa brizantha* cv. Marandu obtidos por meio da análise de imagem aos sete dias após a semeadura em rolo de papel.. 48
- Figura 12 - Valores de comprimento da Raiz (A), da Razão Hipocótilo-Raiz (B), do hipocótilo (C) e de plântulas (D) *Urochloa brizantha* cv. Marandu obtidos por meio da análise de imagens aos 14 dias após a semeadura em rolo de papel. 50

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Incidência de fungos (%) nos doze lotes de sementes de <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu submetidas ao teste de sanidade..... | 54 |
| Figura 14 - Análise dos componentes principais (PCA) referentes aos testes de germinação, emergência e sanidade dos doze lotes de sementes de <i>U. brizantha</i> cv. Marandu..... | 57 |
| Figura 15 - Correlação de Pearson (r) entre germinação e fitopatógenos encontrados em doze lotes de sementes de <i>U. brizantha</i> cv. Marandu..... | 58 |
| Figura 16 - Análise de imagem radiográfica de sementes de <i>U. brizantha</i> cv. Marandu.. | 59 |
| Figura 17 - Coeficiente de correlação de Pearson estimado entre os resultados dos testes de tetrazólio na avaliação da viabilidade das sementes dos doze lotes de <i>U. brizantha</i> cv. Marandu pela análise visual e de imagem nos diferentes planos de fundo das placas: azul escura (AzE), preta (P) e azul clara (AzC)..... | 63 |
| Figura 18 - Análise dos componentes principais (PCA) na avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio nos doze lotes de sementes de <i>U. brizantha</i> cv. Marandu referentes à análise visual (tetrazólio visual) e de imagem das redes de decisões dos planos de fundo de cor azul escuro com o classificador 1 (AzE1), azul escuro com o classificador 2 (AzEC2), azul claro com o classificador 1 (AzCC1), azul claro com o classificador 2 (AzCC2), preto com o classificador 1 (PC1), preto com o classificador 2 (PC2)..... | 64 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios dos testes de primeira contagem de germinação (PCG), condutividade elétrica (CE), tetrazólio (TZ), germinação (G), somatório das plântulas normais mais sementes remanescentes viáveis após o teste de germinação (G+R), emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) obtidos em nove lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu.....40
- Tabela 2 - Valores médios (%) do teste de germinação (G), semente morta (SM), semente dormente (SD), primeira contagem de germinação (PCG), plântula anormal (PA), semente remascente da germinação (SRG), velocidade de germinação (VG) para avaliação do potencial fisiológico dos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu.....51
- Tabela 3 - Valores médios do teste de emergência (estande inicial - EI% e estande final - EF%), velocidade de emergência (VE) e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) (CE) para avaliação do potencial fisiológico dos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu.....53
- Tabela 4 - Quadrados médios (QM), Coeficiente de variação (C.V.) e significância do F referentes às análises do teste de tetrazólio visual e por análise de imagem realizadas nas diferentes placas e classificadores dos doze lotes de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu.....59
- Tabela 5 - Porcentagem média da viabilidade de sementes dos doze lotes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu avaliadas pela análise visual e por imagem..... 60
- Tabela 6 - Média da porcentagem de sementes viáveis dos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu por análise visual e de imagem..... 64

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 15 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 15 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 3.1 | Mercado de sementes forrageiras no Brasil | 15 |
| 3.2 | Qualidade de sementes do gênero <i>Urochloa</i>..... | 17 |
| 3.3 | Teste de tetrazólio por meio do processamento digital de imagem..... | 20 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 4.1 | Experimento 1: Desenvolvimento de metodologias de análise de imagem na determinação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio e na avaliação do vigor de plântulas de braquiária | 24 |
| 4.2 | Experimento 2: Comparação da avaliação da viabilidade de sementes pelo método convencional e por análise de imagem | 29 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 35 |
| 5.1 | Experimento 1: Desenvolvimento de metodologias de análise de imagem na determinação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio e na avaliação do vigor de plântulas de braquiária | 35 |
| 5.2 | Experimento 2: Comparação da avaliação da viabilidade de sementes pelo método convencional e por análise de imagem. | 51 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 67 |
| | REFERÊNCIAS..... | 68 |

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne e leite no país é baseada em grande parte em pastagens de gramíneas e leguminosas forrageiras. Devido à importância da pecuária nacional para a economia do país, o cultivo de plantas forrageiras assume papel relevante para a cadeia produtiva (REIS; BERNARDES; SIQUEIRA 2013). Além da crescente utilização de plantas forrageiras como plantas de cobertura em sistema de plantio direto de grandes culturas.

O Brasil é considerado o maior produtor, consumidor e exportador de sementes de gramíneas forrageiras do mundo, exportando para mais de 20 países. Entre as forrageiras cultivadas, as gramíneas do gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) são as mais utilizadas no Brasil, devido principalmente à sua alta capacidade de se adaptar às diferentes condições edafoclimáticas. Além disso a *U. brizantha* se destaca por ser a forrageira com o maior volume de sementes destinadas à exportação (ABRASEM, 2019).

Apesar do volume de produção, a qualidade de sementes de forrageiras voltadas para o abastecimento do mercado interno brasileiro, se apresenta muitas vezes, abaixo dos padrões mínimos de comercialização, que é de 60% para o teste de germinação ou tetrazólio, estabelecidos em normas e padrões federais (IN N° 30, de 26 de outubro de 2010). Vários são os fatores que podem interferir diretamente na qualidade das sementes comerciais, entre eles, a falta de uniformidade na emissão das inflorescências; florescimento irregular nas panículas; baixo número de sementes férteis; dormência das sementes, a alta deiscência natural, um dos maiores problemas da qualidade das gramíneas forrageiras tropicais e o método de colheita por varredura, que contém grande quantidade de impurezas (BONOME et al., 2017; RIBEIRO et al., 2019).

Diante disso e devido à importância que o mercado de forrageiras representa para o Brasil, a cadeia produtiva dessas sementes tem passado por transformações nos últimos anos e o uso de técnicas rudimentares, com baixo controle de qualidade, perdeu espaço pelo fato dos consumidores estarem mais exigentes e conscientes da importância da qualidade. Os setores de produção têm se especializado e, em consequência, demandado novas tecnologias de avaliação da qualidade das sementes, como o emprego de testes rápidos, uma ferramenta importante em programas de controle de qualidade de sementes.

Testes que além de agilidade, proporcionem segurança em seus resultados, são fundamentais nos laboratórios de análises de sementes, principalmente na comercialização daquelas sementes de espécies, que exigem períodos relativamente longos para se obter resultados da condução do teste de germinação.

É o caso de sementes forrageiras do gênero *Urochloa*, que tem como indicação das Regras para Análise de Sementes, o prazo de até 21 dias para realização do teste de germinação (BRASIL, 2009), tempo demasiado longo, quando comparado com outras espécies cultivadas. Por determinação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o teste de germinação mesmo sendo considerado oficial, quando da comercialização dessas sementes, pode ser substituído pelos resultados do teste de tetrazólio, de acordo com instrução normativa de número 30, de 26 de outubro de 2010 (BRASIL, 2010).

Este teste de viabilidade proporciona informações valiosas sobre o vigor e é utilizado rotineiramente por empresas produtoras de sementes forrageiras. Existem ainda algumas limitações como a subjetividade da análise, o consumo excessivo de tempo para obtenção dos resultados, além do cansaço visual ocasionado pela análise de sementes individuais e pequenas, o que pode levar a erros. Estudos que investiguem a possibilidade de avaliação do teste de tetrazólio de forma rápida e eficiente são altamente desejáveis.

Um exemplo refere-se à mecanização e a automação de procedimentos analíticos que têm possibilitado avanços no controle de qualidade de sementes de várias espécies. O processamento digital de imagens, técnica não destrutiva, rápida, objetiva e extremamente eficiente para a avaliação da qualidade das sementes, tem sido cada vez mais estudada e por sua diversidade de aplicabilidade, tem ganhado espaço em diversos campos, havendo ainda a necessidade de pesquisas que permitam validar o uso desse tipo de análise na rotina de laboratórios para diferentes espécies. Além disso, essa técnica possibilita a ampliação e armazenamento das imagens que constituem uma ferramenta valiosa no controle de qualidade interno das empresas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Adequar processos e metodologias de análise digital de imagens na avaliação da viabilidade de sementes no teste de tetrazólio e no vigor de plântulas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu pelo sistema GroundEye® nas versões S120 e S800.

2.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver e testar metodologias de análise digital para avaliar a viabilidade de sementes de braquiária submetidas ao teste de tetrazólio e correlacionar os resultados com a qualidade fisiológica das sementes.
2. Avaliar o vigor de plântulas por análise de imagem e correlacionar os resultados com testes de vigor tradicionais.
3. Comparar a viabilidade de sementes de braquiária submetidas ao teste de tetrazólio pelo método convencional, visual, com a análise de imagem.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Mercado de sementes forrageiras no Brasil

As áreas de pastagens no Brasil ocupam a maior parte do território nacional. São áreas em que se desenvolve preferencialmente a criação de bovinos de corte e leiteiro, responsáveis por produtos de consumo direto, produtos industrializados, e também para exportação de carnes. Geralmente, estas áreas de pastagens cultivadas são de baixa tecnologia, apresentando baixa lotação animal por hectare. Para melhoria desta situação, deve-se considerar que, entre os vários fatores para implantação de novas áreas ou renovação de pastagens, o uso de sementes de alta qualidade é fator primordial (VILELA, 2017).

Na safra 2018/2019, a produção de sementes de forrageiras tropicais no Brasil foi de aproximadamente 60 mil toneladas com área plantada de 197,6 mil hectares e para exportação de 9,5 mil toneladas e US\$ 79,65 milhões (ABRASEM, 2019). Dos 161,7 milhões de hectares cultivados com pastagens no país, 150,5 milhões são de uso exclusivo de pastagens e 11,8 milhões são de pastagens em uso integrado (ABIEC, 2018).

Estima-se que de toda a área com pastagens cultivadas no Brasil, 60% da área seja ocupada por forrageiras do gênero *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*) (BISCOLA; PEREIRA; COSTA, 2013).

Sua ampla utilização se deve a uma série de características que as tornam atrativas aos produtores: grande adaptação às mais variadas condições de solo e de clima, elevado potencial de produção de forragem e bom valor nutritivo (TELES et al., 2011).

Geralmente, estas áreas de pastagens cultivadas são de baixa tecnologia (ABIEC, 2018) porém, o aumento da produtividade precisa, necessariamente, passar pelo manejo das pastagens. No Brasil, estima-se que 57% das pastagens apresentam algum nível de degradação (PARENTE, et al., 2019) e para melhoria desta situação, deve-se considerar que, entre os vários fatores para implantação de novas áreas ou renovação de pastagens, o uso de sementes de alta qualidade apresenta-se como fator primordial na obtenção do sucesso (MACEDO et al., 2013).

Os mercados interno e externo, estão cada vez mais exigentes, da importância da qualidade das sementes no estabelecimento rápido e uniforme do dossel de plantas no campo, pressionando a indústria sementeira cada vez mais, em busca da produção de sementes de alta qualidade fisiológica e de baixo custo. No campo, a utilização de sementes que atendam os atributos de qualidade fisiológica, genética, física e sanitária, é essencial, pois apresentam maior capacidade de suportar condições adversas, além de evitar contaminação genética e física e proporcionar confiabilidade ao agricultor (AMARO et al., 2019; DECARLI et al., 2019; ZHENG et al., 2016).

Isso porque, apesar de ser considerado o maior produtor de sementes forrageiras tropicais no mundo, historicamente, o consumo interno brasileiro é principalmente de sementes consideradas de baixa qualidade quando comparadas às sementes de grandes culturas. Além disso, existe ainda o comércio informal, com o uso de sementes piratas que podem causar prejuízos ao setor sementeiro por disseminar doenças e plantas daninhas (KIST et al., 2019).

Os atributos de qualidade para comercialização de sementes no país são assegurados por Instruções Normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Instrução Normativa nº 30 de 21 de maio de 2008 é responsável por determinar os parâmetros de comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical. Esta determina que o percentual mínimo de germinação para as espécies *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* deve ser de 60%, enquanto que a *U. humidicola* deve apresentar germinação mínima de 40% (BRASIL, 2008). Atualmente, vigora a Instrução Normativa de número 30 de 26 de outubro de 2010 que estabelece que sementes dessa espécie poderão ser comercializadas com base nos resultados de viabilidade obtidos por meio do Teste de Tetrazólio - TZ, conforme metodologias estabelecidas pelo MAPA (BRASIL, 2010).

Dessa forma, a produção e o controle da qualidade de sementes forrageiras, em especial do gênero *Urochloa*, necessitam de mais investimentos e desenvolvimento de tecnologias para atender às demandas do mercado nacional e internacional.

3.2 Qualidade de sementes do gênero *Urochloa*

Semente de qualidade é um dos principais componentes para uma produção agrícola bem sucedida e seu uso torna-se necessário para assegurar populações adequadas de plantas em condições de campo (KHAN et al, 2016).

Para a formação de pastagens de excelente qualidade não basta somente manejo adequado, mas também a utilização de sementes com alto poder germinativo e vigor (CARDOSO et al., 2014; SILVA et al., 2013).

A qualidade de um lote de sementes resulta da interação de características físicas, genéticas, fisiológicas e sanitárias, que determinam o seu valor para a semeadura, sendo que para avaliação da qualidade, torna-se necessário correlacionar resultados de testes laboratoriais e o desempenho de sementes em campo (CANTARELLI et al., 2015).

Segundo Laura et al. (2009), o atributo fisiológico, determinado pela longevidade, germinação e vigor, é aquele atributo que mais tem despertado interesse em pesquisas em análise e controle de qualidade de sementes. É esse atributo que fornece informações ao agricultor se as

sementes que ele adquiriu vão se expressar no campo, mesmo em condições de estresse, se vão apresentar uma maior velocidade de germinação e emergência e a formação de um estande adequado, uniforme e vigoroso, proporcionando os melhores resultados pela maximização dos demais insumos aplicados nos solos e conseqüentemente, o retorno do seu investimento (PIRES, 2021).

Nos últimos anos, o cenário sementeiro tem apresentado uma dinâmica diferenciada em relação aos seus padrões de qualidade. Empresas do setor sementeiro têm se deparado com um mercado, tanto nacional, quanto internacional exigente e consciente da importância de se adquirir sementes com bons atributos de qualidade e dentro de padrões mínimos estabelecidos conforme legislação específica para cada espécie a ser comercializada (VERSZIGNASSI, 2013).

No entanto, no caso específico das sementes forrageiras, características da espécie *Urochloa brizantha* e o manejo da cultura, além de dificultar a produção de sementes, tem limitado a obtenção de lotes homogêneos e qualidade comercial (AMARO et al., 2019; DECARLI et al., 2019; LAURA et al., 2009; MACEDO, 2005; MASCHIETTO, 1994; ZHENG et al., 2016)

Dentre as características da espécie, destaca-se o período prolongado para emissão das inflorescências e abertura de flores entre e dentro de uma mesma inflorescência, a degrana das sementes, por ocasião da maturação, ou mesmo antes, e dormência das sementes (; LAURA et al., 2009; MASCHIETTO, 1994).

Um agravante é que em relação ao manejo da cultura, nos campos de produção a maior parte das sementes é colhida pelo sistema de varredura do solo. Deste modo, os lotes de sementes produzidos podem conter grande quantidade de impurezas, tais como torrões de terra, pedras, espiguetas vazias, cariopses parcialmente desenvolvidas, imaturas, sementes de plantas daninhas e palha, o que prejudica diretamente a qualidade física e sanitária das sementes, uma vez que a presença de patógenos nas sementes resulta no decréscimo da germinação e do vigor, além de comprometer o desenvolvimento e a formação da cultura em campo (MARCOS et al., 2015; MELO et al., 2016; NERY et al., 2012).

Com os diversos fatores que podem afetar à qualidade de sementes de espécies forrageiras de clima tropical, foram criadas normas e padrões mínimos de qualidade, estabelecidos na Instrução Normativa de nº 30 de 21 de maio de 2008, que determinam dentre outras

regulamentações, que sejam realizados alguns testes como: pureza física; germinação ou viabilidade de sementes pelo teste de tetrazólio (BRASIL, 2010).

O teste de germinação consiste na determinação do potencial de germinação em condições ótimas de laboratório, podendo ser usado para se comparar o desempenho de diferentes lotes e estimar o valor para semeadura em campo (BRASIL, 2009). Para muitos, no entanto, por ser um teste considerado padronizado com ampla repetição dos resultados, ele superestima o potencial fisiológico, por não considerar aspectos reais da relação semente x ambiente, além do que, o teste de germinação não detecta o progresso da deterioração de sementes (MARCOS-FILHO, 2015).

Dessa forma, torna-se necessário utilizar testes que além de identificar possíveis variações no grau de deterioração das sementes quando expostas às condições adversas de ambiente também forneçam informações da viabilidade destas. Estes testes devem apresentar características que justifiquem seu uso adicional nos programas de controle de qualidade interno, como; simplicidade, rapidez, baixo custo, objetividade, reprodutibilidade e resultados relacionados com a emergência das plântulas em campo (MARCOS-FILHO, 2015).

Dentre esses testes, destaca-se o teste de tetrazólio, um dos testes de maior aplicabilidade para diversas espécies. Tem como princípio a alteração da coloração de tecidos vivos pela difusão do sal 2-3-5 trifenil-tetrazólio, que forma um composto de coloração rósea chamado formazam. Tecidos vivos se colorem indicando atividade respiratória nas mitocôndrias e tecidos mortos ou com baixa atividade respiratória, permanecem descoloridos (KRZYZANOWSKI et al., 2020).

No processo de produção de sementes, principalmente forrageiras, seu uso como parte do controle interno de qualidade, se justifica por ser um teste rápido que indica o potencial de geminação dos lotes em tempo inferior ao estabelecido pelo teste tradicional de germinação, que são 21 dias. No entanto, pela inserção cada vez mais recorrente de tecnologias, empresas vem acrescentando em seus programas internos, a análise de sementes e plântulas por meio de imagens digitais. Seu uso é favorecido pela redução ainda maior do tempo, pela consistência das informações que apresentam, pouca interferência humana por ser um processo automatizado, além de ser um método não destrutivo que viabiliza o material para avaliações posteriores (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO NETO et al., 2012).

3.3 Teste de tetrazólio por meio do processamento digital de imagem

O teste de tetrazólio, segundo a International Seed Testing Association - ISTA (2021) e Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) é um teste bioquímico para determinar a viabilidade de sementes de forma indireta, por meio da atividade respiratória nas células que compõem os tecidos das sementes. Tem como objetivo estimar de forma rápida a viabilidade de amostras de sementes, em particular, aquelas que demonstram dormência ao final do teste de germinação. No caso de espécies que germinam lentamente, este teste pode inclusive, ser usado em substituição ao tradicional teste de germinação, como é o caso de algumas gramíneas (Poaceae) forrageiras.

