

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
VEGETAL**

Márcia Ramos dos Santos

**Adequação do teste de tetrazólio e fenotipagem computacional da qualidade
fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* A.C. Smith (Fabaceae)**

**Montes Claros
2019**

Márcia Ramos dos Santos

Adequação do teste de tetrazólio e fenotipagem computacional da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* A.C. Smith (Fabaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Delacyr da Silva Brandão Júnior

Coorientador: Carlos Alberto de Araújo

Montes Claros
Setembro de 2019

Santos, Márcia Ramos dos.

S237a Adequação do teste de tetrazólio e fenotipagem computacional
2019 da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* A.C.
Smith (Fabaceae) / Márcia Ramos dos Santos. Montes Claros:
ICA/UFMG, 2019.

65 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Produção
Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Agrárias.

Orientador: Delacyr da Silva Brandão Júnior.

Banca examinadora: Carlos Alberto de Araújo, Alcinei Místico de
Azevedo, Leticia Renata de Carvalho.

Inclui referências.

1. Análise de Imagem. 2. Tetrazólio. 3. Semente. I. Brandão
Júnior, Delacyr da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.53|

Elaborada pela BIBLIOTECA Universitária do ICA/UFMG

Edézia Cristina Sousa Versiani - CRB6 1349

Márcia Ramos dos Santos

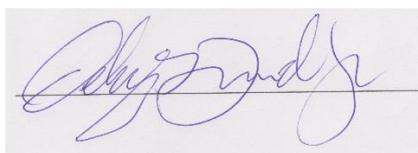
Adequação do teste de tetrazólio e fenotipagem computacional da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* A.C. Smith (Fabaceae)

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof^a. Dr^a. Leticia Renata de Carvalho
ICA-UFMG

Prof. Dr. Alcinei Místico de Azevedo
ICA-UFMG

Prof. Dr. Carlos Alberto de Araújo
Coorientador ICA-UFMG



Prof. Dr. Delacyr da Silva Brandão Júnior
Orientador ICA-UFMG

Montes Claros, 26 de Setembro de 2019.

Dedico esta conquista a minha filha Maya que chegou para abrilhantar os meus dias, tornando a jornada menos árdua. Ao meu esposo Ednaldo pelos incentivos, amor e dedicação. Aos meus pais por todo esforço e amparo nessa caminhada para que eu não desistisse. A toda minha família e amigos pelo suporte e compreensão.

AGRADECIMENTO

A Deus por tornar possível esta jornada, sendo meu refúgio nos momentos de fraqueza.

À minha filha Maya, por ser minha dose diária de renovação e por esse sorriso que aquece a minha alma.

Ao meu esposo Ednaldo pelo amor, companheirismo e incentivo para que tudo corresse bem.

À minha família por todo o apoio, amparo, incentivo e amor. Em especial, à minha mãe Maria de Lourdes, a meu pai Antônio e aos meus irmãos.

Aos meus amigos e familiares que, de alguma forma, estiveram presentes com palavras de apoio e incentivo.

Ao Prof. Delacyr pela orientação, paciência, apoio, compreensão e conhecimentos compartilhados durante esta jornada.

Ao Prof. Dr. Alcinei pelo empenho e imensurável contribuição para que este trabalho fosse finalizado.

Ao Prof. Carlos pela dedicação, força de vontade e ensinamentos.

Ao Sementec pela ajuda, durante o desenvolvimento da pesquisa e pelo companheirismo.

Ao Programa de pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais – ICA/UFMG, por possibilitar este sonho.

Aos professores da banca examinadora pela participação e contribuições. Aos professores do Programa pelos ensinamentos durante o curso.

Ao Instituto de Ciências Agrárias e ao Laboratório de Análise de Sementes que propiciou o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus colegas da Produção Vegetal, em especial, à Ana Clara, Josy, Sabrina e Jack pelos conhecimentos compartilhados e companheirismo os quais foram essenciais neste processo, tornando os meus dias mais leves.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Brasil, pela concessão de bolsa de estudo e possibilidade de realização do curso.

“God is always faithful to answer. Sometimes His answer is a much desired “Yes”. Sometimes His answer is a merciful “no”. Sometimes His answer is a faith-building “not yet”. And sometimes...Sometimes, when an answer cannot be found, His answer is simply *Trust me*” (Stacy L. Sanchez).

Adequação do teste de tetrazólio e fenotipagem computacional da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* A.C. Smith (Fabaceae)

RESUMO

A produção de sementes de espécies nativas florestais é muito utilizada na obtenção de mudas, para plantios florestais e, na restauração de áreas degradadas, visto que a análise da qualidade fisiológica e dos fatores que afetam o poder germinativo e vigor de sementes é fundamental para a obtenção de mudas de alta qualidade para projetos de recuperação e conservação in e ex-situ dos recursos genéticos. Dentre os procedimentos utilizados, o teste de tetrazólio se destaca pela sua rapidez e quantidade de informações geradas, com diagnose precisa das principais causas de redução da qualidade. Entretanto, um problema inerente ao teste é a subjetividade do analista na interpretação adequada dos resultados. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho estabelecer o procedimento adequado para avaliar a qualidade de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae), pelo teste de tetrazólio; estabelecer uma metodologia de baixo custo para a avaliação do teste e classificação da viabilidade e vigor das sementes, por meio da automação da análise de imagens e comparar com os testes tradicionalmente utilizados. A primeira parte envolveu a adequação do tetrazólio, aplicação da metodologia em três lotes de sementes (I, II e III) e comparação com testes de qualidade física e fisiológica. Para isso, testaram-se dois métodos de pré-preparo (sementes escarificadas e sem escarificação) e três temperaturas de embebição (30, 35 e 40 graus) avaliados em esquema fatorial duplo 2x3. As sementes foram expostas, na solução de tetrazólio a 0,05%/2h30 horas a 30°C. Procedeu-se à análise visual, classificando as sementes em quatro classes de viabilidade e vigor. Quanto à análise de imagens, coletaram-se, a partir das imagens provenientes das repetições, diferentes tons de vermelho e marrom, utilizados posteriormente na segmentação das sementes quanto à porcentagem de tecido vivo e morto e na classificação da viabilidade e vigor pelas RNA's. Procedeu-se à análise de variância, teste de média (Tukey = 0,05%) e os parâmetros foram correlacionados. Para a padronização do tetrazólio, o método de preparo com escarificação das sementes sobressaiu, permitindo melhor remoção do tegumento. As temperaturas testadas não diferiram estatisticamente, entretanto observou-se maior inviabilidade dos embriões a 40°C. O lote I se destacou quanto à viabilidade do tetrazólio e quanto aos testes de vigor da germinação. Houve correlação significativa positiva entre Tz viabilidade e Tz vigor em relação aos parâmetros de qualidade física e fisiológica. A avaliação pela análise de imagens permitiu quantificar as porcentagens de tecido morto (PM1 a PM5) e de tecido vivo, quanto aos tons médios de vermelho (V1 a V5), presentes em cada semente, conforme a sua localização e classificá-las individualmente em vigorosa, viável e inviável com 100% de acerto. Quando correlacionado com os parâmetros do teste de germinação, o vigor das sementes pela classificação por imagens correlacionou-se positivamente de forma significativa com a porcentagem de germinação, IVE, Comprimento e massa seca de epicótilo e hipocótilo. Por outro lado, a maior germ (%), IVE, CME, CMH está relacionada à maior porcentagem de tecido vivo, ou tons de vermelho, nas regiões vitais da semente (V1 e V2) devido a maior estimativa de correlação. A massa seca, contudo, está relacionada às menores porcentagens de tecido morto, em todas as regiões da semente. Sementes escarificadas e embebidas, em água por 24 horas a 30°C, com posterior remoção do tegumento e exposição na solução de tetrazólio a 0,05%/2:30 horas a 30°C, é eficiente na avaliação da viabilidade de sementes de *A. cearensis*. A análise de imagens computacional, utilizando Redes Neurais Artificiais, é uma alternativa eficaz para avaliar o teste de tetrazólio quanto à qualidade fisiológica de sementes de *A. cearensis*.

Palavras chave: Vigor, Viabilidade, Redes neurais, Inteligência artificial, umburana.

Adequacy of tetrazolium test and computational phenotyping of the physiological seed quality of *Amburana cearensis* A.C. Smith (Fabaceae)

ABSTRACT

The production of seeds of native forest species is widely used in obtaining seedlings, for forest plantations and for the restoration of degraded areas, since the analysis of physiological quality and of factors that may affect the germination power and vigor of seeds is fundamental for obtaining high quality seedlings for recovery projects and conservation, in situ and ex situ, of the genetic resources. Among the procedures used, the tetrazolium test stands out for its speed and amount of information generated, with precise diagnosis of the main causes of quality reduction. However, a problem inherent in the test is the subjectivity of the analyst in the proper interpretation of the results. Thus, the objective with this work was to establish the appropriate procedure to evaluate the quality of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) seeds by the tetrazolium test; to establish a low cost methodology for the evaluation of the test and classification of seed viability and vigor through the automation of image analysis and compare with traditionally used tests. The first part involved the adequacy of tetrazolium, application of the methodology in three seed lots (I, II and III) and comparison with physical and physiological quality tests. For this, two pre-preparation methods (scarified and non-scarified seeds) and three soaking temperatures (30, 35 and 40 degrees Celsius) were tested, and evaluated in a double factorial scheme (2x3). The seeds were exposed to tetrazolium solution (0.05%) for 2h30 hours at 30 °C. It was proceeded the visual analysis, classifying seeds into four classes of viability and vigor. As for the image analysis, were collected, from the images of each repetition, different shades of red and brown, later used in the segmentation of seeds as the percentage of dead tissue and medium tones of red from living tissue for the classification of viability and vigor by RNA's. It was proceeded the analysis of variance, mean test (Tukey = 0.05%) and the parameters were correlated. For the tetrazolium standardization, the method of preparation using scarified seeds stood out, allowing better removal of the integument. The temperatures tested did not differ statistically, however it was observed greater unviability of the embryos at 40 ° C. Lot I stood out for the tetrazolium viability and germination vigor tests. There was a significant positive correlation between Tz viability and Tz vigor in relation to physical and physiological quality parameters. The evaluation by image analysis could quantify the percentages of dead tissue (PM1 to PM5) and living tissue or the medium tones of red (V1 to V5), present in each seed, according to its location and to classify them, individually, in vigorous, viable and unviable with 100% accuracy. When correlated with germination test parameters, seed vigor by image classification positively correlated, in a significantly way, with germination percentage, Emergency Speed Index (IVE), Length and dry mass of epicotyl (CME and MSE) and hypocotyl (CMH and MSH). From the correlation estimates it was observed that the highest germination (%), IVE, CME and CMH are related to the higher percentage of living tissue, or tones of red, in the vital regions of the embryo (V1 and V2). Dry mass, however, is related to lower percentages of dead tissue in all regions of the seed. Seeds scarified and soaked in water for 24 hours at 30 °C, with subsequent tegument removal and exposure in tetrazolium solution at 0.05% / 2: 30 hours at 30 °C, is efficient in evaluating the viability of seeds of *A cearensis*. Computational image analysis using Artificial Neural Networks is an effective alternative to evaluate the tetrazolium test for the physiological quality of *A. cearensis* seeds.

Keywords: Vigor, Viability, Neural Network, Artificial Intelligence, umburana.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1– Estrutura de uma rede neural artificial. 23
- Figura 1– Caracterização de sementes de *A. cearensis* em classes de vigor, viabilidade e inviabilidade pelo teste de tetrazólio. 45
- Figura 2– Gráfico para a Condutividade Elétrica (CE) de três lotes de sementes de *A. cearensis* com seis tempos de embebição. 46
- Figura 3 - Representação gráfica da estimativa de correlação entre o Teste de tetrazólio quanto ao vigor (Tz vigor) e viabilidade (Tz Viabilidade) em relação aos testes de qualidade física, germinação e vigor em três lotes de sementes de *A. cearensis*. 46
- Figura 1– Classificação visual das sementes de *A. cearensis* submetidas ao teste de tetrazólio em vigorosas, viáveis e inviáveis. 50
- Figura 2– Fluxograma das etapas realizadas, a partir da obtenção das imagens, referentes à segmentação e extração de atributos. 52
- Figura 3 – Exemplo de imagem obtida das sementes de *A. cearenses*, após o teste de tetrazólio, para uma das repetições (A), imagem segmentada separando o fundo do objeto de imagem (B), preenchimento das partes escuras ou necrosadas das sementes (C), paletas de tons de vermelho (D) e tons de marrons (E), encontradas nas imagens e utilizadas para o treinamento das RNAs e à segmentação das sementes quanto aos tecidos vivos (F). 53
- Figura 4 – Representação das divisões das imagens das sementes feita computacionalmente seguida dos respectivos parâmetros estimados pelas RNAs. 54
- Figura 5– Representação gráfica da estimativa de correlação da classificação média dos lotes, quanto ao escore (Cl.), porcentagem de sementes vigorosas, viáveis e inviáveis, em relação às porcentagens de tecido vivo (V1 a V5) e tecido morto (PM1 a PM5 e PMT). 57
- Figura 6– Representação gráfica da estimativa de correlação da classificação média dos lotes, quanto à classificação das RNAs (Cl.), porcentagem de sementes vigorosas, viáveis e inviáveis, em relação aos parâmetros do teste de germinação. Linhas vermelhas indicam correlação negativa e verdes correlações positivas. A espessura da linha indica a magnitude da correlação. 58
- Figura 7– Representação gráfica da estimativa de correlação de descritores da qualidade fisiológica pelo teste de germinação em relação aos parâmetros estimados pelas RNAs. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Médias de vigor e viabilidade de sementes de <i>A. cearensis</i> da padronização do tetrazólio para diferentes temperatura e preparo da semente. O fator A representa o modo de preparo das sementes: sementes escarificadas (ES) e sem escarificação (SE) e o fator B representam as temperaturas (30, 35 e 40 °C) de embebição.	46
Tabela 2– Avaliação da qualidade de lotes de sementes de <i>A. cearensis</i> pela porcentagem de germinação e pelo teste de tetrazólio em classes de Vigor e Viabilidade.	46
Tabela 3– Caracterização da qualidade física de lotes de sementes de <i>A. cearenses</i> pelo teor de água (%), peso de 1000 sementes (g), comprimento (mm), largura (mm) e espessura (mm).	47
Tabela 4– Caracterização da qualidade fisiológica dos lotes de sementes de <i>A. cearensis</i> pela germinação, comprimento (comp) e massa seca (MS) do epicótilo (EP) e do hipocótilo (Hip), e médias da primeira contagem (1 ^a) e Índice de velocidade de Emergência (IVE).	47
Tabela 5– Resultado do teste de envelhecimento acelerado com a determinação do teor de água das sementes antes e após o período de envelhecimento.	47
Tabela 1– Teste de comparação múltipla, para os descritores avaliados, em três lotes de sementes de <i>A. cearensis</i> .	54
Tabela 2–Número de sementes da amostra de validação classificadas como inviável, viável, e viável + vigorosa de acordo com a análise visual e pelas RNAs.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Condutividade elétrica
CI	Escore de classificação média da qualidade dos lotes pelas RNA's
CV%	Coefficiente de Variação
CME	Comprimento de Epicótilo
CMH	Comprimento de Hipocótilo-radícula
EA	Envelhecimento Acelerado
Germ(%)	Porcentagem de germinação
G(%)	Porcentagem de germinação
IVE	Índice de Velocidade de Emergência
MSE	Massa Seca de Epicótilo
MSH	Massa Seca de Hipocótilo-radícula
OPF	Optimum-Path Forest
PM	Porcentagem de tecido morto total
PM1 a PM5	Porcentagem de tecido morto em 5 partes da semente
RNA	Redes Neurais Artificiais
RGB	Vermelho, verde e azul
TZ	Tetrazólio
Tz Vig	Vigor pelo teste de tetrazólio
Tz Viab	Viabilidade pelo teste de tetrazólio
Tz Inv	Inviabilidade pelo teste de tetrazólio
V1 a V5	Porcentagem do tom médio de vermelho em 5 partes da semente

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO GERAL.....	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
4 REFERÊNCIAS.....	26
5 ARTIGO.....	30
5.1 Artigo 1.....	30
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1 Adequação do teste de Tetrazólio.....	34
2.2 Aplicação do Teste de tetrazólio para a avaliação de viabilidade e vigor.....	35
2.3 Caracterização da qualidade física e fisiológica.....	35
2.4 Envelhecimento acelerado.....	36
2.5 Condutividade elétrica.....	36
2.6 Análise estatística.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4 CONCLUSÕES.....	41
5 REFERÊNCIAS.....	42
FIGURAS E TABELAS.....	42
ARTIGO 2 - RESUMO.....	48
1 INTRODUÇÃO.....	449
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Local de experimento e caracterização do material vegetal.....	49
2.2 Teste de tetrazólio.....	50
2.3 Teste de germinação.....	51
2.4 Obtenção das imagens.....	51
2.5 Análise das imagens.....	51
2.6 Análise estatística dos dados.....	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4 CONCLUSÕES.....	60
5 REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	62

1 INTRODUÇÃO GERAL

O estudo de metodologias, em análise de sementes florestais, tem importante papel nas pesquisas em tecnologia de sementes, fornecendo informações acerca da qualidade fisiológica de lotes, tanto para a propagação e conservação como a utilização para os mais diversos interesses (ANDRADE; PEREIRA, 1994). Contudo conhecer sobre estruturas e os fatores que afetam o poder germinativo e vigor de sementes, por meio de técnicas eficientes, é fundamental. Entretanto, considerando a grande diversidade de espécies florestais nativas encontradas, ainda são poucas as informações sobre adequação e padronização de procedimentos e parâmetros utilizados, na avaliação da qualidade de sementes, em contraste com o setor agrícola, encontrados nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Amburana cearensis A.C. Smith (Fabaceae), popularmente conhecida como amburana, umburana, imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru, é amplamente distribuída nas terras áridas da América do Sul. No Brasil, ocorre nos biomas da caatinga e cerrado bem como em floresta tropical (LORENZI & MATOS, 2002; LUCIO *et al.*, 2016). Pode ser empregada para uma diversidade de usos, como: na movelaria fina, esculturas e marcenaria em geral, na medicina popular e na bioprospecção, o que tem reforçado a importância de estudos com essa espécie.

