



ALCEBÍADES FOGAÇA DE SOUZA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES
DE SOJA POR MEIO DO *BIOSPECKLE LASER***

**LAVRAS – MG
2023**

ALCEBÍADES FOGAÇA DE SOUZA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA POR
MEIO DO *BIOSPECKLE LASER***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Instrumentação, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior
Orientador

Prof. Dr. Everson Reis Carvalho
Coorientador

Prof. Dr. Alex de Oliveira Ribeiro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

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

Souza Sobrinho, Alcebíades Fogaça de.

Avaliação da Qualidade Fisiológica de Sementes de Soja por
Meio do *Biospeckle Laser* / Alcebíades Fogaça de Souza Sobrinho.
- 2023.

45 p. : il.

Orientador(a): Roberto Alves Braga Junior.

Coorientador(a): Everson Reis Carvalho, Alex de Oliveira Ri-
beiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Controle de Qualidade. 2. Glycine max. 3. Speckle Dinâ-
mico. I. Braga Junior, Roberto Alves. II. Carvalho, Everson Reis.
III. Ribeiro, Alex de Oliveira. IV. Título.

ALCEBIADES FOGAÇA DE SOUZA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA POR
MEIO DO *BIOSPECKLE LASER***

**EVALUATION OF THE PHYSIOLOGICAL QUALITY OF SOYBEAN SEEDS USING
THE *BIOSPECKLE LASER***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Instrumentação, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de março de 2023

Dr. Roberto Alves Braga Junior UFLA

Dr. Everson Reis Carvalho UFLA

Dr. José Luiz Contado UFLA

Dr. Juliana Aparecida Fracarolli UNICAMP

Dr. José Eduardo Silva Gomes CEFET-MG

Prof. Dr. Roberto Alves Braga Junior
Orientador

Prof. Dr. Everson Reis Carvalho
Coorientador

Prof. Dr. Alex de Oliveira Ribeiro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por conceder serenidade, paz e proteção.

Aos meus pais, Adão e Maria, por desde o princípio me apoiarem e serem o meu porto seguro.

Ao Antônio, Rosalra e Tereza, pelo acalento, companhia e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior, pela orientação, atenção e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Everson Reis Carvalho, pela contribuição, atenção e companheirismo.

À Amanda e Débora pela atenção e contribuição no meu trabalho.

À Aparecida, pela simplicidade e companhia.

Às equipes de trabalho do Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicado à Agropecuária (CEDIA) e Laboratório Central de Sementes (DAG), pelo apoio.

À Universidade Federal de Lavras, por todas as oportunidades concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

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

RESUMO

A análise da qualidade de sementes envolve diversos testes, com metodologias utilizadas em todas as etapas de produção, e visam avaliar principalmente o vigor e viabilidade desde a colheita até a semeadura. A busca por novas alternativas de testes que permitam análises mais rápidas e menos subjetivas é uma tendência atual, o uso de técnicas novas como o *biospeckle laser* pode auxiliar na obtenção de metodologias eficientes e rápidas. Objetivou-se neste trabalho avaliar a capacidade do *biospeckle laser* em diferenciar amostras de semente de soja de acordo com a qualidade fisiológica e determinar metodologias adequadas para esse fim. Foram avaliadas 12 amostras de sementes com diferentes níveis de qualidade, determinado por meio de testes tradicionais. Para a análise por meio do *biospeckle laser* foram capturadas 512 imagens de cada semente, e submetidas a dois métodos de processamento: o *Graphic Absolute Value of the Differences (GAVD)*, que gerou mapas de atividade biológica dos cotilédones das sementes, e o *Numerical Analysis of the Average Difference (NUMAD)*, que forneceu valores numéricos que quantificou a atividade biológica. Os testes tradicionais utilizados para validar a qualidade das amostras foram: germinação; primeira contagem de germinação; emergência; primeira contagem de emergência; condutividade elétrica; teste de envelhecimento acelerado em papel e substrato. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média de *Scott-Knott*. Para a validação dos resultados adquiridos com o *biospeckle laser*, foi feita a correlação de *Pearson* com os resultados dos testes tradicionais comumente utilizados em análises de sementes. No teste de médias de *Scott-Knott*, a separação das amostras de semente de soja pelo processamento de imagens, demonstrou-se semelhante aos dos testes tradicionais. Pelo coeficiente de *Pearson*, o NUMAD obteve maior correlação com os testes de envelhecimento acelerado em substrato, emergência e envelhecimento acelerado em papel, respectivamente. O *biospeckle laser* demonstrou ser capaz de avaliar a qualidade fisiológica das sementes de soja, e os resultados indicaram maior correlação com os testes de vigor.

Palavras-chave: Controle de Qualidade. *Glycine max*. Processamento de Imagens. Speckle Dinâmico. Vigor de Sementes.

ABSTRACT

The analysis of seed quality involves several tests, with methodologies used in all stages of production, and mainly aim to evaluate vigor and viability from harvest to sowing. The search for new test alternatives that allow faster and less subjective analyzes is a current trend, the use of new techniques such as biospeckle laser can help to obtain efficient and fast methodologies. The objective of this work was to evaluate the ability of the biospeckle laser to differentiate soybean seed samples according to physiological quality and to determine suitable methodologies for this purpose. Twelve samples of seeds with different levels of quality, determined by means of traditional tests, were evaluated. For the analysis using the biospeckle laser, 512 images of each seed were captured and submitted to two processing methods: the Graphic Absolute Value of the Differences (GAVD), which generated maps of biological activity of the cotyledons of the seeds, and the Numerical Analysis of the Average Difference (NUMAD), which provided numerical values that quantified biological activity. The traditional tests used to validate the quality of the samples were: germination; first germination count; emergency; first emergency count; Electric conductivity; accelerated aging test on paper and substrate. The experimental design adopted was completely randomized (DIC). The data obtained were submitted to analysis of variance and Scott-Knott mean test. To validate the results obtained with the biospeckle laser, Pearson's correlation was performed with the results of traditional tests commonly used in seed analysis. In the Scott-Knott mean test, the separation of soybean seed samples by image processing, proved to be like the traditional tests. By Pearson's coefficient, NUMAD obtained the highest correlation with the tests of accelerated aging on substrate, emergence, and accelerated aging on paper, respectively. The biospeckle laser proved to be capable of evaluating the physiological quality of soybean seeds, and the results indicated a greater correlation with vigor tests.

Keyword: Quality Control. Glycine max. Image Processing. Dynamic Speckle. Seed Vigor.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Qualidade das sementes.....	11
2.2	Práticas para obtenção e manutenção da qualidade de sementes.....	12
2.3	Análise da qualidade fisiológica de sementes.....	14
2.4	O biospeckle laser.....	17
2.5	O biospeckle laser aplicado à agricultura.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	Localização.....	22
3.2	Desenvolvimento da metodologia para o biospeckle laser e a qualidade de sementes de soja.....	22
3.3	Validação da metodologia.....	23
3.3.1	Sementes utilizadas.....	23
3.4	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes.....	24
3.5	Bancada de captura de imagens.....	25
3.6	Processamento das imagens.....	26
3.6.1	Análise gráfica.....	26
3.6.2	Análise numérica.....	26
3.7	Delineamento experimental e análise estatística.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	Desenvolvimento da metodologia para biospeckle laser e qualidade de sementes de soja.....	30
4.2	Validação da metodologia.....	34
5	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A.....	45

1 INTRODUÇÃO

A constante evolução da agricultura proporcionou o aumento da produção de alimentos, suprindo a demanda em tempos contemporâneos. Entretanto, com o contínuo crescimento da população global, a produção de alimentos em alta escala sempre terá um destaque nas discussões e ações das nações.

A cadeia produtiva agrícola é longa e diversificada, podendo variar a complexidade de acordo com o produto desejado, e todo o processo, seja para a obtenção de produtos industrializados ou *in natura*, proteína animal, combustíveis, fármacos e cosméticos, tem como o início do processo o cultivo e exploração do solo.

O cultivo do solo para obtenção de recursos, por mais primitivo que possa parecer, é constituído de etapas interrelacionadas e interdependentes; se apenas um desses ciclos for negligenciado, todo o processo será comprometido.

Um exemplo que se pode citar é a qualidade dos insumos utilizados na implantação da lavoura. Um solo bem manejado, em que pH foi devidamente corrigido, os fertilizantes foram utilizados de acordo com as exigências da cultura, houve a garantia do fornecimento de água necessário, não terá todo o seu potencial aproveitado se for utilizado na semeadura sementes de baixa qualidade.

A semente é o principal insumo agrícola; conseqüentemente devem-se utilizar lotes que possuem alta pureza física, elevada taxa de germinação, alto vigor, boa qualidade genética e sanitária. Sementes com essas características, com condições favoráveis em campo, irão proporcionar a densidade de plantas desejada; a lavoura se estabelecerá mais rapidamente; e com o manejo adequado, o produtor alcançará alta produtividade, além de uma menor incidência de patógenos, pois muitos desses podem ser veiculados via sementes.

Os processos relacionados à produção de sementes de soja são mais complexos se comparados com a produção de grãos, exigindo um controle minucioso de pragas e doenças, segregação varietal, preferência por áreas de plantio com clima moderado, entre outras características. E os cuidados extras não se limitam somente à condução da lavoura.

No ato da colheita, o maquinário deve ser criteriosamente limpo para não ocorrer a mistura de cultivares, evitando, assim, contaminações varietais. Na etapa de transporte do campo para a unidade de beneficiamento de sementes (UBS), feito na maioria por via rodoviária, deve-se minimizar a exposição do veículo de transporte ao

sol, evitando o aquecimento excessivo da massa de sementes.

Na UBS, as sementes devem ser limpas até alcançarem alto grau de pureza física, e secas a baixa temperatura até que atinjam o grau de umidade adequado. E, posteriormente, devem ser armazenadas em bags ou sacarias. E para garantir que as sementes utilizadas no plantio sejam de alta qualidade, são feitos vários testes ao longo de todo o processo de produção que podem avaliar atributos, como os fisiológicos, físicos, genéticos e sanitários

O controle de qualidade eficiente é um fator muito importante no processo produtivo de sementes e vários testes podem ser realizados para o monitoramento dos processos e produtos. Em sementes de soja, são comuns os testes de germinação, envelhecimento acelerado, emergência em canteiros, dentre outros. Eles são realizados em várias etapas da produção, desde a pré-colheita até o armazenamento, sendo cada tipo de análise mais adequado para uma determinada situação e no momento da produção.

Os testes em laboratório são bastantes eficazes; porém, podem ser dispendiosos, demandando muita mão de obra especializada e um tempo de execução bastante extenso, além dos custos, que podem ser elevados. Assim, os principais fatores que prejudicam a eficiência dos testes tradicionais são a falta de treinamento e capacitação da mão de obra aliada a subjetividade humana, e o tempo demandado para algumas análises.