A técnica para a condução do teste de tetrazólio é dividida em pré-condicionamento, preparo para coloração, imersão em solução de tetrazólio e avaliação da semente. Em menos de 24 horas é estimada a viabilidade das sementes com base na alteração da coloração dos tecidos vivos em presença de uma solução incolor do 2,3,5 trifenil cloreto ou brometo de tetrazólio, usada como indicador para revelar os processos de redução que acontecem dentro das células vivas. Os íons de H⁻ liberados durante a respiração dos tecidos vivos são transferidos por algumas enzimas, principalmente a desidrogenase do ácido málico, e interagem com o tetrazólio, o qual é reduzido a um composto vermelho, estável e não difusível, chamado de trifenil formazan. Como todo o processo acontece no interior das células vivas e como já mencionado que o composto não se difunde, há nítida separação dos tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles que não colorem, ou seja, mortos (BRASIL, 2009).

Porém, como limitação, não possibilita ter maiores informações sobre a porcentagem de sementes dormentes e nem sobre contaminação de patógenos (BRASIL, 2009). Segundo Carvalho et al. (2013), os resultados do teste não sofrem interferência de fatores que podem influenciar algumas análises, como no teste de germinação com a incidência de microrganismos, além de ser possível aplicá-lo em sementes recém colhidas, e dispensar o tratamento para superação de dormência, que geralmente precede os testes iniciais.

O teste de tetrazólio pode ser utilizado em situações quando há necessidade da rápida aquisição de resultados para a semeadura, pois o tempo para obtenção dos resultados do teste de germinação varia de acordo com cada espécie e que no caso das gramíneas forrageiras, pode

demorar de 21 a 28 dias (BRASIL, 2009). Pode também ser empregado para esclarecer fatores não explicados pelo teste de germinação, como o caso de grande quantidade de plântulas anormais e mortas. Ainda por meio desse teste, as sementes poderão ser comercializadas com base nos resultados de viabilidade, substituindo assim o teste de germinação, conforme a Instrução Normativa de número 30 de 26 de outubro de 2010 (BRASIL, 2010).

Dias; Alves (2008), desenvolveram uma metodologia para reconhecimento de sementes viáveis e não viáveis de *Urochloa* spp, a qual é reconhecida e recomendada pela RAS (BRASIL, 2009). Estes autores afirmaram que o teste de tetrazólio e de germinação foram complementares e, em conjunto, permitiram avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *Urochloa brizantha* cultivar Marandu, recomendando que este teste fosse utilizado por empresas produtoras de sementes forrageiras, mas atentando que a metodologia utilizada em cada laboratório poderia variar de acordo com a concentração da solução, período e temperatura de embebição e de coloração, ou seja, haveria ainda uma dificuldade de padronização do teste.

O teste de tetrazólio não requer equipamentos complexos, entretanto, exige bom conhecimento de morfologia da semente por parte do analista e seu resultado é bastante subjetivo. A subjetividade do teste provoca variações de resultados entre analistas em função da dificuldade de visualização das estruturas da semente e, da interpretação das tonalidades da cor vermelha (DIAS; BARROS, 1999). É um método qualitativo visual que se não for realizado por uma pessoa treinada, pode gerar um falso negativo (ZORZAL et al., 2015). Assim, a eficiência na avaliação adequada do teste de tetrazólio é baseada na correta identificação dos tecidos viáveis e não viáveis e na capacidade de diferenciar o vigor das sementes, por parte do analista (AZERÊDO; PAULA; VALERI, 2011).

Para isso, após a coloração pela solução de tetrazólio, as diferenças de cor observadas nas sementes são as principais características que devem ser consideradas na interpretação dos resultados do teste. A intensidade de coloração das sementes no teste de tetrazólio é variável entre as espécies. Por exemplo, a cor rosa observada em sementes viáveis de leucena é mais clara que a verificada em sementes de *Urochloa brizantha* que apresenta uma cor vermelha ou rosa intenso quando colocadas nas mesmas condições e concentrações. (COSTA; SANTOS, 2010; DIAS; ALVES, 2008).

Mesmo que não necessite de equipamentos sofisticados, conforme dito anteriormente, para observação de espécies que produzem sementes pequenas, como as forrageiras, é necessário

o auxílio de estéreo microscópio para facilitar a visualização e diminuir o esforço visual do analista (HOSOMI et al., 2011), uma vez que essas sementes são analisadas individualmente, e a tomada de decisão deve ser no momento da leitura. Não há na literatura, indicação para o armazenamento das sementes de forrageiras após a coloração, como é recomendável para algumas espécies, como a soja por exemplo, que pode ficar até 12 horas imersas em água e em refrigerador antes da interpretação do teste (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO NETO et al., 2012).

Diante dessas dificuldades, faz-se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas que tenham a finalidade de aumentar a eficiência, a confiança dos resultados e que reduz o erro humano, tais como o processamento digital de imagens que permite a análise de um grande número de amostras de forma rápida (BRUNES et al., 2016; MEDEIROS, PEREIRA, SILVA, 2018). A padronização desses métodos deve ser constantemente reavaliada mediante aplicação de testes de referência, de testes alternativos e da determinação de novas metodologias (GUEDES et al., 2011).

O equipamento GroundEye[®], Tbit Tecnologia e Sistemas, tem por finalidade a avaliação da qualidade física e fisiológica das sementes através de imagens de alta resolução que permitem a extração de informações quanto a cor, textura e geometria (diâmetro, área, circunferência, circularidade) além de fornecer índices para taxas de crescimento e uniformidade de plântulas (PINTO et al., 2015; SILVA et al., 2013).

Segundo Vasconcelos et al. (2018) e Andrade et al. (2016), esse equipamento é capaz de extrair e analisar mais de 300 características morfológicas de sementes e mudas e conforme Guedes et al. (2011), Zhang et al. (2018) e Xia et al. (2019), por ser um método de avaliação não destrutivo, as sementes podem ser utilizadas para germinar após a captura da imagem, em algumas situações. A partir daí, às possíveis relações entre as características físicas e fisiológicas podem ser definidas com base nas análises.

Entretanto, o uso de imagens digitalizadas é uma alternativa que permite a ampliação, o acesso rápido, o arquivamento da informação obtida para uso posterior (HOSOMI et al., 2011). Além disso, permite que a aferição dos resultados seja realizada por mais de um analista, que a transmissão das imagens possa ser feita pela internet para compartilhar a informação, e há também a facilidade de padronizar o procedimento. Como agilidade do processo, as sementes de

uma repetição, podem ser visualizadas simultaneamente (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO NETO et al., 2012).

Estudos realizados com o teste de tetrazólio através de imagens escaneadas em sementes de braquiária, trigo e aveia branca, foram equivalentes às avaliações feitas com o uso de lupas e microscópios, além de proporcionarem uma ampliação maior das sementes (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO NETO et al., 2012; GARCIA, 2018; TEJO et al., 2018; TEJO et al., 2017)

Segundo Freitas et al. (2020) o teste de tetrazólio modificado, utilizando o processamento digital de imagens, é uma ferramenta promissora para complementar a análise sensorial de café e torna-se necessário a execução de pesquisas adicionais para viabilizar sua utilização.

Tejo et al. (2018) ao avaliarem a qualidade fisiológica de sementes de aveia branca com ênfase no teste de tetrazólio com imagens digitalizadas, comprovaram a eficácia da metodologia de avaliação, além de facilitar as análises e proporcionar resultados seguros a respeito da viabilidade das sementes.

Segundo Vieira et al. (2000) ao avaliarem o teste de tetrazólio em sementes de milho pela técnica de análise de imagem foi possível eliminar a área do tegumento, pericarpo e endosperma e analisar somente a área de interesse, o embrião, sendo então, possível discriminar os lotes quanto à qualidade fisiológica.

Mecheln et al. (2015) em seu trabalho de identificação de danos em sementes de soja através do teste de tetrazólio usando macro imagens, estudaram a possibilidade de realizar a identificação de danos em semente de soja através do processamento de imagens, contudo há a necessidade de aprimorar ainda mais a técnica para aumentar a acurácia dos resultados.

A aplicação da digitalização das sementes para avaliação do teste de tetrazólio vem sendo adotada com êxito em várias espécies. Entretanto, no caso das *Urochloa* spp. que possuem estruturas embrionárias pequenas, os estudos ainda são escassos e necessários, apesar da técnica gerar benefícios proporcionando aos analistas a facilidade de analisar as sementes de forma mais rápida e precisa (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO NETO et al., 2012).

Outro método utilizado por meio do processamento digital de imagens é na avaliação do potencial fisiológico em plântulas (MEDEIROS; PEREIRA; SILVA, 2018; JEROMINI et al., 2018; PEREIRA et al., 2020). Os diferentes equipamentos e softwares utilizados, como o SVIS® (Seed Vigor Imaging System), ImageJ, GroundEye® e Vigor-S tem como objetivo avaliar o

vigor de plântulas por meio do seu crescimento e comparar os resultados com os testes tradicionais.

Sendo assim, o uso do processamento digital de imagem, por meio de metodologias adequadas seria uma alternativa para reduzir o tempo gasto na avaliação visual, bem como eliminar a subjetividade da análise dos testes que avaliam a viabilidade de sementes e o vigor de plântulas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras - Minas Gerais, Brasil.

Para atender aos objetivos propostos, o trabalho foi dividido em 2 experimentos envolvendo análise de imagens em sementes e plântulas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu. Os experimentos estão descritos a seguir:

4.1 Experimento 1: Desenvolvimento de metodologias de análise de imagem na determinação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio e na avaliação do vigor de plântulas de braquiária

O experimento 1 foi realizado em três fases. Na primeira fase foram realizados ajustes metodológicos para definição do plano de fundo ideal para a visualização de sementes de braquiária submetidas ao teste de tetrazólio pela análise de imagem com a utilização do equipamento GroundEye®. Nessa fase foi utilizado apenas um lote para os testes preliminares. Na segunda fase foi feita a caracterização fisiológica de nove lotes de sementes e a relação com o teste de tetrazólio avaliado por análise de imagem com o plano de fundo definido na fase um. Na terceira fase foi avaliado o vigor de plântulas dos mesmos lotes com o uso da análise de imagem e comparou-se os resultados com os testes de vigor tradicionais.

Fase 1 - Pré-teste para desenvolvimento metodológico de captura e análise de imagens para leitura da viabilidade das sementes

Para a calibração do equipamento de análise de imagem GorundEye® versão S120 e obtenção dos parâmetros de avaliação da viabilidade, quatro repetições de 50 sementes de um lote comercial de *Urochloa brizantha* cv. Marandu foram submetidas ao teste de tetrazólio.

Para o **teste de tetrazólio** as sementes foram pré-embebidas entre papel de filtro umedecido com 2,5 vezes o peso do papel em água destilada e mantidas em germinador com temperatura a 25 °C por 18 horas. As sementes foram cortadas longitudinalmente com auxílio de bisturi e colocadas em solução de 0,5% de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio em frascos escuros e mantidos em câmaras de germinação tipo BOD com temperatura constante de 35 °C por 3 horas (BRASIL, 2009).

Na avaliação visual e digital foram consideradas a localização e a intensidade da coloração pelo tetrazólio, de acordo com Brasil (2009).

A análise visual foi realizada por um único analista com auxílio de um microscópio estereoscópico com amplificação de 10x.

Para a análise por imagem foram testados dois métodos para a captura das imagens, no primeiro utilizou-se fita dupla face fixadas em folha de acetato transparente e no segundo as sementes cortadas foram dispostas sobre a borracha E.V.A. e entre duas placas de vidro antirreflexo, a fim de evitar o reflexo em superfícies úmidas das sementes e a movimentação das mesmas sobre a bandeja de captura de imagens. Foram realizados testes para escolha dos melhores planos de fundo para a leitura da imagem. Para seleção do melhor contraste entre o fundo e as sementes de braquiária coloridas com solução de tetrazólio, foram utilizadas diferentes colorações de planos de fundo com borracha E.V.A. (Etileno Acetato de Vinila) nas cores preto, azul e amarelo.

Foram realizadas configurações de análise das imagens e testados os espaços de cor (RGB, HSV, CIE L*a*b e YCbCr) combinados com as suas respectivas coordenadas. Essa configuração, denominada de segmentação, tem como função separar os objetos de interesse do restante da imagem (LIMA, 2015).

A cor é o resultado da percepção da luz que incide na retina em células foto-receptoras, denominadas cones. A maioria das cores visíveis pelo olho humano pode ser representada pela

combinação de luzes monocromáticas nos comprimentos de onda do azul, vermelho e verde. Uma cor pode ser decomposta em três componentes independentes: intensidade, matiz, e saturação. A intensidade é responsável pela sensação de brilho. A matiz pela sensação de “cor” (comprimento de onda). A saturação pelo grau de pureza da cor em relação ao branco. O espaço de cor RGB é formado pela soma ponderada dos componentes Red (R), Green (G) e Blue (B). O espaço HSV representa a matriz, saturação e brilho. Como os componentes primários são descorrelacionados, ao melhorar a imagem por meio de transformações radiométricas aplicadas à saturação (S) e/ou ao brilho (V) não afeta a matiz (H). Para o espaço de cor CIE L*a*b, o CIE (Commission Internationale de l’Eclairage), responsável por criar esses modelos de cor, definiu o L* com sendo a luminosidade e as coordenadas cromáticas a* (vermelho/verde) e b* (amarelo/azul). Por fim, o espaço de cor YCbCr, a informação de luminância é representada por Y, a de cor por Cb e Cr (azul e vermelha respectivamente) (BARCELLOS, 2011; CANDEIAS; SILVA, 2004; LIMA, 2015; MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

Utilizou-se também características de geometria das sementes (tamanho máximo e mínimo) para separar os objetos do fundo. Foi feita a seleção do plano de fundo ideal do E.V.A. que permitisse maior contraste entre as sementes e o fundo da imagem.

Fase 2 - Avaliação da viabilidade das sementes submetidas ao teste de tetrazólio com análise digital de imagens e a relação com a qualidade fisiológica

Nove lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cultivar Marandu foram avaliados para caracterização inicial da qualidade fisiológica (perfis dos lotes), por meio dos seguintes testes:

Teor de água: determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas com duas repetições de 5 g de sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem de teor de água (b.u.) (BRASIL, 2009).

Germinação: foi utilizado como substrato o papel mata-borrão, em caixas gerbox, umedecido com 2,5 vezes a massa seca do papel em água destilada. As sementes foram mantidas em BOD com temperatura alternada 20-35 °C e fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro, realizando-se a contagem de plântulas normais conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) no sétimo dia (primeira contagem), e contagem final no vigésimo

primeiro. As sementes remanescentes do teste de germinação foram submetidas ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade.

Tetrazólio: as sementes foram pré-embebidas entre papel de filtro umedecido com 2,5 vezes o peso do papel em água destilada e mantidas em germinador com temperatura a 25 °C por 18 horas. Decorrido esse período, as sementes foram cortadas longitudinalmente com auxílio de pinça e bisturi. Após o corte, as sementes foram colocadas em solução de 0,5% de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio em frascos escuros e mantidos em câmaras de germinação tipo BOD com temperatura constante de 35 °C por 3 horas (BRASIL, 2009). As sementes foram avaliadas visualmente considerando-se a localização e a intensidade da coloração de suas estruturas, em sementes viáveis e não viáveis, e também avaliadas por análise de imagem, com utilização do equipamento GroundEye®, versão S120.

Emergência em condição controlada: a semeadura foi realizada em substrato terra e areia na proporção volumétrica de 1:2, em bandejas plásticas mantidas em câmaras de crescimento com temperaturas de 25 °C. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais ao vigésimo primeiro dia após a semeadura. Foi calculado o **índice de velocidade de emergência**, por meio das contagens diárias de plântulas emergidas durante os 21 dias (MAGUIRE, 1962).

Condutividade elétrica de massa: as sementes foram pesadas e colocadas para embeber em 50 ml de água destilada e deionizada em copo plástico descartável e mantidas em BOD com temperatura de 25 °C por 24 horas. Após o período de embebição procedeu-se a leitura da condutividade elétrica por meio do condutímetro MS TECNOPON®, modelo mCA 150, sendo os resultados expressos em $\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$ de sementes (AOSA, 2009; VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

Tetrazólio por processamento digital de imagem: as sementes dos nove lotes após serem submetidas a solução de tetrazólio, como descrito acima, tiveram suas imagens capturadas no sistema GroundEye® na versão S120. Foi utilizado a configuração de análise de imagem definida na fase anterior com o plano de fundo de borracha E.V.A. de cor azul a fim de comparar com a análise visual.

Para as análises estatísticas, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes para cada lote. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e foram também verificadas as pressuposições estatísticas de normalidade,

homogeneidade e independência. As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o software SISVAR® (FERREIRA, 2014).

Fase 3 - Avaliação de plântulas de braquiária por meio da análise de imagem com nova metodologia para redução do tempo de avaliação

A fim de adequar uma metodologia de avaliação do vigor por análise de imagem com redução do período de contagem da germinação das sementes de braquiária, foram utilizados sementes de nove lotes semeadas em dois tipos de substratos: sobre papel (SP) mata-borrão em caixa gerbox (BRASIL, 2009), e em rolos de papel (RP) germitest mantidos na vertical, para avaliação da adequação das plântulas formadas para processamento digital das imagens pelo equipamento GroundEye® versão S800. Para cada lote e tipo de substrato foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes.

Os substratos foram umedecidos com água destilada, em quantidade de 2,5 vezes a massa seca do papel, acondicionados em sacos plásticos e mantidos em B.O.D. em temperatura alternada de 20-35 °C e fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro.

Análise das plântulas por imagem: as plântulas normais obtidas aos 7 e 14 dias após a semeadura, foram levadas para captura das imagens. As plântulas normais foram removidas do papel de germinação e dispostas uniformemente em bandeja de acrílico com a cor do plano de fundo azul e analisadas por meio do sistema de captura e análise de imagens do equipamento GroundEye® versão S800.

Foram realizadas configurações de análise das imagens e testados os espaços/modelos de cor (RGB, HSV, CIE L*a*b e YCbCr) combinados com as suas respectivas coordenadas.

Após calibração da cor de fundo foi realizada a análise das imagens. Nessa etapa foram extraídos valores médios das características das plântulas de braquiária como o comprimento da raiz (CR), comprimento do hipocótilo (CH), comprimento da plântula (CP) e a razão do comprimento da raiz pelo comprimento do hipocótilo (CR/CH).

Para as análises estatísticas, adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes por lote. Os dados obtidos foram submetidos à análise de

variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o aplicativo computacional SISVAR[®] (FERREIRA, 2014).