A avaliação do potencial fisiológico, na análise da qualidade de sementes, tem a possibilidade de identificar fatores (bióticos e abióticos) que afetam o seu desempenho, as possíveis causas da perda da sua qualidade, entre outros. E regularmente é necessária à rápida diagnose e tomada de decisões, a fim de evitar danos ou perdas desse potencial.

Dentre os testes disponíveis, o teste de tetrazólio apresenta grande vantagem sobre outros testes em informações e agilidade (MARCOS FILHO, 2015). Entretanto um problema inerente à análise da qualidade fisiológica de sementes, por meio do teste de tetrazólio, é que, além de exigir que o analista avalie grandes quantidades de sementes por dia, procurando por danos que podem acometer as sementes, requer conhecimentos intrínsecos à sua morfologia, tornando-se um processo subjetivo e oneroso, altamente suscetível a erros (PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015).

Neste contexto, as técnicas de processamento de imagens, por meio de visão computacional, têm se destacado bastante no setor agrícola, visto que podem ser empregadas para a classificação efetiva de produtos, por meio de suas características visuais (SABANCI; TOKTAS; KAYABASI, 2017). O baixo custo, menor velocidade de análise e processamento de dados, possibilidade de replicação, não evasivo, menor necessidade de mão de obra, identificação de indivíduos outliers e a não subjetividade são algumas das suas vantagens, uma vez que o processo pode ser todo automatizado (SASIDHARAN & PATIL, 2017).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis*, por meio de testes de qualidade fisiológica, física e análise de imagens digitais, para a classificação da qualidade e vigor.

2.1 Objetivos Específicos

- Adequar o teste de tetrazólio para a espécie *Amburana cearensis* e comparar com testes de qualidade de física e fisiológica de semente.
- Criar e utilizar um sistema de classificação de imagens por meio de técnicas de reconhecimento de padrões de classificação para a avaliar o teste de tetrazólio em sementes de *Amburana cearensis*;
- Comparar os testes por meio de correlação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Amburana cearensis

Amburana cearensis A.C. Smith é uma espécie florestal nativa brasileira, pertencente à família Fabaceae. Popularmente conhecida por diversas designações, como amburana, umburana, imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru, a *A. cearensis* é amplamente distribuída nas terras áridas da América do Sul, ocorrendo em países como o Peru, Argentina, Bolívia e, no Brasil, ocorre, principalmente, nos biomas da caatinga e cerrado, bem como em floresta tropical (LORENZI, 2002; LUCIO *et al.*, 2016).

De caule ereto, pode atingir de 10 a 12 metros de altura e pode chegar até 20 m de altura dependendo da região de ocorrência (LORENZI, 1992; LORENZI, 2008). É uma espécie decídua que apresenta variações quanto à floração e frutificação de acordo com a região de ocorrência. A floração ocorre, no início da estação seca, frutificação e dispersão dos frutos, no período mais seco do ano, de agosto a outubro, e a dispersão das sementes podem se estender de outubro a dezembro na região Nordeste (CANUTO; SILVEIRA, 2006; LOPES; NÓBREGA; MATOS, 2014).

As sementes são aladas, tegumento de textura lenhosa e sem dormência, com formato variando entre elíptica, oblonga e ovoide, hilo bem visível, embrião axial e invaginado (CUNHA & FERREIRA, 2003). A germinação é do tipo epígea fanerocotiledonar e as sementes são exotestais e bitegmentadas (exotesta e tégmen), com o tegumento bastante resistente, constituído por tecido esclerenquimático, macroesclereídes e osteoesclereídes e compostos fenólicos, os quais conferem certa impermeabilidade do tegumento, dificultando a absorção de água, portanto o processo de escarificação se faz necessário para uma maior uniformidade na germinação (LOUREIRO *et al.*, 2013).

Por suas propriedades medicinais e potencial de bioprospecção, a espécie vem sendo amplamente estudada, e diversas substâncias secundárias, como: cumarina, alcaloides, ácidos graxos e fenólicos, já foram isoladas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; CARTAXO; SOUZA & ALBUQUERQUE, 2010) da casca do caule (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007), da folha (BARBERINO *et al.*, 2016) e da semente (PEREIRA *et al.*, 2017; MONTEIRO *et al.*, 2017).

A casca do caule é quimicamente constituída de cumarina, responsável pelo seu odor característico, flavonoides isocampferídio, fenólicos amburosídeos A e B, ácidos fenólicos e vanílicos, dentre outros (CANUTO, SILVEIRA & BEZERRA, 2010).

Experimentos realizados com o óleo da semente de *A. cearensis* comprovam que ela é bastante rica em cumarina, alcaloides e ácidos graxos, sendo bastante promissora para a indústria farmacêutica (PEREIRA *et al.*, 2017). Além dos usos tradicionais ao tratamento de afecções, a cumarina isolada e testada da semente de *A. cearensis* apresenta também atividade antileishmanial contra o protozoário da leishmaniose sem apresentar toxicidade aos macrófagos (células alvo da leishmania) (MONTEIRO *et al.*, 2017).

As cumarinas, metabólitos secundários isolados, são as mais abundantes e de comprovada importância quanto à alelopatia. Lessa *et al.* (2017), em estudo realizado com o extrato aquoso das folhas frescas, verificaram que a maior dosagem testada (100 gL⁻¹) apresentou quase 100% de efeito inibitório na porcentagem de germinação e IVG para a espécie daninha *Amaranthus deflexus*.

Dentre outros usos, a madeira da *A. cearensis* oferece potencial, para a laminação com rendimentos satisfatórios (LISBOA *et al.*, 2015), sendo empregada também como barris de

armazenamento e envelhecimento de cachaça (SANTIAGO; CARDOSO; NELSON, 2017). É indicada para a recuperação de ecossistemas degradados, uma vez que apresenta dispersão de frutos anemocóricos e plasticidade às condições adversas, como às variações de luz, água no solo e matéria orgânica, com bom desenvolvimento a pleno sol e adaptações do sistema radicular que pode estar relacionado à capacidade de tolerar condições extremas de seca. Além disso, é empregada, em sistemas agroflorestais, como forrageira e melífera (RAMOS *et al.*, 2004; PIMENTEL & GUERRA, 2011).

As perturbações nas florestas, como resultado da pressão antrópica sobre os recursos naturais, causam alterações no habitat, especialmente, em relação à umidade, temperatura e luminosidade, afetando a sobrevivência e o desenvolvimento de plantas e levando à degradação e fragmentação das áreas florestais. Essas alterações podem afetar a germinação, crescimento e reprodução de plantas, com efeito direto na estrutura e no padrão espacial de populações florestais (SOUZA, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2016). Contudo, dada a multiplicidade de usos da *A. cearensis*, acoplada ao desmatamento e exploração descontrolada dos recursos naturais, a espécie tem sido supra explorada, nos locais de ocorrência, estando listada como espécie ameaçada de extinção (IBAMA, 2008) e espécie de valor econômico com declínio verificado ou projetado (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Sementes

As sementes constituem o principal sistema de propagação de plantas e a maioria das plantas cultivadas dependem delas para a propagação (WANG *et al.*, 2015). As sementes se desenvolvem, a partir de um zigoto fertilizado, em um embrião e um endosperma com grandes quantidades de reservas, principalmente carboidratos, óleos e/ou proteínas, que são biossintetizados e depositados durante o desenvolvimento. Essas reservas, além de importantes para a germinação e crescimento da semente, é componente vital para a dieta humana e animal (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; WANG *et al.*, 2015).

Antes de atingir a maturidade, a semente desenvolve propriedades importantes, incluindo a tolerância à dessecação, germinação/dormência e vigor. Para tanto, é necessário entender os processos fundamentais que ocorrem nas sementes, durante o seu desenvolvimento, armazenamento, germinação e crescimento (BEWLEY *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015).

Dentre os procedimentos utilizados, para a análise da qualidade de sementes, a análise da qualidade fisiológica é a maneira mais precisa (BRASIL, 2009), a qual pode ser definida como um conjunto de características que determinam seu valor para a semeadura, uma vez que reflete a capacidade da semente em desenvolver funções vitais, abrangendo longevidade, germinação e vigor (MARCOS FILHO, 2005; TOLEDO *et al.*, 2009).

Potencial fisiológico

O potencial fisiológico reúne informações sobre a germinação, referente à viabilidade das sementes e sobre o vigor, referente ao conjunto de aptidões que determinam o desempenho durante a germinação (MARCOS FILHO, 2005).

As sementes atingem o máximo potencial fisiológico, na época da maturação, quando cessa o período de acúmulo da matéria seca, acompanhado de uma acentuada redução no teor de água e alterações externas de frutos e sementes, obtendo o seu máximo vigor e capacidade germinação, ou seja, momento ideal para a colheita (MARCOS FILHO, 2005; BEWLEY *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015).

Para conhecer o potencial de desempenho das sementes, deve-se considerar todos os atributos envolvidos: genéticos, físicos, fisiológicos, sanidade, bem como a interação entre eles. Que podem manifestar-se na capacidade das sementes de originarem plântulas normais, na velocidade e na uniformidade de emergência e de crescimento de plântulas em campo, no potencial de armazenamento, bem como na conservação do potencial fisiológico. Os efeitos desses atributos sobre a qualidade são geralmente traduzidos pelo decréscimo, na porcentagem de germinação, aumento de plântulas anormais e redução do vigor das plântulas (MARCOS FILHO, 1987; MARCOS FILHO, 2005; TOLEDO *et al.*, 2009).

Condições ambientais críticas, como variações na temperatura e umidade, durante o processo de maturação, podem afetar a formação de sementes, diminuindo a qualidade e o potencial fisiológico, aumentando o risco de deterioração. Manejo incorreto, durante armazenamento, também, pode ocasionar a deterioração das sementes, portanto, quando as condições ambientais se desviam das mais adequadas, cresce a importância da consistência da metodologia utilizada, para a identificação do potencial fisiológico, recomendando-se a realização de um conjunto de testes (MARCOS FILHO, 2005; BEWLEY *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015).

Deterioração

A deterioração de sementes é um processo inevitável, cuja intensidade e velocidade variam em função de suas características morfológicas e fisiológicas e deve ser retardada, ao máximo, por meio de práticas adequadas de manejo, possibilitando a comercialização de sementes com potencial fisiológico mais próximo possível do alcançado no período de maturação (MARCOS FILHO, 2005; WANG *et al.*, 2015).

Em espécies cultivadas, a deterioração de sementes ortodoxas sempre ocorre durante o armazenamento, resultando em uma perda gradual do vigor, levando à morte e afetando a produção. Contudo a deterioração é criticamente importante para a produtividade agrícola, conservação e evolução das populações naturais. A prevenção ou minimização da perda de vigor, durante o armazenamento, é fundamental, a fim de permitir a produção em temporadas subsequentes, ou mesmo conservação 'ex situ' das espécies. Os principais fatores que afetam a longevidade das sementes, durante o armazenamento, são temperatura e umidade (WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010; WANG *et al.*, 2015).

Na natureza, a longevidade das sementes pode ser uma vantagem adaptativa a plantas que recrutam novos membros do banco de sementes do solo. A variação insuficiente, na dormência e longevidade, combinada com efeitos da mudança climática, pode levar ao aumento da mortalidade, no banco de sementes do solo, afetando as populações naturais. Os esforços de conservação 'ex situ', para preservar a diversidade genética de populações, dependem do armazenamento de sementes por longos períodos para a otimização da viabilidade (LI; PRITCHARD, 2009; WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010; WALCK *et al.*, 2011).

A produção de radicais livres como as espécies reativas de oxigênio é uma das principais causas da perda de vigor. E a eventual morte das sementes é, mais frequentemente, atribuída à degradação oxidativa acumulada de constituintes celulares provenientes dos ataques de radicais livres ou outras espécies reativas de oxigênio. Todas as moléculas orgânicas são suscetíveis à oxidação e essas

reações levam à formação de reações problemáticas, produzindo peróxidos, hidroperóxidos, grupos carboxílicos reativos entre outros subprodutos (RAJJOU *et al.*, 2008; WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010; WANG *et al.*, 2015).

O nível de deterioração das sementes pode variar, de acordo com as características do lote de origem, podendo variar dentro e entre lotes. É influenciada pela umidade da semente, temperatura de armazenamento, como também pelas características intrínsecas à semente, provenientes de interações genéticas e ambientais, durante a maturação e colheita. Assim sendo, é crucial considerar a condição do lote, em consequência do início do processo de armazenamento e controle dos fatores ambientais durante esta fase (WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010).

Germinação e vigor

O teste de germinação tem por finalidade determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, possibilitando comparar a qualidade fisiológica entre lotes, bem como estimar o seu valor para a semeadura em campo (BRASIL, 2009). Ainda de acordo com Brasil (2009), os procedimentos, para a realização do teste, devem ser padronizados, para que os resultados possam ser comparados dentro dos limites aceitáveis pela RAS e também reproduzidos. É importante atentar-se ao tipo de substrato, temperatura, duração do teste, exigências da espécie à luz entre outras instruções descritas na RAS.

Sementes viáveis, maduras morfo e fisiologicamente e sem dormência, estão aptas a germinar em condições ambientais consideradas adequadas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). A germinação inicia-se com a embebição de água, fator ambiental que desencadeia uma sequência de reações metabólicas relacionadas com síntese e degradação de moléculas e termina com a emergência do eixo embrionário, usualmente a radícula. Esse processo não considera o desenvolvimento da plântula (BEWLEY *et al.*, 2013). O termo vigor, por sua vez, engloba tanto a germinação como o crescimento (WANG *et al.*, 2015).

De forma geral, a germinação obedece a um padrão trifásico de absorção de água, em que a fase I é caracterizada por rápida absorção de água, e a fase II, pela estabilização no teor de água das sementes. A fase III, conhecida como fase visível da germinação, é caracterizada pela retomada da absorção de água pelas sementes, culminando com a protrusão da raiz primária. Esses eventos incluem hidratação de proteínas, mudanças estruturais subcelulares, respiração, síntese de macromoléculas e alongação celular (BEWLEY *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015).

De acordo com Brasil (2009), a germinação de sementes, em teste de laboratório, pode ser definida como a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo.

O substrato e a temperatura são dois importantes fatores exógenos que influenciam o processo germinativo e podem ser manipulados, em laboratório, a fim de otimizar o processo (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Esses fatores, além de influenciarem a germinação isoladamente, a interação entre eles é significativa, pois diferenças nos substratos podem ser responsáveis por diferentes respostas inclusive sob mesma temperatura (GUEDES *et al.*, 2010).

O substrato constitui o suporte físico para a semente e sua finalidade é manter as condições ideais para a germinação e o desenvolvimento das plântulas. Atributos como estrutura, composição,

aeração, capacidade de retenção de água, pH, resistência, textura e pureza microbiológica influenciam diretamente a germinação, podendo favorecê-la ou prejudicá-la. Entretanto a escolha do substrato a ser utilizado deve considerar o formato e tamanho da semente, bem como as exigências da espécie quanto à umidade e luz (GUEDES *et al.*, 2010; BRASIL, 2009). Os substratos frequentemente utilizados listados pela RAS (BRASIL, 2009) incluem papel-filtro, papel-mata borrão, papel-toalha, terra vegetal e areia. Estes devem ser adequadamente umedecidos para que forneçam quantidade de água necessária à germinação das sementes.

A temperatura, para a germinação de sementes, influencia tanto a porcentagem de germinação como também a velocidade do processo germinativo. Tem influência ainda na absorção de água pela semente e reações bioquímicas que regulam o metabolismo necessário para iniciar o processo de germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). A temperatura ótima de germinação varia entre espécies, e a germinação também varia de acordo alterações de temperatura. Considera-se temperatura ótima aquela em que ocorre a máxima germinação, em um menor espaço de tempo. São consideradas ainda a máxima e a mínima (ANDRADE; PEREIRA, 1994; GUEDES *et al.*, 2010).

A temperatura de 30 °C é considerada como ótima de germinação para a *A. cearensis* independentemente da presença de luz, conforme Almeida *et al.* (2017), a qual promoveu melhores resultados quanto ao vigor, como a velocidade de germinação e comprimento de plântulas.

O vigor é uma característica ligada ao potencial fisiológico da semente em gerar uma planta robusta, saudável e vigorosa, e um dos principais parâmetros na avaliação da qualidade fisiológica. É influenciado por fatores, como genótipo, grau de umidade das sementes, variações de temperatura e período de armazenamento que, associado ao teste de germinação, pode ser referido como uma força motriz ou energia de crescimento durante o processo de germinação (MARCOS FILHO, 2005; PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015).

O vigor é uma propriedade complexa da semente que determina o seu potencial emergência, desenvolvimento rápido e uniforme perante variações das condições de campo. Pode ser considerado mais ou menos vigorosa, baseado na sua habilidade em originar plântulas normais sob certas condições subótimas. A vida útil das sementes é componente vital do vigor a qual depende do potencial de conservação fisiológica e genética das sementes bem como das condições de armazenamento (RAJJOU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015).

Os testes de vigor são utilizados, para avaliar ou detectar diferenças, na qualidade de sementes ou lotes de sementes que possuem porcentagem de germinação semelhante. Podem ser avaliados em laboratório ou em condições de campo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Dentre os testes realizados concomitantes ao teste de germinação, podem-se destacar: Índice de Velocidade de Germinação (IVG), primeira contagem de germinação, comprimento da plântula, peso da massa seca da plântula e classificação do vigor das plântulas, que são conduzidos em condições laboratoriais, e porcentagem de emergência de plântulas, velocidade de emergência de plântulas, altura de plântula e peso da massa fresca da plântula, que são realizados em campo (MARCOS FILHO, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O IVG é baseado no princípio de que lotes de sementes que apresentam maior velocidade de germinação são mais vigorosos. Na Primeira Contagem do Teste de Germinação, é registrada a porcentagem de plântulas normais no tempo determinado. Ambos são avaliados simultaneamente ao

teste de germinação. No comprimento da plântula, observam-se as diferenças entre plântulas, atribuindo valores numéricos para separar aquelas mais vigorosas (NAKAGAWA, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2015). O peso da matéria seca da plântula considera que plântulas normais com maiores pesos médios de matéria seca são mais vigorosas, uma vez que sementes vigorosas, durante a germinação, proporcionam maior transferência de seus tecidos de reserva para o eixo embrionário, originando plântulas com maior peso, em função do maior acúmulo de matéria. Quanto ao vigor de plântulas, estas podem ser classificadas em plântulas normais fortes, normais fracas e anormais (MARCOS FILHO, 1987; NAKAGAWA, 1999; GUEDES *et al.*, 2010).