Por esses motivos, atualmente são demandadas técnicas e testes, diretos ou indiretos, que sejam objetivos e assertivos nos resultados, porém com resultados rápidos para tomadas de decisões no sistema de produção. Nessa linha de testes rápidos para a análise da qualidade de sementes, trabalhos estão sendo realizados com o uso de tecnologia de captura e processamento de imagens.

A técnica do *biospeckle laser* tem como base a observação da dispersão da luz laser incidente na superfície do material biológico no decorrer do tempo. Este método é sensível aos processos metabólicos das células, que, no caso das sementes, pode se relacionar com análises tradicionais de qualidade.

Na literatura científica, estão disponíveis trabalhos nos quais é utilizado o *biospeckle laser*, para identificar e quantificar a atividade biológica em sementes; essa técnica tem se apresentado viável para a análise de qualidade, trazendo benefícios com a redução do tempo de análise, a diminuição/eliminação da subjetividade, além da potencialidade de automação empregando recursos computacionais, podendo reduzir a necessidade de mão de obra para a execução dos testes.

Com a utilização do *biospeckle laser* é possível que uma única semente seja uma unidade amostral, essa possibilidade pode reduzir significativamente o material necessário para a avaliação, e conseqüentemente a diminuição do esforço empenhado para a realização das análises, já que para a maiorias dos testes tradicionais é necessário no mínimo 50 sementes para se formar uma unidade amostral.

Outra vantagem é que não há a necessidade da utilização de reagentes químicos em nenhuma etapa das análises, e dependendo do nível de automação aplicado, os resultados podem ser obtidos em tempo real.

E é nesse contexto que objetivou-se desenvolver e validar uma metodologia para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja aplicando a técnica do *biospeckle laser*, foi montado uma configuração experimental onde analisou sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. A validação foi feita correlacionando os resultados obtidos por meio do *biospeckle laser* com as dos métodos tradicionais de análise de sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A agricultura é um dos setores com maior importância e estabilidade, porque produz e fornece matérias-primas essenciais para a manutenção da vida; o seu desenvolvimento é um fenômeno obrigatório para a erradicação da fome e da pobreza (PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, 2017). E por isso este setor demanda de contínuo desenvolvimento de técnicas inovadoras que dê suporte à produção e processamento de produtos agrícolas

2.1 Qualidade das sementes

Como principal insumo para a produção de plantas e culturas, as sementes têm uma imensa importância biológica e econômica e costumam despertar muita atenção de agricultores, produtores e laboratório de teste de sementes para garantir alta qualidade (ELMASRY et al., 2020) . A qualidade da semente tem um efeito profundo na uniformidade do desenvolvimento, rendimento e qualidade do produto colhido (XIA et al., 2019).

A viabilidade e os níveis de vigor, são fatores intrínsecos a qualidade das sementes. A viabilidade pode ser compreendida como a medição de sementes vivas capazes de se transformar em plantas (YASMIN et al., 2019). O vigor é uma propriedade complexa que determina o potencial de rápida emergência e desenvolvimento uniforme das plântulas, sob uma ampla gama de condições de campo (RAJJOU et al., 2012). É uma característica de qualidade mais oportuno, refletindo o potencial de germinação, emergência em campo e capacidade de armazenamento em diferentes condições, diferentemente da germinação padrão que é influenciada pelas características genéticas, efeitos ambientais durante o desenvolvimento da semente e as condições de armazenamento (SUN; WANG; SUN, 2007).

A germinação e o vigor das sementes são importantes para o estabelecimento da população de plantas e o seu desenvolvimento inicial, podendo afetar na produtividade (MONDO; NASCENTE; CARDOSO NETO, 2016).

Caverzan et al. (2018) avaliaram a produção da cultivar de soja DM 5958 RSF IPRO, com 4 diferentes níveis de vigor; 90% (94% de germinação), 75% (91% de germinação), 63% (91% de germinação) e 48% (85% de germinação). Cultivadas em três diferentes municípios do estado do Rio Grande do Sul (RS – Brasil): Coxilha,

Tapejara e Passo Fundo. Os campos cultivados com sementes de maior vigor (90%) produziram, respectivamente, 1180, 1376 e 1307 kg ha⁻¹ de grãos a mais, do que os campos cultivados com sementes de menor vigor (48%).

Na estimativa do desempenho produtivo da cultura de soja em duas safras consecutivas, foram utilizados os genótipos *Syn 1059 RR* e *NK 7059 RR* na safra 2014/2015 e o genótipo *Syn 1059 RR* na safra 2015/2016, com os níveis de vigor de 65, 70, 75, 80, 85, 90 e 95%, os lotes de sementes com alto vigor formaram estandes com alta taxa de crescimento e houve o aumento do desempenho produtivo das plantas de acordo com o aumento do vigor das sementes (BAGATELI et al., 2019).

Na avaliação do desenvolvimento de estandes de milho, observou-se nos que foram semeadas com sementes de maior vigor, obtiveram maior índice de cobertura vegetal, o que favoreceu o aumento de grãos por espiga, e estimou-se que cada aumento de 1,0 ponto percentual no nível de vigor das sementes dos lotes, pode proporcionar o aumento na produção de grãos de 43,5 kg ha⁻¹ (REIS et al., 2022).

A produção de sementes com alto nível de qualidade é resultado da evolução dos métodos de manejo na lavoura e no processo de pós-colheita, ao passo que a qualidade genética depende das técnicas de melhoramento. Mas tanto o melhoramento genético quanto os sistemas de produção dependem de testes eficientes em indicar a qualidade das sementes de soja, por isso o controle de qualidade é essencial.

2.2 Práticas para obtenção e manutenção da qualidade de sementes

Para a obtenção de sementes de qualidade, deve-se atentar para os cuidados necessários desde o início da produção em campo, ou seja, a disponibilidade de nutrientes para a planta, fornecimento de água durante a fase de desenvolvimento, condições climáticas e maturação das sementes, assim como nas práticas de colheita e secagem (KAMESWARA RAO; DULLOO; ENGELS, 2017).

Diferentes condições de campo influenciam diretamente na qualidade fisiológicas das sementes de soja. MCCLURE et al. (2017) avaliaram 10 variedades de sementes de soja cultivadas em 4 locais distintos, e observaram diferenças significativas ($p < 0,05$), do peso seco entre 8 cultivares, teor de óleo e proteína em 4 cultivares, atribuindo como as causas dessas variações os diferentes tipos de solos e espaçamento entre plantas.

Na etapa da colheita, os ajustes necessários nos maquinários devem ser

realizados, bem como o planejamento dos seus usos em campo. Esses cuidados são importantes para que não haja o comprometimento do bom manejo anteriormente conduzido em campo. Na colheita da soja a operação em velocidades inferiores a recomendadas, faz com que haja diminuição da quantidade de palhada no interior da colhedora, deixando mais partes metálicas expostas, causando danos mecânicos nas sementes por impacto e consequentemente prejudicando a qualidade (PAIXÃO et al., 2017).

Neste estudo, demonstra-se a importância do adequado manuseio dos maquinários na colheita, pois danos mecânicos são extremamente prejudiciais e diminuem a qualidade das sementes. Sementes de soja com danos internos nos cotilédones, proveniente dos impactos nas partes metálicas ocorridos durante a limpeza em uma debulhadora 5TD-280, apresentaram uma taxa de germinação de apenas 4,5% (NING et al., 2014). Desse modo, se nos processos relativos à colheita os ajustes e planejamento não forem devidamente executados, as consequências podem ser desastrosas para o produtor.

Após a colheita, as sementes são encaminhadas para uma UBS, na qual é realizado o processo de pós-colheita, que constitui na pré-limpeza, limpeza, secagem e armazenamento. Essa etapa pode resultar na melhoria da qualidade fisiológica dos lotes de sementes; essa melhoria e incremento na qualidade do lote acabado é mais acentuada em lotes com qualidade mediana no início do beneficiamento (MOREANO et al., 2018).

Mas para que a etapa de pós-colheita proporcione uma melhoria na qualidade dos lotes de sementes, os procedimentos devem ser executados de maneira adequada. Quando as sementes de soja são colhidas e encaminhadas para a UBS, geralmente encontram-se com umidade superior a 13% b.u., sendo necessário submetê-las ao processo de secagem antes do armazenamento.

No processo de secagem, a temperatura do ar deve ser rigorosamente controlada, pois o ar com alta temperatura afeta negativamente a qualidade fisiológica das sementes.

Hartmann Filho et al. (2016) avaliaram o desempenho de sementes de soja submetidas as diferentes temperaturas de secagem (40, 50, 60, 70 e 80 °C), e após um período de armazenagem de 180 dias, realizou-se o teste de germinação, e concluíram que apenas as sementes secadas à temperatura de 40 °C estariam de acordo com a norma n° 45 (BRASIL, 2013), que estabelece uma taxa mínima de germinação de 80 % para a comercialização, e também constataram efeitos negativos no início do desenvolvimento

das plântulas de soja provenientes de sementes secas com temperaturas elevadas, havendo decréscimos na matéria seca total da muda, do hipocótilo e raízes.

Esses e todos os processos de produção devem ser corretamente monitorados, para verificação das influências dos mesmos sobre a qualidade das sementes de soja, por isso são necessários testes eficientes e confiáveis para estimar essa qualidade e assim nortear diversas tomadas de decisões.

2.3 Análise da qualidade fisiológica de sementes

Os produtores buscam no mercado lotes de sementes geneticamente puras e de alta qualidade; como resultado, as empresas mantêm programas de controle de qualidade que as monitoram desde a colheita até a venda (MCDONALD, 1998).

Os esforços das equipes de pesquisa da *International Seed Testing Association (ISTA)* são, na maioria, direcionados para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de testes práticos para sementes, como avaliação da pureza, sanidade, germinação, vigor e teste de organismos geneticamente modificados (OMG) (ISTA, 2010).

No Brasil existe a normalização feita pela Regra para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), publicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) desde 1967, e está de acordo com a *ISTA*.

Na RAS são descritas metodologias para diversos testes e critérios para avaliação de sementes, dentre as metodologias está o teste de germinação. A germinação das sementes é usada como o indicador básico de qualidade no comércio nacional e internacional, sendo que diferentes resultados de germinação obtidos em condições laboratoriais, e em campo, incentivaram o desenvolvimento do conceito de vigor (VUJAKOVIĆ et al., 2011).

O teste de germinação em laboratório é baseada na emergência e no desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis (BRASIL, 2009). E avalia a porcentagem de plântulas normais formadas das sementes, em condições e períodos controlados. Na Figura 2.5 é ilustrado exemplos de plântulas de soja com diferentes níveis de desempenho, no teste de germinação.

Um outro teste, é o de envelhecimento acelerado, é um dos mais utilizados no Brasil e no mundo (MARCOS FILHO, 1999). Ele utiliza as mesmas variáveis ambientais que afetam a deterioração das sementes: temperatura, umidade relativa e o

tempo de envelhecimento (TEKRONY, 2005). É esperado que nesse teste, as amostras de sementes com maior vigor, tenham maior porcentagem de germinação.