4.2 Experimento 2: Comparação da avaliação da viabilidade de sementes pelo método convencional e por análise de imagem

Por meio da análise de imagens computadorizada, uma nova metodologia de avaliação do teste de tetrazólio em sementes de braquiária, foi testada. Para tal, foram utilizados 12 lotes de sementes comerciais de *Urochloa brizantha* cv. Marandu provenientes da empresa Mineirão Sementes para Pastagens.

As sementes puras dos lotes utilizados foram caracterizadas quanto à qualidade fisiológica inicial, por meio dos testes a seguir:

Teor de água: determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando-se duas repetições de 5 g de sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem de teor de água (b.u.) (BRASIL, 2009).

Germinação: foi realizado com quatro repetições de 50 sementes semeadas em substrato papel mata-borrão, umedecido com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, em caixas de acrílico transparentes (11,0 x 11,0 x 3,5 cm). As sementes foram mantidas em BOD, com temperatura alternada de 20-35 °C e fotoperíodo de 8 horas com luz e 16 horas no escuro e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais aos 21 dias (BRASIL, 2009). As sementes remanescentes do teste de germinação foram submetidas ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade. A fim de obter resultados do teste de germinação e das sementes remanescentes viáveis fez o somatório desses dois testes (G+R).

Primeira Contagem de Germinação: avaliação aos 7 dias após a semeadura para porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Velocidade de Germinação: simbolizada por V.G. (EDMOND; DRAPALLA, 1958) e calculada pela contagem de plântulas normais germinadas diariamente por 21 dias.

Emergência em condições controladas: foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, em substrato terra e areia, na proporção volumétrica de 1:2 respectivamente em

condições controladas de 25°C, realizando-se a contagem de plântulas normais no sétimo dia (estande inicial) e contagem final no vigésimo primeiro (estande final).

Velocidade de Emergência: calculado por meio da contagem diária de plântulas normais emergidas durante os 21 dias após a semeadura (DAS). A fórmula usada para o cálculo foi proposta por Edmond; Drapalla (1958).

Condutividade elétrica de massa: foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, colocadas em recipiente com 50 mL de água deionizada e mantidas a uma temperatura de 25 °C em câmara tipo BOD. Após 24 horas de embebição, foi realizada a leitura da condutividade elétrica em um condutivímetro MS TECNOPON®, modelo mCA 150. O teste foi conduzido conforme descrito por Aosa (2009); Vieira e Krzyzanowski (1999) e os resultados foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de sementes.

Sanidade: foi utilizado o método do papel de filtro (blotter-test), com oito subamostras de 25 sementes, semeadas sobre duas folhas de papel do tipo filtro, estéreis e umedecidos, com água destilada e esterilizada dentro de caixas de acrílico transparentes (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), mantidas por um período inicial de 24 horas sob temperatura de 20 ± 2 °C e, em seguida em congelador (-20 °C) por 24 horas, e retornadas a incubadora a 20 ± 2 °C sob luz fluorescente branca, durante 5 dias. Após a incubação realizou-se a identificação da microflora fúngica das sementes com o auxílio do microscópio estereoscópico e óptico de luz.

A confirmação do fungo em nível de gênero foi realizada com auxílio de uma chave de identificação (BARNETT; HUNTER, 1998), sendo em seguida calculadas as porcentagens de sementes contaminadas por cada gênero fúngico.

Raio-X: foi realizado com quatro repetições de 50 sementes fixadas com fita adesiva do tipo dupla face em folhas de acetato transparente e submetidas a análise radiográfica para avaliação da presença do endosperma. A intensidade da radiação e o tempo de exposição foram determinados através da calibração automática do equipamento Faxitron HP MX-20 digital, calibrado com intensidade de radiação (24 kv por 60 s) aos 35 cm da fonte emissora.

Após a caracterização fisiológica dos lotes, realizou-se as etapas de avaliação da viabilidade das sementes, pelo teste de tetrazólio, descrito abaixo:

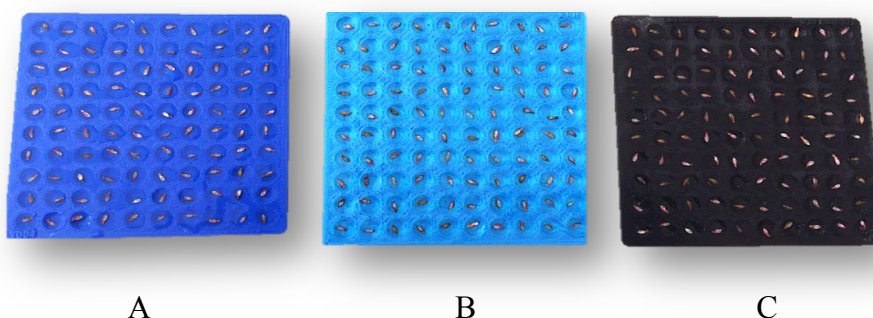
Tetrazólio: as sementes foram pré-embebidas entre papel de filtro umedecido com 2,5 vezes o peso do papel em água destilada e mantidas em germinador com temperatura a 25 °C por 18 horas. Decorrido esse período, as sementes foram cortadas longitudinalmente com auxílio de

pinça e bisturi. Após o corte, as sementes foram colocadas em solução de 0,5% de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio em frascos escuros e mantidos em câmaras de germinação tipo BOD com temperatura constante de 35 °C por 3 horas (BRASIL, 2009). As sementes foram avaliadas visualmente considerando-se a localização e a intensidade da coloração de suas estruturas, em sementes viáveis e não viáveis, e também avaliadas por análise de imagem automatizada, com utilização do equipamento GroundEye®, versão S120, conforme procesimento descrito a seguir.

Análise de imagens na interpretação do teste de tetrazólio

Antes da captura das imagens dos doze lotes, foi realizado um pré-teste, com um lote de semente, com objetivo de avaliar novos planos de fundo para captura e análise computadorizada das sementes de braquiária submetidas ao tetrazólio. Foram utilizados papel mata borrão na coloração branca e placas coloridas personalizadas com 100 cavidades, nas colorações azul clara, azul escura e preta nas dimensões 10,5 x 10,5 cm. As placas foram feitas com material acrílico em impressora 3D contendo 100 cavidades em cada placa com profundidade de 5 mm (Figura 1). As placas foram utilizadas para otimizar o tempo gasto na execução e avaliação do teste de tetrazólio, uma vez que a coloração é feita direto nas placas e acondicionadas em BOD, e após esse período foram transferidas para o equipamento GroundEye®, versão S120 para captura das imagens.

Figura 1 - Placas acrílicas na cor azul escuro (A), azul claro (B) e preta (C) utilizadas como suporte de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu para avaliação da viabilidade em tetrazólio por meio da análise de imagem



Fonte: Do autor (2021)

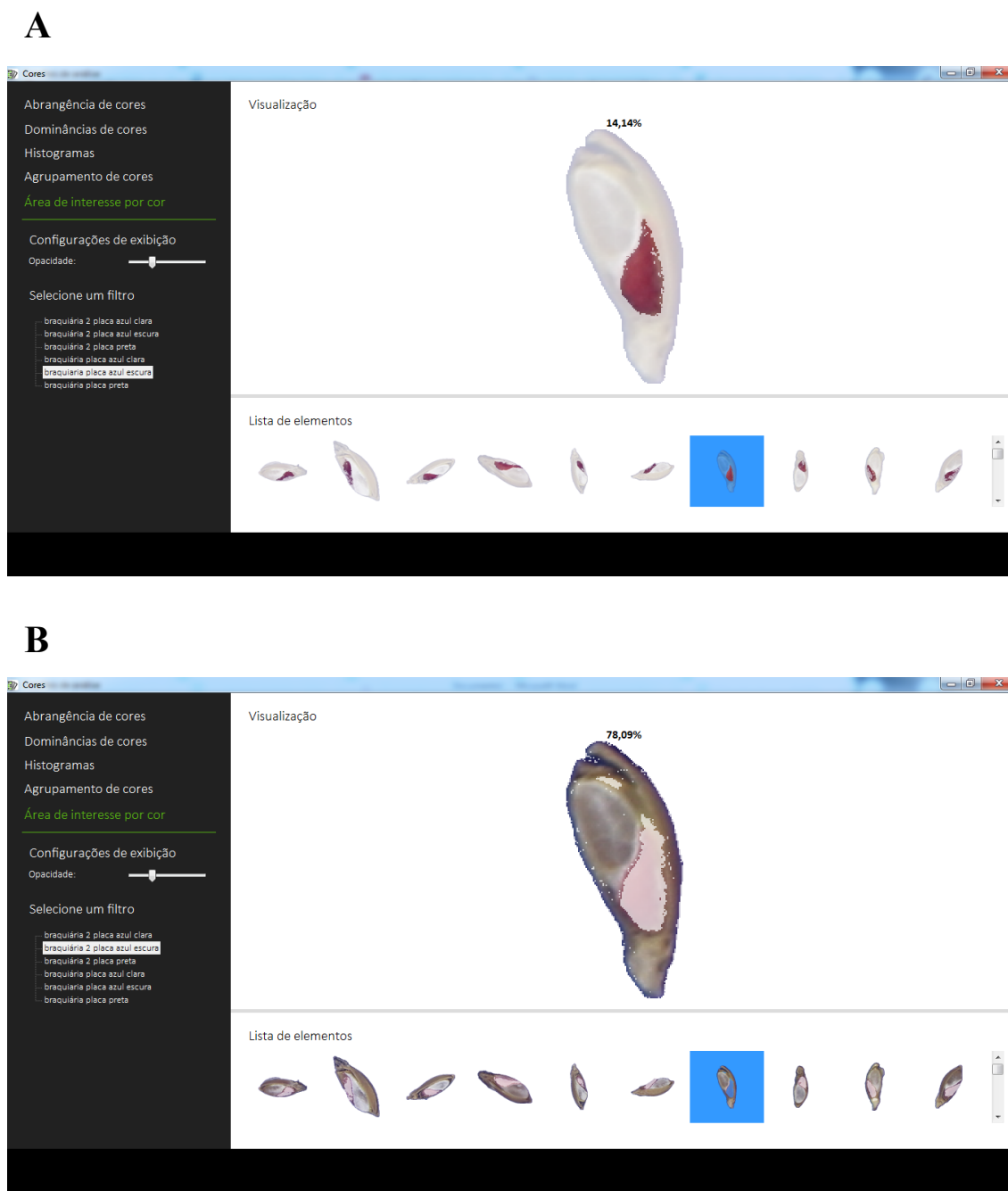
Para se obter uma imagem sem reflexo ou luminosidade, fato este que pode afetar a avaliação das imagens, foi retirado o excesso de água das cavidades onde estavam acondicionadas as sementes com papel mata borrão. As placas e o papel mata- borrão foram inseridos na bandeja do módulo de captação do equipamento para obtenção das imagens em alta resolução.

Foram realizadas configurações de análise das imagens e testados os espaços de cor (RGB, HSV, CIE L*a*b e YCbCr) combinados com as suas respectivas coordenadas. Foram escolhidas como configurações ideais aquelas que proporcionaram maiores contrastes entre as sementes e o fundo da imagem.

Após os testes preliminares para as calibrações das cores de fundo, as sementes dos doze lotes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, submetidas ao teste de tetrazólio, foram conduzidas para captura e análise das imagens e criadas três ferramentas de inteligência artificial (IA). A primeira foi de acordo com a área de interesse por cor, a segunda, pelos classificadores e a terceira, pela rede de decisão.

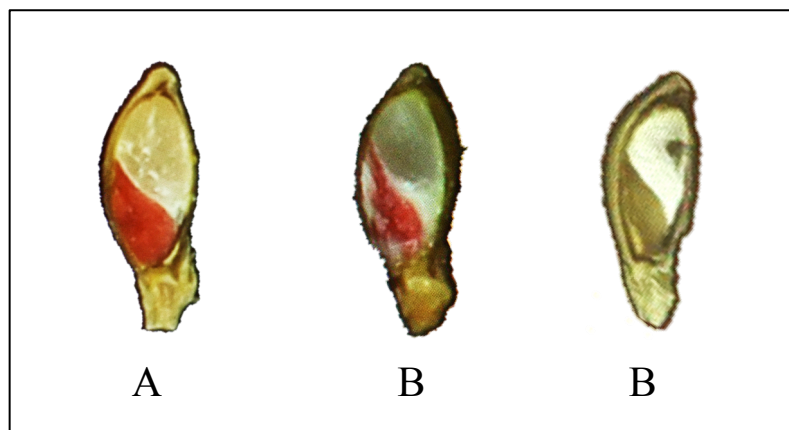
A primeira ferramenta de IA foi composta de duas etapas: a primeira teve o objetivo de treinar o sistema para reconhecer qual parte da morfologia da semente era considerada como viável. Para isso foi selecionada a parte da semente que correspondia ao embrião e que continha uma tonalidade avermelhada (Figura 2A). A segunda etapa foi o treinamento do sistema no reconhecimento da parte da semente considerada como não viável, ou seja, que não foi colorida pela solução de tetrazólio (Figura 2B). Neste caso, era o endosperma com tonalidade branca e o tegumento com tonalidade marrom. Foram consideradas inviáveis sementes com embrião totalmente descolorido ou com partes do eixo embrionário ou região de translocação sem coloração com evidências de danos.

Figura 2 - Configurações da primeira ferramenta de inteligência artificial, área de interesse por cor, na morfologia das sementes de braquiária. A- semente de braquiária considerada inviável, com o endosperma de tonalidade branca e o tegumento de tonalidade marrom. B- semente de braquiária considerada viável com o embrião de tonalidade avermelhada.



Fonte: Do autor (2021)

Figura 3 - Imagens digitalizadas de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu obtidas pelo sistema GroundEye® após reagirem com a solução de tetrazólio e avaliadas como sementes viáveis (A) e inviáveis (B).



Fonte: Do autor (2021)

Para a segunda ferramenta de IA, foi realizado o desenvolvimento e treinamento de dois classificadores. Dessa forma, das imagens obtidas dos doze lotes de sementes, seis lotes foram utilizados para treinar o sistema a reconhecer as duas classes de sementes: viáveis e inviáveis. Para validar os classificadores, foram utilizadas imagens das sementes dos outros seis lotes restantes e os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis e inviáveis.

Posteriormente ao desenvolvimento dessas inteligências artificiais, realizou-se a construção de redes de decisão para melhor interpretação dos resultados. Foram criados doze tipos de rede de decisão de análise, em esquema 2x2x3, ou seja, sementes viáveis e sementes inviáveis x dois tipos de classificadores (1 e 2) x 3 colorações de placas: azul claro, azul escuro e preta. Na construção das redes de decisão, as características utilizadas foram baseadas no treinamento feito com os classificadores, sendo estes a rede suporte para obtenção dos resultados.

Para as análises estatísticas quanto à caracterização da qualidade fisiológica inicial dos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e foram também verificadas as pressuposições estatísticas de normalidade, homogeneidade e independência. As médias foram agrupadas entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de

significância, utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2014). Os resultados foram ainda, submetidos a uma análise multivariada dos dados pela análise de componentes principais (PCA) e também feita uma associação entre as variáveis analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson por meio do software R (R CORE TEAM, 2020).

Para as análises estatísticas do processamento digital de imagens, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes, em esquema fatorial $3 \times 2 \times 12 + 1$, sendo três cores de placas, dois tipos de classificadores, doze lotes e um tratamento adicional com a média dos 12 lotes avaliados por meio do teste de tetrazólio com a avaliação tradicional, ou seja, visual.

As médias foram submetidas à análise de variância e os resultados analisados por meio da comparação de média pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os resultados foram ainda, submetidos a uma análise multivariada dos dados pela análise de componentes principais (PCA) e foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson por meio do software R (R CORE TEAM, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: Desenvolvimento de metodologias de análise de imagem na determinação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio e na avaliação do vigor de plântulas de braquiária

Fase 1 - Pré-teste para desenvolvimento metodológico de captura e análise de imagens para leitura da viabilidade das sementes

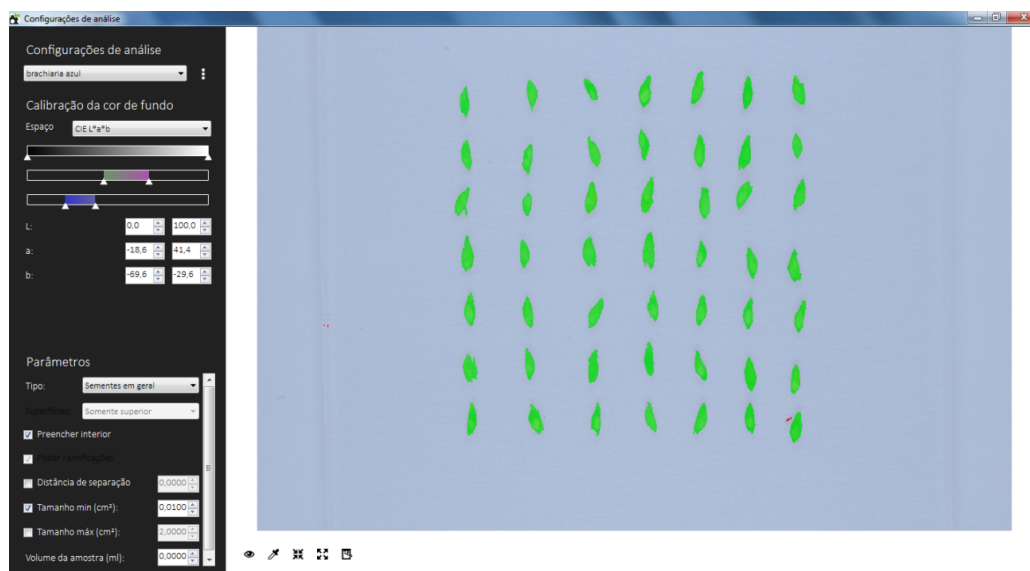
Para a captura das imagens, a fita dupla face fixada em folha de acetato transparente foi selecionada como o suporte ideal para a análise de sementes no sistema GroundEye®, devido à praticidade e redução de custos na aquisição dos materiais em relação à metodologia com duas placas de vidro antirreflexo.

Para a calibração do plano de fundo com a folha de acetato transparente, utilizou-se o modelo de cor HSV com índice de matiz de 176,1 a 246,1, saturação de 0,165 a 0,981 e brilho de 0,00 a 0,492. Como parâmetro de reconhecimento das sementes, utilizou-se o tamanho mínimo de 0,0310 cm² no sistema GroundEye® na versão S120.

Para a calibração do sistema em função do plano de fundo (Figuras 4 e 5), o equipamento não conseguiu separar a borracha E.V.A. de cor amarela das sementes, por isso esse plano de fundo foi descartado das demais etapas. Já para o uso da borracha E.V.A. de coloração azul e preta, o equipamento foi eficiente na separação do plano de fundo das sementes (Figura 4B e 5B respectivamente).