Quanto aos testes realizados em campo, a porcentagem de emergência de plântulas parte do princípio de que sementes que possibilitam maior percentual de emergência, em condições não controladas, são mais vigorosas. A velocidade de emergência (IVE) de plântulas é semelhante ao IVG, em que quanto mais rápida for a emergência das plântulas no campo mais vigoroso será o lote de sementes. E a altura de plântula, comparado ao do teste comprimento da plântula, é quando lotes de sementes que produzem comprimentos ou altura de plantas maiores são mais vigorosos (MARCOS FILHO, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Teste de tetrazólio

Diversos testes podem ser aplicados para a análise da qualidade de sementes, dentre eles, o teste de tetrazólio se destaca pela sua rapidez, precisão e quantidade de informação gerada, além de promover uma diagnose mais precisa das principais causas de redução da qualidade, como alto grau de umidade, danos mecânicos, por secagem ou causados por insetos (MARCOS FILHO, 2005; PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015).

É um método rápido, para estimar a viabilidade e o vigor de sementes, com base na alteração da coloração dos tecidos vivos, em presença de uma solução de cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio, formando um composto não difusível e avermelhado, o formazan. A reação do tetrazólio reflete a atividade do sistema de enzimas desidrogenases, relacionadas à respiração e viabilidade das sementes, permitindo diferenciar o tecido que respira (vivo) do que apresenta atividade fisiológica deficiente, exibindo coloração anormal, ou tecido morto, que não colore. Os tecidos deteriorados liberam baixas quantidades de H⁺, insuficientes para que ocorra a reação normal com o sal de tetrazólio (MARCOS FILHO, 1987; MARCOS FILHO, 2005).

Vários fatores podem interferir nos resultados do teste do tetrazólio, como o preparo e pré-condicionamento das sementes, concentração da solução de tetrazólio, período e temperatura de exposição ao sal. O pré-condicionamento promove a ativação do metabolismo enzimático, facilita o preparo das sementes para o teste e a penetração da solução de tetrazólio. Pode ser realizado entre folhas de papel-toalha ou de filtro, de maneira lenta, ou imersão direta em água. Dentre as técnicas de preparo da semente utilizadas, tem-se o corte longitudinal, puncionamento, remoção do tegumento e escarificação (antes do pré-condicionamento). Dentre os já realizados em espécies florestais, a embebição em água, retirada do tegumento e corte longitudinal se destacam (MARCOS FILHO, 1987; MARCOS FILHO, 2005; ZORZAL *et al.*, 2015).

Depois de passar pelo teste de tetrazólio, as sementes são cortadas pela metade e analisadas individualmente (porção interna e externa) para detectar danos e definir o seu vigor (PEREIRA; SAITO;

BUGATTI, 2015). As áreas vitais devem ser examinadas cuidadosamente, baseando-se na morfologia e relações entre as partes constituintes das sementes. A coloração é importante indicador da viabilidade dos tecidos, em que, colorações mais escuras ou mais claras que a intensidade normal pode caracterizar a deterioração ou a inviabilidade dos tecidos, respectivamente, ou também o período excessivo ou insuficiente de exposição a solução do tetrazólio, respectivamente (MARCOS FILHO, 1987; IOSSI *et al.*, 2017).

A determinação de níveis de viabilidade e de vigor pode ser efetuada, mediante separação das sementes, em diferentes classes, durante a interpretação. Além disso, uma das principais vantagens do teste de tetrazólio é o fornecimento de informações que possibilitam identificar causas de anormalidade (MARCOS FILHO, 2015).

Envelhecimento acelerado

As sementes podem ser submetidas, experimentalmente, a tratamentos de deterioração controlada induzindo danos letais a uma taxa elevada. Conhecido como envelhecimento acelerado ou deterioração controlada, esse processo imita o envelhecimento natural das sementes, que envolve a elevação da temperatura e umidade da semente e é regularmente utilizado para a análise da qualidade de sementes (RAJJOU *et al.*, 2012).

A vida útil das sementes, em condições ideais, é predita pelo seu desempenho, em estudos simulados de envelhecimento acelerado, para desvendar os mecanismos de perda de vigor das sementes durante o armazenamento. Essas previsões dependem do pressuposto de que as sementes dentro de uma espécie respondem de forma idêntica às mudanças na temperatura e na umidade e são utilizadas para modelar o efeito das condições de armazenamento, assumindo uma resposta uniforme à temperatura e à umidade (RAJJOU *et al.*, 2008; WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010).

Condutividade elétrica

A avaliação do vigor das sementes, como complementação às informações fornecidas pelo teste de germinação, priorizando testes rápidos e relacionados aos eventos iniciais de deterioração, tem sido bastante utilizado. Dentre eles, a condutividade elétrica é um teste bastante difundido. Assim como o teste de tetrazólio, a condutividade elétrica é caracterizada como um teste bioquímico e parte do princípio de que sementes menos vigorosas, ou mais deterioradas, apresentam menor velocidade de reparo ou reestabelecimento das membranas celulares, durante o processo de embebição ou absorção de água para germinação, resultando em uma maior liberação de exsudados para o meio externo. É um teste que determina a quantidade total de íons liberados, durante a embebição e pode ser influenciado pelo volume de água de imersão, teor de água das sementes, tempo de embebição e temperatura (MARCOS FILHO, 2005; MARCOS FILHO, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015).

Dentre os lixiviados têm-se os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas, enzimas e íons inorgânicos (K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , Mn^{+2}). Nas condições de campo, a perda de exsudados, após a semeadura, reflete a perda da organização da membrana celular e da permeabilidade seletiva, o que pode estimular o crescimento de microrganismos patogênicos e prejudicar a emergência de plântulas (MARCOS FILHO, 2015).

Pereira *et al.* (2015) afirmam que o aumento do volume de água de imersão pode diminuir a

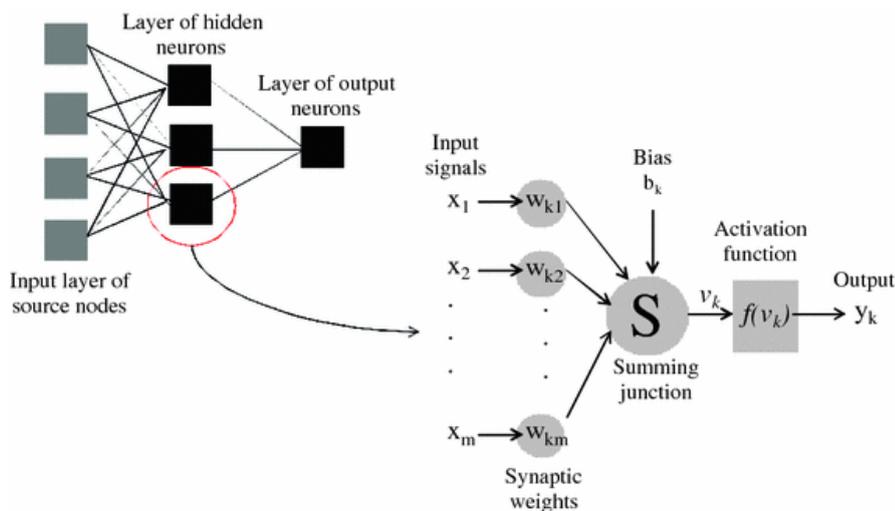
condutividade elétrica pela diluição dos exsudados, observado, principalmente em menores quantidade de sementes, uma vez que a combinação do maior volume de água com a menor quantidade de semente testados levou maior tempo para a diferenciação de lotes. Os autores afirmam, ainda, que o teste foi eficiente para na classificação de lotes de sementes de *Piptadenia moniliformis*, quando realizado com 75 sementes em 75 mL de água por 2 horas ou 50 sementes em 50 mL por 6 horas e temperatura constante de 25 °C.

Guollo *et al.* (2017) afirmam que o teste de condutividade elétrica foi eficiente, para a avaliação da qualidade de sementes de sete diferentes espécies florestais e que, para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, provenientes de espécies nativas, deve-se considerar a integração de testes, já que há grande variação morfológica de espécies.

Redes neurais artificiais

Redes neurais artificiais (RNA) são simplificações do neurônio biológico constituídas especificamente por sistema computacional (neurônios artificiais) que imitam o funcionamento do cérebro humano (BINOTI; BINOTI; LEITE, 2014). Numa rede neural artificial (FIGURA 1), os neurônios são elementos de processamento simples e cada neurônio é uma unidade de ativação em que é gerado um valor de saída. Nessas unidades, aplica-se uma determinada função matemática aos dados (função de ativação) gerando uma única resposta (SILVEIRA, 2014).

Figura 1 – Estrutura de uma rede neural artificial



Fonte: Leite *et al.* (2011).

A RNA é uma técnica de aprendizado supervisionado que possui, em sua estrutura, variáveis de entrada, que podem ser de caráter quantitativo ou qualitativo categórico, e variável de saída ou variável dependente (HAYKIN, 2001). Além disso, podem ser utilizadas na solução de problemas, proporcionando bons ajustes, operando, inclusive, com pequenas bases de dados em seu treinamento (OSÓRIO, 1999) e têm surgido como uma alternativa promissora, em diversos setores, pois apresenta bons ajustes e, diferente da regressão, consegue utilizar variáveis quantitativas e qualitativas categóricas nas modelagens.

Processamento e classificação de imagens

Pode-se definir imagem como uma função bidimensional $f(x,y)$, em que x e y são coordenadas espaciais, e a amplitude de f , em qualquer par dessas coordenadas, é caracterizada como a intensidade da imagem daquele ponto. Quando os valores dessa função são discretos e finitos, a imagem é chamada de digital. Uma imagem digital é composta de um número finito de elementos e cada elemento tem um valor e uma localização específica. Esses elementos são chamados de pixels (BOVIK, 2005).

A aquisição de imagem é realizada por meio de diferentes sensores e técnicas, que geralmente envolvem um mapeamento de uma cena 3D num espaço 2D. O número de pixels usados, para representar a imagem, e o número de níveis de quantificação usados, para representar a intensidade dos pixels, são as principais características de uma imagem. Atualmente, o processamento de imagem transformou-se numa tecnologia essencial e economicamente viável, com inúmeras aplicações nos mais diversos setores (SABANCI; TOKTAS; KAYABASI, 2017).

O processamento digital de imagem refere-se ao processamento de imagem, por meio de sistema computacional e, para entendê-lo, é necessário conhecer o processo de extração de informações, por meio de imagens, como a classificação e processamento que envolvem os processos de aquisição, pré-processamento, segmentação, extração de atributos e interpretação de dados (SILVEIRA, 2014).

O pré-processamento tem a função de melhorar a qualidade da imagem, por meio de filtros de imagem, para redução de ruído, aumento de contraste e suavização de imagem. O histograma da imagem digital é uma ferramenta do pré-processamento que consiste na distribuição estatística dos pixels de uma imagem. Se o histograma da imagem é pequeno, significa que a imagem é pouco visível, ou seja, a diferença nos níveis de cinza presentes na imagem é baixa, enquanto uma distribuição uniforme dos níveis de cinza significa maior contraste e melhor visibilidade (SILVEIRA, 2014; PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015).

A segmentação significa separar a imagem nas partes que a constituem e que se diferenciam entre si, denominando por objetos da imagem os grupos de pixels de interesse e fundo da imagem para o grupo de pixels não desejáveis, ou seja, classificar a imagem para processamento e análises. Pode ser feita, baseada no contorno “edge-based segmentation” ou baseada em regiões “region-based segmentation”. Nesta etapa, o objeto de entrada é uma imagem, mas a saída pode ser composta por um conjunto de atributos extraídos das imagens (contornos e bordas). É considerada uma das mais importantes do tratamento da informação, pois erros ou distorções cometidas, nesta etapa, refletem nas demais. Por fim, tem-se a interpretação do conteúdo da imagem (SILVEIRA, 2014). Uma das técnicas de segmentação utilizada é o Otsu (algoritmos de segmentação por thresholding), que permite melhor separação entre fundo e objeto de imagem (TININI, 2015).

Em um sistema desenvolvido, para a classificação de danos em sementes de soja, foi realizada uma etapa de registro da imagem, em que as sementes são colocadas em mesma orientação para possibilitar a classificação. Em seguida, cada imagem passa pela extração de atributos, em que as características intrínsecas são extraídas automaticamente e organizadas nos chamados vetores de recursos. Esses recursos são usados para executar a classificação de danos de cada semente, permitindo inferir sobre o vigor (PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015).

Para as etapas de extração de atributos e classificação de imagens, diferentes técnicas de

aprendizagem de máquinas podem ser empregadas. No primeiro caso, existem os descritores de cores, para a extração de atributos, baseado na frequência de diferentes intensidades de cores, algoritmos como o *Local Binary Patterns* (LBP) para textura, entre outros. Para a classificação, podem-se empregar diferentes algoritmos como *Optimum-Path Forest* (OPF), *Support Vector Machine* (SVM) e o *Random Forest* (RF), Redes Neurais Artificiais como as MLP's (MultiLayer Perceptron), lógica *Fuzzy* e sistemas híbridos como o *neuro-fuzzy* (PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015). Ainda, segundo os autores, o sistema de classificação, proposto para a avaliação de danos pelo teste de tetrazólio, em sementes de soja, utiliza essas técnicas de aprendizagem e obtiveram boa performance e classificação efetiva.

4 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E.M.D.F.L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p.325-354, 2007.
- ALMEIDA, J.P.N.D.; LESSA, B.F.D.T.; PINHEIRO, C.L.; GOMES, F.M.; MEDEIROS FILHO, S; SILVA, C.C. Germination and development of *Amburana cearensis* seedlings as influenced by seed weight, light and temperature. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 39, n. 4, p.525-533, 2017.
- ANDRADE A. D.; PEREIRA T. S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação e no vigor de sementes de cedro - *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 34-40, 1994.
- BARBERINO, R.S.; BARROS, V.R.P.; MENEZES, V.G.; SANTOS, L.P.; ARAÚJO, V.R.; QUEIROZ, M.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; PALHETA, R.C.; MATOS, M.H.T. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**, v. 24, n. 2, p.277-285, 2016.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILBORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds e Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd ed. Springer, New York. **Seed Science Research, Cambridge**, v. 23, n. 4, p. 289-289, dez. 2013.
- BINOTI, D. H. B.; DA SILVA BINOTI, M. L. M.; LEITE, H. G. Configuração de redes neurais artificiais para estimação do volume de árvores. **Revista Ciência da Madeira**, Pelotas, v. 5, n. 1, p. 58-67, mai. 2014.
- BOVIK, A. C. **Handbook of image and video processing**. 2nd edition, Academic press, 2005. 1384 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* AC Smith. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1241, 2006.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.662-666, 2010.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.
- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; BRAGA JÚNIOR, J. M.; VIANA, J. S.; COLARES, P. N. Q. Substratos e temperaturas para testes de germinação e vigor de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n.1, p.57-64, 2010.
- GUOLLO, K.; POSSENTI, J. C.; FELIPPI, M.; DEL QUIQUI, E.M.; LOIOLA, T. M. avaliação da qualidade fisiológica de sementes florestais através do teste de condutividade elétrica. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n..1, p. 86-92, jan. 2017.
- HARRINGTON, J.F.; KOZLOWSKI, T.T. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T. T. Insects, and Seed Collection, Storage, Testing, and Certification. **Seed biology, Academic Press**, v. 3, p.145-245, 1972.
- HAYKIN, S. **Redes neurais: princípios e prática**. Porto Alegre: Bookman, 2001. 900p.
- IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção**. Portaria nº. 37-N de 3 de abril de 1992. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf. Acesso em: 16 Jul. 2019.
- IOSSI, E.; MÔRO, F.V.; FERRARI, R.A.; BARBOSA, R.M.; VIEIRA, R.D. Composição química, anatomia

do embrião e viabilidade pelo teste de tetrazólio em pirênios de *Euterpe edulis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 11, n. 4, p.310-316, 2017.

LEITE, H. G.; SILVA, M. L. M.; BINOTI, D. H. B.; FARDIN, L.; TAKIZAWA, F. H. Estimation of inside-bark diameter and heartwood diameter for *Tectona grandis* Linn. trees using artificial neural networks. **European Journal of Forest Research**, v. 130, n. 2, p. 263-269, 2011.

LESSA, B.F.D.T.; SILVA, M.L.D.S.; BARRETO, J.H.; OLIVEIRA, A.B.D. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de folhas de *Amburana cearensis* e *Plectranthus barbatus* na germinação de *Amaranthus deflexus*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p.79-86, 2017.

LISBOA, F. J. N.; GUIMARÃES, I. L.; GUIMARÃES JUNIOR, J. B.; MENDES, R. F.; MENDES, L. M. Avaliação do processo de laminação de madeira de *Sclerolobium paniculatum*, *Myracrodruon urundeuva* e *Amburana cearensis*. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, n. 21, v. 11, p. 324-333, jun. 2015.

LOPES, I.S.; NÓBREGA, A.M.F.; MATOS, V. P. Maturação e colheita da semente de *Amburana cearensis* (Allem.) AC Smith. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p.565-572, jul., 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5ª ed. Nova Odessa: Inst. Plantarum, vol. 1, 248p., 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 382p. 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512p. 2002.

Loureiro, M.B.; Teles, C.A.S.; Virgens, I.O.; Araújo, B.R.N.D.; Fernandez, L.G. & Castro, R.D.D. Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de sementes e plântulas de *Amburana cearensis* (Fr. All.) AC Smith (Leguminosae-Papilionoideae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 37, n. 4, p. 679-689, 2013.

LUCIO, A. A.; ARAUJO, M. N.; SILVA, F. F. S.; DANTAS, B. F. Effect of storage in different environments and packages on germination of *Amburana cearensis* (Allemao) AC Smith. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)**, v. 1, n. 4, Nov. 2016.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

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

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 749-818 p. 2013.

MONTEIRO, R. M.; CARNEIRO, I. S.; SOUSA, F.D.; TEIXEIRA, M.J.; DOURADO, R.C.M.; MOREIRA, R.A.; MOREIRA, A.C.D.O.M. Antileishmanial Activity of Coumarin from *Amburana cearensis* Seeds. **Open Access Library Journal**, p. 4, n. 11, p.1, 2017.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 221 p.

OLIVEIRA, A. C. S.; MARTINS, G. N.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **Inter Science Place**, v. 1, n. 4, Jan. 2015.