Figura 2.5 – Plântulas de soja oriundas de sementes de alta qualidade (A) e plântulas de soja oriundas de sementes enrugadas devido à deterioração por umidade (B).



Fonte: (KRZYZANOWSKI; FRANÇA-NETO; HENNING, 2018)

Esses testes tradicionais são aplicados nas sementes para a determinação do vigor, que é uma combinação de características que determinam o potencial de alto desempenho após a sementeira. Existem outros teste para determinar a sua avaliação, dentre os quais se inserem: condutividade elétrica; tetrazólio e testes que avaliam o crescimento de mudas (MARCOS FILHO, 2015).

Um teste muito comum no sistema de produção de sementes de soja é o teste de tetrazólio, um teste que, em relação aos demais, como envelhecimento acelerado e germinação, apresenta um tempo de execução mais curto. Ele é baseado nos processos de respiração que ocorrem nas mitocôndrias das células dos tecidos das sementes, e conforme há a redução da solução do sal sob a ação das enzimas desidrogenases, produz o trifenilformazan, que possui a coloração vermelho carmim, e de acordo com os padrões de coloração, são interpretados os níveis de vigor das sementes (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI; DA COSTA, 1998).

Mesmo que o teste de tetrazólio necessita de menos tempo que os demais testes para obtenção de resultados, ele demanda que as sementes de soja fiquem um período de 16 horas acondicionados em papel umedecido em água, e postas por mais 3 horas em solução de tetrazólio para coloração, e para a interpretação do teste, requer um analista bem treinado na técnica, e a precisão dos resultados dependem da experiência e julgamento crítico (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018).

Na aplicação dos testes tradicionais para a determinação das características das

sementes, como por exemplo a porcentagem de germinação, que é um fator determinante na produção da cultura, a avaliação ainda é feita manualmente com a ajuda de pessoas treinadas, podendo ser um processo cansativo e sujeito a erros, e por esse motivo várias técnicas de aprendizagem de máquina e reconhecimento de imagens foram propostas por diferentes autores para automatizar o processo de classificação de sementes (MESHRAM et al., 2021).

O aprendizado de máquina, surgiu junto com tecnologias de big data e computação de alto desempenho, com o objetivo de criar oportunidades para quantificar e entender processos intensivos em dados no ambiente operacionais agrícola (LIAKOS et al., 2018).

Larios et al., (2020) propuseram um método de análise da qualidade fisiológica de sementes de soja com base no conteúdo de nutrientes, essa técnica utiliza a degradação induzida por laser e algoritmos de aprendizagem de máquina, e dentre alguns algoritmos de classificação avaliados, o *Support Vector Machine (SVM)*, obteve 100% de acertos na classificação das amostras de alto vigor e 97,8% na classificação das amostras de baixo vigor.

Colmer et al., (2020) desenvolveram uma plataforma automatizada (*hardware e software*) para a análise de sementes de diversas culturas, por meio de imagens digitais baseada em aprendizagem de máquina. Para a avaliação da germinação foram monitorados parâmetros físicos tais como: área da semente, perímetro, circularidade, variação da largura e comprimento das sementes durante a germinação e dentre outras. Os resultados demonstraram que na análise de sementes de tomate (6 genótipos), houve uma forte correlação entre as curvas de evolução de germinação com as curvas de área das sementes. Os autores afirmaram que a plataforma pode medir mudanças morfológicas e determinar a germinação de cinco espécies de culturas de diferentes genótipos, e tem o potencial de substituir a avaliação manual da germinação e da emergência das raízes.

Também utilizando aprendizagem de máquina e processamento de imagens digitais, Genze et al., (2020) propuseram um método de avaliação da qualidade de sementes de *Zea mays* (milho), *Pennisetum glaucum* (milheto) e *Secale cereale* (centeio) utilizando redes neurais artificiais. Os modelos propostos alcançaram *mean average precision (mAP)* elevada, 97,9%; 94,2% e 94,3% para o milho, centeio e milheto respectivamente.

A medição de propriedades ópticas em sementes tem sido usada com sucesso

para determinação simultânea de várias características de qualidade e para inspeção automática e avaliação de segurança (ELMASRY et al., 2019). Técnicas mais diretas de análises de sementes também demonstram ter grande potencial em determinar a qualidade fisiológica.

Em sementes de *Coffea arabica* a atividade do *biospeckle laser* foi associado ao crescimento do embrião e a atividade metabólica, e o método demonstrou potencial em prever a qualidade das mudas em 6 dias após a embebição, período bem inferior se comparado ao teste tradicional que é de 30 dias (VIVAS et al., 2017).

É neste panorama que fica evidente a contínua atualização a qual os processos relacionados a agricultura passam, acompanhando a evolução das tecnologias, e no atual ciclo de modernização, a disponibilidade de recursos computacionais com alta capacidade de processamento de dados demonstram ter grande potencial de contribuição para o ciclo atual.

2.4 O *biospeckle laser*

O *biospeckle laser* é um fenômeno óptico que é adotado como uma técnica não invasiva usualmente empregada na avaliação de sistemas biológicos. Esse fenômeno ocorre quando há a interferência de ondas eletromagnéticas coerentes dispersas por uma superfície, na qual existe um processo dinâmico. Quando esse processo ocorre em um tecido animal ou vegetal, o tamanho das organelas, o crescimento e divisão das células, as reações bioquímicas que ocorrem nos tecidos biológicos, além da atividade da água, afetarão o fenômeno observado (FRACAROLLI et al., 2020).

Quando a luz coerente (*laser*) incide sob uma superfície biológica, um padrão granuloso (*speckle*), com brilho aleatório, é observado na imagem da região iluminada; esse fenômeno é produzido por causa da interferência de ondas múltiplas com amplitudes e fases distintas, havendo movimento na superfície iluminada, os grãos variam o seu brilho de forma solidariamente ao movimento dos dispersores de luz (RAMÍREZ-MIQUET et al., 2017).

A luz é retroespalhada por uma superfície opticamente áspera, e devido à interferência, áreas claras e escuras aparecem em um plano de observação (ZDUNEK et al., 2014). Na Figura 2.1 está ilustrado um padrão de *biospeckle laser* formado na superfície de uma semente de soja

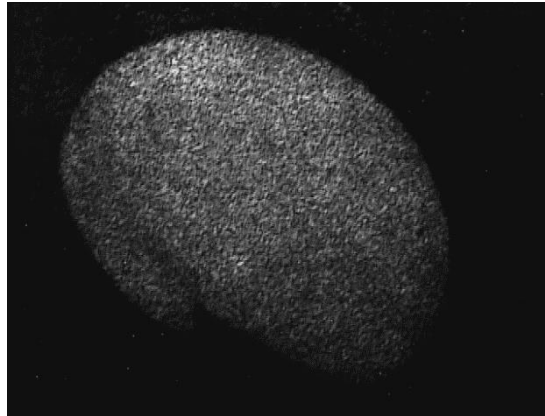
Caracterizando a evolução do padrão de *speckle* no decorrer do tempo, é

possível extrair informações relacionadas às regiões iluminadas, e os processos inerentes à dispersão da luz coerente (RABAL; BRAGA JR, 2009).

Segundo Braga et al., (2009), processos como fluxo citoplasmático, movimento de organelas, crescimento e divisão celular durante a maturação dos frutos e reações bioquímicas são responsáveis por determinadas atividades do *biospeckle laser*.

A flutuação do speckle é uma função do movimento cíclico de organelas intracelulares, como cloroplastos e amiloplastos, ou do movimento *browniano* de minerais, partículas em vacúolos celulares (ZHAO et al., 1997).

Figura 2.1 – Fenômeno *biospeckle laser* observado em uma semente de soja.



Fonte: Autor

O aparato necessário para a utilização da técnica é relativamente simples e de baixo custo de aquisição, a sua aplicação é altamente versátil, podendo ser útil nas mais variadas áreas do conhecimento. O *biospeckle laser* tem sido extensivamente aplicada à medicina, biologia e agricultura para avaliação de diferentes tipos de tecidos biológicos, por ser um método óptico seguro, simples e não destrutivo (YOUSSEF et al., 2019).

2.5 O *biospeckle laser* aplicado à agricultura

O *biospeckle laser* tem sido aplicado na identificação de danos mecânicos, estágio de maturação em frutas e vegetais, avaliação da qualidade de carnes, análise de viabilidade de sementes e detecção de presença de fungos (PANDISELVAM et al., 2020).

E pode ser uma alternativa para as metodologias tradicionais de análise de sementes, com a vantagem de ser um método não invasivo, que obtém resultados

objetivos, de maneira rápida e automatizada (CONTADO; SILVA; BRAGA JÚNIOR, 2020).

Porém, ajustes e adequações específicas dessa técnica se faz necessário, pois cada espécie de semente possui características distintas, o que pode demandar no desenvolvimento de um protocolo de análise próprio para cada uma.

Para avaliar o dano em grãos de trigo causado pela germinação, Sutton e Punja (2017) utilizaram o *biospeckle laser*. Por meio da transformada de *Fourier* para a análise da frequência do sinal, o *biospeckle laser* foi capaz de distinguir os grãos de trigo germinados, mesmo aquelas nas quais a emergência da radícula não modificou a aparência externa dos grãos. Nas mesmas condições Xing et al. (2010), utilizando a análise *hyperspectral* de imagens, para a classificação dos grãos de trigo saudáveis e danificados, obtiveram menor precisão nos resultados.

Utilizando o *Laser Speckle Contrast Analysis* (LASCA), Silva et al. (2018) avaliaram a atividade fúngica (*Fusarium spp.*) em amostras de sementes de milho, com período de armazenamento de 0, 15 e 35 dias, tratadas com o bioprotetor *Trichoderma harzianum*. As imagens das amostras de controle, obtidas com o LASCA, apresentaram tons mais escuros, indicando maior atividade biológica, se comparada com as amostras tratadas com o bioprotetor, com 0 dia de armazenamento, que apresentaram imagens com tons mais claros. No teste de sanidade, a incidência do *Fusarium spp* foi de 97,5% para as sementes-controle e 31,5% para as sementes tratadas e com 0 dia armazenado.

Utilizando o *Motion History Image* (MHI), Singh et al. (2020) conseguiram distinguir sementes de soja contaminadas com o *F. oxysporum* das sementes não contaminadas. O MHI gerou imagens com manchas vermelhas, indicando maior a atividade biológica causada pelo fungo, que foi aumentando com o decorrer do tempo.