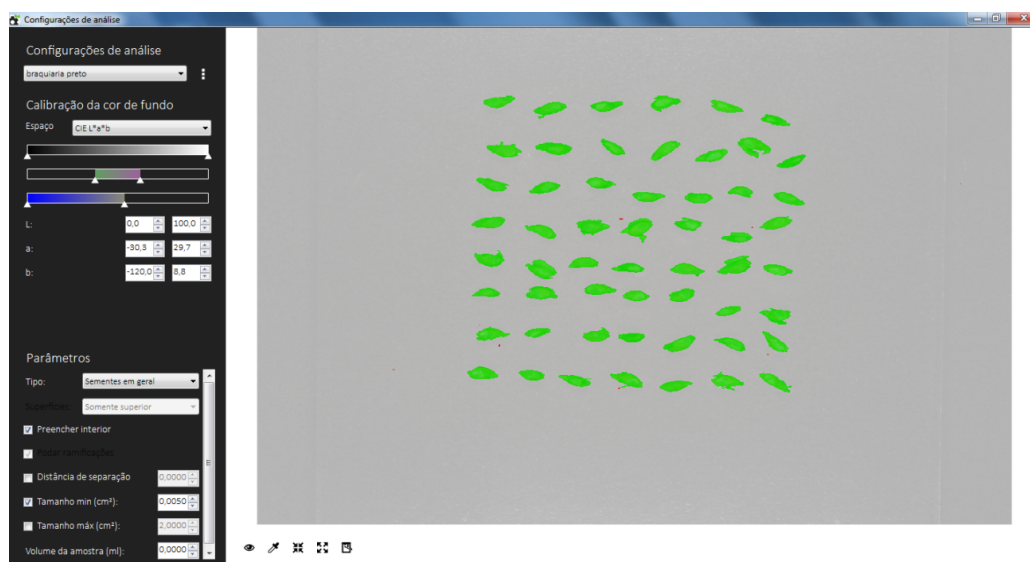
Para a calibração do plano de fundo com a borracha E.V.A. de cor azul, após análises técnicas e visuais, foi definido o modelo de cor CIEL*a*b com índice de luminosidade de 0,0 a 100, dimensão “a” -18,6 a 41,4 e dimensão “b” de -69,6 a -29,6 (Figura 4). Para a calibração do plano de fundo com a borracha E.V.A. de cor preto foi definido o modelo de cor CIEL*a*b com índice de luminosidade de 0,0 a 100 dimensão “a” -30,3 a 29,7 e dimensão “b” de -120,0 a 8,8 (Figura 5). As definições foram realizadas em função do melhor contraste, reconhecimento e delineamento das sementes em relação ao plano de fundo, conforme Figuras 4B e Figura 6B.

Figura 4 - Tela de configuração do sistema GroundEye® da análise de calibração do plano de fundo, com utilização de E.V.A. de cor azul (A) e separação do plano de fundo da semente braquiária submetidas ao teste de tetrazólio (B).

A**B**

Fonte: Do autor (2021)

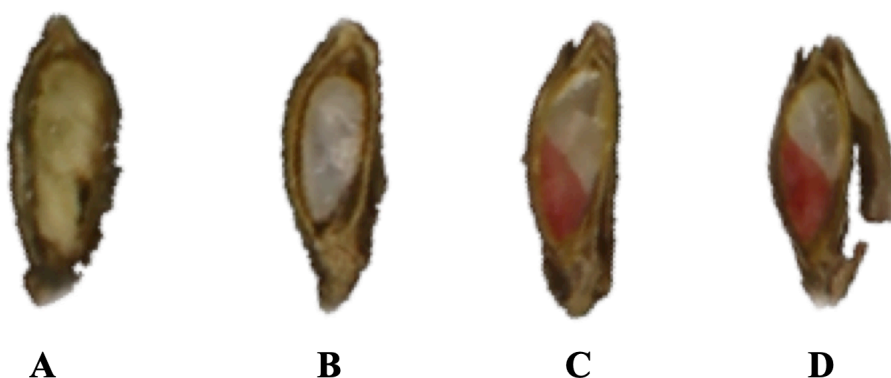
Figura 5- Tela de configuração do sistema GroundEye® da análise de calibração do plano de fundo, com utilização de E.V.A. de cor preta (A) e separação do plano de fundo da semente braquiária submetidas ao teste de tetrazólio (B).

A**B**

Fonte: Do autor (2021)

Conforme os resultados obtidos da calibração do equipamento no processamento das imagens coletadas de forma geral para as sementes nas placas observou-se que os planos de fundo de coloração azul e preta permitiram a obtenção apenas das imagens das sementes como um todo, sem distinção das partes da mesma, embrião, endosperma e tegumento, ou seja, sem a interferência da cor do plano de fundo (Figuras 4B e 5B). Assim, a análise seguinte foi por meio da avaliação individual de cada objeto/semente (Figura 6). Com as novas imagens das sementes individuais, o sistema foi capaz de fazer a extração das características necessárias para a avaliação da viabilidade das sementes de braquiária coloridas pela solução de tetrazólio, como separação entre embrião, endosperma e tegumento, sendo possível distingui-las em sementes viáveis e inviáveis pelo sistema de análise de imagens (Figura 6). As sementes inviáveis apresentavam o endosperma e embrião de coloração esbranquiçada (ausência de tons avermelhados e róseos) e o tegumento de coloração marrom (Figura 6 A e B), já as sementes viáveis apresentavam o embrião de tonalidade avermelhada (Figuras 6 C e D).

Figura 6 - Sementes inviáveis de braquiária (A e B) e viáveis (C e D) submetidas ao teste de tetrazólio e à análise digital de imagens obtida pelo sistema GroundEye®



Fonte: Do autor (2021)

Na etapa da análise das imagens, realizada logo após a calibração da cor de fundo, foi utilizada a ferramenta de inteligência artificial (IA), área de interesse por cor, para avaliar a

coloração da solução de tetrazólio e classificar as sementes em viáveis ou inviáveis. Como observado na Figura 7, a área da semente demarcada de vermelho, em função da posição e conformação do embrião, classifica a semente como viável. De acordo com os resultados obtidos com essa ferramenta de IA foi possível selecionar e separar a parte da semente classificada como viável.

Figura 7 - Configuração de análise de imagem obtida pelo sistema GroundEye® utilizando a ferramenta de Inteligência Artificial, área de interesse por cor, com seleção da área demarcada de vermelho colorida com a solução de tetrazólio.



Fase 2 - Avaliação da viabilidade das sementes submetidas ao teste de tetrazólio com análise digital de imagens e a relação com a qualidade fisiológica

Fonte: Do autor (2021)

O grau de umidade inicial das sementes de braquiária dos nove lotes variou entre 11 e 12%. Essa pequena variação de 1 ponto percentual, proporcionou maior segurança, indicando que esse parâmetro não afetou o comportamento das sementes durante a condução dos testes.

De acordo com os dados referentes à caracterização inicial da qualidade fisiológica dos nove lotes de braquiária apresentados na Tabela 1, observou-se diferenças significativas entre eles, quanto aos resultados dos testes de primeira contagem de germinação, condutividade elétrica e tetrazólio (avaliação visual tradicional) sendo os lotes agrupados em duas categorias de qualidade. Foi observado similaridade nos resultados dos testes de primeira contagem de germinação e condutividade elétrica sendo os lotes 3, 8 e 9 considerados como os de piores

qualidades fisiológicas. No tetrazólio, o lote 3 também foi classificado entre os dois lotes de pior qualidade.

Tabela 1 - Valores médios dos testes de primeira contagem de germinação (PCG), condutividade elétrica (CE), tetrazólio (TZ), germinação (G), somatório das plântulas normais mais sementes remanescentes viáveis após o teste de germinação (G+R), emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) obtidos em nove lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu.

| Lotes | Avaliação da qualidade de sementes de braquiária | | | | | | |
|--------|--|---------|-------|-------|--------|-------|--------|
| | PCG(%) | CE | TZ(%) | G(%) | G+R(%) | E(%) | IVE(%) |
| 1 | 58 a | 48,27 a | 80 a | 67 a | 77 a | 63 a | 5,36 a |
| 2 | 47 a | 52,25 b | 73 b | 56 a | 62 a | 54 a | 4,12 a |
| 3 | 39 b | 53,47 b | 64 b | 48 a | 61 a | 57 a | 4,82 a |
| 4 | 48 a | 50,65 b | 88 a | 61 a | 67 a | 57 a | 4,82 a |
| 5 | 53 a | 47,12 a | 78 a | 59 a | 69 a | 63 a | 5,29 a |
| 6 | 48 a | 46,58 a | 83 a | 63 a | 73 a | 55 a | 4,47 a |
| 7 | 36 b | 46,83 a | 85 a | 57 a | 68 a | 65 a | 5,74 a |
| 8 | 42 b | 50,40 b | 77 a | 54 a | 60 a | 59 a | 4,87 a |
| 9 | 41 b | 55,98 b | 81 a | 58 a | 66 a | 63 a | 5,06 a |
| CV (%) | 16,98 | 6,68 | 8,50 | 12,34 | 4,12 | 16,14 | 16,14 |

*Médias seguidas de mesma letra minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2021)

Para os resultados da primeira contagem, realizada aos sete dias após a instalação do teste de germinação, houve diferenças no potencial fisiológico das sementes em dois níveis de vigor, sendo o valor máximo observado de plântulas normais foi para o lote 1 enquanto o valor mínimo foi para o lote 7 e a diferença entre eles foi de 22 pontos percentuais.

Pelo princípio do teste de condutividade elétrica, observaram-se menores valores para os lotes 1, 5, 6 e 7, podendo estes serem considerados os mais vigorosos, uma vez que quanto menor o valor obtido melhor a qualidade do lote de semente avaliado. Pode-se considerar o teste de condutividade elétrica como um dos mais sensíveis para avaliar o vigor de sementes, uma vez que esse teste, avalia o potencial fisiológico de lotes de sementes pelo grau de desestruturação do sistema de membrana (PINTO, et al., 2016). Segundo Nogueira et al. (2013) os aumentos nos índices de condutividade elétrica correspondem a maior lixiviação de solutos, ocasionando à

diminuição do potencial fisiológico das sementes como observado na Tabela 1 para os lotes 2, 3, 4, 8 e 9.

De acordo com os resultados da viabilidade das sementes obtidos pelo teste de tetrazólio, os lotes 2 e 3 apresentaram valores inferiores aos demais, confirmando os resultados obtidos nesses dois lotes para o teste de condutividade elétrica e para a primeira contagem de germinação no lote 3, com qualidade inferior (Tabela 1).

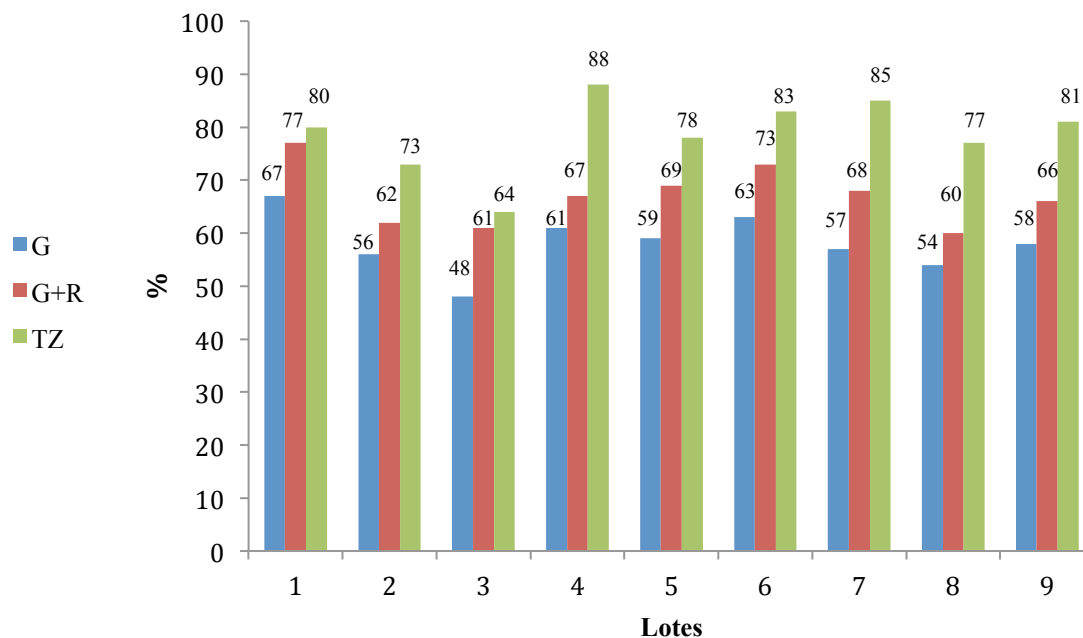
Segundo a instrução normativa de número 30 de 21 de maio de 2008, o padrão mínimo de germinação para sementes do gênero *Urochloa* é 60%. Pelo que se observa na Tabela 1, dos nove lotes avaliados, somente os lotes 1, 4 e 6 atenderam essas exigências mínimas para comercialização. Porém, quando na mesma Tabela, se observam os resultados obtidos no teste de tetrazólio, o padrão mínimo é atendido para todos os lotes estudados, com valores mínimos de viabilidade de 64% e máximo de 88%. Conforme Instrução Normativa de número 30 de 26 de outubro de 2010 (BRASIL, 2010), sementes dessa espécie poderão ser comercializadas com base nos resultados de viabilidade obtidos por meio do Teste de Tetrazólio - TZ, conforme metodologias estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Por isso, a relevância do teste de tetrazólio para sementes dessa forrageira, principalmente ao utilizar novas metodologias de avaliação como o processamento digital de imagens que além de evitar subjetividade, cansaço por parte do analista na avaliação e menor tempo gasto, também é possível arquivar os resultados.

Vale ressaltar que essa diferença se dá pela presença da dormência nas sementes, condição natural às espécies de braquiária, como observado pelos valores de sementes viáveis obtidas ao final do teste de germinação (Figura 8), que somando-se à porcentagem de plântulas normais obtidas no teste de germinação (G+R), não inviabilizaram a condição de sementes aptas à comercialização.

Esses resultados corroboram com os de Pereira et al. (2017) e Silva et al. (2017) que verificaram que os testes de viabilidade superestimaram os lotes em relação à germinação de sementes de *Urochloa*, devido principalmente a ocorrência de dormência das sementes.

Para os demais testes de germinação, emergência, índice de velocidade de emergência e o somatório das sementes remanescentes viáveis após o teste de germinação mais plântulas normais, observa-se que não houve diferenças significativas entre os lotes de sementes (Tabela 1).

Figura 8 - Porcentagem dos testes de germinação (G), germinação mais sementes dormentes (G+R) e sementes viáveis (TZ) dos nove lotes de sementes de braquiária.



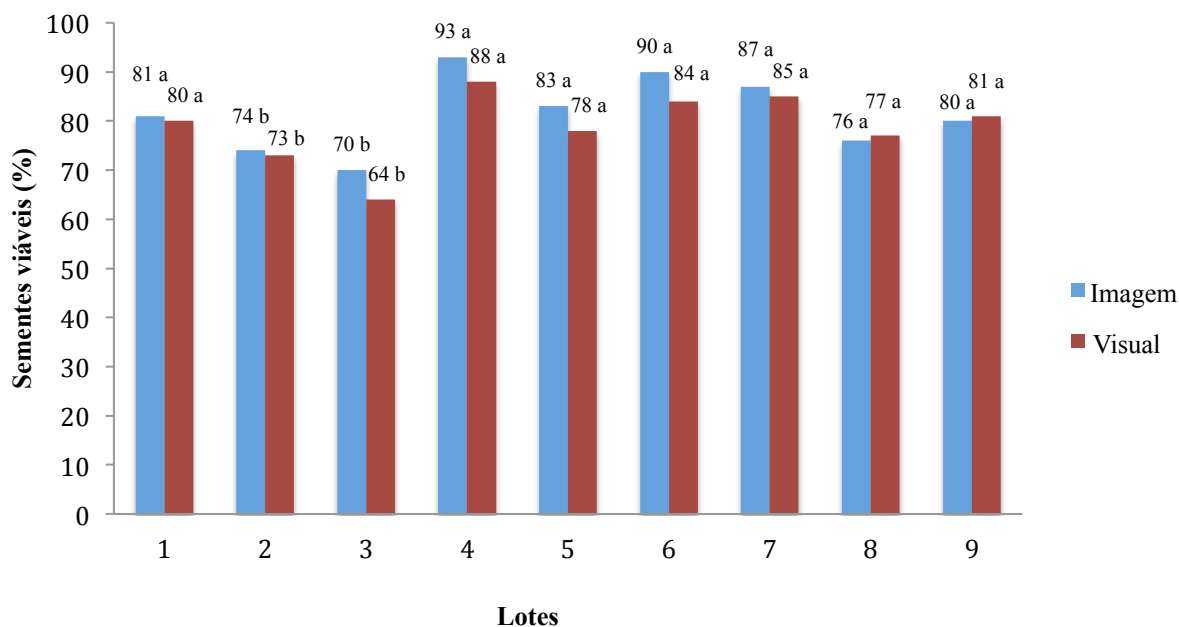
Fonte: Do autor (2021)

Quanto a avaliação da viabilidade das sementes analisadas por imagem, foi utilizado o plano de fundo do E.V.A. na cor azul com as sementes fixadas na folha de acetato transparente e os resultados foram comparados com a análise visual (Figura 9A e 9B).

Sendo assim, como observado na caracterização inicial dos lotes de sementes de braquiária (Tabela 1), na Figura 9A observam-se diferenças significativas entre os lotes quanto a porcentagem de sementes viáveis presentes em cada lote após o teste de tetrazólio avaliados tanto pela análise visual quanto pela análise de imagem. Observa-se que os lotes 2 e 3 obtiveram os menores valores de sementes viáveis em ambas análises. Ressalta-se que foi observado uma inferioridade dos lotes 2 e 3 na caracterização da qualidade fisiológica dos lotes no teste de primeira contagem de germinação no lote 3 e para esses dois lotes no teste de condutividade elétrica (Tabela 1).

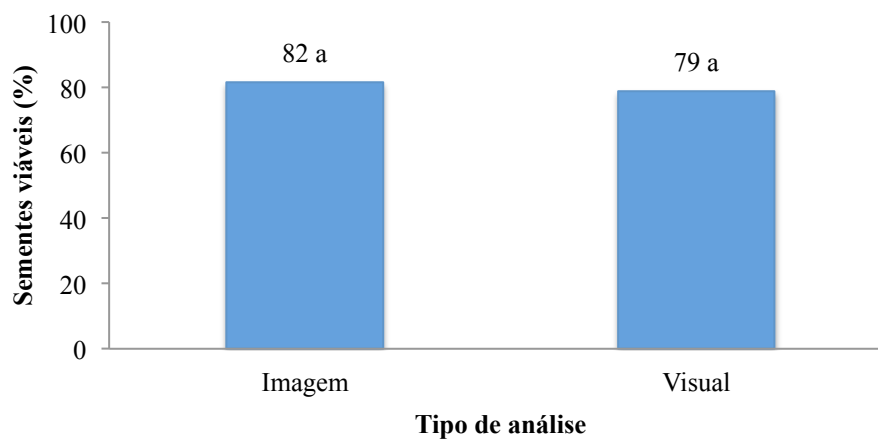
Figura 9 - Porcentagem de sementes viáveis avaliadas pelo teste de tetrazólio para os nove lotes de sementes de *U. brizantha* analisadas por análise visual e computadorizada de imagens (A) e a média dos nove lotes da análise computadorizada de imagem e visual (B).