OSÓRIO, F. S. A hybrid system for constructive machine learning. **Neurocomputing**, v. 2, n. 28, p. 191-205, 10 nov. 1999.

PEREIRA, D. F.; SAITO, P.; BUGATTI, P. H. An image analysis framework for effective classification of seed damages. In: **Proceedings of the 31st Annual ACM Symposium on Applied Computing ACM**, p. 61-66, abr. 2016.

PEREIRA, K.T.O.; AQUINO, G.S.M.; ALVES, T.R.C.; BENEDITO, C.P.; TORRES, S.B. Electrical conductivity test in *Piptadenia moniliformis* Benth. seeds. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 4, p.199-205, 2015.

PEREIRA, M. P.; JÚNIOR, A.F. M.; ROYO, V.D.A.; SIMÕES, M.O. M.; FONSECA, F.S.; FERRAZ, V.P.; OLIVEIRA, D.A.; MENEZES, E.V.; BRANDÃO, M.M. Histochemical and Phytochemical Study of *Amburana cearensis* (Fabaceae) Seed Oil. **Natural Product Communications**, v. 12, n. p.907-910, Jan./Abr., 2017.

PIMENTEL, J.V.; GUERRA, H.O. Irrigação, matéria orgânica e cobertura morta na produção de mudas de cumaru (*Amburana cearensis*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, Campina Grande - PB, v. 15, n. 9, p. 896-902, 2011.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual review of plant biology**, v. 2, n. 63, p. 507-533, 2012.

RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; GROOT, S. P.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 620-641, Sept., 2008.

RAMOS, K.M.O.; FELFILI, J.M.; FAGG, C.W.; SOUSA-SILVA, J.C.; FRANCO, A.C. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 351-358, 2004.

RODRIGUES, D. R.; BOVOLENTA, Y. R.; PIMENTA, J. A.; BIANCHINI, E. Height structure and spatial pattern of five tropical tree species in two seasonal semideciduous forest fragments with different conservation histories. **Revista Árvore**, v. 40, n.3, p. 395-405, 2016.

SABANCI, K.; TOKTAS, A.; KAYABASI, A. Grain classifier with computer vision using adaptive neuro-fuzzy inference system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3994–4000, 2017.

SANTIAGO, W.D.; CARDOSO, M.D.G; NELSON, D.L. Cachaça stored in casks newly constructed of oak (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaea caribouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*): alcohol content, phenol composition, colour intensity and dry extract. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 2, p.232-241, 2017.

SILVEIRA, D. P. **Estimação do volume de madeira empilhada utilizando imagens digitais e redes neurais**. 2014. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

SOUZA, F.B.C. **Morfologia de frutos, sementes e plântulas, a qualidade física e fisiológica de sementes de *Galesia integrifolia* (Spreng.) Harms**. Trabalho de dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, ES, 2013.

TININI, R.C.D.R. **Avaliação não destrutiva de sólidos solúveis por meio de imagens espectrais de uvas submetidas a desidratação parcial**. Tese de dissertação (departamento de Eng. Agrícola) – Unicamp, São Paulo, 2015.

TOLEDO, M. Z. FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade Fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 2, p. 124-133, abr./jun. 2009.

WALCK, J. L.; HIDAYATI, S. N.; DIXON, K. W.; THOMPSON, K. E. N.; POSCHLOD, P. Climate change and plant regeneration from seed. **Global Change Biology**, v. 17, n. 6, n. 2145-2161, 2011.

WALTERS, C., BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. A. Structural mechanics of seed deterioration: standing the test of time. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 565-573, 2010.

WANG, W. Q.; LIU, S. J.; SONG, S. Q.; MOLLER, I. M. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p. 1-15, 2015.

ZORZAL, T. A.; FANTINATO, D. E.; CAMPOS, L. M.; LUZ, A. C. C.; CORTE, V. B. Teste do tetrazólio para estimativa da viabilidade de sementes. **Natureza online**, v. 13, n. 3, p. 144-149, 2015.

5 ARTIGO

5.1 Artigo 1: ADEQUAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. SMITH (FABACEAE)

Este artigo foi elaborado conforme normas do periódico Journal of seed science

ADEQUAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. SMITH (FABACEAE)

TETRAZOLIUM TEST IN THE EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL QUALITY OF *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. SMITH (FABACEAE) SEEDS

M.R.SANTOS ^(a), A.M.AZEVEDO ^(b), A. S. NOGUEIRA^(c), A.C.GONÇALVES ^(a), D.S.BRANDÃO JÚNIOR ^(b)

^(a) Estudante de pós-graduação ICA-UFMG, Montes Claros, MG, ^(b) Professor da Universidade Federal de Minas Gerais ICA /UFMG; Montes Claros, MG; ^(c) Estudante de graduação da Universidade Federal de Minas Gerais ICA/UFMG; Montes Claros, MG; Brasil.

Autor correspondente: D.S.BRANDÃO JÚNIOR. E-mail: delacyr@hotmail.com

ADEQUAÇÃO DO TESTE DE TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. SMITH (FABACEAE)

RESUMO

Conhecer sobre estruturas, qualidade fisiológica e os fatores que afetam o poder germinativo e vigor de sementes é fundamental para produção de sementes de espécies nativas florestais para as mais diversas finalidades, seja produção de mudas, conservação in ou ex-situ. Além disso, frequentemente é necessária a rápida tomada de decisão e o emprego de técnicas eficientes é fundamental. E dentre os procedimentos empregados, para avaliar a qualidade de sementes, o teste de tetrazólio se destaca pela sua rapidez, precisão e quantidade de informações geradas das principais causas de redução da qualidade. *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) é uma espécie supra explorada nos locais de ocorrência, bastante utilizada na produção de medicamentos populares e empregada na indústria madeireira. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, estabelecer o procedimento adequado para o teste de tetrazólio em sementes de *A. cearensis*, aplicá-lo na avaliação da qualidade de diferentes lotes de sementes da espécie e correlacionar com testes de qualidade física e fisiológica. Para isso, testaram-se dois métodos de pré-preparo (sementes escarificadas e sem escarificação) em três temperaturas de embebição (30, 35 e 40 graus). As sementes foram expostas na solução de tetrazólio a 0,05%/2:30 horas a 30°C. O delineamento experimental utilizado foi o DIC em esquema fatorial duplo 3x2 (Fator A: pré-preparo e Fator B: temperaturas), e as sementes foram classificadas em vigorosas, viáveis e inviáveis. O melhor tempo de embebição e método de preparo foi aplicado na avaliação da qualidade fisiológica de três lotes de sementes (Lotes I, II e III). Os lotes foram caracterizados, por meio de testes de qualidade física (biometria, umidade e peso de 1000 sementes), teste de germinação conduzido em bandejas utilizando substrato areia a 60% da capacidade de campo, e concomitante, a 1ª contagem, IVE, G%, comprimento (cm) e massa (g) de epicótilo e do eixo hipocótilo-radícula, condutividade elétrica e envelhecimento acelerado. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de média quando necessário e os parâmetros correlacionados por meio do programa estatístico *R studio*. Quanto à padronização do teste, houve diferença estatística para o Fator A com melhor resultado para sementes escarificadas. Não houve diferença estatística entre as temperaturas testadas e não houve interação entre os fatores. Quando aplicado na avaliação dos lotes, o lote I apresentou a maior porcentagem de sementes viáveis, mas não houve diferenças estatísticas entre os lotes quanto ao vigor. O lote I se destacou quanto aos testes de qualidade física e fisiológica. Houve correlação significativa positiva entre Tz viabilidade e Tz vigor em relação aos parâmetros de qualidade física e fisiológica. O procedimento utilizando sementes escarificadas e embebidas em água por 24 horas a 30°C, com posterior remoção do tegumento e exposição na solução de tetrazólio a 0,05%/2:30 horas a 30°C é eficiente na avaliação da viabilidade de sementes de *A. cearensis*.

Palavras-chave: umburana, germinação, vigor, florestal.

INTRODUÇÃO

Amburana cearensis A.C. Smith é uma espécie florestal nativa brasileira, pertencente à família Fabaceae. Popularmente conhecida por diversas designações, como amburana, umburana, imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru, é amplamente distribuída nas terras áridas da América do Sul. No Brasil, ocorre nos biomas da caatinga e cerrado bem como em floresta tropical (LORENZI; MATOS, 2002; LUCIO *et al.*, 2016). Pode ser empregada, para uma diversidade de usos, como, na movelaria fina, esculturas e marcenaria em geral e, na medicina popular, para a confecção de medicamentos destinados ao tratamento de afecções pulmonares, tosse, asma, bronquite e coqueluche (LORENZI; MATOS, 2002).

Por suas propriedades medicinais e potencial de bioprospecção, a espécie vem sendo amplamente estudada, e diversas substâncias secundárias, como: cumarina, alcaloides, ácidos graxos e fenólicos, já foram isoladas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010) da casca do caule (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007), da folha (BARBERINO *et al.*, 2016) e da semente (PEREIRA *et al.*, 2017; MONTEIRO *et al.*, 2017). Entretanto, em virtude da supra exploração da espécie, nos locais de ocorrência, esteve listada como espécie ameaçada de extinção (IBAMA, 2008) e espécie de valor econômico com declínio verificado ou projetado (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Diversos testes podem ser aplicados para a análise da qualidade de sementes, dentre eles, o teste de tetrazólio se destaca pela sua rapidez quando comparado ao teste de germinação, precisão e quantidade de informação gerada. Além de promover uma diagnose mais precisa das principais causas de redução da qualidade, como alto grau de umidade e danos: mecânicos, de secagem ou os causados por insetos, o teste não é afetado pela dormência (MARCOS FILHO, 2005; PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2016).

É um método que permite estimar a viabilidade e o vigor de sementes, com base na atividade de enzimas desidrogenases e alteração da coloração de tecidos vivos, que, na presença da solução do cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio, forma um composto não difusível e avermelhado: o formazan. Por outro lado, tecidos deteriorados liberam baixas quantidades de H⁺ insuficientes para que ocorra a reação normal com o sal de tetrazólio. Dessa forma, é possível diferenciar o tecido que respira (vivo) do que apresenta atividade fisiológica deficiente com coloração anormal, ou tecido morto que não colore (MARCOS FILHO, 1987; MARCOS FILHO, 2005; MARCOS FILHO, 2015).

Ainda, de acordo com os autores, alguns fatores podem interferir nos resultados do teste, como o preparo e pré-condicionamento das sementes, concentração da solução de tetrazólio, período e temperatura de exposição ao sal. O pré-condicionamento pode ser realizado entre folhas de papel, de maneira lenta, ou imersão direta em água, que promove a ativação do metabolismo enzimático, facilita o preparo das sementes para o teste e a penetração da solução de tetrazólio.

As sementes são cortadas pela metade e analisadas individualmente (porção interna e externa) no intuito de detectar danos e definir o seu vigor (PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015). As áreas vitais devem ser examinadas, com cuidado, baseando-se na morfologia e relações entre as partes constituintes das sementes. E a coloração é importante indicador da viabilidade dos tecidos, uma vez que, colorações mais escuras podem caracterizar a deterioração ou período excessivo de exposição ao sal, e as mais claras podem caracterizar inviabilidade dos tecidos ou período insuficiente de exposição (MARCOS FILHO, 1987; IOSSI *et al.*, 2017).

Diversos trabalhos têm sido publicados com a adequação do teste de tetrazólio, para diferentes

espécies florestais. Dentre os já realizados, a embebição em água retirada do tegumento e corte longitudinal se destacam como técnicas de preparo da semente (DANTAS; MATIAS & RIBEIRO, 2015; ZORZAL *et al.*, 2015). Lamarca *et al.* (2009) recomendam duas horas de incubação a 0,05% ou 0,075% a 35 °C para o pau brasil (*Caesalpinia echinata*). Fogaça *et al.* (2011) sugerem sementes escarificadas e embebidas em água a 35 °C, por 24 horas para a copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e a 48 horas, para guapuruvu (*Schizolobium parahyba*), com posterior retirada do tegumento e incubação, na solução de tetrazólio a 0,2% (copaíba) e 0,1% (guapuruvu), por 4 horas a 35°C. Já Oliveira, Carvalho & Nery (2005) recomendam a embebição entre papéis por 12 horas, retirada do tegumento e imersão, na solução de tetrazólio a 0,5%, para o ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e 0,07%, para o ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), por 12 horas a 30°C.

Dessa forma, conhecer sobre as estruturas e os fatores que afetam o poder germinativo e vigor de sementes, por meio de técnicas eficientes, é fundamental. Considerando a grande diversidade de espécies florestais nativas encontradas, em contraste com o setor agrícola, ainda são escassas as informações sobre adequação e padronização de procedimentos e parâmetros para avaliar a qualidade de sementes. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho estabelecer o procedimento adequado, para o teste de tetrazólio em sementes de *A. cearensis*, aplicar à avaliação da qualidade de diferentes lotes de sementes da espécie e correlacionar com testes de qualidade física e fisiológica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Sementes (LAS) do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado em Montes Claros – Minas Gerais, no segundo semestre de 2018. Para adequação do teste de tetrazólio, foram utilizadas sementes de *A. cearensis*, adquiridas em comércio de Montes Claros, provenientes de municípios pertencentes ao Norte de Minas Gerais. Para a aplicação do procedimento padronizado do tetrazólio, testes de qualidade física e fisiológica foram utilizados três lotes de sementes de *A. cearensis* de diferentes procedências: um lote de sementes coletadas em outubro de 2017 de três árvores matrizes localizadas no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais - Montes Claros-MG (lote I) e dois lotes adquiridos de diferentes comerciantes (lotes II e III) em Montes Claros – MG, provenientes de municípios da região Norte do estado. Os lotes foram armazenados em câmara fria a 10° C até o início das análises.

2.1 Adequação do teste de Tetrazólio

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial duplo. Os tratamentos constituíram-se de sementes escarificadas, na região oposta ao eixo embrionário (hilo), e sementes não escarificadas (Fator A), submetidas a três temperaturas de embebição: 30°C, 35°C e 40°C (Fator B) por 24 horas. Por meio de testes preliminares definiram-se a temperatura e o tempo de imersão na solução de tetrazólio e priorizou-se a menor concentração da solução. A exposição do embrião ocorreu pela retirada do tegumento os quais foram incubados na solução de 2,3,5 - trifenil cloreto de tetrazólio à concentração de 0,05%, durante 2,5 horas a 30°C. Após a coloração, as sementes foram lavadas em água corrente. A avaliação ocorreu de forma individual e levou em consideração a intensidade da coloração vermelha, ao longo das estruturas vitais, tanto na

parte externa (face posterior) como na parte interna (face anterior) do embrião, após separação dos cotilédones, no intuito de verificar a ocorrência de danos: em termos de profundidade, localização e extensão. As sementes foram classificadas em classes de vigor e viabilidade, baseando-se em Paraíso *et al.* (2019).

Classe I - sementes viáveis e vigorosas sem a presença de danos.

Classe II - sementes viáveis e vigorosas com a presença de danos iniciais em tecidos não vitais (até aproximadamente 10%).

Classe III - sementes viáveis com menos de 50% de dano na região cotiledonar.

Classe IV – sementes inviáveis que apresentam morte do eixo embrionário, mais de 50% do cotilédone danificado, embrião vivo com cotilédone morto ou sementes mortas.

Estimou-se a porcentagem de sementes pertencente a cada classe, em que a porcentagem de sementes vigorosas corresponde às classes I e II, a porcentagem de sementes viáveis é correspondente às classes I, II e III e a porcentagem de sementes inviáveis corresponde à classe IV.

2.2 Aplicação do Teste de tetrazólio para a avaliação de viabilidade e vigor

A fim de avaliar a eficiência da metodologia padronizada do tetrazólio, o teste foi aplicado para avaliação da qualidade dos três lotes de sementes de *A. cearensis*. Para cada lote, utilizaram-se quatro repetições de 25 sementes que foram pré-condicionadas com imersão total em água destilada a 30°C por 24 horas. Após a remoção do tegumento, as sementes foram submetidas à solução de 2,3,5 - trifenil cloreto de tetrazólio, na concentração de 0,05%/2h30 e avaliadas, conforme as classes de vigor, viabilidade e inviabilidade descritas anteriormente.

2.3 Caracterização da qualidade física e fisiológica

Paralelamente à adequação do teste de tetrazólio, para a comparação dos resultados, os lotes de sementes foram submetidos aos testes de qualidade física e fisiológica. A caracterização da qualidade física envolveu quatro repetições de 25 sementes por lote, sendo realizados os testes: grau de umidade - realizado pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2009); biometria - realizado por meio de paquímetro digital, computando o comprimento, largura e espessura das sementes e peso de 1000 sementes - determinado pela contagem ao acaso de quatro subamostras de 100 sementes pesadas, em balança analítica de precisão (0,0001g); o resultado foi expresso em gramas e extrapolado para 1000 sementes seguindo os critérios estabelecidos na RAS (BRASIL, 2009).

A caracterização da qualidade fisiológica envolveu os testes de germinação e vigor. Para a germinação, utilizaram-se cinco repetições de 20 sementes por lote que foram previamente desinfestadas pela imersão em hipoclorito de sódio a 2% por 3 minutos. O teste de germinação foi realizado em bandejas, utilizando o substrato areia a 60% da sua capacidade de campo e conduzido, em câmara do tipo BOD, regulada à temperatura constante de 30°C e fotoperíodo de 8 horas. Como o substrato utilizado, para o teste de germinação, foi areia, a primeira contagem de germinação foi realizada no 8º dia, adotando como critério a protrusão da raiz primária e do epicótilo (CUNHA & FERREIRA, 2003; GUEDES *et al.*, 2013). A contagem final foi realizada no 18º dia, após a semeadura e foram determinadas o número de plântulas normais com todas as estruturas essenciais presentes e saudáveis, plântulas anormais e sementes não germinadas (mortas ou duras), conforme a RAS

(BRASIL, 2009; GUEDES *et al.*, 2013).

Ao final do teste, contabilizou-se a porcentagem de germinação, correspondente ao número de plântulas normais, o IVE (Índice de Velocidade de Emergência), conforme Maguire (1962), comprimento (por meio de régua) e massa seca dos eixos hipocótilo-radícula e epicótilo. Para a obtenção da massa seca, após pesagem da massa fresca, as plântulas normais foram secas, em estufa regulada a 65°C até atingir peso constante (48 horas), dentro de sacos de papel kraft. Ao final, as amostras foram pesadas para a obtenção da massa seca expressa em gramas.