Singh et al. (2020a) avaliaram o desempenho de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum L*) submetidos ao *Priming*. Os tratamentos foram a embebição das sementes em água destilada, solução de cloreto de sódio, solução de ureia, solução de nitrato de potássio e controle. Foram avaliados os períodos de embebição de 6, 12, 18 e 24 horas, com concentrações das soluções de 1, 2 e 5%. Testes de porcentagem e tempo médio de germinação também foram realizados. Para a análise numérica do *biospeckle laser*, foi utilizado o método do contraste (MOREIRA; CARDOSO; BRAGA, 2014). A correlação de *Pearson* demonstrou uma forte correspondência positiva entre o *biospeckle laser* e a porcentagem de germinação ($R = 0,88$, $p < 0,01$), e uma forte correlação negativa com o tempo médio de germinação ($R = -0,92$, $p < 0,01$). Singh et al. (2020a)

concluíram que o *biospeckle laser* é uma ferramenta útil para a análise dos efeitos do *priming* em sementes de grão-de-bico.

Braga Júnior et al. (2020), em estudo da imersão de sementes de café (*Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Vermelho 144), em campo magnético para a diminuição do tempo de germinação, identificou diferença estatística na atividade biológica por meio dos índices do *Inertia Moment* (IM) e o *Absolute Value of the Differences* (AVD). As densidades de campos magnéticos utilizadas foram de 10 e 28 mT, e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o índice AVD, houve diferenças estatísticas significativas na atividade biológica, se comparadas com as sementes-controle. Já com o índice IM, todos os tratamentos e controle apresentaram diferenças estatísticas significativas. Também foram realizadas análises tradicionais como o teste de germinação e o índice de velocidade de germinação, em que ambos os tratamentos obtiveram melhores resultados, diferenciando-se estatisticamente das sementes-controle.

Silva et al. (2020) correlacionaram os valores do IM com a umidade em grãos da *Moringa Oleifera*. Os grãos foram secos até alcançarem a umidade de média de 7% b.s. e, posteriormente, colocados para umedecer em solução de NaCl 0,5%. Os valores de umidade foram coletados nos períodos de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 21; 23 e 27 horas. Os resultados apresentaram boa precisão na determinação da umidade ($R^2 = 81,34\%$), pelo IM em relação ao método da estufa.

Rahmanian et al. (2020) classificaram os níveis de danos em frutos de laranjas causados pelo congelamento. As amostras dos frutos foram armazenadas por um período de 16 horas em freezer, nas temperaturas de 1° C, -7° C, -20° C e em temperatura ambiente. Para a análise da atividade biológica por meio do *biospeckle laser*, utilizaram o método gráfico Fujii e a Matriz de Coocorrência (COM). Da COM, foram extraídas informações utilizadas em uma Rede Neural Artificial (RNA) para classificar os danos causados pelo congelamento nos frutos de laranjas. A RNA era do tipo multicamadas *feed-forward* com algoritmo de aprendizado *back-propagation*, e classificou com precisão de 100% os danos por congelamento. Os níveis de danos estabelecidos foram: sem resfriamento, com resfriamento, congelamento moderado e congelamento extremo, a técnica de iluminação utilizada foi o espalhamento direto.

Singh et al. (2021) propuseram um sensor baseado na atividade do *biospeckle laser*, junto a um protocolo para a classificação de lesões em plantas de soja, causada pelo patógeno *Macrophomina phaseolin*. Para validar o método, foi feita a análise visual mensurando a extensão das lesões e comparando-as com os resultados obtidos pela

análise do *biospeckle laser*. Utilizando o THSP com distribuição gaussiana, combinado ao AVD, conseguiram identificar, nas regiões contaminadas pelo *Macrophomina phaseoli*, acréscimos nos valores do AVD, antes mesmo de que fosse possível constatar alguma alteração visual nos tecidos do caule das plantas de soja.

Pires et al. (2021), em estudo de microrganismos para o consórcio no tratamento de águas residuais do processamento do café (ARPC), utilizaram o *biospeckle laser* em conjunto com o AVD, para monitorar a atividade de cepas de bactérias inoculadas em amostras de ARPC. As cepas utilizadas foram as *Serratia marcescens* CCMA 1010 e CCMA 1012, *Corynebacterium flavescens* CCMA 1006 e a *Acetobacter indonesiensis* CCMA 1002, que foram inoculadas em amostras de ARPC com origem da região do cerrado (ARPC_c) e da mata atlântica (ARPC_{fl}). Também foram analisadas amostras sem inoculação para o controle (ARPC_{ctr}), sendo a atividade biológica monitorada por um período de 9 dias. Os resultados demonstraram que até o dia 4, a atividade biológica da ARPC_c e ARPC_{fl} não se diferiram estatisticamente entre si, e apresentaram um aumento de 120% em relação ao ARPC_{ctr}; nos dias posteriores, houve a estabilização da atividade da ARPC_c enquanto na ARPC_{fl} houve um aumento até o dia 7, apresentando uma atividade biológica 190% maior em relação a ARPC_{ctr}. Neste trabalho, os autores concluíram que a seleção de microrganismos para o biotratamento pode diminuir a quantidade de poluentes em águas residuais, antes que sejam destinadas ao ambiente final.

No estudo da seletividade de nematicidas, O'Callaghan et al. (2019) utilizaram o *biospeckle laser* para monitorar o comportamento de nematoides sob a aplicação do *Isotiocianato*, uma substância natural com potencial de substituir os nematicidas sintéticos; e o metanol, que é comumente utilizado na remediação do solo. Foram preparadas amostras com dois grupos tróficos de nematoides, e dentre eles o *Trichodorus*, uma praga-vetor de vírus de relevância econômica. Os tratamentos consistiram em amostras de nematoides contendo separadamente o *Isotiocianato*, metanol e controle. Baseado no método *Generalized Difference* (GD), os pesquisadores constataram um declínio significativo na atividade do *biospeckle laser*, após um período de 24 horas nas amostras de *Trichodorus*, contendo o *Isotiocianato*, para as amostras contendo o metanol; o declínio significativo foi observado após um período de 2 horas. Os autores concluíram que o *biospeckle laser* tem se mostrado uma técnica eficiente para detectar mudanças na atividade biológica, em uma ampla gama de organismos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Localização

O experimento foi realizado em conjunto entre o Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicado à Agropecuária – Cedia, e o Laboratório Central de Sementes – DAG, ambos localizados nas dependências da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

3.2 Desenvolvimento da metodologia para o *biospeckle laser* e a qualidade de sementes de soja.

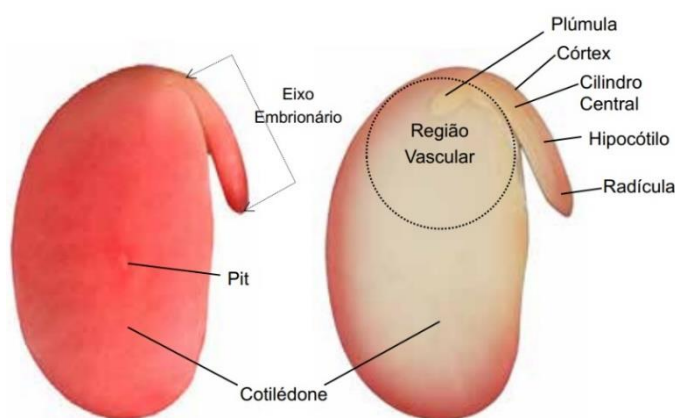
Foi realizado um ensaio inicial com o objetivo de avaliar qual o tempo de embebição ideal das sementes, para diferenciá-las utilizando o *biospeckle laser*, tendo como critério de comparação os resultados da análise de qualidade fisiológica. Realizar os ajustes no *Setup* e gerar informações que possibilitasse adaptar procedimentos laboratoriais para o manuseio e preparação das sementes para a capturas das imagens.

No ensaio foi utilizado três amostras de sementes com distintos níveis de qualidade fisiológica. O experimento foi constituído de 3 tratamentos com 55 repetições, sendo cada semente 1 repetição. Foi avaliada a capacidade de discriminação das sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica, por meio do *biospeckle laser*, em três períodos de embebição em água: 8, 12 e 16 horas. Para a embebição, as sementes foram semeadas em papel do tipo “Germitest”, umedecidas com água em 2,5 o peso do papel.

Após o término do período de embebição, para evitar a perda de água por evaporação antes da captura das imagens, as sementes foram postas em caixas plásticas tipo gerbox, adaptadas com tela de alumínio suspensa contendo 40 mL de água. No momento da captura das imagens, a semente foi retirada da caixa gerbox, uma por vez, e separada os cotilédones de forma que o eixo embrionário permanecesse unido sempre ao cotilédone direito. Foram capturadas 512 imagens de cada sementes, do cotilédone direito, para a análise pelos métodos GAVD e NUMAD.

No processamento das imagens pelo método do NUMAD, foi avaliada a atividade na parte interna do cotilédone, especificamente a denominada como região vascular, conforme (FIGURA 3.4).

Figura 3.4 – Divisão morfológica da semente de soja coloridas no teste de tetrazólio.



Fonte: (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI, 2018).

3.3 Validação da metodologia

Após o teste de tempo de embebição, constatou-se que o melhor período para a distinção das sementes pelos níveis de qualidade fisiológica por meio das análises de imagens, foi a de 8 horas. Com isso a próxima etapa foi a de testar o método com um número maior de amostras no tempo de embebição de 8 horas.

3.3.1 Sementes utilizadas

Foram utilizadas 9 amostras de sementes de soja originadas de diferentes lotes (TABELA 3.1). Durante o período de armazenamento, as sementes foram mantidas em câmara fria, à temperatura de 10° C e umidade relativa do ar de 50%. Para a caracterização da qualidade fisiológica dos lotes de sementes, foram realizados os seguintes testes: primeira contagem de germinação; germinação; condutividade elétrica; emergência; teste de envelhecimento acelerado em substrato e teste de envelhecimento acelerado em papel.

Para a classificação das sementes por meio da análise de imagens foram utilizadas 100 sementes por amostra, sendo cada sementes 1 repetição. Os procedimentos de manuseio e preparação das sementes para a captura das imagens foi o mesmo descrito no item 3.2. Para a embebição das sementes em água, a semeadura foi feita em papel do tipo “Germitest”, na forma de rolo, umedecido com água em 5 vezes o peso do papel seco.

Tabela 3.1 – Lotes de sementes de soja utilizadas no experimento

Lotes	Genótipo	Safra
1	Bônus	19/20
2	Foco	20/21
3	Desafio	20/21
4	P96R70	20/21
5	M7739	20/21
6	M6410	19/20
7	M7739	19/20
8	P96R70	19/20
9	M6410	19/20

Fonte: Autor

3.4 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes.

Os testes de qualidade fisiológica foram realizados no Laboratório Central de Sementes – DAG, da Universidade Federal de Lavras. Utilizou-se 4 repetições com 50 sementes, totalizando 200 sementes por teste.

Foram feitos os testes comumente utilizados para a análises de sementes, esses têm como objetivo gerar informações sobre o desempenho em laboratório, e feita a interpretação dos resultados, pode-se prever o desempenho dos lotes de sementes em campo.