A



*Médias seguidas pela mesma letra, no mesmo método de análise, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

B



**Médias seguidas pela mesma letra entre os tipos de análises não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2021)

Observa-se na Figura 9B que os dois métodos de avaliação da viabilidade das sementes, análise visual e a análise computadorizada de imagens, não apresentaram diferença significativa para os resultados obtidos entre eles. Estudos com sementes de trigo, aveia branca e braquiária também demonstraram eficácia do método de avaliação do teste de tetrazólio por análise de imagem (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO NETO et al., 2012; GARCIA, 2020; TEJO et al., 2017, 2018). Porém, mesmo que as análises realizadas por esses autores tenham sido digitalizadas por scanner de mesa e aumentadas para uma nítida avaliação da viabilidade, ainda assim foram subjetivas, sendo necessário a interpretação individual de cada semente por um analista. Na atual pesquisa, além das análises terem sido realizadas pelo sistema GroundEye[®], ou seja, sem que houvesse subjetividade na interpretação, o tempo para obtenção dos resultados foi menor, praticamente instantâneo.

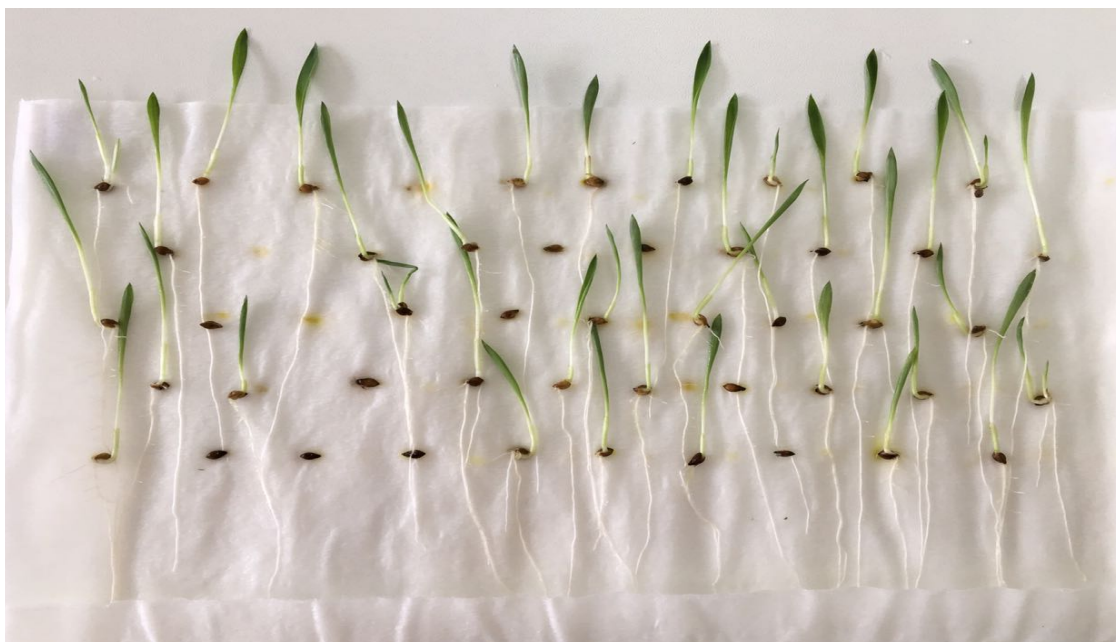
Por estas metodologias e configurações de análise desenvolvidas verifica-se o potencial de avaliação da viabilidade do teste de tetrazólio pelo sistema GroundEye[®]. O uso dessa tecnologia pode levar a uma redução da subjetividade, dos erros e do tempo das análises em relação à metodologia de avaliação visual tradicional. A análise na rotina do laboratório pode ser afetada por analistas destreinados e com fadiga ocular, ao longo da jornada de trabalho.

Fase 3: Avaliação de plântulas de braquiária por meio da análise de imagem com nova metodologia para redução do tempo de avaliação

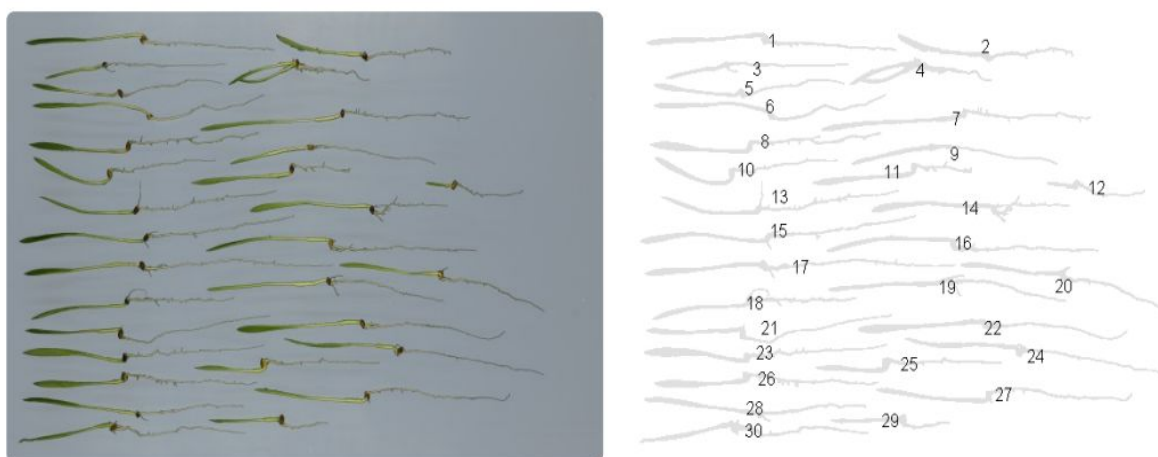
Para avaliação de plântulas obtidas das sementes submetidas ao teste de germinação e analisadas com processamento digital de imagens, foi observado que a utilização da metodologia SP com a caixa gerbox (Descrito na RAS, BRASIL, 2009) não proporcionaram a obtenção de plântulas apropriadas para a captura da imagem, devido à restrição vertical (fundo do gerbox/papel) que não permitiu um desenvolvimento ideal do sistema radicular para coleta de imagens. Condição contrária à observada para as sementes germinadas em rolo de papel germitest, cujas plântulas apresentaram parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos, com adequada conformação, condição esta que favoreceu a correta captura da imagem para análise (Figura 10).

Figura 10 - Plântulas normais de braquiária obtidas de sementes submetidas ao teste de germinação em rolo de papel germitest por sete dias (A) e avaliadas por análise de imagens (B).

A



B



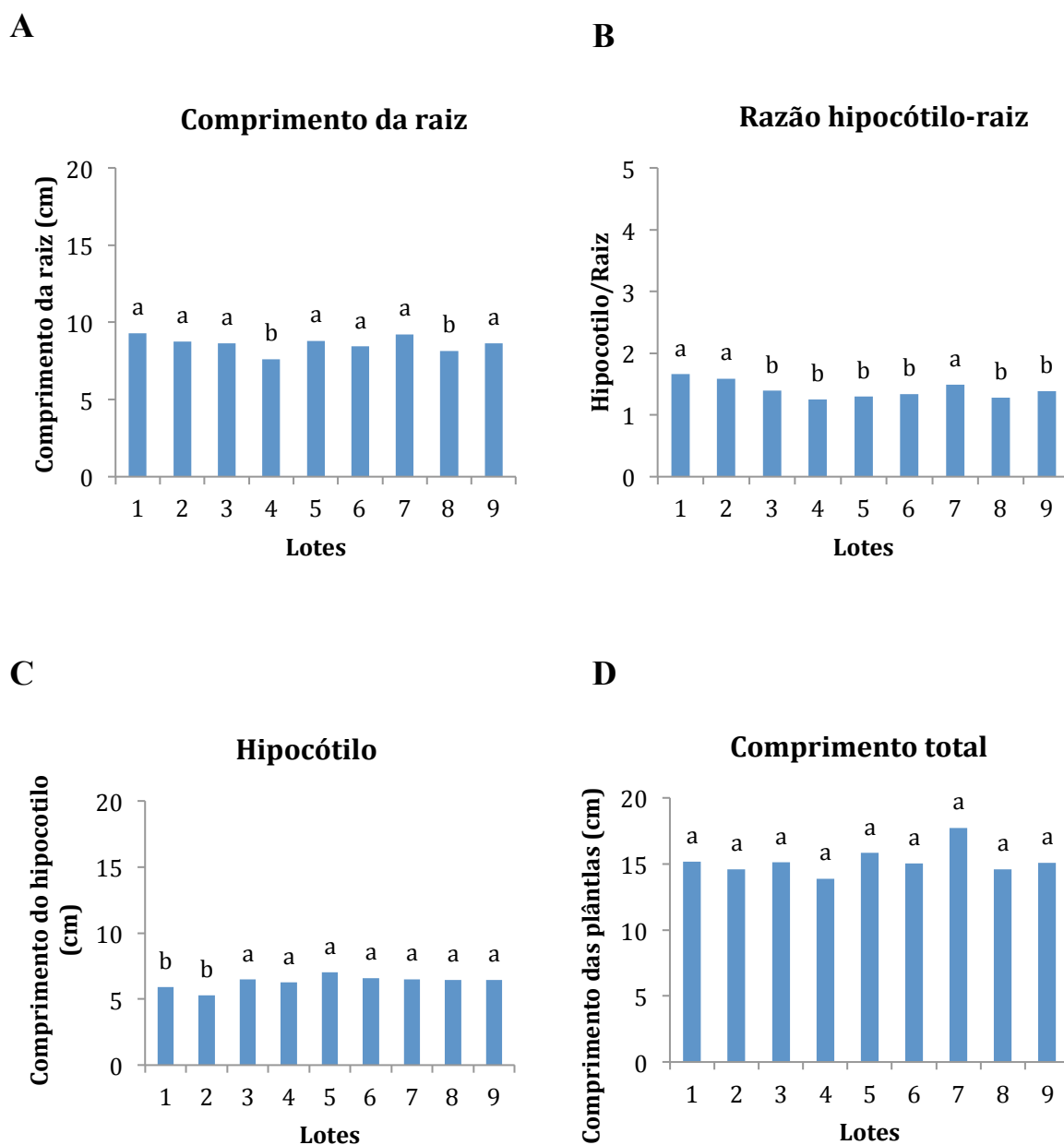
Fonte: Do autor (2021)

Ressalta-se que durante a condução do teste de germinação, 14 dias, não houve à necessidade da reposição de água no substrato rolo de papel, enquanto no substrato sobre papel (mata-borrão) realizou-se a reposição da umidade diariamente. Segundo estudos realizados em sementes de *U. brizantha* cv. Marandu a luz não influenciou a germinação quando semeadas em rolo de papel ou caixa gerbox em temperaturas alternadas de 20-35 °C (FERREIRA, 2019).

Para a calibração do sistema em função do plano de fundo, foram utilizadas três configurações de coloração devido às diferenças na espessura das plântulas. Foi utilizado para a configuração 1 o modelo de cor CIEL*a*b, com índice de luminosidade de 0 a 100, dimensão “a” -31,5 a 28,5 e dimensão “b” de -36,0 a -7,9 e tamanho mínimo de reconhecimento das plântulas de 0,2000 cm². Na configuração 2 utilizou-se o modelo de cor CIEL*a*b, com índice de luminosidade de 0 a 40,4, dimensão “a” -32,0 a 36,2 e dimensão “b” de -24,1 a -6,1 e tamanho mínimo de reconhecimento das plântulas de 0,0530 cm². Para a configuração 3, utilizou-se o modelo de cor CIEL*a*b, com índice de luminosidade de 0 a 40,4, dimensão “a” -32,0 a 36,2 e dimensão “b” de -15,2 a -3,7 e tamanho mínimo de reconhecimento das plântulas de 0,0900 cm².

Assim como observado na caracterização inicial dos lotes em que estes apresentaram diferenças estatísticas nos testes de primeira contagem de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica (Tabela 1), a análise computadorizada de imagens de plântulas pelo sistema GroundEye® foi capaz de diferenciar os lotes quanto ao vigor (Figuras 11 e 12). Foram observadas diferenças aos 7 dias para as variáveis comprimento da raiz (11A), da razão do hipocótilo pela raiz (11B) e do comprimento do hipocótilo (11C), e não sendo observada diferença significativa para o comprimento total das plântulas (11D). Os lotes foram separados em dois níveis de vigor, aqueles ranqueados como sendo os menos vigorosos foram os lotes 4 e 8 para o comprimento da raiz e os lotes 1 e 2 para o comprimento do hipocótilo enquanto para a razão hipocótilo-raiz os lotes 1, 2 e 7 foram os mais vigorosos. Pelo testes tradicionais de vigor, o lote 8 foi classificado entre os de menor qualidade (Tabela 1).

Figura 11 - Valores de comprimento da Raiz (A), da Razão Hipocótilo-Raiz (B), do hipocótilo (C) e plântulas (D) de *Urochloa brizantha* cv. Marandu obtidos por meio da análise de imagem aos sete dias após a semeadura em rolo de papel.



*Médias seguidas pela mesma letra entre os lotes não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

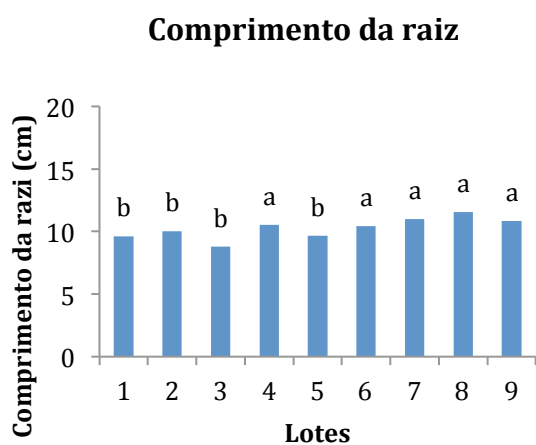
Fonte: Do autor (2021)

Para avaliação aos 14 dias, somente foram constatadas diferenças entre os lotes nas variáveis comprimento de raiz e razão hipocótilo raiz (Figura 12). Já com a análise das plântulas aos 7 dias foram constatadas diferenças em três variáveis (Figura 11). Aos 14 dias, os lotes foram separados em dois níveis de vigor, sendo que para o comprimento da raiz os lotes 4, 6, 7, 8 e 9 apresentaram maiores valores enquanto para a razão hipocótilo-raiz foram os lotes 2, 7, 8 e 9. Nas demais variáveis, comprimento do hipocótilo (12C) e comprimento total das plântulas (12D) não foram observadas diferenças significativas entre os lotes. Na análise de imagem de plântulas aos 14 dias não foi observada relação com os resultados dos testes tradicionais de vigor e se mostrou menos sensível para diferenciação de vigor em relação à avaliação aos 7 dias. O tempo maior de condução do teste pode possibilitar que mesmo aqueles lotes de vigor mais baixo formem plântulas normais e desenvolvam suas estruturas.

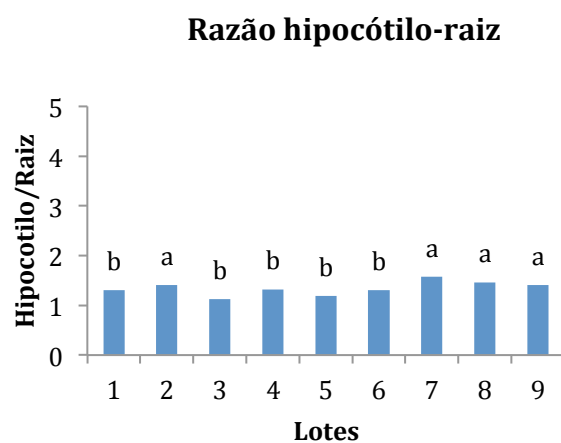
Em ambas as avaliações houve diferenças entre os comprimentos radiculares (Figuras 11 e 12). Vanzolini et al. (2007) buscaram correlacionar os dados de comprimento total de plântula e de raiz com os dados de vigor de sementes de soja e concluíram que somente o comprimento de raiz obteve tal correlação de forma a diferenciar os lotes. Assim como Vanzolini et al. (2007), outros autores também relataram ser o comprimento da raiz mais sensível na diferenciação do vigor de sementes de soja (CARVALHO et al., 2020; KRZYANOWSKI et al., 2020; NAKAGAWA et al., 1999) e de gramíneas (HOCHHOLDINGER et al., 2004).

Figura 12 - Valores de comprimento da Raiz (A), da Razão Hipocótilo-Raiz (B), do hipocótilo (C) e de plântulas (D) *Urochloa brizantha* cv. Marandu obtidos por meio da análise de imagens aos 14 dias após a semeadura em rolo de papel.

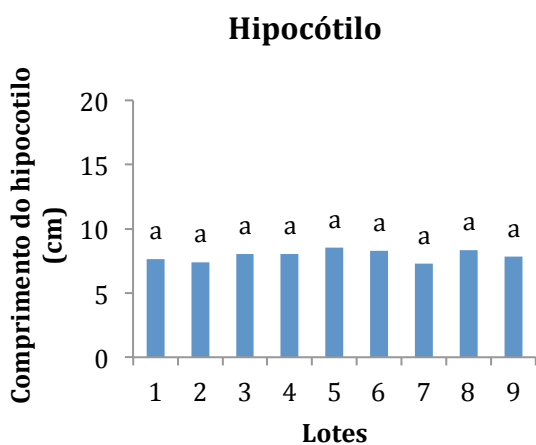
A



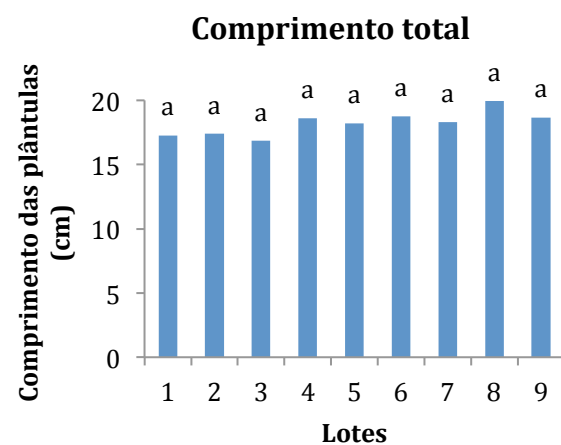
B



C



D



*Médias seguidas pela mesma letra entre os lotes não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2021)

Os testes de vigor baseados no desempenho de plântulas são fundamentados pelo fato de que as sementes mais vigorosas originam plântulas mais desenvolvidas. Tal fato traduz a eficiência da ação dos mecanismos de reparo, da mobilização de reservas e de síntese de novos tecidos durante a germinação (MARCOS-FILHO, 2015). Esses fatos confirmam que o comprimento da raiz de plântulas avaliado pela análise de imagem, com essa metodologia, tem potencial a ser utilizado, com o objetivo de reduzir o tempo e os custos da avaliação da qualidade de lotes de sementes de braquiária.