2.4 Envelhecimento acelerado

Para avaliar o envelhecimento acelerado, quatro repetições de 25 sementes por lote foram distribuídas em camada única sobre uma tela inox e colocadas em caixas plásticas do tipo gerbox (11cm x 3cm), contendo 40mL de água destilada no fundo. Em seguida, foram submetidas ao envelhecimento acelerado, em câmara do tipo BOD, regulada à temperatura constante de 41°C por 72 horas com 100% de umidade relativa do ar (GUEDES *et al.*, 2010A). Decorrido o tempo de envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação em papel *germitest* e teste de umidade. Os dados foram transformados por meio da transformação angular:

$$(\text{Germinação transformada} = \text{ArcSen} \sqrt{\text{Germinação}(\%)/100}).$$

2.5 Condutividade elétrica

Foram utilizadas cinco repetições de 10 sementes por lote. Houve uma pré-seleção das sementes, retirando da amostra aquelas que estavam danificadas. Posteriormente, as sementes foram pesadas em balança analítica de precisão (0,0001g) e submetidas à embebição, em copos descartáveis, contendo 75 mL de água ultrapura. As amostras foram mantidas em germinador a uma temperatura de 25°C. A leitura da condutividade elétrica da solução de embebição procedeu-se aos períodos de 0 (controle), 12, 24, 36, 48 e 60 horas, por meio de condutímetro, resultado expresso em $\mu\text{S cm}^{-1}$. Os dados foram analisados, por meio da análise de regressão, utilizando o programa estatístico R com auxílio do pacote *ExpDes*, em que foram testados os modelos de regressão linear, cúbico e quadrático, selecionando o que melhor se ajustou.

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos do teste de tetrazólio, germinação e envelhecimento acelerado foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e teste de homogeneidade Bartlett. Procedeu-se a análise de variância dos dados considerando o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), e quando significativos foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Estimou-se a correlação de Pearson entre o teste de tetrazólio e os parâmetros de qualidade física e fisiológica, sendo descritas graficamente somente as correlações significativas que apresentavam coeficiente de determinação (R^2) igual ou superior a 0,55. Linhas verdes representam correlação positiva, vermelha correlação negativa e a espessura da linha representa a magnitude da correlação. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico *R studio* utilizando o pacote *ExpDes*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema adotado para a separação das sementes de *A. cearensis* em classes de vigor e viabilidade após o teste de tetrazólio está disposto na Figura 1. As sementes viáveis apresentaram coloração variando do rósea ao vermelho brilhante de maneira uniforme, enquanto os embriões inviáveis apresentaram colorações marrom e branca. Como um dos primeiros sinais da deterioração é a perda da integridade das membranas, o aumento na reação do tetrazólio nos tecidos gera coloração vermelha mais intensa. Por outro lado, a inexistência de atividade metabólica dos tecidos não permite a reação com o sal. Portanto, tecido branco ou marrom, como encontrado nesse experimento, indicam tecido morto (IOSSI *et al.*, 2017; SILVA; BARBOSA & VIEIRA, 2012).

Na Tabela 1 encontram-se as médias da análise de vigor e viabilidade das sementes de *A. cearensis* para a padronização do tetrazólio. O modo de preparo das sementes, sem escarificação e escarificadas, foi significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$), apresentando melhores resultados de vigor e viabilidade, para as sementes escarificadas previamente à imersão em água. Entretanto, as médias das diferentes temperaturas testadas não diferiram estatisticamente entre si e não houve interação significativa entre os fatores (APÊNDICE A).

O pré-umedecimento utilizando sementes intactas não possibilitou a remoção do tegumento em nenhuma das temperaturas testadas. Verificou-se que a absorção de água foi comprometida e os tegumentos apresentaram-se rígidos, exigindo maior força para retirá-los, o que levou a danos no embrião comprometendo principalmente o eixo embrionário. Esse fato contradiz o relatado por Guedes *et al.* (2010B) para sementes da espécie, em que embebição de sementes intactas, na temperatura de 35°C, favoreceu a remoção dos tegumentos sem prejudicar os embriões.

Os resultados de viabilidade e vigor demonstram que o pré-umedecimento com imersão direta em água por 24 horas, utilizando sementes escarificadas, foi eficaz para a remoção dos tegumentos nas três temperaturas testadas. O pré-umedecimento, previamente à imersão na solução de tetrazólio, faz-se necessário, para que ocorra a ativação do metabolismo e do sistema enzimático da semente e, assim, possibilitar a absorção do tetrazólio e coloração uniforme dos tecidos (MARCOS FILHO, 2005). A utilização de sementes intactas torna a absorção de água lenta pelo fato de o tegumento estar mais aderido à semente. A escarificação é, portanto, um importante método para diminuir o tempo de embebição, facilitar a exposição do embrião e viabilizar a rapidez do teste de tetrazólio.

Apesar de não haver diferença estatística entre as médias de viabilidade e vigor para as temperaturas testadas, observou-se que o maior percentual de sementes inviáveis, em decorrência de danos, sobretudo, no eixo embrionário, ocorreu na temperatura de 40 °C. Isso pode estar relacionado à maior velocidade de absorção de água, em razão do aumento da temperatura, danificando os tecidos. Contudo, a temperatura de 40 °C, além de provocar danos ao embrião, não favoreceu a remoção dos tegumentos das sementes intactas.

Os resultados da porcentagem de sementes viáveis e vigorosas pelo teste de tetrazólio, em diferentes lotes de *A. cearensis*, aplicando a metodologia padronizada com pré-umedecimento a 30°C/24 horas e incubação na solução de tetrazólio a 0,05% em 30°C durante 2:30 horas, estão dispostos na Tabela 2. Não houve diferença estatística entre os lotes ao nível de vigor. No entanto, diferença estatística pode ser observada entre os lotes quanto à viabilidade (APÊNDICE B), permitindo separar o lote III, de menor qualidade, dos demais (I e II).

A escolha do procedimento adequado deve considerar o menor tempo gasto, para a coloração, bem como menores concentrações do reagente, viabilizando menor custo, uma vez que concentrações mais baixas são mais indicadas por permitirem melhor identificação de possíveis lesões (CARVALHO *et al.*, 2017). Os referidos autores recomendam, para a realização do teste em *Libidibia ferrea* - pau ferro (Fabaceae), a remoção do tegumento e incubação na concentração de 0,05% por 3 horas a 35 ou 40°C. Enquanto Ferro *et al.* (2019) recomendam as concentrações de 0,075% e 0,1%, em temperatura de 30°C durante 2 horas, para avaliar a viabilidade de sementes de *Caesalpinia pulcherrima* (Fabaceae).

Na Tabela 3 estão contidos os dados referentes à caracterização da qualidade física dos lotes de *A. cearensis*, em que se observa diferença estatística entre eles, com destaque ao lote I quanto aos dados de biometria e peso de 1000 sementes. Quanto ao teor de água, o lote II apresentou média superior a 1,5% se diferindo estatisticamente dos demais. Por outro lado, os lotes I e III apresentaram padrão de umidade semelhante, o que é importante para a obtenção de resultados mais uniformes. Diferenças entre 1 e 2%, nos teores de água, não são considerados comprometedores, por outro lado, diferenças acentuadas podem interferir na uniformidade dos testes e na velocidade de deterioração das sementes (Marcos Filho, 1999).

Para a biometria de sementes, houve diferenças estatísticas entre os lotes, apresentando comprimento em torno de 13,71 a 17,05 mm e largura entre 10,42 a 11,60 mm. Esses valores condizem com o relatado por Cunha & Ferreira (2003) para sementes da espécie, com comprimento variando de 12,55 mm a 17,55 mm e a largura de 8,35 mm a 11,50 mm. Em termos médios, possui 14,4 mm de comprimento, 10,4 mm de largura e 4,7 mm de espessura (LOUREIRO *et al.*, 2013). O peso de 1000 sementes foi o mais eficiente na distinção dos lotes, em que os lotes I e III apresentam-se com maior e menor peso, respectivamente.

A porcentagem de germinação e os resultados dos testes de vigor estão dispostos na Tabela 4. Houve diferença estatística entre os lotes para todos os testes realizados, e o lote I se destaca quanto aos parâmetros avaliados. Embora a porcentagem de germinação não tenha diferenciado os lotes I e II, constataram-se diferenças significativas para as médias de vigor. Tal fato corrobora com o proposto por Marcos Filho (2005), em que valores semelhantes no teste de germinação não necessariamente refletem em alto vigor, por ser um teste realizado em condições controladas de temperatura e umidade. Isso evidencia a importância de testes complementares de vigor para avaliar a qualidade de sementes, já que a germinação é a última característica fisiológica afetada pelo processo de deterioração, não sendo eficiente para detectar diferenças entre lotes de sementes (GUOLLO *et al.*, 2017).

Todos os lotes se diferenciaram estatisticamente quanto à matéria seca do eixo hipocótilo-radícula, em que o lote I é o mais vigoroso, sendo a variável mais sensível, como também mais promissora na estratificação dos lotes em diferentes níveis de vigor. Por outro lado, o lote II obteve maiores índices para o IVE e 1ª contagem, o que pode estar relacionado com o tamanho e o peso das sementes.

Almeida *et al.* (2017) relatam que as sementes mais leves de *A. cearensis* obtiveram maior velocidade de germinação, em relação às mais pesadas, por necessitarem de maior tempo para a absorção de água e iniciar o processo de germinação devido a relação superfície/volume. Os autores relatam, ainda, que as sementes maiores apresentaram menor taxa de germinação o que pode estar relacionado aos maiores teores de cumarina, conhecida pelo seu potencial alelopático em outras

espécies (LESSA *et al.*, 2017). A menor velocidade de emergência do lote III, pode estar associada ao seu menor vigor, pois sementes menos vigorosas levam mais tempo para organização do sistema de membranas e translocação de reservas, conseqüentemente, mais tempo para iniciar o processo de germinação (PINTO *et al.*, 2015).

A matéria seca de plântula pode estar associada à massa seca do tecido de reserva da semente e sua transferência para o eixo embrionário. Sementes menores, por necessitarem de menor quantidade de água, são as primeiras a germinar, exibindo, assim, maior velocidade de emergência que aquelas de maior tamanho, que por sua vez, produzem plântulas mais vigorosas, provavelmente porque possuem maior quantidade de material de reserva (SNIDER *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2019; ARANTES *et al.*, 2019). Esse fato pode ser confirmado pela correlação positiva e significativa (FIGURA 3) entre a massa seca do eixo hipocótilo-radícula, em relação ao comprimento e peso de 1000 sementes, com valores de 0,913 e 0,955, respectivamente (APÊNDICE E).

O teor de água e a porcentagem de germinação das sementes submetidas ao envelhecimento acelerado estão dispostos na Tabela 5. Como se pode observar, as sementes dos lotes II e III obtiveram as menores porcentagens de germinação, em relação as do lote I, após submetidas ao envelhecimento. Quanto ao teor de água antes de submeter ao teste, o lote II apresentou o maior teor, diferenciando-se dos demais. Por outro lado, após o tempo de envelhecimento, o lote I apresentou o menor teor de água em relação aos demais lotes.

Lotes de sementes com diferenças menos perceptíveis de vigor podem exibir comportamento distinto no processo de armazenamento ou na emergência em campo (realizada em condições não favoráveis). E o envelhecimento acelerado é um teste de vigor realizado para avaliar a tolerância das sementes ao estresse, fornecendo informações acerca do potencial de armazenamento. Em que a temperatura e a umidade são os fatores mais importantes que afetam a qualidade de sementes durante o seu armazenamento (MARCOS FILHO, 2015).

Contudo, para os dados do teste de envelhecimento acelerado, o tempo de envelhecimento de 72 horas a 41 °C permitiu detectar diferenças acentuadas na porcentagem de germinação entre os lotes de qualidade fisiológica menos contrastante (I e II). E a baixa porcentagem de germinação do lote II pode estar associada ao maior teor de água das suas sementes.

Guedes *et al.* (2013B), trabalhando com *Erythrina velutina* (mulungu) – Fabaceae, também afirmam que a combinação de 41°C/72 horas foi eficiente para avaliar o vigor de sementes da espécie. Flávio & Paula (2010) também afirmam que o tempo de 72 horas e temperatura de 45°C foram adequados para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *Dictyoloma vandellianum* (tingui-preto) - Rutaceae.

Observa-se, para a umidade das sementes, após o teste de envelhecimento acelerado, variações consideráveis entre os lotes, no qual o lote I apresentou o menor teor de água (27,68%), o que pode estar relacionado com o tamanho e massa das sementes, já que este lote sobressaiu quanto a estes critérios (TABELA 3). Flávio & Paula (2010), relatam que o tamanho das sementes pode influenciar nos resultados, que em testes preliminares com a espécie *Dictyoloma vandellianum* observaram que a utilização da massa fresca, como critério para compor a repetição, em vez do número de sementes, proporcionou menor variação dos resultados.

Na Figura 2, encontra-se o gráfico com a equação de regressão para a condutividade elétrica

(CE) dos três lotes. Os resultados apontam altos coeficientes de determinação, denotando alta associação entre o tempo e o teor de lixiviados, constatado pelo aumento no valor de CE no decorrer do tempo de embebição, sendo mais expressivo para o lote III em relação aos demais. Sementes mais deterioradas, durante o processo de embebição de água para germinação, apresentam menor velocidade de reparo da membrana celular, liberando assim maior quantidade de lixiviados para o meio (MARCOS FILHO, 2015).

Para o tempo de embebição de 12 horas não houve diferença estatística entre os lotes (APÊNDICE D). Nos demais tempos de embebição, o teste de condutividade elétrica foi eficiente para separar a qualidade do lote mais contrastante (III) dos demais, mas sem eficiência para distinguir o vigor dos lotes I e II, que apresentam diferenças menos perceptível na qualidade fisiológica, conforme demonstrado pelos testes de tetrazólio e germinação. Esse mesmo comportamento foi observado por Santos & Paula (2009) em sementes de *Sebastiania commersoniana* (branquilho) usando dois tempos de embebição (2 e 24 horas).

Tendo em vista que os testes de laboratório nem sempre detectam diferenças menos acentuada entre lotes de alta qualidade, e, considerando ainda o tempo necessário para a execução do teste de emergência, o teste de condutividade elétrica é um dos mais recomendados devido ao menor tempo e facilidade de execução, a fim de prever a emergência em campo (PEREIRA *et al.*, 2015), além de bastante indicado para espécies da família Fabaceae que possuem sementes de grandes cotilédones. Visto que, mesmo apresentando consideráveis áreas de tecido morto, desde que não afete as regiões críticas do embrião, ainda germinam em condições favoráveis de laboratório (MATTHEWS & POWELL, 2006).

A temperatura e o tempo de embebição, grau de umidade e número de sementes estão entre os fatores que podem afetar os resultados do teste de CE, uma vez que lotes de sementes de qualidade parecida ou de maior tamanho, a utilização de um maior tempo de embebição pode ser necessário para a distinção da qualidade, enquanto que, para lotes com diferenças mais acentuadas de vigor ou de sementes pequenas, um menor tempo de embebição pode ser utilizado para diferenciá-los (MARQUES, PAULA & RODRIGUES, 2002).

Além disso, Pereira *et al.* (2015) observaram que independentemente do número de sementes utilizado, os maiores valores de CE foram observados para os menores volumes de água em sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. Medeiros, Pádua & Pereira (2017) verificaram redução nos valores de CE, para maior volume de água, e a utilização de maior número de sementes permitiu melhor diferenciação dos lotes de *Moringa oleifera*. Contudo, Dalanhol *et al.* (2014) relatam que, para o maior volume de água e menores quantidades de sementes, maior será o efeito de diluição, e em consequência, maior variação da CE e do coeficiente de variação.

Mesmo o maior tempo de embebição testado (60 horas) não foi eficiente na separação dos lotes I e II, o que pode ser atribuído, provavelmente, ao volume de água e número de sementes por repetição utilizados. Todavia, o uso da CE, utilizando 10 sementes em 75 mL de água por 24 horas pode ser utilizada para a separação de vigor de sementes de *A. cearensis* de lotes mais contrastantes (APÊNDICE D). Resultados semelhantes são reportados por Araújo *et al.* (2011), com melhores resultados para sementes de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão), utilizando 15 sementes diluídas em 75 mL de água após 6 horas de embebição.

A representação gráfica das estimativas dos coeficientes de correlação linear entre o teste de tetrazólio (TZ vigor e TZ viabilidade) e os testes de qualidade física, de germinação e vigor está disposta na FIGURA 3. Houve correlação significativa entre os parâmetros, evidenciando alta associação entre essas características. Tanto as variáveis referentes à qualidade física quanto as de qualidade fisiológica apresentam alta associação com o tetrazólio, confirmando a eficácia do teste em avaliar a qualidade de sementes de *A. cearensis* de diferentes lotes.

Amoedo & Ferraz (2017) obtiveram, para o tetrazólio em relação a dois critérios de germinação, protrusão radicular e plântula normal, coeficiente de correlação linear de 0,848 e 0,792 para *Carapa guianensis*, e 0,910 e 0,918 para *Carapa surinamensis*, respectivamente. Lazarotto *et al.* (2011) também relatam correlação positiva e significativa entre o tetrazólio e germinação para sementes de *Ceiba speciosa* (paineira).

O alto coeficiente de correlação entre Tz viabilidade e a porcentagem de germinação (APÊNDICE E) confirmam a eficiência do teste de tetrazólio ao avaliar a viabilidade de sementes, relativo ao seu potencial de germinação. A viabilidade do teste de tetrazólio avalia tecidos viáveis da semente que tem potencial de germinar sob condições ótimas, enquanto o Tz vigor está relacionado ao potencial de vigor da semente, importante variável na estimativa de emergência em condições de campo e capacidade de gerar plântulas normais e uniformes. Contudo, testes de vigor, como o Tz vigor e aqueles provenientes do teste de germinação, são essenciais, já que o Tz viabilidade e germinação podem não estar bem relacionados com a emergência em campo sob condições não favoráveis (MARCOS FILHO, 2015).

Nota-se que, pelo teste de tetrazólio, não foi possível a estratificação dos lotes quanto ao vigor, no entanto esta variável apresentou altos coeficientes de correlação com os testes de vigor do teste de germinação, principalmente a massa seca e comprimento de epicótilo e hipocótilo (APÊNDICE E). Por outro lado, o peso de 1000 sementes e a massa seca de hipocótilo foram as variáveis mais eficazes na estratificação dos lotes em diferentes níveis de qualidade física e fisiológica, respectivamente.