Germinação

A semeadura foi feita em papel do tipo “Germitest”, na forma de rolo, umedecido com água em 2,5 vezes o peso do papel seco. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em estufa tipo BOD ajustado a 25 °C. Aos 5 dias após a semeadura, realizou-se a primeira contagem de germinação, e aos 8 dias, a contagem da germinação (BRASIL, 2009).

Emergência

O substrato utilizado foi composto pela mistura de areia + solo (proporção 2:1) colocado em bandejas plásticas, irrigado a 60% da capacidade de campo na semeadura e posteriormente quando necessário de forma uniforme. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação à temperatura de 25 °C, em regime alternado de luz e escuro (12

horas). As contagens de porcentagens de emergência de plântulas normais foram realizadas aos 5 dias, primeira contagem de emergência (PCE%) e aos 8 dias após a semeadura, emergência (E%).

Condutividade elétrica

Foram utilizadas 4 repetições contendo 50 sementes cada uma, sendo pesadas, e em seguida, colocadas em copos plásticos descartáveis com 75 mL de água deionizada. Após 24 horas de embebição a uma temperatura de 25 °C, mantida em estufa tipo BOD, a condutividade elétrica foi determinada com auxílio de um condutivímetro Digimed CD-21. Os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

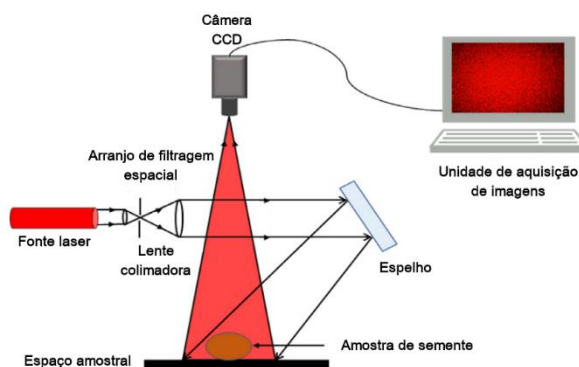
Envelhecimento acelerado

Foram utilizadas caixas plásticas tipo gerbox, adaptadas com tela de alumínio suspensa. Em cada gerbox foram adicionados 40 mL de água e uma camada única de sementes sobre toda a tela. Em seguida foram mantidas em câmara tipo BOD a 41 °C por 48 horas (Marcos-Filho, 2020). Após este período, a semeadura foi realizada em substrato acondicionado em bandeja plástica, contendo areia + solo na proporção 2:1, umedecido a 60% da capacidade de retenção de água. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal à temperatura de 25 °C, em regime alternado de luz e escuro (12 horas). A avaliação foi realizada com contagem de plântulas normais emergidas aos 8 dias.

3.5 Bancada de captura de imagens.

A bancada onde foram capturadas as imagens é composta de uma câmera CCD, com resolução de 640 x 486 pixels e velocidade do obturador de 1/60 s; a fonte de luz coerente foi um laser HeNe com comprimento de onda e potência de 632 nm e 10 mW, respectivamente. Foi utilizado um filtro neutro para controle da luminosidade do laser na semente e uma lente dispersora de luz. A Figura 3.5 apresenta o esquema básico da bancada de captura de imagens.

Figura 3.5 – Esquema básico da bancada de captura de imagens.



Fonte: Autor

3.6 Processamento das imagens

As imagens foram submetidas a dois métodos de análise:

- a) **Análise gráfica:** gerou mapas de atividade da semente, fornecendo informações visuais que possibilitou a identificação de qual região apresentou maior variação de atividade, em função dos diferentes níveis de qualidade fisiológica.
- b) **Análise numérica:** forneceu um valor numérico que variou em função da atividade da região da semente analisada, previamente definida na etapa da análise gráfica. A obtenção do valor numérico possibilitou avaliar quantitativamente a atividade metabólica relacionada à germinação de cada semente. Para o processamento das imagens, foram utilizados os algoritmos do *Biospeckle Laser Tool Library* (BSLTL) (BRAGA JUNIOR; RIVERA, 2019).

3.6.1 Análise gráfica

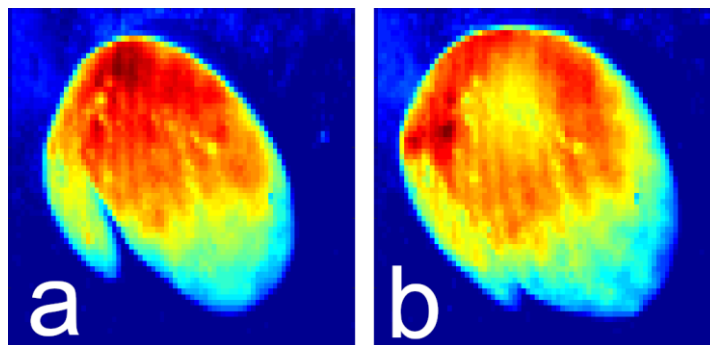
Na análise gráfica, as imagens foram submetidas ao *Graphic Absolute Value of the Differences Method* (GAVD) (BRAGA; RIVERA; MOREIRA, 2016). Nesse método, é realizado o somatório das diferenças dos níveis de cinza dos pixels (i_{xy}), subsequentes ao conjunto de imagens capturadas, formando uma matriz 2D com o mesmo tamanho das imagens das sementes; posteriormente, foi feita a normalização da matriz 2D (EQUAÇÃO 3.1), em que $NTIMES$ é a quantidade de imagens capturadas para a análise do *biospeckle laser*, e I_k é a imagem capturada no instante k . A imagem capturada no instante I_k é uma matriz numérica, em que cada pixel da imagem corresponde a uma célula da matriz, e os valores variam de 0 a 256, dependendo da

intensidade do brilho registrado no pixel.

$$GAVD = \frac{1}{NTIMES - 1} \sum_{K=1}^{NTIMES-1} |I_K - I_{K+1}| \quad (3.1)$$

A saída de dados foi uma imagem a qual representou a semente de soja, preenchida com pseudocores variando do azul-escuro ao vermelho, seguindo a ordem do espectro eletromagnético visível. As regiões que se aproximam do azul-escuro são áreas de baixa atividade, e as regiões que se aproximam do vermelho são áreas de alta atividade (FIGURA 3.1).

Figura 3.1 – Imagens de sementes de soja processada pelo o método *Graphic Absolute Value of the Differences Method* (GAVD), (a) oriunda de lote de sementes de alto vigor, (b) oriunda de lote de sementes de baixo vigor.



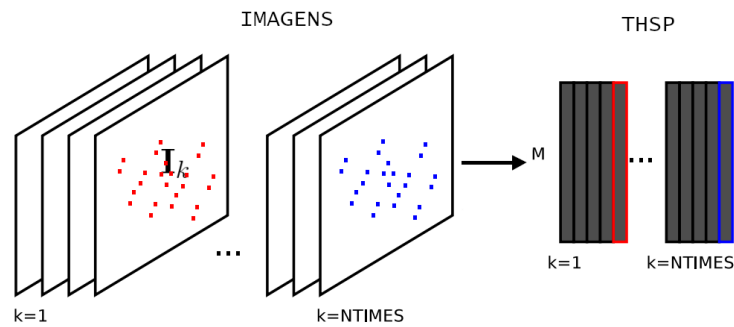
Fonte: Autor

3.6.2 Análise numérica

Na análise numérica as imagens passaram por três etapas de processamento: a primeira foi o *Time History Speckle Pattern* (THSP) (XU; JOENATHAN; KHORONA, 1995), com distribuição da seleção dos pixels de forma gaussiana. Nessa etapa, foi formado um vetor-coluna preenchido com os valores dos níveis de cinza coletados em uma imagem I_k , capturada no instante k , sendo a imagem é uma matriz de níveis de tamanho de M linhas e N colunas. O vetor-coluna extraído da imagem I_k compôs uma nova matriz (THSP), de tamanho M linhas e $NTIMES$ colunas. Na figura 3.2 é representado o processamento das imagens por meio do THSP, sendo os pontos

coletados de forma aleatória, diferindo as posições dos pixels amostrados entre o conjunto de imagens capturadas de cada semente, as marcações em vermelho representam os valores dos níveis de cinza sendo coletados na imagem I_k , e os pontos em azul são os valores a serem coletados nas imagens subsequentes. A quantidade de imagens capturadas por sementes é $NTIMES$.

Figura 3.2 – Representação do processo de construção da matriz THSP.



Fonte: Adaptado (BRAGA; RIVERA; MOREIRA, 2016).

A segunda etapa do processamento das imagens foi a aquisição da matriz de coocorrência (HARALICK; SHANMUGAM; DINSTEIN, 1973) da matriz THSP. A matriz de coocorrência representa as ocorrências de saltos dos valores dos níveis de cinza, entre quaisquer dois pontos consecutivos (BRAGA; RIVERA; MOREIRA, 2016).

A terceira etapa do processamento das imagens foi o *Numerical Analysis of the Average Difference Method* (NUMAD) (REIS; RABAL; BRAGA, 2016), que teve como resultado duas saídas numéricas denominadas $NUMAD_1$ e $NUMAD_2$, expressas nas Equações 3.2 e 3.3, respectivamente:

$$NUMAD_1 = \sum_{ij} \frac{COM(i,j)}{\sum COM(l,m)} \frac{|i-j|}{i+j} \quad (3.2)$$

$$NUMAD_2 = \sum_{ij} \frac{COM(i,j)}{\sum COM(l,m)} \left(\frac{|i-j|}{i+j} \right)^2 \quad (3.3)$$

Fonte: (REIS; RABAL; BRAGA, 2016).

3.7 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em laboratório com ambiente homogêneo e controlado. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média de Scott-Knott. A conferência dos resultados obtidos por meio da análise de imagens com as técnicas tradicionais foi feita por meio da correlação de *Pearson*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitas inferências e discussões dos resultados obtidos com as análises das sementes por meio do *biospeckle laser*, comparando com as análises tradicionais.

4.1 Desenvolvimento da metodologia para *biospeckle laser* e qualidade de sementes de soja

Na avaliação da diferenciação de lotes de sementes em função dos períodos de embebição de 8, 12 e 16 horas, somente o período de 8 horas permitiu a diferenciação dos lotes pelo processamento de imagens, com o uso da técnica do *biospeckle laser*. Para os tempos de 12 e 16 horas não houve diferença estatística entre os valores obtidos (TABELA 4.1). A dinâmica que envolve o processo de germinação das sementes é complexa, e o entendimento de parte desse é fundamental para a compreensão dos resultados, pois quanto maior o tempo de embebição maior será a atividade metabólica das sementes.

Tabela 4.1 – Teste de Scott-Knott entre os lotes de sementes de soja, realizado ao nível de significância de 5%, para NUMAD 1.