5.2 Experimento 2: Comparação da avaliação da viabilidade de sementes pelo método convencional e por análise de imagem.

O grau de umidade inicial das sementes de braquiária dos doze lotes avaliados variou entre 9 e 10 %. Essa pequena variação proporcionou maior segurança nas inferências dos testes.

Em relação ao teste de germinação, as porcentagens de plântulas normais, dormentes, mortas e remanescentes viáveis, de plântulas anormais, primeira contagem de germinação e velocidade de germinação estão apresentados na Tabela 2.

Observou-se que houve diferença entre as médias dos lotes 1, 2, 6 e 7 com os demais, esses apresentaram menores porcentagens de plântulas normais. Somente para o lote 1, a porcentagem média de plântulas normais obtidas no teste de germinação estava abaixo do padrão mínimo exigido por lei para comercialização de sementes de *Urochloa brizantha* que é de 60 % (BRASIL 2008). Para porcentagem média de plântulas anormais, não houve diferença estatística entre os lotes.

Os lotes 6, 7 e 12 foram os que apresentaram as maiores porcentagens de sementes mortas. A quantidade de sementes mortas em um lote, inicialmente pode ser causada pela deterioração das sementes nas condições de cultivo nos campos de produção, e posteriormente, pelas condições inadequadas de armazenamento (GOLDFARB; QUEIROGA, 2013).

A instrução normativa do MAPA nº 30 de 26/10/2010 (BRASIL, 2010) flexibilizou a comercialização das sementes forrageiras do gênero *Urochloa* e permite que estas sementes sejam comercializadas pelo resultado do teste de germinação ou tetrazólio com base na viabilidade das sementes. O teste de tetrazólio, viabilidade, é importante principalmente em

situações em que os lotes ainda apresentam porcentagens de dormência, o que pode ocorrer em sementes de *Urochloa brizantha* dependendo da época das análises.

As menores médias da porcentagem de sementes dormentes foram observadas nos lotes 5, 6, 10 e 12. Conforme Pariz et al. (2010) a dormência em gramíneas forrageiras ocorre, principalmente, em função da presença de substâncias fixadoras de oxigênio nas estruturas de cobertura das sementes. No entanto, o percentual de sementes dormentes encontradas no teste de germinação, mesmos que estas estejam viáveis, não permite inferir que, após semeadas, venham a germinar e transformar em plântulas normais.

Tabela 2 - Valores médios (%) do teste de germinação (G), semente morta (SM), semente dormente (SD), primeira contagem de germinação (PCG), plântula anormal (PA), semente remascente da germinação (SRG), velocidade de germinação (VG) para avaliação do potencial fisiológico dos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu

| Lote | G | SM | SD | PCG | PA | SRG | VG |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 59 b | 19 a | 15 a | 43 b | 5 a | 6 a | 8,91 a |
| 2 | 62 b | 14 a | 18 a | 50 b | 6 a | 10 a | 8,84 a |
| 3 | 75 a | 12 a | 11 a | 62 a | 1 a | 7 a | 7,34 a |
| 4 | 69 a | 14 a | 11 a | 54 b | 4 a | 3 b | 8,48 a |
| 5 | 81 a | 10 a | 5 b | 74 a | 3 a | 2 b | 7,22 a |
| 6 | 63 b | 32 b | 2 b | 49 b | 2 a | 0 b | 8,54 a |
| 7 | 63 b | 26 b | 9 a | 52 b | 2 a | 6 a | 7,95 a |
| 8 | 71 a | 15 a | 12 a | 63 a | 2 a | 10 a | 7,64 a |
| 9 | 75 a | 13 a | 9 a | 56 b | 2 a | 4 b | 7,40 a |
| 10 | 73 a | 17 a | 6 b | 52 b | 3 a | 1 b | 7,47 a |
| 11 | 73 a | 13 a | 11 a | 49 b | 2 a | 5 a | 7,89 a |
| 12 | 70 a | 23 b | 2 b | 51 b | 3 a | 0 b | 7,05 a |
| CV | 12,66 | 43,84 | 60,50 | 18,31 | 82,45 | 87,21 | 15,88 |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2021)

Houve diferença significativa entre os lotes em relação às porcentagens de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação (Tabela 2). Os lotes 3, 5 e 8 apresentaram valores superiores aos demais lotes na primeira contagem e estiveram no grupo de maiores valores no teste de germinação. Para os lotes 1, 2, 6 e 7 foram observados valores inferiores em no teste de germinação e estiveram no grupo de menores valores para primeira contagem de germinação (Tabela 2). Munizzi et al. (2010), relataram que sementes de maior qualidade fisiológica possuem maior velocidade nos processos metabólicos, propiciando germinações mais rápidas e uma maior uniformidade das plântulas.

De acordo com Bhering et al. (2003), a primeira contagem do teste de germinação pode ser utilizada como um teste de vigor, uma vez que a velocidade de germinação é reduzida com o avanço da deterioração da semente. Assim, amostras que apresentam maiores valores de germinação na primeira contagem podem ser consideradas mais vigorosas.

Quanto aos valores referentes à velocidade de germinação, não houve diferença estatística entre os lotes, o que permite inferir que uma grande quantidade de sementes tem potencial para um rápido e uniforme estabelecimento, em condições de campo. No entanto, em se tratando de valores absolutos, o lote 1 foi o que apresentou a menor velocidade de germinação (Tabela 2). Segundo Edmond e Drapala (1958), quanto maior o valor obtido pela fórmula de velocidade de germinação ou de emergência, têm-se lotes de sementes com menor potencial fisiológico e conseqüentemente maior tempo para germinar. Neste mesmo lote foram observados valores inferiores tanto na primeira contagem quanto na germinação.

Na Tabela 3, pode ser observado que nos testes de emergência (estande inicial e estande final), velocidade de emergência e condutividade elétrica não foram detectadas diferenças significativas entre os lotes.

Em geral, os resultados obtidos no teste de germinação foram superiores, patamar mais elevado, em relação aos obtidos para a emergência das plântulas, ou seja, a porcentagem de emergência (Tabelas 3) foi inferior à da germinação (Tabelas 2). Estima-se que, em função do tamanho das sementes e do tipo de substrato usado no teste de emergência tenham contribuído para essa variação.

Conforme os dados apresentados no teste de condutividade elétrica observou-se que, em valores absolutos, sementes do lote 1 apresentaram maior perda de exsudatos (Tabela 3), sendo

assim membranas mais desestruturadas. Este mesmo lote foi classificado entre os de menor qualidade tanto no teste de primeira contagem quanto na germinação.

Tabela 3 - Valores médios do teste de emergência (estande inicial - EI% e estande final - EF%), velocidade de emergência (VE) e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) (CE) para avaliação do potencial fisiológico dos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu

| Lote | EI (%) | EF (%) | VE | CE |
|------|--------|--------|--------|---------|
| 1 | 49 a | 62 a | 6,04 a | 62,19 a |
| 2 | 36 a | 50 a | 6,60 a | 57,23 a |
| 3 | 32 a | 53 a | 7,30 a | 56,99 a |
| 4 | 39 a | 51 a | 6,42 a | 58,92 a |
| 5 | 34 a | 47 a | 6,55 a | 59,54 a |
| 6 | 38 a | 55 a | 6,46 a | 52,45 a |
| 7 | 44 a | 56 a | 6,21 a | 52,63 a |
| 8 | 41 a | 52 a | 6,29 a | 55,48 a |
| 9 | 39 a | 54 a | 6,88 a | 58,72 a |
| 10 | 42 a | 58 a | 6,39 a | 59,87 a |
| 11 | 46 a | 55 a | 6,06 a | 57,37 a |
| 12 | 39 a | 55 a | 7,06 a | 53,20 a |
| CV | 18,4 | 13,71 | 9,12 | 10,04 |

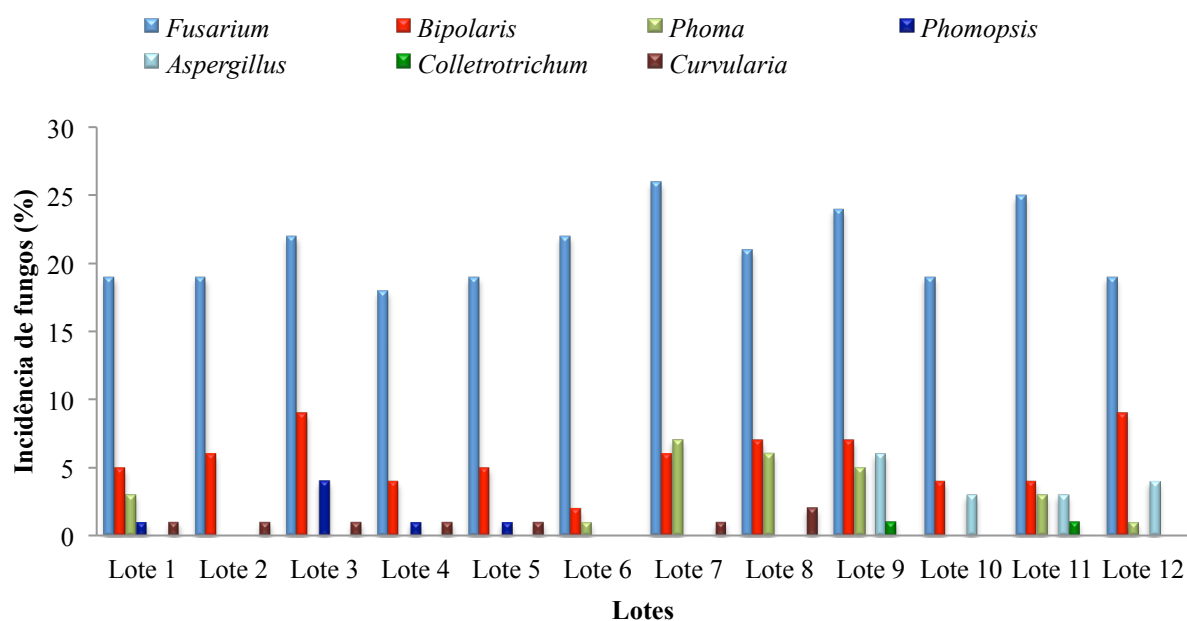
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2021)

Pelo teste de sanidade foram identificados sete gêneros de fungos patogênicos (Figura 13). Todos os lotes, sem exceção, apresentaram alguma contaminação. Observou-se variação tanto na ocorrência quanto na frequência dos fungos, em função dos lotes. Os patógenos que

apresentaram maior incidência nas sementes foram os dos gêneros *Fusarium* sp. com média de 26% no lote 7 e *Bipolares* sp. com 9% nos lotes 3 e 12. Em lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu torna-se preocupante a alta incidência de fungos com crescimento rápido e agressivo como *Fusarium* sp. por promover a morte das sementes antes mesmo da germinação (MARCHI *et al.*, 2010). Na presente pesquisa, o lote 7 foi sempre designado no grupo de menores porcentagens tanto de germinação quanto de primeira contagem, e entre os que apresentaram maiores porcentagens de semente mortas (Tabela 2). Fatos estes que podem estar relacionados com a maior incidência do fungo *Furasium* sp. e *Phoma* sp. (Figura 13). De acordo com os estudos realizados por Silva *et al.* (2019) e Mallmann *et al.* (2013) a alta incidência dos fungos em sementes podem ter como causa as condições climáticas favoráveis nas regiões podutoras ou em áreas de ocorrência de fungos que podem favorecer o aumento da incidência desses patógenos, devido ao incremento do inóculo na área.

Figura 13 - Incidência de fungos (%) nos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu submetidas ao teste de sanidade.



Fonte: Do autor (2021)

Para explicar a variabilidade dos dados, na análise de componentes principais dos doze lotes de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu, foram necessários dois componentes principais (PC1 e PC2), para discriminar aproximadamente 54% da variância total em que o PC1 foi responsável por 32% e o PC2 por 21,7 % das variações dos dados (Figura 14).

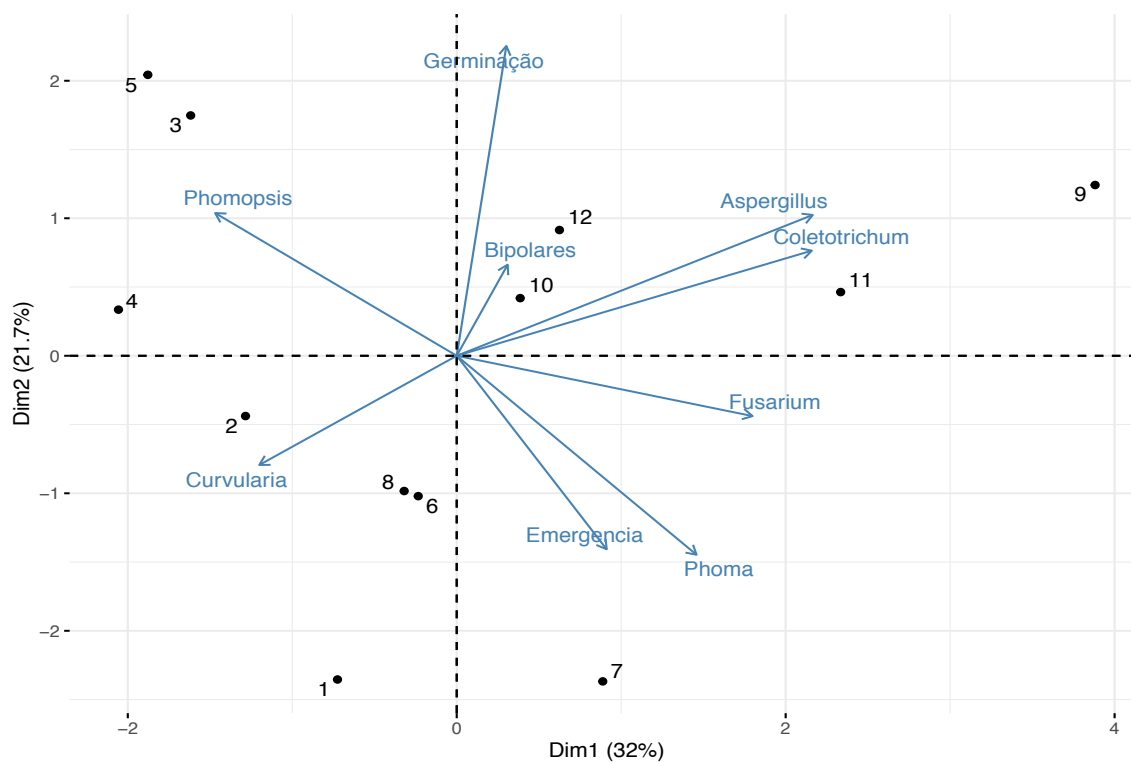
Semelhante ao resultado apresentado na Figura 13, foi observado no gráfico biplot pela análise de componentes principais (Figura 14) que a germinação está no quadrante superior da PC1 e o lote 7 está no quadrante inferior da PC1, ou seja, estão em hemisférios opostos. Esse mesmo lote 7 também está no mesmo quadrante que os fungos *Fusarium* sp. e *Phoma* sp., e também da variável emergência, que pode ter apresentado alguma relação com esses patógenos. Ou seja, germinação e ocorrência de *Phoma* e *Fusarium* tem tendências opostas. De acordo com Lasca et al. (2004), alguns fitopatógenos como *Phoma* sp. que estão presentes em sementes de *Urochloa* sp., podem afetar a qualidade fisiológica.

A redução no processo de germinação não deve ser somente associada com as características climáticas da região de produção dessas sementes mas também com as características inerentes do campo de produção. A transmissão de fungos fitopatogênicos por meio de sementes, como é o caso de *Bipolares* sp., pode ser considerada a principal fonte de inóculo nas pastagens. Segundo Mallmann et al. (2013), a taxa de transmissão de semente para plântula, desse fungo, é de 100%. No entanto, foi observado que o vetor desse fungo foi o menor entre os demais, confirmando assim a não correlação com os componentes principais.

Já a contaminação por *Aspergillus* sp. pode reduzir a germinação e vigor das sementes devido à deterioração (MARCHI et al., 2010). Tal fato pode ser decorrente ao aumento de umidade dos grãos por haver condensação de água e presença de calor no local de armazenamento das sementes (FLEURAT, 2017).

Para os demais patógenos, apesar de possuírem características fitopatogênicas às sementes, não foi possível estabelecer relação clara com a a qualidade fisiológica, a baixa e inconstante ocorrência desses pode ter contribuído.

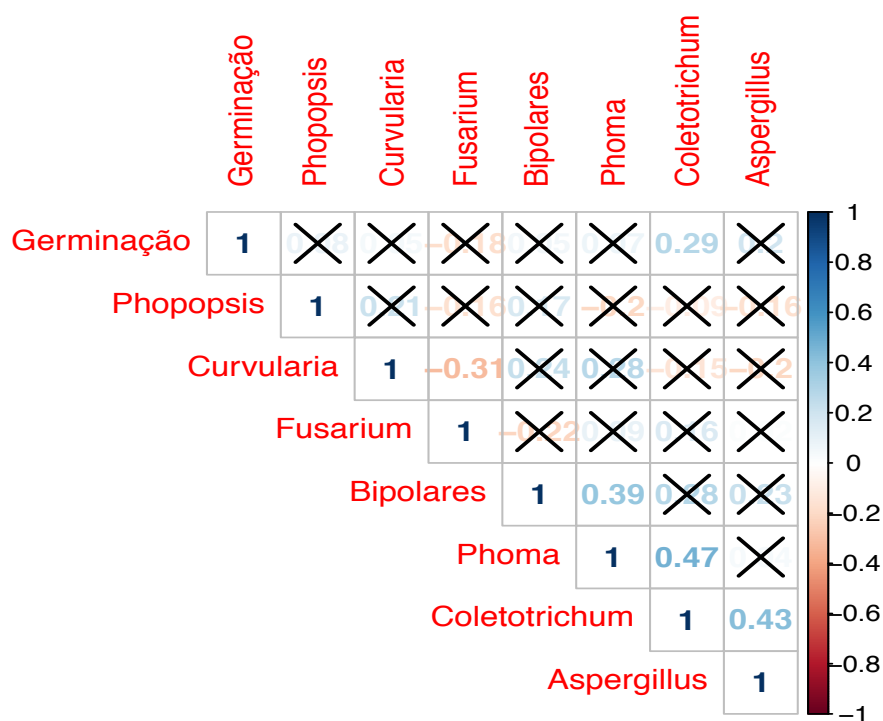
Figura 14 - Análise dos componentes principais (PCA) referentes aos testes de germinação, emergência e sanidade dos doze lotes de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu.