4 CONCLUSÕES

O teste de tetrazólio é eficiente na avaliação da viabilidade de sementes de *A. cearensis*, pré-acondicionadas escarificadas e embebidas em água por 24 horas à temperatura de 30°C, com posterior remoção do tegumento e imersão na solução de tetrazólio na concentração de 0,05% por 2h:30 e temperatura de 30°C.

O pré-umedecimento, utilizando sementes intactas, não possibilita a remoção do tegumento nos tempos e temperaturas testados.

A avaliação da viabilidade e vigor pode ser efetuada, mediante a separação visual das sementes de *A. cearensis* submetidas ao teste de tetrazólio, em quatro classes, sendo Classe I: viáveis e vigorosas - sem presença de danos; classe II: viáveis e vigorosas - com presença de danos iniciais de até 10% da região cotiledonar; classe III: viáveis e não vigorosas com presença de danos em até 50% do cotilédone e classe IV: sementes não viáveis e mortas: embrião com vermelho intenso indicando tecido em deterioração intensa, mais de 50% da região cotiledonar e embrião morto, eixo embrionário branco indicando tecido morto, embrião com coloração mais clara que a normal e semente morta. Portanto,

viáveis as sementes das classes I, II e III, vigorosas as das classes I e II e não viáveis as da classe IV.

Agradecimentos

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

5 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E.M.D.F.L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p.325-354, 2007.
- ALMEIDA, J.P.N.D.; LESSA, B.F.D.T.; PINHEIRO, C.L.; GOMES, F.M.; MEDEIROS FILHO, S; SILVA, C.C. Germination and development of *Amburana cearensis* seedlings as influenced by seed weight, light and temperature. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 39, n. 4, p.525-533, 2017.
- AMOEDO, S.C.; FERRAZ, I.D.K. Seed quality evaluation by tetrazolium staining during a desiccation study of the recalcitrant seeds of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa surinamensis* Miq.-Meliaceae. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 12, p.1005-1013, 2017.
- ARANTES, C.R.D.A.; FAVA, C.L.F.; CAMILI, E.C.; SCARAMUZZA, W.L.M.P. Seed Germination and Seedling Vigor of *Magonia pubescens*. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 4, 2019.
- ARAÚJO, R.F.; ZONTA, J.B.; ARAÚJO, E.F.; DONZELES, S.M.; COSTA, G.M. Teste de condutividade elétrica para sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Idesia (Arica)**, v. 29, n. 2, pp.79-86, 2011.
- BARBERINO, R.S.; BARROS, V.R.P.; MENEZES, V.G.; SANTOS, L.P.; ARAÚJO, V.R.; QUEIROZ, M.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; PALHETA, R.C.; MATOS, M.H.T. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**, v. 24, n. 2, p.277-285, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n.2, p.326-342, 2010.
- CARVALHO, S.M.C.; TORRES, S.B.; BENEDITO, C.P.; NOGUEIRA, N.W.; SOUZA, A.A.T.; SOUZA NETA, M.L.D. Viability of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea*) seeds by tetrazolium test. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 1, p.7-12, 2017.
- CUNHA, M.D.C.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) AC Smith-Cumaru-Leguminosae Papilionoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 2, p.89-96, 2003.
- DALANHOL, S.J.; REZENDE, E.H.; ABREU, D.C.A.D.; NOGUEIRA, A.C. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Floresta e ambiente**, v.21, n.1, p.69-77. 2014.
- DANTAS, B.F., MATIAS, J.R. AND RIBEIRO, R.C. Teste de tetrazólio para avaliar viabilidade e vigor de sementes de espécies florestais da Caatinga. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, v. 25, nº.1, 2015.
- FERRO, J.S.; ROCHA, D.F.; JUNIOR, J.L.A.; NETO, J.C.; SILVA, J.V.; PAVÃO, J.M.J. Germination and Viability of Seeds of *Caesalpinia pulcherrima* Newly Harvested and Stored. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 7, p. 73-85, 2019.
- FLAVIO, J.J.P.; PAULA, R.C.D. Testes de envelhecimento acelerado e de condutividade elétrica em sementes de *Dictyoloma vendellianum* A. Juss. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, n. 87, p.391-399,

2010.

FOGAÇA, C.A.; KROHN, N.G.; DE AQUINO SOUZA, M.; PAULA, R.C., 2011. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. **Floresta**, pp.895-904.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U., COSTA, E. M. T.; SANTOS-MOURA, S. S.; SILVA, R. D. S., CRUZ, F. R. S. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, 2013A.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; BRAGA JÚNIOR, J. M.; VIANA, J. S.; COLARES, P. N. Q. Substratos e temperaturas para testes de germinação e vigor de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n.1, p.57-64, 2010A.

GUEDES, R.S.; ALVES, E.U.; GONÇALVES, E.P.; VIANA, J.S.; BRUNO, R.D.L.A.; COLARES, P.N.Q., Physiological response of *Erythrina velutina* Willd. seeds to accelerated aging. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p.323-330, 2013B.

GUEDES, R.S.; ALVES, E.U.; GONÇALVES, E.P.; VIANA, J.S.; SILVA, K.B.; GOMES, M.S. Metodologia para teste de tetrazólio em sementes de *Amburana cearensis* (Allemao) AC Smith. **Rev. bras. plantas med**, v. 12, n. 1, p.120-126, 2010B.

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

HARRINGTON, J.F.; KOZLOWSKI, T.T. Seed storage and longevity. *Seed biology*, v.3, p.145-245, 1972.

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção**. Portaria n°. 37-N de 3 de abril de 1992. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf. Acesso em: 16 Jul. 2019.

IOSSI, E.; MÔRO, F.V.; FERRARI, R.A.; BARBOSA, R.M.; VIEIRA, R.D. Composição química, anatomia do embrião e viabilidade pelo teste de tetrazólio em pirênios de *Euterpe edulis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 11, n. 4, p.310-316, 2017.

LAMARCA, E. V.; LEDUC, S. N. M.; BARBEDO, C. J. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil-Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 4, p. 793-803, 2009.

LESSA, B.F.D.T.; SILVA, M.L.D.S.; BARRETO, J.H.; OLIVEIRA, A.B.D. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de folhas de *Amburana cearensis* e *Plectranthus barbatus* na germinação de *Amaranthus deflexus*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p.79-86, 2017.

LOUREIRO, M.B.; TELES, C.A.S.; VIRGENS, I.O.; ARAÚJO, B.R.N.D.; FERNANDEZ, L.G. & CASTRO, R.D.D. Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de sementes e plântulas de *Amburana cearensis* (Fr. All.) AC Smith (Leguminosae-Papilionoideae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 37, n. 4, p. 679-689, 2013.

LUCIO, A. A.; ARAUJO, M. N.; SILVA, F. F. S.; DANTAS, B. F. Effect of storage in different environments and packages on germination of *Amburana cearensis* (Allemao) AC Smith. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)**, v. 1, n. 4, Nov. 2016.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seeding emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 76-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

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

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARQUES, M. A.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, T. J. D. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.). **Revista Brasileira de Sementes**, p. 271-278, 2002.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 749-818 p. 2013.

MATTHEWS, S.; POWELL, A. Electrical conductivity vigour test: physiological basis and use. **Seed Testing International**, v. 131, p. 32-35, 2006.

MEDEIROS, M.L.S; PÁDUA, G.V.G.; PEREIRA, M.D. Adaptação do teste de condutividade elétrica para sementes de Moringa oleifera. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 91, pp.269-275, 2017.

MONTEIRO, R. M.; CARNEIRO, I. S.; SOUSA, F.D.; TEIXEIRA, M.J.; DOURADO, R.C.M.; MOREIRA, R.A.; MOREIRA, A.C.D.O.M. Antileishmanial Activity of Coumarin from *Amburana cearensis* Seeds. **Open Access Library Journal**, p. 4, n. 11, p.1, 2017.

OLIVEIRA, A. C. S.; MARTINS, G. N.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **Inter Science Place**, v. 1, n. 4, Jan. 2015.

OLIVEIRA, L.M.; DE CARVALHO, M.L.M.; NERY, M.C. Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex AP de Candolle) Standley-Bignoniaceae. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 36, n. 2, p.169-174, 2005.

PARAÍSO, H.A.; JUNIOR, D.D.S.B.; AVELAR, R.I.S.; COSTA, C.A.; DE PAULA GOMES, L.S.; NASCIMENTO, W.M. Adjustments in the tetrazolium test methodology for assessing the physiological quality of chickpea seeds. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 1, p.007-012, 2019.

PEREIRA, D. F.; SAITO, P.; BUGATTI, P. H. An image analysis framework for effective classification of seed damages. In: **Proceedings of the 31st Annual ACM Symposium on Applied Computing ACM**, p. 61-66, abr. 2016.

PEREIRA, K.T.O.; AQUINO, G.S.M.; ALVES, T.R.C.; BENEDITO, C.P.; TORRES, S.B. Electrical conductivity test in *Piptadenia moniliformis* Benth. seeds. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 4, p.199-205, 2015.

PEREIRA, M. P.; JÚNIOR, A.F. M.; ROYO, V.D.A.; SIMÕES, M.O. M.; FONSECA, F.S.; FERRAZ, V.P.; OLIVEIRA, D.A.; MENEZES, E.V.; BRANDÃO, M.M. Histochemical and Phytochemical Study of *Amburana cearensis* (Fabaceae) Seed Oil. **Natural Product Communications**, v. 12, n. p.907-910, Jan./Abr., 2017.

PINTO, C.A.G.; CARVALHO, M.L.M.D.; ANDRADE, D.B.D.; LEITE, E.R.; CHALFOUN, I. Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds¹. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 2, p.319-328, 2015.

SANTOS, S.R.G.D.; PAULA, E. Testes de vigor para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, p.7-16, 2009.

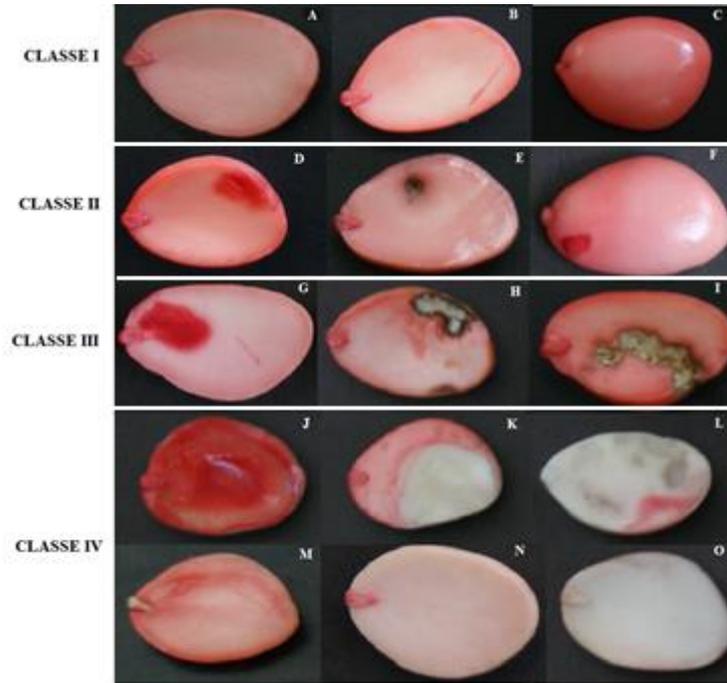
SILVA, C. B.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, R. D. Evaluating sunn hemp (*Crotalaria juncea*) seed viability using the tetrazolium test. **Seed Technology**, v. 34, n. 2, p. 263-272, 2012.

SNIDER, J.L., COLLINS, G.D., WHITAKER, J., CHAPMAN, K.D., HORN, P. AND GREY, T.L. Seed size and oil content are key determinants of seedling vigor in *Gossypium hirsutum*. **Journal of Cotton Science**, v. 18, n. 1, p.1-9, 2014.

STEINER, F.; ZUFFO, A.M.; BUSH, A.; OLIVEIRA SOUSA, T.; ZOZ, T. Does seed size affect the germination rate and seedling growth of peanut under salinity and water stress?. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 49, p. 54353, 2019.

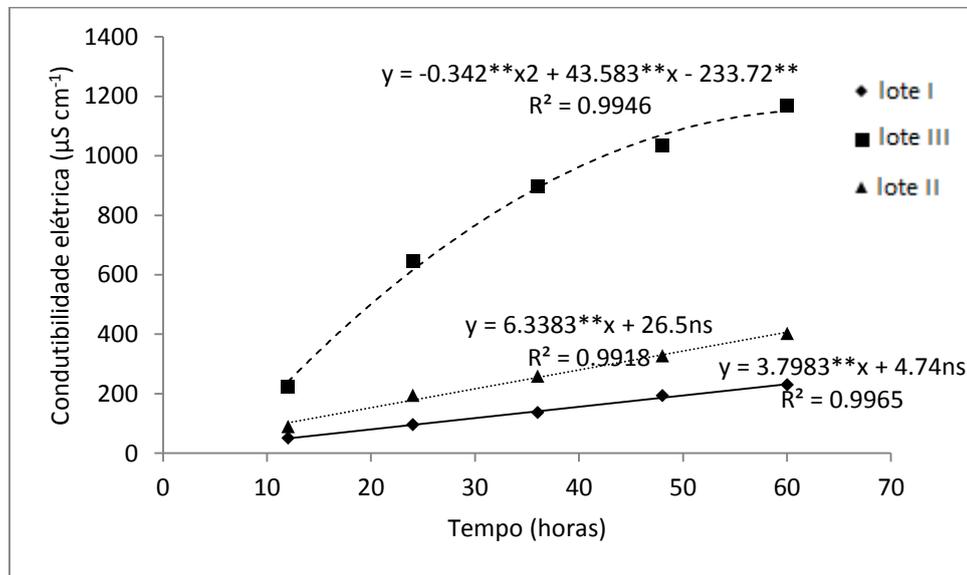
ZORZAL, T. A.; FANTINATO, D. E.; CAMPOS, L. M.; LUZ, A. C. C.; CORTE, V. B. Teste do tetrazólio para estimativa da viabilidade de sementes. **Natureza online**, v. 13, n. 3, p. 144-149, 2015.

Figura 1: Caracterização de sementes de *A. cearensis* em classes de vigor, viabilidade e inviabilidade pelo teste de tetrazólio.



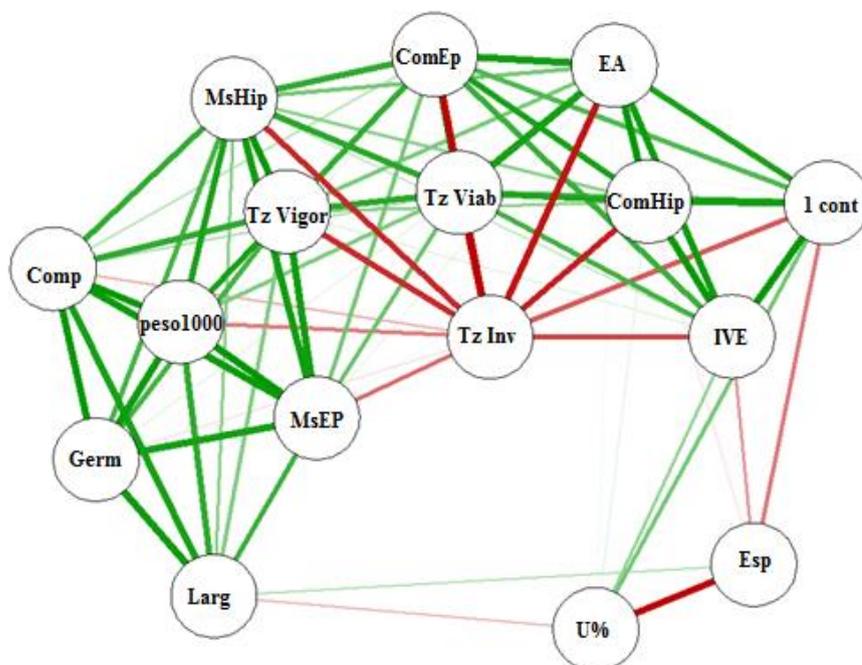
Classe I = viáveis e vigorosas sem presença de danos (A, B e C); classe II = viáveis e vigorosas: com presença de danos iniciais de até 10% da região cotiledonar (D, E e F); classe III = viáveis e não vigorosas com presença de danos em até 50% do cotilédono (G, H e I) e classe IV = sementes não viáveis e mortas: embrião com vermelho intenso indicando tecido em deterioração intensa (J), mais de 50% da região cotiledonar e embrião morto (K e L), eixo embrionário morto e cotilédono vivo (M), embrião com coloração mais clara que a normal (N) e semente morta (O).

Figura 2: Gráfico para a Condutividade Elétrica (CE) de três lotes de sementes de *A. cearensis* com seis tempos de embebição.



** Significativo ($P \leq 0,05$). ^{ns} Não significativo ($P > 0,05$).

Figura 3: Representação gráfica da estimativa de correlação entre o Teste de tetrazólio quanto ao vigor (Tz vigor) e viabilidade (Tz Viabilidade) em relação aos testes de qualidade física, germinação e vigor em três lotes de sementes de *A. cearensis*.



Porcentagem de germinação (G%), massa seca de epicótilo (MSEp) e hipocótilo-radícula (MSHip), comprimento de epicótilo (CEp) e hipocótilo-radícula (CHip), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), primeira contagem (1ª cont), germinação pelo envelhecimento acelerado (EA), porcentagem de umidade (U%), Comprimento (comp), largura (Larg), espessura (Esp) e peso de 1000 sementes (Peso1000).

Tabela 1. Médias de vigor e viabilidade de sementes de *A. cearensis* da padronização do tetrazólio para diferentes temperatura e preparo da semente. O fator A representa o modo de preparo das sementes: Sementes escarificadas (ES) e sem escarificação (SE) e o fator B representa as temperaturas (30, 35 e 40 °C) de embebição.

Fator	TZ vigor			TZ viabilidade		
	30	35	40	30	35	40
ES	70	62	50	89	80	71
SE	20	10	14	45	43	37
Germ.(%)	85					

Tabela 2: Avaliação da qualidade de lotes de sementes de *A. cearensis* pela porcentagem de germinação e pelo teste de tetrazólio em classes de Vigor e Viabilidade.