Lotes	Tempo de embebição		
	16 horas	12 horas	8 horas
1	0,1050 a	0,1056 a	0,0967 a
2	0,1041 a	0,1024 a	0,0875 b
3	0,1043 a	0,1027 a	0,0813 c
CV (%)	7,2	8,42	11,38

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

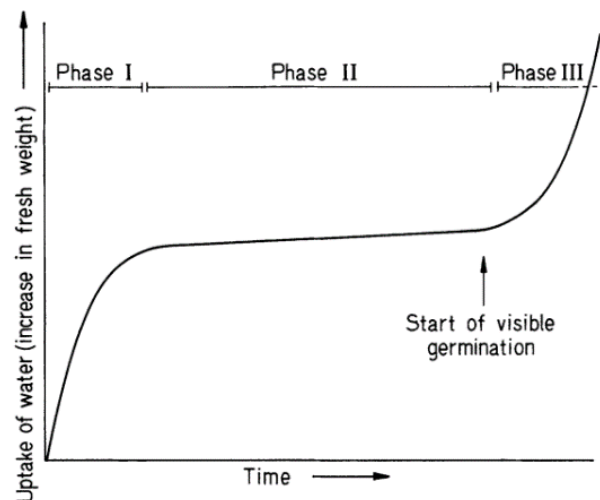
A germinação é considerada como a retomada do crescimento ativo pelo embrião, resultando na ruptura do tegumento da semente e no surgimento de uma planta jovem, sendo a água um quesito básico para que isso ocorra, tendo participação na ativação enzimática, quebra, translocação e uso do material de reserva (COPELAND; MCDONALD, 2001).

Para que a respiração da semente de soja se inicie, deverá atingir um grau de umidade de 25% durante o período de embebição (VERTUCCI; LEOPOLD, 1987). Sendo que para a ativação total dos processos respiratórios, o grau de umidade deverá

ser de no mínimo 33% (DACOSTA; MARCOS, 1994). E um período de 8 horas pode ser mais que suficiente para que isso aconteça (THONGSRI et al., 2021).

Na Figura 4.1 é ilustrado o padrão trifásico de absorção de água que a maioria das sementes apresenta no decorrer da germinação, e com a soja não é diferente. Na fase I, ocorre a embebição, igualmente para os tecidos mortos e vivos, portanto, é independente da atividade metabólica; entretanto, nessa fase, o metabolismo inicia-se rapidamente em consequência da hidratação; na fase II, as sementes não dormentes estão com o metabolismo ativo e em preparação para a germinação; na fase III, predomina a germinação, intensifica-se a atividade metabólica e inicia a mobilização das reservas armazenadas (BEWLEY; BLACK, 1978). Sementes de soja com maiores níveis de vigor contêm quantidades mais abundantes de amido, proteínas e açúcares solúveis e maior capacidade de mobilização de reservas na germinação (HENNING et al., 2010).

Figura 4.1 – Comportamento trifásico das sementes na absorção de água durante o período de embebição



Fonte: (BEWLEY; BLACK, 1978).

Visto esses conceitos, pode-se inferir que, sendo o período de 8 horas de embebição foi o suficiente para que a semente de soja absorva a quantidade de água necessária para a iniciar o processo germinativo, a atividade metabólica que ocorreu nesta etapa é a primária, ocorrendo ainda na fase I do padrão trifásico. E as sementes de maiores níveis de vigor, possuindo mais atributos que favorecem a germinação, a atividade relacionada a esse processo iniciou-se primeiro e com maior intensidade, se comparado com sementes de menor vigor. Sendo essas diferenças de atividades sensíveis ao *biospeckle laser*, possibilitando a separação das sementes por meio do

processamento de imagens.

A separação por esse método não foi possível nos períodos de embebição de 12 e 16 horas, devido ao maior tempo disponível para os processos relativos à germinação se equalizarem, impossibilitando a distinção das sementes de alto e baixo vigor. Na Tabela 4.2 são apresentados os resultados da avaliação da qualidade fisiológica das sementes de soja, utilizando testes fisiológicos tradicionais e o processamento de imagens do *biospeckle laser*; os resultados do NUMAD 1 que constam na tabela são referentes ao período de embebição de 8 horas.

Tabela 4.2 – Teste de Scott-Knott entre os lotes de sementes de soja, cultivar M6410IPRO, realizado ao nível de significância de 5%, para germinação (G, %), primeira contagem de germinação (PCG, %), emergência (E, %) e primeira contagem de emergência (PCE, %), *Numerical Analysis of the Average Difference Method* (NUMADs 1 e 2, com 8 horas de embebição).

Lote	G	PCG	E	PCE	NUMAD 1
1	83,0 a	83,0 a	90,0 a	89,0 a	0,0967 a
2	81,0 a	74,0 b	66,0 b	54,0 b	0,0875 b
3	74,0 b	70,0 b	60,0 b	48,0 b	0,0813 c

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

O processamento digital de imagens do *biospeckle laser* proporcionou médias do NUMAD 1, que se diferenciaram entre si em todos os valores dos três lotes (TABELA 4.2). Já nos resultados dos testes tradicionais, de todos, somente houve diferenciação do lote 1, maior vigor, em relação aos outros 2, exceto para germinação que nos lotes 1 e 2 foram semelhantes e superiores ao lote 3 (Tabela 4.2). A diferenciação pode estar explicada pela maior amostragem, no método de processamento de imagem, em que cada semente é uma unidade amostral. No ensaio preliminar, foram utilizadas 55 sementes, totalizando 55 repetições por amostra de sementes avaliadas. Nos testes tradicionais, foram utilizadas 200 sementes para cada teste; entretanto, para obter 1 repetição são utilizadas 50 sementes, possibilitando 4 repetições por teste.

No teste de correlação de *Pearson*, o NUMAD 1 correlacionou-se fortemente com os testes de emergência e primeira contagem de emergência, correlação moderada com a primeira contagem de germinação e correlação não significativa com o teste de germinação (TABELA 4.3).

Tabela 4.3 – Teste de significancia e coeficiente de correlação de *Pearson* dos testes padrão com os NUMAD 1.

Teste padrão	Coef. de correlação	Valor-p
Germinação	0,37086	0,23531 ^{ns}
PCG	0,59783	0,04007*
Emergência	0,73622	0,00633**
PCE	0,74656	0,00528**

ns: teste não significativo ao nível de 5%, *teste significativo ao nível de 5%, **teste significativo ao nível de 1%.

Nos testes de emergência e primeira contagem de emergência é considerada a plântula emergida a que conseguiu expor totalmente os cotilédones acima do substrato. Esse teste é um parâmetro importante para a determinação do vigor, já que avalia o desempenho das sementes em condições de substrato (areia:terra). E como o NUMAD 1 obteve um coeficiente de correlação forte com eles, teoriza-se que o *biospeckle laser* é sensível à atividade metabólica inicial do estágio de germinação; e as sementes que obtiveram êxito na emergência e primeira contagem de emergência seriam aquelas que teriam a sua atividade metabólica inicial mais intensa e conseqüentemente maior vigor das plântulas na emergência, e essa maior intensidade é detectada precocemente pelo *biospeckle laser*, por isso apresentando correlação com o desenvolvimento da plântula de soja.

A alta sensibilidade do *biospeckle laser* aos processos que envolvem a atividade relacionada ao metabolismo de sementes já é notoriamente registrado na literatura científica. Como exemplo, pode-se citar que o *biospeckle laser* identificou variações no desenvolvimento germinativo de sementes de soja submetidos a diferentes temperaturas e teores de umidade inicial. Os autores concluíram que a técnica tem potencial em ser utilizada na avaliação do impacto da temperatura e umidade no desenvolvimento inicial de sementes (THAKUR et al., 2022).

Nos testes de geminação e primeira contagem de germinação, são oferecidas para as sementes condições ótimas para o desenvolvimento, ou seja, ambiente com temperatura controlada e suprimento de água adequado. Além disso, os parâmetros de avaliação são delimitados aos estádios iniciais de desenvolvimento das plântulas, essas não passando nem brevemente por adversidades ambientais em campo, ou simuladas em laboratório. E o NUMAD 1 tendo uma correlação moderada com a primeira contagem de germinação, e correlação não significativa com a germinação, infere-se

que as sementes contadas na primeira contagem de germinação foram aquelas em que a atividade metabólica inicial teria sido detectada com maior intensidade pelo *biospeckle laser* e, conseqüentemente, alcançariam maiores valores no NUMAD 1. Levando a inferir que o NUMAD 1, pode estar relacionado mais diretamente ao vigor e menos à germinação e viabilidade.

A correlação não significativa do NUMAD 1 com a germinação pode ser em virtude do fenômeno semelhante que se teorizou nos períodos de embebição em água de 12 e 16 horas (TABELA 4.1), em que o período extra foi o suficiente para equalizar as diferenças do início da atividade metabólica das sementes; então, analogamente, a primeira contagem de germinação foi realizada no quinto dia e na germinação no oitavo; assim o maior tempo de embebição em água foi suficiente para que as sementes que iniciaram tardiamente o processo de germinação, se desenvolvesse de modo que fossem consideradas sementes germinadas, situação que não ocorreu na primeira contagem de germinação e nos testes de vigor

4.2 Validação da metodologia

Com as informações obtidas no primeiro experimento para desenvolvimento da metodologia, ficou definido os procedimentos de embebição a 8 horas para análise de sementes de soja por meio do *biospeckle laser*. Assim para validação, o *biospeckle laser* foi utilizado para separar nove amostras retiradas de diferentes lotes de sementes de soja, e os resultados obtidos por meio dos NUMADs 1 e 2 foram correlacionados e comparados com os resultados das análises tradicionais de sementes. Para a caracterização da qualidade fisiológica dos lotes, foram realizados os testes de primeira contagem de germinação (PCG, %), germinação (G, %), condutividade elétrica (CE, $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$), emergência (E, %), envelhecimento acelerado em substrato (EA substrato, %) e envelhecimento acelerado em papel (EA papel, %), com os resultados apresentados na Tabela 4.4. Os valores médios das análises tradicionais, juntamente com os NUMADs 1 e 2, foram submetidos ao teste de média de Scott-Knott (TABELA 4.4).

A diferenciação dos lotes de sementes pelas médias dos NUMADs 1 e 2 seguiu tendência semelhante aos testes tradicionais, entretanto, nos lotes 2 e 4 houve uma maior variação nos resultados em comparação com as análises fisiológicas tradicionais.

Tabela 4.4 – Teste de Scott-Knott realizado ao nível de significância de 5%, com as médias dos testes de caracterização fisiológica das sementes de soja e os NUMADs 1 e 2.