Fonte: Do autor (2021)

Ao observar a correlação entre os patógenos e a germinação dos doze lotes de sementes analisados, foram observadas apenas correlações fracas positivas e negativas entre eles (Figura 15). Pela correlação de Pearson (r) não foi possível estabelecer uma ligação entre germinação e a ocorrência dos fungos em sementes de *U. brizantha* cv. Marandu.

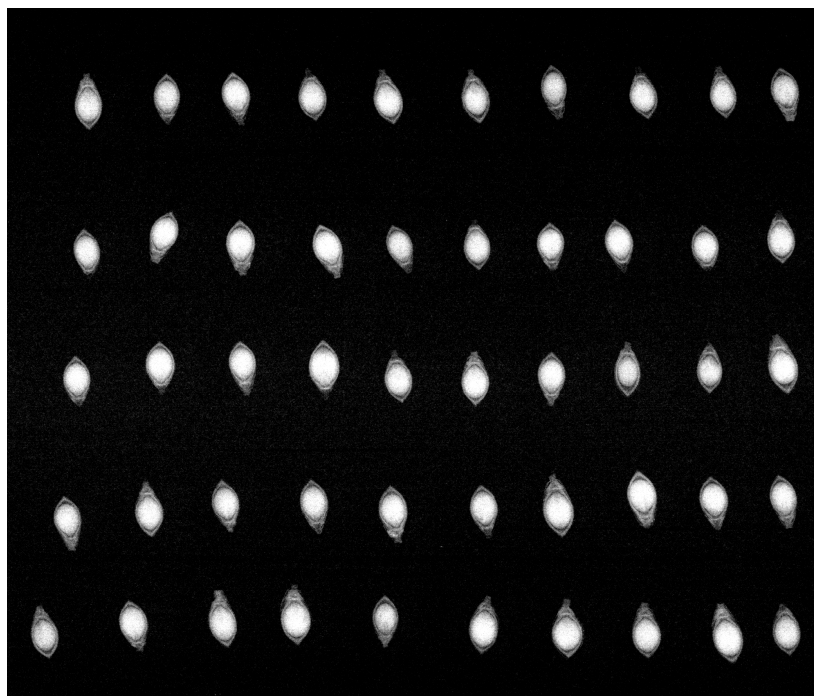
Figura 15 - Correlação de Pearson (r) entre germinação e fitopatógenos encontrados em doze lotes de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu



Fonte: Do autor (2021)

Ao analisar as imagens radiográficas dos doze lotes de sementes de braquiária, foi observado que 100% das sementes de todos os lotes avaliados apresentavam-se cheias com o endosperma preenchido, conforme imagem apresentada de um lote na Figura 16. Os lotes não apresentavam problemas de má formação ou formação incompleta, levando a maior segurança na inferência sobre a qualidade das mesmas.

Figura 16 - Análise de imagem radiográfica de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu



Fonte: Do autor (2021)

Em relação à análise de imagens realizada por meio do equipamento GroundEye®, nos pré-testes realizados para metodologias de captura das imagens, constatou-se que o uso do fundo de papel mata borrão na coloração branca não foi apropriado para captação e configurações posteriores. Os melhores resultados para aquisição das imagens das sementes de braquiária foram com as placas acrílicas azul clara, azul escura e preta, sendo estas então utilizadas para as análises subsequentes, com as seguintes definições.

Na configuração de análise para calibração da cor de fundo foi utilizado o modelo de cor CIEL*a*b com índice de luminosidade de 0 a 100 para todas as placas de acrílico. Para a placa de acrílico azul clara, a dimensão "a" foi de -13,6 a 46,4 e dimensão "b" de -64,7 a -24,7. Para a placa de acrílico azul escura, a dimensão "a" foi de 10,9 a 70,9 e dimensão "b" de -93,2 a -35,6. Para a placa de acrílico preta, a dimensão "a" foi de -30,0 a 30,0 e dimensão "b" de -20,0 a 2,9. Para os parâmetros, o tipo escolhido para todas as placas foi “elementos em geral” e o tamanho mínimo para avaliação das sementes foi de 0,03 cm².

Pela análise de variância verificou-se efeito significativo das variáveis analisadas na análise de imagem, para a cor da placa, classificadores e lotes, além da interação entre cor da placa e o lote (Tabela 4). Não houve diferença significativa entre a média do fatorial triplo, análises por imagem, e a análise visual do tetrazólio (Tabela 4).

Tabela 4 - Quadrados médios (QM), Coeficiente de variação (C.V.) e significância do F referentes às análises do teste de tetrazólio visual e por análise de imagem realizadas nas diferentes placas e classificadores dos doze lotes de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu.

| FATORIAL TRIPLO | | |
|---------------------------------|------|----------------------|
| Fator de Variação | G.L. | Q.M. |
| Cor da Placa | 2 | 5271,46* |
| Classificador | 1 | 1085,00* |
| Lote | 11 | 1275,44* |
| Cor da Placa*Classificador | 2 | 259,17 ^{ns} |
| Cor da Placa*Lote | 22 | 734,79* |
| Classificador*Lote | 11 | 39,38 ^{ns} |
| Cor da Placa*Classificador*Lote | 22 | 23,04 ^{ns} |
| TZ visual*Fatorial | 1 | 433,52 ^{ns} |
| Erro | 219 | 113,96 |
| Total | 291 | |
| C.V. (%) | 2,94 | |

Fonte: Do autor (2021)

A partir dos resultados contidos na Tabela 5, ao analisar a viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio nos doze lotes pela análise de imagem, pode-se observar que os únicos lotes de sementes que não apresentaram diferenças significativas na viabilidade quando analisados nas três cores de placas foram os 5 e 8. O lote 2 foi o que apresentou uma viabilidade inferior em relação aos demais, independente do modo de avaliação, ou seja, dentro de cada plano de fundo.

Outro fator relevante e comumente detectado nos testes de tetrazólio e germinação é demonstrarem divergência em relação aos resultados, tendo em vista a necessidade de considerar a sanidade das sementes que pode afetar negativamente os resultados do teste de germinação, associado ao fato de não serem previamente tratadas e a possível presença de dormência nas sementes (ISTA, 2021).

Tabela 5 - Porcentagem média da viabilidade de sementes dos doze lotes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu avaliadas pela análise visual e por imagem.

| Lote | Análise Visual | Análise de Imagem | | |
|--------|----------------|-------------------|-------|------------|
| | | Cor da Placa | | |
| | | Azul escuro | Preta | Azul claro |
| 1 | 69 aA | 61 aA | 50 bC | 46 bC |
| 2 | 55 aB | 51 aB | 52 aC | 39 bD |
| 3 | 73 aA | 74 aA | 59 bB | 50 bC |
| 4 | 46 bB | 48 bB | 79 aA | 47 bC |
| 5 | 68 aA | 69 aA | 80 aA | 74 aA |
| 6 | 45 bB | 49 bB | 80 aA | 70 aA |
| 7 | 44 bB | 50 bB | 60 aB | 46 bC |
| 8 | 51 aB | 57 aB | 65 aB | 58 aB |
| 9 | 54 bB | 56 bB | 72 aA | 56 bC |
| 10 | 60 aA | 67 aA | 71 aA | 46 bC |
| 11 | 64 aA | 71 aA | 54 bC | 34 cD |
| 12 | 63 bA | 64 bA | 75 aA | 53 cC |
| Média | 57 | 60 | 66 | 52 |
| CV (%) | 2,94 | | | |

Médias seguidas da mesma letra minúsculas na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

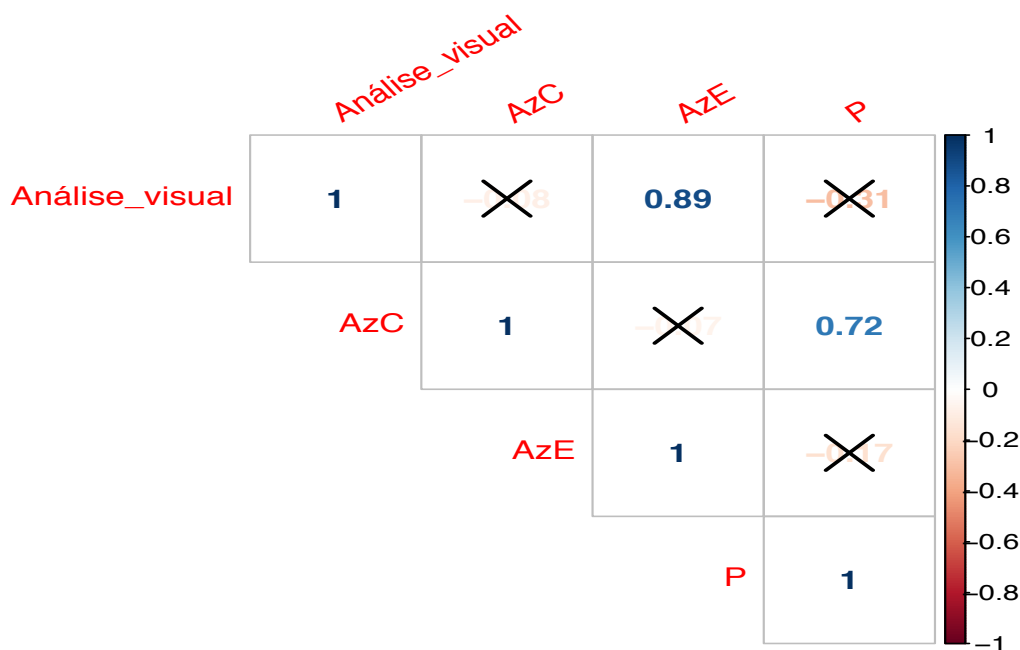
Fonte: Do autor (2021)

Ao observar o efeito plano de fundo na leitura da viabilidade a cor da placa azul claro houve a separação em quatro níveis de qualidade, para a azul escuro em dois e para a preta em três. Os planos de fundo que propiciaram maiores valores absolutos de viabilidade, dentro de cada tratamento, foram os das cores azul escuro e preta. Para análise visual, os lotes foram divididos em 2 grupos em relação à qualidade, a exemplo do observado para o fundo azul escuro.

Ressalta-se que no pré-teste, ao avaliar as cores das placas, com o papel mata-borrão de cor branca não foi possível de aferir o equipamento para as análises do teste de tetrazólio. Assim, permitiu constatar que as placas de cores mais escuras, como azul escuro e preta, foram superiores que a azul claro e papel mata borrão. Comparando-se as médias da análise visual de cada lote com as obtidas na análise digital, observou-se que os resultados obtidos com a placa azul escuro não diferiram estatisticamente dos da análise visual, em nenhum lote, com diferença máxima de 8 pontos percentuais para um mesmo lote. Pode-se então inferir que a placa azul escura é a que mais se aproxima da análise convencional interpretada sob estéreo microscópio.

Conforme os dados da análise de correlação entre os resultados da viabilidade das sementes avaliadas pela análise visual e de imagem (Figura 17), estes sugerem que o plano de fundo de cor azul escuro foi o que correlacionou de forma forte e positiva com a análise visual. Isso confirma que esse plano de fundo usado no processamento digital de imagem no sistema GroundEye® é o que melhor se aproximou da leitura visual.

Figura 17 - Coeficiente de correlação de Pearson estimado entre os resultados dos testes de tetrazólio na avaliação da viabilidade das sementes dos doze lotes de *U. brizantha* cv. Marandu pela análise visual e de imagem nos diferentes planos de fundo das placas: azul escura (AzE), preta (P) e azul clara (AzC)

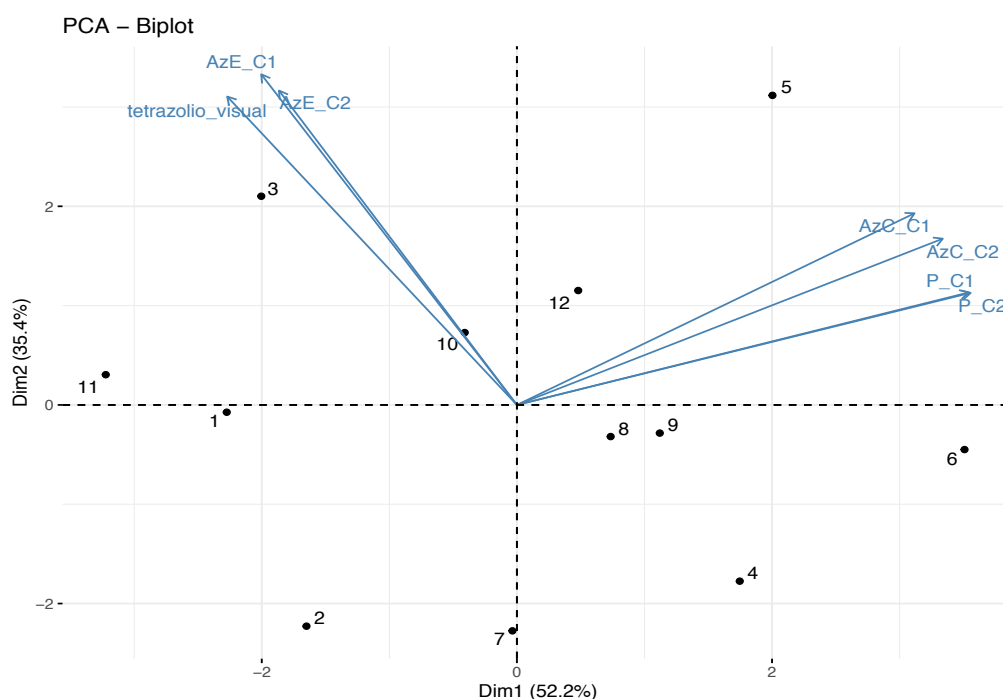


Fonte: Do autor (2021)

Para melhor explicar a variabilidade dos dados da análise dos componentes principais (PCA) referentes à viabilidade das sementes, foram utilizados os dois primeiros componentes principais, PC1 e PC2 que explicaram 87,6% da variância total acumulada, sendo assim foi possível reduzir de cinco componentes principais para apenas dois (Figura 18). Esta mesma figura apresenta os dois componentes principais no plano cartesiano. O PC1 localizado no eixo Dim1, apresentou uma variação dos dados de 52,2% enquanto o PC2 localizado no eixo Dim 2 foi de 35,4%. Assim, 52,2% da variação total do conjunto de dados é explicada apenas pelo PC1 em contrapartida dos 35,4% pelo PC2. Estudos realizados com testes de vigor por Medeiros et al. (2020); Silva, et al. (2019); Silva, et al. (2017) em sementes de braquiária e Barbosa, et al. (2013) em sementes de soja, também corroboram com a atual pesquisa que dois componentes principais

foram suficientes para explicar 84,5% 73,47%, 74,23% e 65,86%, respectivamente, da variância total dos dados na discriminação das variáveis.

Figura 18 - Análise dos componentes principais (PCA) na avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio nos doze lotes de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu referentes à análise visual (tetrazólio visual) e de imagem das redes de decisões dos planos de fundo de cor azul escuro com o classificador 1 (AzE1), azul escuro com o classificador 2 (AzEC2), azul claro com o classificador 1 (AzCC1), azul claro com o classificador 2 (AzCC2), preto com o classificador 1 (PC1), preto com o classificador 2 (PC2)



Fonte: Do autor (2021)

Observa-se que na Figura 18 os parâmetros individuais da análise visual e de imagem, esta última referente às redes de decisões dos planos de fundo analisados, foram ilustrados como vetores. A análise visual e de imagem com o plano de fundo de cor AzEC1 e AzEC2, plano de fundo de cor azul escuro e classificadores 1 e 2 respectivamente, foram as variáveis que mais contribuíram e apresentaram-se próximas para a variação dos dados para o PC2. Esses dados confirmam a alta correlação entre a análise visual com a de imagem com o plano de fundo azul

escuro. Já para PC1, em direção oposta à análise visual, os palnos de fundo azul claro com o classificador 1 (AzCC1), azul claro com o classificador 2 (AzCC2), preto com o classificador 1 (PC1) e preto com o classificador 2 (PC2) apresentaram maior contribuição e tendências similares.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6 referentes à análise de variância do teste de tetrazólio, a interação do teste tradicional (análise visual) com a análise de imagem por processamento digital não foi significativa. A interpretação do teste por imagem permitiu a avaliação das partes vitais do embrião e não vitais do endosperma de forma semelhante à visual. Ao comparar esses dois métodos de análise, foi observado uma porcentagem média de sementes viáveis realizada pela análise visual de 49% em comparação com a análise de imagem de 59%, sem diferença estatística (Tabela 6).

Tabela 6 - Média da porcentagem de sementes viáveis dos doze lotes de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu por análise visual e por imagem

| Teste de tetrazólio | Média |
|---------------------|---------|
| | Viáveis |
| Análise visual | 49 a |
| Análise de imagem | 59 a |
| CV (%) = 2,94 | |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2021)

Os resultados dessa pesquisa corroboram com estudos realizados em sementes de trigo, aveia branca e braquiária na interpretação do teste de tetrazólio por análise de imagens digitalizadas evidenciando a eficiência da avaliação equivalente ao emprego do estéreio microscópio (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO NETO et al., 2012; GARCIA et al., 2020; TEJO et al., 2017, 2018). Porém nesta pesquisa, a utilização do equipamento GroundEye® torna-se vantajosa pela praticidade e tempo gasto na realização dos testes para a avaliação da viabilidade das sementes, uma vez que tanto a coloração das sementes com solução de tetrazólio acondicionadas em BOD, quanto a captura das imagens pelo sistema GroundEye®, foram

realizados nas mesmas placas acrílicas, sem que houvesse a necessidade da transferência das sementes para as avaliações. Ressalta-se ainda que as análises realizadas por esses autores foram subjetivas pela necessidade da avaliação individualizada de cada semente por um analista.

Pode-se inferir, a partir destes resultados, que o uso do processamento digital de imagem pelo sistema GroundEye[®], demonstrou ser de grande potencial na determinação da viabilidade das sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, com um alto grau de eficiência e precisão, e com menor tempo para a execução do teste. A automatização dessas análises traz significativas contribuições e um caminho promissor para a área de tecnologia de sementes.

6 CONCLUSÃO

A análise digital (sistema GroundEye®) da viabilidade de sementes de braquiária submetidas ao teste de tetrazólio é eficiente, apresenta alta correlação com a análise visual tradicional.

O plano de fundo da placa acrílica de cor azul escuro possibilita o melhor contraste para captura e análise de imagens de sementes submetidas ao tetrazólio.