Lote	Germinação (%)	TZ Viabilidade (%)	TZ Vigor (%)
I	83 a	81 a	60 a
II	85 a	77 a	52 a
III	56 b	63 b	46 a
C.V.(%)	11,60	9,27	25,94

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 3: Caracterização da qualidade física de lotes de sementes de *A. cearensis* pelo teor de água (%), peso de 1000 sementes (g), comprimento (mm), largura (mm) e espessura (mm).

QUALIDADE FÍSICA					
Lote	Teor de água (%)	Peso 1000 (g)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)
I	6.98 b	604.16 a	17.05 a	11.60 a	5.354 a
II	8.59 a	449.14 b	13.83 b	10.42 b	5.348 ab
III	6.92 b	419.35 c	13.71 b	10.72 b	5.118 b
C.V.%	4,61	2,64	1,56	1,73	2,26

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 4: Caracterização da qualidade fisiológica dos lotes de sementes de *A. cearensis* pela germinação, comprimento (comp) e massa seca (MS) do epicótilo (EP) e do hipocótilo (Hip), e médias da primeira contagem (1ª) e Índice de velocidade de Emergência (IVE).

Lotes	Germinação (%)	1ª Contagem (%)	IVE (índice)	Comp. EP (cm)	MS EP (g)	Comp. Hip (cm)	MS Hip (g)
I	83 a	54,4 ab	2,02 a	136.8 a	0.497 a	101.32 a	0.767 a
II	85 a	62,4 a	2,27 a	128.46 a	0.407 b	107.08 a	0.537 b
III	56 b	40 b	1,37 b	93.46 b	0.382 b	60.06 b	0.358 c
C.V.%	11.60	23.42	11.12	11.25	11.22	14.12	12.59

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 5: Resultado do teste de envelhecimento acelerado com a determinação do teor de água das sementes antes e após o período de envelhecimento.

Lote	Teor de água Antes (%)	Teor de água Após (%)	Germinação (%)
I	7,61 (0.2794) b	27,68 (0.5536) b	78 (1.0858) a
II	8,87 (0.3023) a	33,52 (0.6175) a	9 (0.2920) b
III	7,61 (0.2794)b	37,95 (0.6637) a	13 (0.3590) b
C.V.(%)	1,6	4,27	17,03

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

Artigo 2: AUTOMAÇÃO COMPUTACIONAL DA INTERPRETAÇÃO DO TESTE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Amburana cearensis* (ALEMÃO) A.C. SMITH

RESUMO

O teste de tetrazólio é um método rápido de avaliação da viabilidade e vigor de sementes bastante difundido pela diagnose mais precisa das principais causas de redução da qualidade. Entretanto, uma das suas limitações é a adequada interpretação dos resultados decorrente da subjetividade do analista e são poucos os procedimentos padronizados para espécies florestais nativas. Contudo objetivou-se estabelecer uma metodologia de baixo custo, para identificar a qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* (Alemão) A.C. Smith pelo teste Tz, por meio da automação computacional da análise de imagens. Para isso, utilizaram-se três lotes de sementes de *A. cearensis* (lotes I, II e III) que foram submetidos aos testes de tetrazólio e germinação. Foram realizadas as análises visuais do Tz e, para a análise de imagens, utilizaram-se RNA's para a segmentação das sementes quanto à porcentagem de tecido vivo e morto, posteriormente, utilizada na classificação da viabilidade e vigor. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Procedeu-se a análise de variância, teste de média (Tukey = 0,05) e correlação de Pearson entre os testes. Para a análise visual do TZ, os lotes não diferiram entre si quanto ao vigor. Entretanto, quanto à viabilidade, o lote III diferiu-se dos demais, apresentando a menor porcentagem de sementes viáveis, comprovada pela menor porcentagem de germinação. A avaliação pela análise de imagens permitiu quantificar as porcentagens de tecido morto (PM1 a PM5) e de tecido vivo (V1 a v5), presente em cada semente, conforme a sua localização e classificá-las, individualmente, em vigorosa, viável e inviável com 100% de acerto. Quando correlacionados com os parâmetros do teste de germinação, o vigor e o CI (escore de classificação média da qualidade dos lotes) apresentaram correlação positiva significativa com todos os parâmetros avaliados do teste de germinação. A maior porcentagem de germinação, IVE, Comprimento de epicótilo e hipocótilo estão relacionados à maior porcentagem de tecido vivo, ou tons médios de vermelho, nas regiões vitais da semente (V1 e V2) pela maior estimativa de correlação. A massa seca, entretanto, está relacionada às menores porcentagens de tecido morto, em todas as regiões da semente, apresentando correlação significativa e negativa em relação às partes mortas (PMT). A análise de imagens computacional, utilizando Redes Neurais Artificiais, é uma alternativa eficaz, para avaliar o teste de tetrazólio, quanto à qualidade fisiológica de sementes de *A. cearensis*.

Palavras-chave: Inteligência Artificial, vigor, viabilidade, sementes.

1 INTRODUÇÃO

Amburana cearensis (Alemão) A.C. Smith é uma espécie florestal pertencente à família Fabaceae e conhecida popularmente como amburana, umburana, imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru. A espécie é amplamente distribuída na América do Sul e, no Brasil, ocorre em floresta tropical e nos biomas da caatinga e cerrado (LORENZI & MATOS, 2002; LUCIO *et al.*, 2016). É uma espécie bastante explorada por suas propriedades madeireiras, farmacêuticas e medicinais, cujas sementes e as cascas do caule são tradicionalmente empregadas, na produção de medicamentos, destinados ao tratamento de afecções pulmonares, tosses, asma, bronquite, entre outros (LORENZI & MATOS, 2002). Diversas substâncias secundárias como cumarina, alcaloides, ácidos graxos e fenólicos já foram isoladas da casca do caule e das sementes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; CARTAXO; SOUZA & ALBUQUERQUE, 2010; CANUTO, SILVEIRA & BEZERRA, 2010). Embora a espécie seja importante, ainda são poucos os procedimentos padronizados para as suas sementes.

A qualidade fisiológica de sementes pode ser avaliada por meio de testes de viabilidade e vigor. Dentre os testes utilizados, o teste de tetrazólio se destaca pela sua rapidez, apresentando diagnose mais precisa das principais causas de redução da qualidade (MARCOS FILHO, 2015; PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015). É um método que estima a viabilidade e o vigor de sementes, com base na alteração da coloração dos tecidos vivos, em presença do cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio. A reação reflete a atividade de enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração, em que o cloreto é reduzido a trifenil formazan, composto não difusível e avermelhado, que permite diferenciar tecido vivo do tecido morto (MARCOS FILHO, 2015). Colorações mais escuras ou mais claras que a intensidade normal pode caracterizar a deterioração ou a inviabilidade dos tecidos, respectivamente (MARCOS FILHO, 2005; IOSSI *et al.*, 2017).

Entretanto, um problema inerente à análise da qualidade de sementes, por meio do teste de tetrazólio é que, além de exigir que o analista avalie grandes quantidades de sementes por dia, a fim de detectar possíveis danos, requer conhecimentos intrínsecos à sua morfologia, tornando-se um processo subjetivo, oneroso e suscetível a erros, além de demandar maior tempo para a avaliação dos resultados (PEREIRA; SAITO; BUGATTI, 2015; PINTO *et al.*, 2015).

Neste contexto, as técnicas de processamento, por meio de visão computacional, podem ser empregadas para a classificação, garantindo a avaliação e classificação automática da qualidade de sementes, integrando técnicas de inteligência artificial, como as Redes Neurais artificiais (RNA's) (SABANCI; TOKTAS; KAYABASI, 2017).

Logo, considerando a importância da amburana, bem como seu potencial de bioprospecção, objetivou-se estabelecer uma metodologia de baixo custo, para identificar a qualidade fisiológica de sementes pelo teste de tetrazólio, por meio da automação computacional da análise de imagens.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de experimento e caracterização do material vegetal

Foram utilizados três lotes de sementes de *A. cearensis* de diferentes procedências. Um lote de sementes recém-coletadas de três árvores matriz, no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade

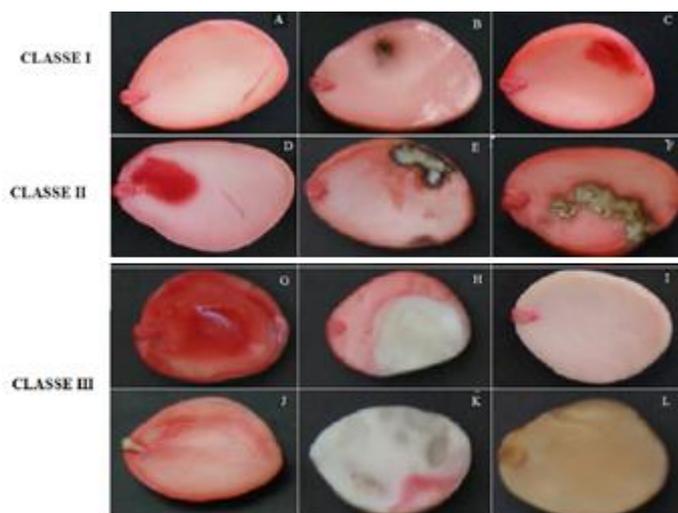
Federal de Minas Gerais (lote C), em outubro de 2017 e dois lotes adquiridos de diferentes comércios locais de Montes Claros – MG, caracterizados como lotes M e W, ambos provenientes de municípios localizados ao Norte de Minas Gerais. As sementes foram armazenadas, em câmara fria a 10°C até o início das análises, que ocorreram no segundo semestre de 2018, no Laboratório de Análises de Sementes (LAS) do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais - Montes Claros/MG.

2.2 Teste de tetrazólio

Para o teste de tetrazólio, utilizou-se, para cada lote, quatro repetições de 25 sementes escarificadas em lixa nº 80 e pré-condicionadas com imersão total em água destilada a 30°C por 24 horas. Posteriormente, houve a exposição dos embriões, por meio da remoção do tegumento, os quais foram submetidos à solução de 2,3,5 - trifenil cloreto de tetrazólio, na concentração de 0,05%, durante 2:30 horas. Após a coloração, as sementes foram lavadas em água corrente e avaliadas.

A avaliação visual ocorreu de forma individual, no intuito de verificar a ocorrência de danos nas sementes, como a profundidade, localização e extensão e, assim, classificá-las quanto à sua viabilidade e vigor (FIGURA 1): classe I - sementes viáveis e vigorosas: sem a presença de danos ou pequenas lesões iniciais; classe II - sementes viáveis e não vigorosas e classe III – sementes não viáveis.

Figura 1. Classificação visual das sementes de *A. cearensis* submetidas ao teste de tetrazólio em vigorosas, viáveis e inviáveis.



Classe I = Vigorosas: sem a presença de danos (A) ou a presença de danos iniciais em até 10% do embrião distante de regiões vitais (B e C); classe II = viáveis e não vigorosas: com coloração mais intensa em regiões vitais (D) e presença de danos em até 50% do cotilédone em regiões não vitais da semente (E e F); classe III = sementes não viáveis: com vermelho intenso em todo o embrião (G), mais de 50% cotilédone morto (H); coloração mais clara que a intensidade normal (I), eixo embrionário morto e cotilédone vivo (J) e sementes mortas (K e L).

Após a classificação das sementes, foi estimada, para cada lote, a porcentagem de sementes pertencentes às classes I, II e III. Além disso, foi estimado um escore associado a elas. Para isso, foi alocado os valores de 1, 2 e 3, para cada semente, em função de sua classificação (I, II e III) e, posteriormente, foi calculada a média desses valores para cada parcela e para cada lote.

2.3 Teste de germinação

A fim de comparar os resultados do tetrazólio, realizou-se o teste de germinação, com desinfestação prévia das sementes pela imersão em hipoclorito de sódio a 2% durante 3 minutos. O teste foi realizado em bandejas com cinco repetições de 20 sementes, utilizando substrato areia a 60% da sua capacidade de campo, foi conduzido em câmeras do tipo BOD, reguladas à temperatura constante de 30°C e fotoperíodo de 8 horas, com as contagens de sementes germinadas realizadas diariamente do 8° até o 18° dia (GUEDES *et al.*, 2013). Foram contabilizadas a porcentagem de germinação, correspondente ao número de plântulas normais, IVE (Índice de Velocidade de Emergência) conforme Maguire (1962), comprimento do epicótilo (CmE) e hipocótilo-radícula (CmH) por meio de régua graduada e massa seca dos eixos hipocótilo-radícula (MSH) e epicótilo (MSE). Para a obtenção da massa seca, adotou-se o método de estufa regulada a 65°C até atingir peso constante (72 horas) com as plântulas normais dentro de sacos de papel kraft. Realizou-se o peso fresco e seco de plântulas normais, em balança de precisão (0,001g), para a obtenção da massa seca (g).

2.4 Obtenção das imagens

As sementes, provenientes do teste de tetrazólio, foram fotografadas com uma câmara semiprofissional *Nikon* (DSLR-A200K, α 200, DT18-70 mm, F3.5-5.6), no modo automático e sem flash, posicionada sob uma base nivelada (tripé). As sementes foram posicionadas sempre com o hilo para a esquerda sob papel cartolina de coloração escura, o fundo da imagem. Cada repetição foi composta por uma placa de 25 sementes.

2.5 Análise das imagens

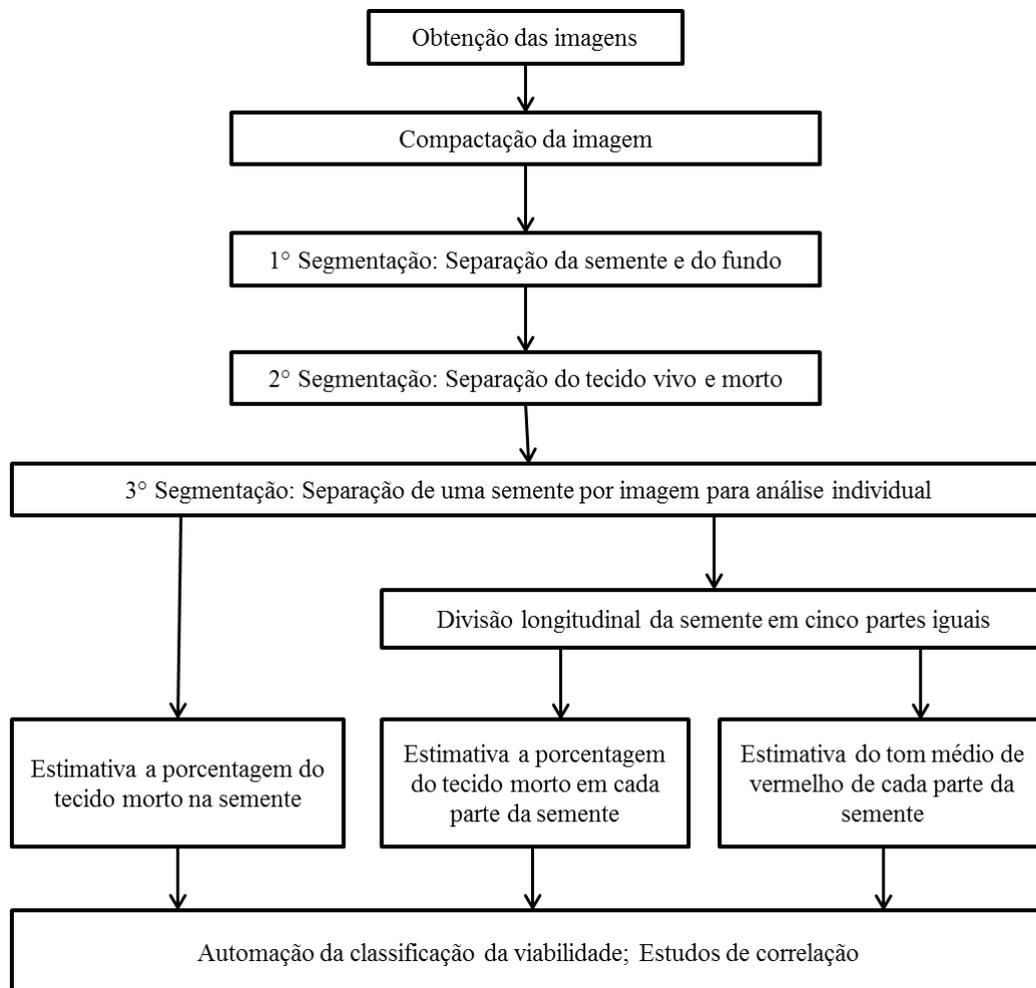
Todas as análises dos dados, apresentadas na Figura 2, foram realizadas no software R. Para compactar as imagens, a fim de possibilitar a análise computacional com um menor tempo, foram utilizadas as funções *image_read* e *image_scale* do pacote *magick*. As imagens foram compactadas para 400 pixels de largura, 314 pixels de altura. Após a compactação, foram abertas pela função *readImage* do pacote *EImage*, quando se conseguiu obter, para cada imagem, três matrizes, cada uma com 400 colunas e 314 linhas, contendo, em cada uma, os valores de vermelho, verde e azul (RGB), com valores variando entre 0 e 1.

Para a segmentação de cada imagem (FIGURA 3A), a fim de separar a semente do fundo, utilizou-se apenas a matriz (banda) de vermelho, para a qual utilizou-se um limiar (threshold) de 0.35. Assim, todos os pixels com valor abaixo deste limiar foram considerados como fundo, de cor preta, atribuindo o valor 1. Para os demais pixels, correspondente às sementes, atribuiu-se o valor 0 (FIGURA 3B). A fim de preencher possíveis espaços vazios nos pixels correspondentes às sementes, em casos de necroses, todos os pixels de valor 1, entre a margem das sementes, foram substituídos pelo valor 0 (FIGURA 3C). Essa matriz foi utilizada como coordenada das sementes. A partir dessas coordenadas, obtiveram-se os valores de vermelho, verde e azul de cada pixel correspondente às sementes.