Lotes	PCG	G	CE	E	EA substrato	EA papel	NUMAD1	NUMAD2
1	91,0 a	93,0 a	83,0 a	89,5 a	93,5 a	94,0 a	0.103497 a	0.018903 a
2	94,5 a	94,5 a	91,9 a	91,5 a	92,0 a	92,5 a	0.098137 b	0.017171 b
3	96,5 a	96,5 a	124,2 b	93,5 a	89,0 a	82,5 b	0.101246 a	0.018139 a
4	91,5 a	93,5 a	99,0 a	91,5 a	83,5 b	85,5 b	0.094971 c	0.016112 c
5	76,0 b	82,8 b	137,9 b	67,5 b	70,0 c	74,0 c	0.095000 c	0.016139 c
6	81,0 b	87,0 b	94,6 a	54,0 c	54,0 d	48,0 e	0.093826 c	0.015768 c
7	66,0 c	66,5 c	156,0 b	51,0 c	46,8 e	62,3 d	0.097868 d	0.017016 d
8	84,5 b	85,0 b	143,2 b	80,5 a	69,5 c	68,8 d	0.097046 d	0.016746 d
9	82,8 b	84,5 b	85,0 a	40,0 d	56,5 d	52,5 e	0.094122 c	0.015865 c
CV (%)	5,47	5,55	12,93	9,80	6,10	6,21	11,76	20,66

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

A diferenciação dos lotes de sementes pelas médias dos NUMADs 1 e 2 seguiu tendência semelhante aos testes tradicionais, entretanto, nos lotes 2 e 4 houve uma maior variação nos resultados em comparação com as análises fisiológicas tradicionais.

Esse desvio pode ser devido ao método de embebição em água utilizado, uma possível fonte de erro na metodologia, em que as sementes foram postas em papel germitest e embebidas com 5 vezes o peso do papel com água, e colocadas em sacos plásticos hermeticamente fechados. Durante esse procedimento, supõe-se que o excedente de água não absorvido pelo papel germitest ficou mal distribuídas dentro de alguns desses sacos plásticos, fazendo com que sementes do mesmo lote tivessem diferentes níveis de disponibilidade de água para a embebição, influenciando nos resultados obtidos pelo *biospeckle laser*.

Mas de forma geral, a diferenciação tanto pelo NUMAD 1 quanto pelo NUMAD 2, foram próximas aos testes tradicionais, principalmente com os testes de vigor: E, EA substrato e EA papel (tabela 4.4.). Verificou-se que, a exemplo do constatado no experimento 1 para definição de metodologias, os valores obtidos nos NUMADs apresentaram maior variação numérica.

No teste de correlação de *Pearson*, houve significâncias estatísticas dos NUMADs 1 e 2 com os testes de emergência, envelhecimento acelerado em substrato e em papel, e para o NUMAD 2 também houve significância estatística com o teste de primeira contagem de germinação (TABELA 4.5).

Tabela 4.5 – Teste de significância e coeficiente de correlação de *Pearson* dos testes padrão com os NUMADs 1 e 2.

Teste padrão	NUMAD 1		NUMAD 2	
	Coeficiente de correlação	Valor-p	Coeficiente de correlação	Valor-p
PCG	0,3244	0,0535 ^{ns}	0,3395	0,0428*
Germinação	-0,0926	0,1527 ^{ns}	0,2591	0,1271 ^{ns}
Cond. elétrica	0,0434	0,8014 ^{ns}	0,0257	0,8819 ^{ns}
Emergência	0,4948	0,0022**	0,5003	0,0019**
EA Bandeja	0,5315	0,0009**	0,5471	0,0006**
EA Papel	0,4661	0,0042**	0,4841	0,0028**

ns: teste não significativo ao nível de 5%, *teste significativo ao nível de 5%, **teste significativo ao nível de 1%.

No teste de emergência, é considerada uma plântula emergida a que expõe totalmente os cotilédones para fora do substrato; e nos testes de envelhecimento acelerado em substrato e em papel, a semente sofre o estresse artificial em ambiente com temperatura e umidade relativa do ar elevadas, antes de ser posta para embebição em água, e nesse processo, há o decréscimo da qualidade fisiológica; então, nessas condições, foi avaliado o vigor das sementes. Quando comparado com o teste de germinação, no qual a semente não é submetida a nenhum tipo de estresse, sendo disponibilizadas condições ótimas de fornecimento de água e temperatura, é avaliada a viabilidade das sementes, parâmetro esse menos restritivo que o vigor.

Consequentemente a significância estatística dos NUMADs 1 e 2 na correlação de *Pearson* com os testes de vigor, emergência e envelhecimento acelerado em substrato e em papel, e a não significância com o teste de germinação, indica que o *biospeckle laser* é sensível à atividade metabólica das sementes de maior vigor, que foram menos susceptíveis aos obstáculos e estresse imposto nos testes de emergência e envelhecimento acelerado.

Hipótese que é reforçada com o maior coeficiente de correlação dos NUMADs 1 e 2 com o teste de envelhecimento acelerado em substrato, se comparado com o realizado em papel (TABELA 4.5). No teste em substrato, além de a semente ser submetida ao estresse em ambiente com temperatura e umidade elevada, ela é posta para germinar em substrato, e a avaliação feita é análoga ao teste de emergência, exigindo, assim, maiores níveis de vigor da semente para que obtenha êxito nos testes.

Hipótese que é reforçada com o maior coeficiente de correlação dos NUMADs 1 e 2 com o teste de envelhecimento acelerado em substrato, se comparado com o

realizado em papel (TABELA 4.5). No teste em substrato, além de a semente ser submetida ao estresse em ambiente com temperatura e umidade elevada antes da semeadura, ela é semeada em substrato solo:areia, e a avaliação feita é análoga ao teste de emergência, exigindo, assim, maiores níveis de vigor da semente para que obtenha êxito nos testes. Sendo esse o teste considerado o mais restritivo, entre todos os realizados.

Diferindo do NUMAD 1, o NUMAD 2 obteve significância estatística com a primeira contagem de germinação na correlação de *Pearson*; esse resultado é consequência das diferenças entre os dois algoritmos. Entre as duas existe uma distinção na segunda parte do segundo membro, em que no NUMAD 2 é elevado à potência de dois, fazendo com que, proporcionalmente, a diferença entre as médias obtidas nas análises dos diferentes lotes de sementes de soja tenda a ser maiores, se comparado aos obtidos com o NUMAD 1 (Tabela 4.5).

Isoladamente, esse efeito pode levar a conclusões precipitadas no estudo dos dados; entretanto, nesse caso, a significância estatística do NUMAD 2 com a primeira contagem de germinação é corroborada com as correlações dos NUMADs 1 e 2 com os testes de emergência e envelhecimento acelerado em substrato e papel que, como já citado, são testes nos quais o vigor das sementes têm um fator aditivo para a obtenção de um melhor desempenho das plântulas de soja, e como na primeira contagem de germinação, a contabilização das sementes é feita anteriormente ao da germinação; as mais vigorosas de um mesmo lote terão melhor desempenho no teste, e como os resultados deste trabalho demonstram, o *biospeckle laser* foi sensível em detectar a maior atividade biológica das sementes de maior vigor.

Para o NUMAD 2, a significância estatística com o teste de primeira contagem de germinação e não para o teste de germinação, pressupõe-se que nesses dois tipos de avaliações sejam oferecidas condições ótimas para o início do desenvolvimento da semente; entretanto, na primeira contagem de germinação, a contabilização das sementes é realizada primeiro, assim com um menor período para se desenvolver, as diferenças de vigor terá maior influência nos resultados, em que as sementes mais vigorosas serão as com maior probabilidade de serem contabilizadas como germinadas. Sendo a primeira contagem de germinação, mesmo que menos restritivo, considerado um teste de vigor, reforçando a relação do *biospeckle laser* com o vigor das sementes.

Na Figura 4.1 é apresentada a matriz de correlação de *Pearson*, contendo os coeficientes de correlação entre todas as variáveis estudadas no experimento de validação; nela os NUMADs 1 e 2 obtiveram maior coeficiente de correlação com os

testes de emergência e envelhecimento acelerado em substrato e em papel, testes esses de vigor. Vale reforçar que esses valores de correlação para o uso do *biospeckle laser* foram maiores, em módulo, quando se comparado a correlação do teste de condutividade elétrica, todos abaixo de 0,33, e esse já amplamente utilizado, com os mesmos testes tradicionais de vigor.

Figura 4.1 – Matriz dos coeficientes de correlação de *Pearson*

	PCG	Germinação	Cond. elétrica	Emergência	EA bandeja	EA papel	NUMAD 1	NUMAD 2
PCG	1	0,95	-0,42	0,66	0,77	0,58	0,32	0,34
Germinação	0,95	1	-0,5	0,61	0,74	0,52	0,24	0,26
Cond. elétrica	-0,42	-0,5	1	-0,11	-0,33	-0,16	0,04	0,03
Emergência	0,66	0,61	-0,11	1	0,89	0,81	0,49	0,5
EA bandeja	0,77	0,74	-0,33	0,89	1	0,87	0,53	0,55
EA papel	0,58	0,52	-0,16	0,81	0,87	1	0,47	0,48
NUMAD 1	0,32	0,24	0,04	0,49	0,53	0,47	1	1
NUMAD 2	0,34	0,26	0,03	0,5	0,55	0,48	1	1

Fonte: Autor

Esses resultados podem ser devido aos diferentes tipos de genótipos de sementes utilizados no experimento (TABELA 3.1). O teste de condutividade elétrica avalia a condutância de uma solução constituída de compostos lixiviados das sementes provenientes da degradação de suas membranas, paredes celulares, entre outras. E com os diferentes genótipos utilizados no experimento, o padrão de degradação é bastante variável, podendo gerar, assim, resultados inconclusivos; isso demonstra o potencial do *biospeckle laser* para a análise de lotes de sementes de soja com diferentes genótipos, já que, de maneira geral, os NUMADs 1 e 2 obtiveram maior correlação com todos os testes tradicionais.

5 CONCLUSÃO

A técnica do *biospeckle laser* foi capaz de diferenciar as sementes de soja, de acordo com a qualidade fisiológica determinada com os testes usuais.

Os índices do *biospeckle laser*, NUMADs 1 e 2, obtiveram maior correlação com os testes de vigor; essa característica pode ser um indicativo de que o *biospeckle laser* pode prever quais lotes de sementes terá o melhor desempenho em campo.

As metodologias desenvolvidas e adaptadas neste trabalho, podem contribuir para a oficialização do *biospeckle laser* na utilização em análise de sementes.

Na análise por meio do *biospeckle laser*, pelo fato de cada semente ser uma unidade amostral, essa técnica tem vantagem na análise estatística, se comparada com os testes usuais, pois facilita uma maior amostragem.