A metodologia da germinação em rolo de papel por sete dias proporciona plântulas adequadas para captura e processamento digital de imagens, com maior sensibilidade pelo comprimento de raiz para separação de vigor.

O processamento digital de imagens pelo sistema GroundEye® fornece dados confiáveis sobre a viabilidade e vigor das sementes e plântulas de braquiária e pode ser considerada uma abordagem eficiente, rápida, não subjetiva e com economia de tempo.

REFERÊNCIAS

- ABIEC - **Perfil de Pecuária no Brasil** – Relatório Anual 2018 (Abiec, Brazilian Beef, Apex Brasil). Disponível em: <http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>. Acesso em: fevereiro de 2021.
- ALMEIDA, R. G.; ZIMMER, A. H.; VALLE, C. B. Sementes de forrageiras para o Brasil tropical. **Seed News**, Pelotas, v. 9, n. 6, p. 8-11, 2007.
- ALVES, B. A. et al. Germinação de sementes de forrageiras do gênero *Brachiaria* em função dos ambientes e tempos de armazenamento. **Global Science and Technology**, Goiânia, v. 10, n. 01, p. 11-19, 2017.
- AMARO, H. T. R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de crambe tratadas com zinco e molibdênio. **In Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 15, n. 2, p. 133-139, 2019.
- ANDRADE, D. B. et al. Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). **International Journal of Current Research**. Milano, v. 8, p. 26462-26465, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS - ABRASEM. Associação Brasileira de sementes e mudas: Semente é tecnologia. **Revista ABRASEM- Anuário 2019**, Brasília, p. 1-124, 2019.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. Seed vigor testing handbook. **Ithaca**: AOSA, 341 p, 2009.
- AZERÊDO, G. A.; PAULA, R. C.; VALERI, S. V. Viabilidade de sementes de *Piptadenia moniliformis Benth* pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n.1, p. 61-68, 2011.
- BARCELLOS, R. Novo método de mapeamento de espaços de cor através de redes neurais artificiais especializadas. 2011. 121 p. **Tese** (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Evaluation of Tomato Lines against Septoria Leaf Spot under Field Conditions and Its Effect on Fruit Yield. **Agricultural Sciences**, Wuhan, v. 7, n. 4, 218 p, 2016.
- BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. **Forragicultura, Ciência, Tecnologia e Gestão dos recursos Forrageiros**. 1 ed., Jaboticabal: Gráfica e editora multipress, v. único, 2013.
- BHERING, M. C.; DIAS, D. C. F. S.; BARROS, D. I.; DIAS, L. A. S.; TOKUHISA, D. Avaliação do vigor de sementes de melancia *Citrullus lanatus* Schrad pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 125, n. 2, p. 1-6, 2003.

BISCOLA, P. H. N.; PEREIRA, M. A.; COSTA, F. P. **Relatório de avaliação dos impactos das tecnologias geradas pela Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2013.

BONOME, L. T. S. et. al. Osmoconditioning of *Urochloa brizantha* seeds to reduce pelleting negative effects. **Brazilian Journal of Agriculture**, Piracicaba, v. 92, n. 2, p. 87-100, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 26 de outubro de 2010. Estabelece normas e padrões para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2010.
Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 15 abril de 2021.

BRASIL. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária**, Brasília:, p. 395, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 21 de maio de 2008. Estabelece normas e padrões para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical. **Diário Oficial da União**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, v. 45., 2008.
Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 15 abril de 2021.

BRUNES, A. P. et. al. Seedling length in wheat determined by image processing using mathematical tools. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza v. 47, n. 2, p. 374-379, 2016.

CÂMARA, H. H. L. L.; SERAPHIN, E. S. Germinação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e tratamento hormonal. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 32, n.1, p. 21-28, 2002.

CANDEIAS, A. L. B.; SILVA, E. A. Extração de Estradas de uma imagem ETM+ Landsat usando Morfologia Matemática. In: Congresso Brasileiro de Cadastro Técnico Multifinalitário (COBRAC), **Anais [...]**. Florianópolis, p. 1-8. 2004.

CANTARELLI, L. D.; SCHUCH, L. O. B.; TAVARES, L. C.; RUFINO, C. A. Variabilidade de plantas de soja originadas de sementes de diferentes níveis de qualidade fisiológica. **Acta Agronômica**, Palmira-Colômbia, v. 64, n. 3, p. 234-238, 2015.

CARDOSO, E. D. et al. Desempenho fisiológico e superação de dormência em sementes de *Brachiaria brizantha* submetidas a tratamento químico e envelhecimento artificial. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 21-37, 2014.

CARVALHO, E. R. et al. Fitotoxicidade em sementes de soja tratadas com produtos fitossanitários em diferentes momentos de aplicação. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, p. 1-11, 2020.

CARVALHO, T. C. et al. Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 361-367, 2013.

CHORTASZKO, N. G. et al. Avaliação da qualidade fitossanitária e germinação de sementes forrageiras. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Natal, v. 12, p. 81-88, 2019.

COSTA, C. J.; SANTOS, C. P. Teste de tetrazólio em sementes de leucena. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 2, p.66-72, 2010.

CUSTÓDIO, C. C.; DAMASCENO, R. L.; MACHADO NETO, N. B. Imagens digitalizadas na interpretação do teste de tetrazólio em sementes de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 334-341, 2012.

DE BONA, F. D.; MONTEIRO, F. A. Marandu palisadegrass growth under nitrogen and sulphur for replacing Signal grass in degraded tropical pasture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, n.5, p.570-578, 2010.

DECARLI, L., et al. Tratamento industrial em sementes de soja: qualidade fisiológica e desempenho da cultura. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Piracicaba, v. 14, n. 3, 2019.

DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 145-151, 2008.

DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p. 841- 849, 1999.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and cetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 71, n. 2, p. 428-434, 1958.

FAVORETO, L. et. al. Estudo fitossanitário, multiplicação e taxonomia de nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 35, n. 2, p. 1-2, 2011.

FERREIRA, A. M. O. **Vigor de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu por análise de imagem**. 2019, 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins - An update. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdã, v. 71, p. 22-40, 2017.

FILHO, D. B. M. Formação e Manejo de Pastagens. **Comunicado Técnico**. Belém, 2012.

FONSECA, D. M.; SANTOS, M.E.R.; MARTUSCELLO, J.A. Importância das forrageiras no sistema de produção. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (eds.). **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, p. 13-29. 2011.

FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, cap. 8, p. 1-7. 1999.

FREITAS, M. N. et. al. Identification of physiological analysis parameters associated with coffee beverage quality. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 44, p. 1-14, 2020.

GARCIA, E. B. Testes de vigor em sementes de trigo. Dissertação (Mestrado em Agricultura Conservacionista) – **Instituto Agrônomo do Paraná**, Londrina, p. 80, 2018.

GARCIA, E. B.; ÁVILA, M. R.; JÚNIOR, N. S. F.; NAGASHIMA, G. T. Imagens digitalizadas na avaliação do teste de tetrazólio em sementes de trigo. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente. v. 16, n. 6, p. 67-78, 2020.

GOLDFARB, M.; QUEIROGA, V. P. Considerações sobre o armazenamento de sementes. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa. v. 7, n. 3, p.71-74, 2013.

GUEDES, R. S. et al. Germination of *Dalbergia nigra* (Vell.), **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 445, 2011.

HOCHHOLDINGER, F. et al. From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 42-48, 2004.

HOSOMI, S. T. et. al. Preconditioning Cattleya seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, Cambridge, v. 39, n. 1, p. 178-189, 2011.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). International Rules for Seed Testing. Bassersdorf: **International Seed Testing Association**, Cambridge 2021.

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**, Recife, v. 13, n. 4, 2018.

KHAN, A. Z. et al. Impact of Fertilizer Priming on Seed Germination germination behavior and vigor of maize. **International Society of Pure and Applied Biology**, Balochistan, v. 5, n. 4, p. 183-192, 2016.

KIST, B. B. et al. **Anuário Brasileiro de Sementes**, 2019. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, Santa Cruz, 2019.

KRZYZANOWSKI, F.C. et al. Vigor de sementes: conceitos e testes. 2.ed. Londrina: **Abrates**, 601 p., 2020.

LAGO, A. A.; MARTINS, L. Qualidade fisiológica de sementes de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 199-204, 1998.

LAURA, V. A. et al. Qualidade física e fisiológica de sementes de braquiárias comercializadas em Campo Grande-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 326-332, 2009.

LIMA, D. C. **Avaliação do vigor e germinação de sementes de soja a partir da análise de imagens de plântulas**. 2015. 85p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica/ Processamento de Sinais e Instrumentação) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

MACEDO, M. C. M. et al. Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação, e formas de mitigação. In: Encontro de adubação de pastagens da scot consultoria - tec - fértil 1, Ribeirão Preto, SP. **Anais [...]**. Bebedouro: Scot Consultoria, p. 158-181, 2013.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentáveis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais [...]**. Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. p. 56- 84.

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

MALLMANN, G. et. al. Fungos e nematoides associados a sementes de forrageiras tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 3, p. 201-203, 2013.

MARCHI, C. E. et al. Fungos veiculados por sementes comerciais de braquiária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 65-73, 2010.

MARCOS-FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 495p, 2015.

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

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

MARCOS-FILHO, J.; VIEIRA, R.D. Seed Vigor Tests: Principles – Conductivity Tests. In: Riad Baalbaki; Sabry Elias; Julio Marcos Filho; Miller B. McDonald. (Org.). **Seed Vigor Testing Handbook**. 1ªed.Ithaca: AOSA, p. 77-90, 2009.

MARCOS, M. F. et. al. Reação à *Bipolaris maydis*, agente causal da mancha foliar, em híbridos apomíticos de *Panicum maximum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 197-201, 2015.

MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H. Processamento digital de imagens. Rio de Janeiro: Brasport, 1999. 406p.

MASCHIETTO, J. Produção de sementes de gramíneas forrageiras. In: PEIXOTO, A.M. et. al. (ed.). **Pastagens: fundamentos da exploração racional**. Piracicaba, ed. FEALQ, p. 837-856, 1994.

MECHELN, L. H. M. V. et. al. Identificação de danos em sementes de soja no teste de tetrazólio usando macro imagens. In: Congresso Brasileiro de Soja, 7.; MERCOSOJA, 2015, Florianópolis. **Tecnologia e mercado global: perspectivas para soja**, Londrina, Embrapa Soja, 2015.

MEDEIROS, J. A. D. et al. Teste de vigor de plântulas normais intactas (fortes) de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. **Journal Seed Science**, Londrina, v. 42, p. 1-10, 2020.

MEDEIROS, A. D., PEREIRA, M. D., SILVA, J. A. Processamento digital de imagens na determinação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.13 n. 3, p. 1-7, 2018.

MELO, L. F. et al. Beneficiamento na qualidade física e fisiológica de sementes de capim-mombaça. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 47, n. 4, p. 667-674, 2016.

MELO, P. A. F. R.; JEROMINI, T. S.; AFFONSO, C. E.; ALVES, E. U.; MARTINS, C. C. Vigor tests in assessing the quality of signal grass seeds. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 3491-3498, 2017.

MITTELMANN, A. Principais espécies forrageiras. In: PEGORARO, L. M. C. (Ed.). **Noções sobre produção de leite**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, p. 153, 2006.

MUNIZZI, A.; BRACCINI, A. L.; RANGEL, M. A. S.; SCAPIM, C. A.; ALBRECHT, L. P. Qualidade de sementes de quatro cultivares de soja, colhidas em dois locais no estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 176-185, 2010.

NERY, M. C. et al. Produção de sementes forrageiras. **Boletim Técnico**, Lavras, n. 88, p. 47, 2012.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**, Londrina, ABRATES, cap. 2, p. 1-24, 1999

NOGUEIRA, J. L.; SILVA, B.A.; CARVALHO, T.C.; Panobianco, M. Electrical conductivity test for assessing the physiological potential of black oat seeds. **Revista Ceres**, v. 60, n. 6, p. 896-901, 2013.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - Still a mystery. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

PARENTE, L. et al. Assessing the pasturelands and livestock dynamics in Brazil, from 1985 to 2017: A novel approach based on high spatial resolution imagery and Google Earth Engine cloud computing. *Remote Sensing of Environment*, **Elsevier**, Amsterdã, v. 232, 2019.

PARIZ, C. M. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Brachiaria* e avaliação da produtividade de massa seca, em diferentes sistemas de integração lavoura-pecuária sob irrigação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 330-340, 2010.

PARMEJANI, R. S.; SILVA, R. B.; MELLO, R. A. Qualidade física e fisiológica de sementes de forrageiras comercializadas no estado de Rondônia: safra 2012/2013. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 24, n. 3, p. 112-117, 2014.

PEREIRA, M. D. et al. Processamento digital de imagens de plântulas na avaliação do vigor de sementes de *Moringa oleifera* Lam. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 291-306, 2020.

PEREIRA, S. R. et al. Qualidade de sementes comercializadas de braquiárias: O que mudou após 10 anos? **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 20 p, 2019.

PEREIRA, D. S. et al. Physiological changes in hybrid *Brachiaria* cv. Mulato II after accelerated aging to overcome dormancy. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 3, p. 244-253, 2017.

PINTO, A. H. et al. Teste de condutividade elétrica para diferenciação dos níveis de deterioração de sementes de forrageiras. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 3, n. 2, p. 9-15, abr./jun. 2016.

PINTO, C. A. G. et al. Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 2, p. 319-328, 2015.

PIRES, R. M. O. **Semente de qualidade: a protagonista do agronegócio**. Disponível em: <https://mundoagro.blog.br/semente-de-qualidade-a-protagonista-do-agronegocio/> Acesso em 2021.

RAGONHA, E. P.; OLIVEIRA, G. P.; SILVA, D. C. B. Comparação dos testes de germinação e tetrazólio para análise do vigor de sementes de forrageiras. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 12, n. 2, p. 63-66, 2018.

REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. . **Forragicultura. Ciência, Tecnologia e Gestão dos recursos Forrageiros**. 1. ed. Jaboticabal: Gráfica e editora multipress, v. único, 714p., 2013.

RIBEIRO, E. C. G. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Urochloa brizantha* submetidas a condicionamento com sais de cálcio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 49, 2019.

ROCHA, C. R. M.; SILVA, V. N.; CICERO, S. M. Avaliação do vigor de sementes de girassol por meio de análise de imagens de plântulas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 6, p. 970-976, 2015.

SANTOS, G. R. et al. Sanitary analysis, transmission and pathogenicity of fungi associated with forage plant seeds in tropical regions of Brazil. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 54-62, 2014.

SENA, D. V. A.; ALVES, E. U.; MEDEIROS, D. S. Vigor de sementes de milho cv. 'Sertanejo' por testes baseados no desempenho de plântulas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 11, p. 1910-1916, 2015.

SILVA, G. Z. et al. Multivariate analysis and vigor tests to determine the quality of *Brachiaria decumbens* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 50, n. 2, p. 291-299, 2019.

SILVA, G. Z. et al. Evaluation the physiological quality of *Brachiaria brizantha* cv. BRS 'Piatã' seeds. **Bioscience Journal**, Uberlândia, n. 3, v. 33, p. 572-580, 2017.

SILVA, P. P.; FREITAS, R. A.; CÍCERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J.; NASCIMENTO, W. Análise de imagens no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**, Recife v. 32, p. 210-214, 2014.

SILVA, V. N.; SARMENTO, M. B.; SILVEIRA, A. C.; SILVA, C. S.; CICERO, S. M. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 4, p. 1158-1169, 2013.

SOUZA, F. H. D. **Produção de sementes de gramíneas forrageiras tropicais**. Boletim Técnico, Embrapa Sudeste - CPPSE, São Carlos, n. 30, p. 43, 2001.

TEJO, D. P. et al. Qualidade fisiológica de sementes de aveia branca com ênfase no teste de tetrazólio com imagens digitalizadas. **Scientia Agraria Paranaensis**, Parana, Marechal Cândido Rondon, v. 17, n. 4, p. 532-536, 2018.

TEJO, D. P. et al. Análise de imagens digitalizadas do teste de tetrazólio em sementes de trigo. In: Congresso Brasileiro De Sementes, Foz do Iguaçu, 2017.

TELES, T. G. R. M, et al. Produção e composição química da *Brachiaria brizantha* cv. MG-4 sob efeito de adubação com NP. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, Maringá, v. 33 n. 2, p. 137-143, 2011.

USBERTI, R. Determinação do potencial de armazenamento de lotes de sementes de *Brachiaria decumbens* pelo teste do envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 5, p. 691-699, 1990.

VANZOLINI, S. et al. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 90-96, 2007.

VASCONCELOS, M. C. et al. Radiography and biometric analysis of broadleaf vegetable seeds. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 61, 2018.

VENDRAMINI, J. M. B.; DUBEUX JR, J. C. B.; COOKE, R. F. Gramíneas e Leguminosas de Clima Temperado. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. (Eds.). **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. 1. Ed.. Jaboticabal: Maria de Lourdes Bradel, v.1. cap 9, p. 125-135, 2013.

VERSZIGNASSI, J. R. A pesquisa em sementes de espécies forrageiras de clima tropical no Brasil. **Informativo ABRATES**. p. 23:36-37, 2013.

VIEIRA, P. A. et al. A interpretação do teste de tetrazólio em sementes de milho com o emprego da técnica de análise de imagens In: **Congresso Nacional De Milho E Sorgo**, Uberlândia, 2000.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI F. C. Teste de condutividade elétrica. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira R.D.; França Neto, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES, Londrina, p. 4.1- 4.26, 1999.

VILELA, L. Impactos de pastagens degradadas na produtividade animal. In: Mapeamento e Monitoramento das Pastagens Brasileiras. **Anais [...]**. Brasília: Laboratório de Processamento de Imagens e Geoprocessamento (Lapig), 2017.

WITT, F. A. P.; OLIVEIRA, F. F.; TAKESHITA, V.; RIBEIRO, L. F. C. Qualidade sanitária de sementes de *Urochloa e Panicum* comercializada no norte mato-grossense. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n. 21; p.16-36, 2015.

XIA, Yu. et al. Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review. **Artificial Intelligence in Agriculture**, Amsterdã, v. 1, p. 35-47, 2019.

ZANUZO, M. R.; MULLER, D.; MIRANDA, D. M. Análise de sementes de capim braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) em diferentes épocas de florescimento. **UNICIÊNCIAS**, Cuiabá, v. 14, n. 2, p. 187-197, 2010.

ZHANG, C. et. al. High-throughput phenotyping of seed/seedling evaluation using digital image analysis. **Agronomy**, Basel, v.8, n. 63, 2018.

ZHENG, M. et al. Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 78, n. 2, p.167-178, 2016.

ZORZAL, T. A. et al. Teste do tetrazólio para estimativa da viabilidade de sementes. **Natureza**, Santa Tereza, v. 13, p. 144-149, 2015.