REFERÊNCIAS

- BAGATELI, J. R. et al. Productive performance of soybean plants originated from seed lots with increasing vigor levels. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 2, p. 151–159, 2019.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1978.
- BRAGA JÚNIOR, R. A. et al. Magnetic field in coffee seed germination. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 44, n. 003920, p. 1–10, 2020.
- BRAGA JUNIOR, R. A.; RIVERA, F. P. **Bio-Speckle Laser Tool Library**. Disponível em: <<http://www.nongnu.org/bsltl/index.html>>. Acesso em: 16 abr. 2021.
- BRAGA, R. A. et al. Live biospeckle laser imaging of root tissues. **European Biophysics Journal**, v. 38, n. 5, p. 679–686, 2009.
- BRAGA, R. A. J.; RIVERA, F. P.; MOREIRA, J. **A Practical Guide to Biospeckle Laser Analysis. Theory and Software**. Lavras - MG: 1, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regra para Análise de Sementes. 2009.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 45, DE 17 DE SETEMBRO DE 2013. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA**, 2013.
- CAVERZAN, A. et al. How does seed vigor affect soybean yield components? **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1318–1327, 2018.
- COLMER, J. et al. SeedGerm: a cost-effective phenotyping platform for automated seed imaging and machine-learning based phenotypic analysis of crop seed germination. **New Phytologist**, v. 228, n. 2, p. 778–793, 2020.
- CONTADO, J. L.; SILVA, C. D. F.; BRAGA JÚNIOR, R. A. BIOSPECKLE LASER TO MONITOR THE GERMINATION OF ANGICO-VERMELHO SEEDS. **Theoretical and Applied Engineering**, v. 4, n. 4, p. 1–9, 4 ago. 2020.
- COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of Seed Science and Technology**. Boston, MA: Springer US, 2001.
- DACOSTA, N. P.; MARCOS, J. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seeds. **Seed Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 9–18, 1994.
- ELMASRY, G. et al. Utilization of computer vision and multispectral imaging techniques for classification of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 12 mar. 2019.
- ELMASRY, G. et al. Emerging thermal imaging techniques for seed quality evaluation: Principles and applications. **Food Research International**, v. 131, p. 109025, 1 maio 2020.
- FRACAROLLI, J. A. et al. Computer vision applied to food and agricultural products. **REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA**, v. 51, n. 5, p. 1–20, 2020.

FRANÇA NETO, J.; KRZYZANOWSKI, F. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja** EMBRAPA-CNPSo Londrina - PR, 2018. Disponível em: <www.embrapa.br/fale-conosco/sac>. Acesso em: 14 jul. 2020

FRANÇA NETO, J.; KRZYZANOWSKI, F.; DA COSTA, N. O teste de tetrazólio em sementes de soja. **EMBRAPA-CNPSo**, v. Documento, p. 72, 1998.

GENZE, N. et al. Accurate machine learning-based germination detection, prediction and quality assessment of three grain crops. **Plant Methods**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2020.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I. Textural Features for Image Classification. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. SMC-3, n. 6, p. 610–621, nov. 1973.

HARTMANN FILHO, C. P. et al. The effect of drying temperatures and storage of seeds on the growth of soybean seedlings. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 287–295, 1 dez. 2016.

HENNING, F. A. et al. Chemical composition and reserve mobilization in soybean seeds with high and low vigor. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 727–734, 2010.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). Seed Testing International. **ISTA News Bulletin**, n. 139, p. 44, 2010.

KAMESWARA RAO, N.; DULLOO, M. E.; ENGELS, J. M. M. A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, n. 5, p. 1061–1074, 2017.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. DE B.; HENNING, A. A. A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. **Circular Técnica 136**, v. 1, n. Londrina PR, p. 24, 2018.

LARIOS, G. S. et al. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy as a Powerful Tool for Distinguishing High- and Low-Vigor Soybean Seed Lots. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 9, p. 1691–1698, 2020.

LIAKOS, K. G. et al. **Machine learning in agriculture: A review** *Sensors (Switzerland)* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 14 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/18/8/2674/htm>>. Acesso em: 11 fev. 2023

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). . **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina, PR.: ABRATES, 1999. p. 1–24.

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

MCCLURE, T. et al. Impact of Environment on the Biomass Composition of Soybean (*Glycine max*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 32, p. 6753–6761, 16 ago. 2017.

MCDONALD, M. B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, v. 8, n. 2, p. 265–275, 1998.

- MESHARAM, V. et al. Machine learning in agriculture domain: A state-of-art survey. **Artificial Intelligence in the Life Sciences**, v. 1, p. 100010, 1 dez. 2021.
- MONDO, V. H. V.; NASCENTE, A. S.; CARDOSO NETO, M. O. Common bean seed vigor affecting crop grain yield. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 365–370, 2016.
- MOREANO, T. B. et al. Evolution of the physical and physiological quality of soybean seeds during processing. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 3, p. 313–322, set. 2018.
- MOREIRA, J.; CARDOSO, R. R.; BRAGA, R. A. Quality test protocol to dynamic laser speckle analysis. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 61, p. 8–13, 1 out. 2014.
- NING, X. et al. Seeds of soybean with internal mechanical damage feature and influence to its germination. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 7, n. 2, p. 59–63, 2014.
- PAIXÃO, C. S. S. et al. Physical and physiological quality of soybean seeds at three speeds of the harvester. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 214–218, 1 mar. 2017.
- PANDISELVAM, R. et al. Biospeckle laser technique – A novel non-destructive approach for food quality and safety detection. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, n. January, p. 1–13, 2020.
- PIRES, J. F. et al. Protocol to select efficient microorganisms to treat coffee wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 278, n. P2, p. 111541, jan. 2021.
- PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture: Recent developments, challenges, and perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–13, 2017.
- RABAL, H. J.; BRAGA JR, R. A. **Dynamic Laser Speckle and Applications**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009.
- RAHMANIAN, A. et al. Application of biospeckle laser imaging for early detection of chilling and freezing disorders in orange. **Postharvest Biology and Technology**, v. 162, p. 111118, 1 abr. 2020.
- RAJJOU, L. et al. Seed Germination and Vigor. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 507–533, 2 jun. 2012.
- RAMÍREZ-MIQUET, E. E. et al. Digital imaging information technology for biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasites. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1375–1386, 15 ago. 2017.
- REIS, R. O.; RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. Light intensity independence during dynamic laser speckle analysis. **Optics Communications**, v. 366, p. 185–193, 2016.
- REIS, V. U. V. et al. Vigor of maize seeds and its effects on plant stand establishment, crop development and grain yield. **Journal of Seed Science**, v. 44, p. 1–12, 2022.
- SILVA, G. K. E et al. Indirect determination of moisture using biospeckle technique. **REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA**, v. 51, n. 1, p. 1–3, 2020.
- SILVA, G. M. et al. Evaluation of Maize Seeds Treated with Trichodermil® through

Biospeckle. **Journal of Agricultural Science and Technology B**, v. 8, n. 3, p. 175–187, 28 mar. 2018.

SINGH, P. et al. Application of laser biospeckle analysis for assessment of seed priming treatments. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 169, n. January, p. 105212, fev. 2020a.

SINGH, P. et al. **Early Detection of Seed Infection using Motion History Image based Laser Biospeckle Technique**. 2020 IEEE 17th India Council International Conference (INDICON). **Anais...IEEE**, 10 dez. 2020bDisponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/9342582/>>

SINGH, P. et al. Biospeckle-Based Sensor for Characterization of Charcoal Rot (Macrophomina Phaseolina (Tassi) Goid) Disease in Soybean (Glycine Max (L.) Merr.) Crop. **IEEE Access**, v. 9, p. 31562–31574, 2021.

SUN, Q.; WANG, J. HUA; SUN, B. QI. Advances on Seed Vigor Physiological and Genetic Mechanisms. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 9, p. 1060–1066, 1 set. 2007.

SUTTON, D. B.; PUNJA, Z. K. Investigating biospeckle laser analysis as a diagnostic method to assess sprouting damage in wheat seeds. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 141, p. 238–247, 1 set. 2017.

TEKRONY, D. M. Accelerated Aging Test: Principles and Procedures. **Seed Technology**, v. 27, n. 1, p. 135–146, 2005.

THAKUR, P. S. et al. Laser biospeckle technique for characterizing the impact of temperature and initial moisture content on seed germination. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 153, p. 106999, 1 jun. 2022.

THONGSRI, K. et al. Effects of brassinosteroids and gibberellin on water uptake and performance of soya bean seeds under different temperatures. **Seed Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 141–157, 31 ago. 2021.

VERTUCCI, C. W.; LEOPOLD, A. C. Oxidative processes in soybean and pea seeds: effect of light, temperature, and water content. **Plant physiology**, v. 84, p. 1038–1043, 1987.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. **Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES**, v. 1, p. 1–26, 1999.

VIVAS, P. G. et al. Biospeckle activity in coffee seeds is associated non-destructively with seedling quality. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n. 2, p. 141–149, 1 mar. 2017.

VUJAKOVIĆ, M. et al. GERMINATION AND VIGOR OF SOYBEAN SEED PRODUCED UNDER DIFFERENT AGROMETEOROLOGICAL CONDITIONS. **Journal on Processing and Energy in Agriculture**, v. 4487, p. 157–159, 2011.

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

XING, J. et al. Detection of sprout damage in Canada Western Red Spring wheat with

multiple wavebands using visible/near-infrared hyperspectral imaging. **Biosystems Engineering**, v. 106, n. 2, p. 188–194, 1 jun. 2010.

XU, Z.; JOENATHAN, C.; KHORONA, B. M. K. Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens. **Optical Engineering**, v. 34, n. 5, p. 1487, 1995.

YASMIN, J. et al. Classification method for viability screening of naturally aged watermelon seeds using FT-NIR spectroscopy. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 5, 2019.

YOUSSEF, D. et al. Biospeckle local contrast analysis for surface roughness study of articular cartilage. **Optik**, v. 183, p. 55–64, 1 abr. 2019.

ZDUNEK, A. et al. The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: A review. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 52, n. 1, p. 276–285, 2014.

ZHAO, Y. et al. Point-wise and whole-field laser speckle intensity fluctuation measurements applied to botanical specimens. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 28, n. 6, p. 443–456, 1997.

ANEXO A

Teste de normalidade (Shapiro-Wilk), com nível de significância de 5%. Valor $p > 0,05$ indica normalidade dos dados (ensaio preliminar).

Variáveis	Estatística W	Valor p
Germinação	0,96692	0,87601
PCG	0,95855	0,76295
Emergência	0,86835	0,06413
PCE	0,86464	0,05590
NUMAD	0,96477	0,84910

Teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), com nível de significância de 5%. Valor $p > 0,05$ indica normalidade dos dados (validação).

Variáveis	Estatística do Teste (D)	Valor p
Germinação	0,1301	0,5763 ^{ns}
PCG	0,1278	0,5989 ^{ns}
Cond. elétrica	0,1412	0,4300 ^{ns}
Emergência	0,1643	0,2853 ^{ns}
EA bandeja	0,1587	0,3245 ^{ns}
EA papel	0,1396	0,4847 ^{ns}
NUMAD 1	0,1317	0,5180 ^{ns}
NUMAD 2	0,1291	0,5428 ^{ns}

ns: Teste não significativo ao nível de 5% indica normalidade dos resíduos.