Para a segmentação das sementes, quanto às partes vivas e mortas, empregaram-se redes neurais do tipo perceptron de multicamadas. As imagens obtidas dos três lotes construíram duas paletas de cores: uma com cinco tons de vermelho (FIGURA 3D) e outra com cinco tons de marrons (FIGURA 3E) presente nas sementes. Para cada tom de vermelho e de marrom, foram coletados dados de RGB

referentes a 1000 pixels, selecionados aleatoriamente. Assim, obteve-se uma matriz com 10000 linhas referente a cada pixel e cinco colunas. As três primeiras colunas formadas pelos valores de RGB, a quarta coluna com valores de 0 a 5, 0 para pixel de coloração marrom e os valores de 1 a 5 para os tons de vermelho do claro para o escuro, respectivamente. Na quinta coluna atribuiu-se o valor 0 para o pixel com algum tom de vermelho e 1 para tons de marrom. Para o treinamento das redes neurais artificiais, selecionaram-se aleatoriamente dados de 3000 pixels, os quais foram normalizados, para variarem entre 0 e 1 com o auxílio da função *normalizeData* do pacote *RSNNS*.

Figura 2. Fluxograma das etapas realizadas, a partir da obtenção das imagens, referentes à segmentação e extração de atributos.

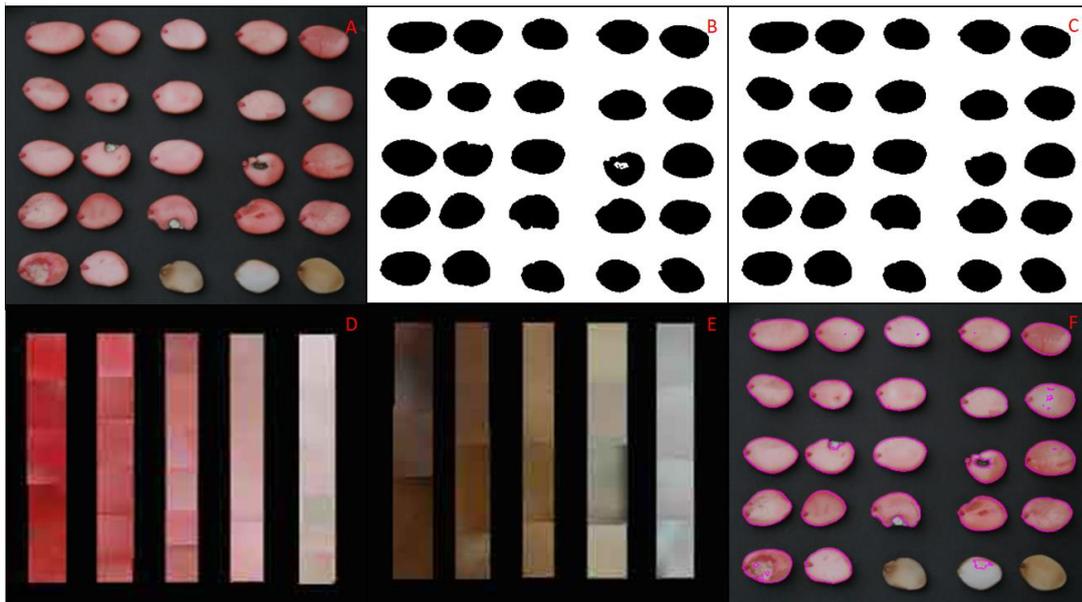


Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Foram selecionados dados de 2000 pixels, para o treinamento das redes e 1000, para validação, por meio da função *splitForTrainingAndTest*. Assim, considerou-se, para os *perceptrons* multicamadas, três neurônios na camada de entrada referente aos valores de RGB e dois neurônios na camada de saída, sendo o primeiro correspondente aos tons de vermelho e o segundo para tons de marrom. Consideraram-se, de forma arbitrária, duas camadas intermediárias com três neurônios na primeira camada e seis na segunda. O treinamento da rede foi feito com a função *mip* do pacote *RSNNS*, considerando-se 1000 interações, função de ativação sigmoideal para as camadas intermediárias e linear

para a camada de saída. Para verificar a eficiência do ajuste e ausência de *overfitting*, estimou-se, para a amostra de validação, o coeficiente de determinação para os tons de vermelho e taxa de acerto para a presença de marrom.

Figura 3: Exemplo de imagem obtida das sementes de *A. cearensis*, após o teste de tetrazólio, para uma das repetições (A), imagem segmentada separando o fundo do objeto de imagem (B), preenchimento das partes escuras ou necrosadas das sementes (C), paletas de tons de vermelho (D) e tons de marrons (E) encontradas nas imagens e utilizadas para o treinamento das RNAs e para a segmentação das sementes quanto aos tecidos vivos (F).



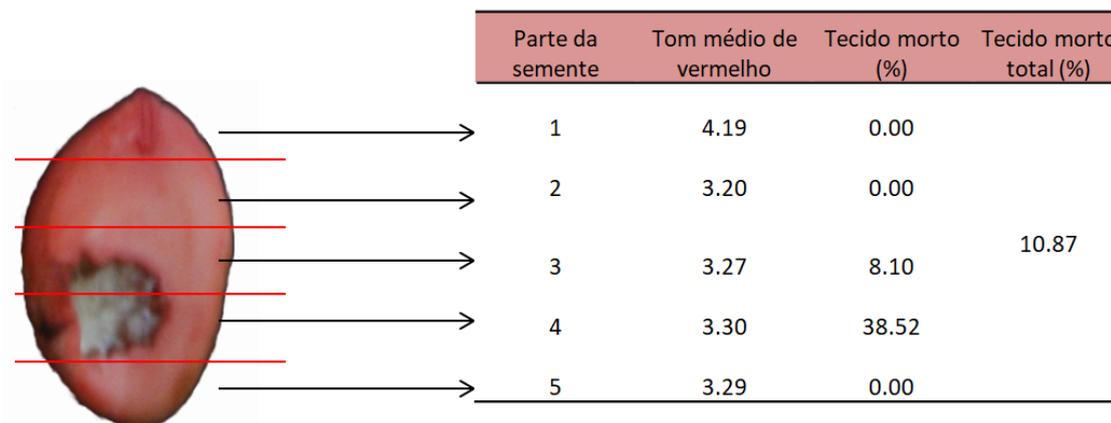
Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Após a constatação de eficiência de ajuste das RNAs, os valores de RGB de cada pixel presente nas sementes foram utilizados como entrada da rede, e os valores preditos de marrom foram usados para a segmentação das sementes. Os valores 0 (tons de vermelho) indicam tecido vivo e os valores 1 (tons de marrom) tecido morto (FIGURA 3F). Desta forma, foi possível obter a porcentagem de tecido morto. A fim de identificar a localização do dano, cada semente foi dividida, longitudinalmente, em cinco partes de comprimento igual (FIGURA 4). Para cada uma das partes, os valores de RGB foram submetidos novamente à rede neural ajustada, obtendo, para cada pixel, o tom de vermelho ou presença de marrom. Assim, foi calculado, para cada uma das partes, o tom médio de vermelho (V) e a porcentagem de tecido morto (PM). Logo, para cada semente foram obtidas 11 informações.

Para a classificação da viabilidade e vigor das sementes, consideraram-se três classes, conforme a classificação visual (FIGURA 1): viável e vigorosa (escore 1), viável (escore 2) e inviável (escore 3). Para a automação dessa classificação, utilizaram-se perceptrons de multicamadas com onze neurônios na camada de entrada, correspondente às 11 informações (Figura 3) e três neurônios na camada de saída, correspondente às três classes, atribuindo-se 1(um) para a classe da semente e 0 para as demais. Os dados de 200 sementes foram utilizados, para o treinamento da rede e das 100 sementes restantes para a validação. Considerou-se de forma arbitrária, duas camadas intermediárias com três neurônios na primeira camada e seis na segunda. O treinamento da rede foi feito com a função

mlp do pacote *RSNNS*, considerando-se 1000 interações, função de ativação sigmoideal para as camadas intermediárias e linear para a camada de saída. Para verificar a eficiência do ajuste e ausência de overfitting, estimou-se, para a amostra de validação, a taxa de acerto (%) de classificações corretas.

Figura 4. Representação das divisões das imagens das sementes feita computacionalmente seguidas dos respectivos parâmetros estimados pelas RNAs.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

2.6 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos, no teste de germinação e na classificação pelas redes neurais artificiais, foram submetidos à análise de variância, considerando-se o delineamento inteiramente casualizado. Quando encontrada diferença estatística entre os lotes pelo teste F ($p \leq 0.05$), realizou-se o teste Tukey ao nível de 5% de significância, com o auxílio do pacote *ExpDes*. Além disso, foram estimadas correlações de Pearson, por meio da função *cor* do pacote *stats* e sua representação gráfica pelo pacote *qgraph*. Para a representação gráfica, foram consideradas apenas as correlações significativas que apresentaram coeficientes de determinação (R^2) igual ou superior a 0,55.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise visual das sementes de *A. cearensis* pelo tetrazólio, não houve diferenças estatísticas entre os lotes quanto ao vigor pelo teste de tetrazólio. Por outro lado, diferença estatística pode ser observada entre os eles quanto à viabilidade (APÊNDICE A), com a menor porcentagem de sementes viáveis, para o lote M, diferenciando-o dos demais (C e W), o que está condizente com a porcentagem de germinação (TABELA 1).

Uma das limitações do teste de tetrazólio é a interpretação adequada dos resultados, visto que o analista avalia as sementes quanto à intensidade e padrão de coloração, categorizando-as subjetivamente em classes de vigor e viabilidade. Tal processo está sujeito a dificuldades na padronização e, principalmente, na capacidade de avaliar uma semente como vigorosa, tornando-se uma das principais fontes de variação dos resultados (MCDONALD Jr. & PHANEENDRANATH, 1978; FRANÇA-NETO & KRZYZANOWSKI, 2019). Dessa forma, a maior dificuldade em analisar o vigor pelo teste de tetrazólio aliado à subjetividade da avaliação pode ter resultado em maior variação dos

resultados para essa característica.

Paraíso *et al.* (2019) relatam divergência entre a classificação do vigor dos lotes pelo teste de tetrazólio, em relação aos testes de vigor do teste de germinação, em que obtiveram maior coeficiente de variação, para a avaliação do vigor, quanto à viabilidade, para o teste de tetrazólio, em sementes de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

Tabela 1. Teste de comparação múltipla, para os descritores avaliados, em três lotes de sementes de *A. cearensis*:

Parâmetros	Lotes			pValor (teste F)	C.V. (%)
	C	M	W		
V1	2.69 ab	2.45 b	2.95 a	< 0.001	34.06
PM1 (%)	0.12 a	1.84 a	0.58 a	0.2527	894.1
V2	2.05 a	1.95 a	2.17 a	0.1758	40.61
PM2 (%)	0.15 a	1.99 a	0.99 a	0.1281	612.84
V3	1.79 a	1.86 a	1.99 a	0.1805	41.51
PM3 (%)	0.06 a	2.72 a	1.30 a	0.0343	528.98
V4	1.77 a	1.91 a	2.01 a	0.0925	40.4
PM4 (%)	0.08 a	2.57 a	1.87 a	0.1101	571.54
V5	2.05 a	2.13 a	2.27 a	0.1549	38.34
PM5 (%)	0.13 a	2.56 a	1.51 a	0.1406	617.81
PMT (%)	0.11 b	24.47 a	1.30 b	< 0.001	283.23
Cl.	2.54 a	2.18 b	2.47 a	0.003	32.71

Nota: Tecido Vivo das cinco porções da semente (V1 a V5), porcentagem de tecido morto nas cinco porções (PM1 a PM5) e Total (PMT).

Médias seguidas da mesma letra na linha não se diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Os testes de vigor realizados concomitantes ao teste de germinação (TABELA 1) detectaram diferenças significativas entre os lotes, em que o lote M é o menos vigoroso e menos viável, apresentando a menor porcentagem de germinação (56%). Além disso, verifica-se que os lotes C e W apresentam qualidade fisiológica semelhante, conforme a porcentagem de germinação e viabilidade do teste de tetrazólio. Entretanto a massa seca dos eixos epicótilo e hipocótilo-radícula detectaram diferenças significativas entre esses lotes, o que pode estar relacionado à disponibilidade de reservas da semente influenciada pelo tamanho e peso das sementes (ALMEIDA *et al.*, 2017; STEINER *et al.*, 2019; ARANTES *et al.*, 2019).

Varição no desempenho dos lotes, em relação aos testes de qualidade fisiológica de sementes, pode ocorrer, já que esses testes avaliam diferentes características (PINTO *et al.*, 2015). Contudo valores semelhantes, na porcentagem de germinação, não necessariamente refletem em alto vigor (MARCOS FILHO, 2005) sendo necessários testes complementares como os de vigor, os quais são fundamentais à separação de lotes de sementes de germinação parecida, pois são mais sensíveis e identificam estágios menos avançados do processo de deterioração (PINTO *et al.*, 2015).

A avaliação do teste de tetrazólio pela análise de imagens em sementes de *A. cearensis*

(TABELA 1) permitiu quantificar as porcentagens de tecido morto (PM1 a PM5) e de tecido vivo (V1 a v5), presentes em cada semente, nos três lotes, conforme a sua localização (FIGURA 4). PMT refere-se à porcentagem total de tecido morto e CI refere-se ao escore de classificação média da qualidade dos lotes pelas RNA's. Para esses dois últimos parâmetros, é possível observar que o lote M obteve a maior porcentagem de tecido morto (24.47%) e, conseqüentemente, menor viabilidade das sementes, diferindo-se estatisticamente dos demais. Tal fato, além de esperado, é condizente com as informações obtidas nos testes de germinação e tetrazólio pela análise visual, revelando a eficácia do sistema na avaliação da qualidade fisiológica dessas sementes.

Pereira; Saito; Bugatti (2016), ao propor um sistema de classificação por análise de imagens, para avaliar o vigor do tetrazólio, em sementes de soja, relatam que o classificador Optimum-Path Forest (OPF) foi o que apresentou melhor performance, com eficácia de até 80% na classificação. Entretanto, na divisão das classes considerou-se a porção da semente, o tipo e o nível do dano. Ao contrário do proposto neste trabalho, não levam em consideração a separação da semente em regiões de maior e menor vitalidade, fundamental para definir viabilidade e o vigor.

Os resultados da amostra de validação, constituída de 100 sementes, referentes às porcentagens de tecidos vivos e mortos, foram utilizados como variáveis de entrada pelas RNA's, para classificar as sementes, quanto às três classes: viável e vigorosa, viável e inviável. Quando comparadas com a análise visual e individual das sementes, as RNA's obtiveram 100% de acerto na classificação (TABELA 2). Ou seja, a modelagem da classificação visual, por meio de análise de imagem pelas RNA's, foi eficiente para estimar a qualidade fisiológica de sementes de *A. cearensis*.

Tabela 2: Número de sementes da amostra de validação classificadas como inviável, viável, e viável + vigorosa de acordo com a análise visual e pelas RNAs.

Classificação visual	Classificação pelas RNAs		
	Viável + vigorosa	Viável	Inviável
Inviável	0	0	21
Viável	0	29	0
Viável e vigorosa	50	0	0

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Trabalhos envolvendo análise de imagem em sementes, fornecendo informações rápidas e precisas, têm sido publicados, para as mais diversas finalidades, como: caracterização e identificação, classificação, avaliação da qualidade fisiológica, detecção de danos, cor e formato de sementes (KAPADIA; PATIL, 2017). Sabanci, Toktas & Kayabasi (2017), ao desenvolver um classificador utilizando sistema de inferência neuro- fuzzy, para dois tipos de grãos de trigo, utilizaram como variáveis de entrada a análise visual da dimensão, textura e cor de 200 grãos, 100 para cada tipo e obtiveram precisão de 99,46% no treinamento e 100% na classificação.

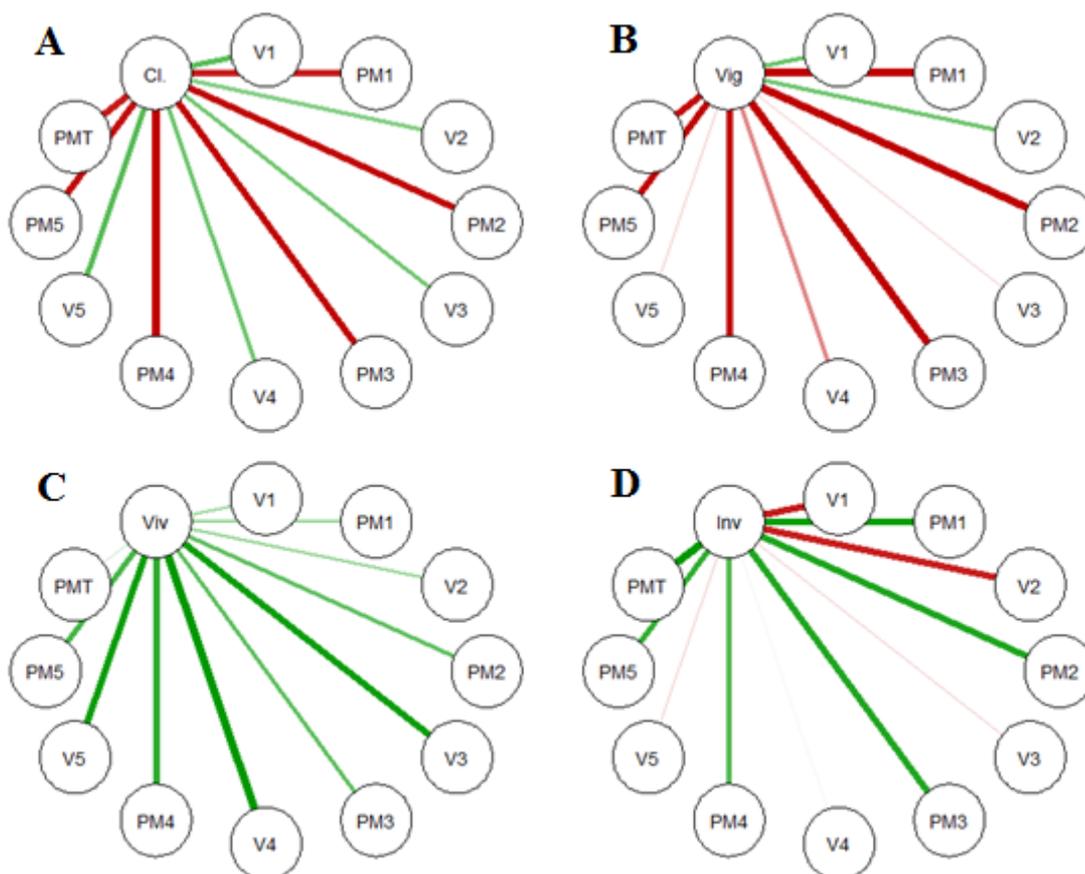
As classificações de viabilidade e vigor e as porcentagens de tecido vivo e morto das cinco partes das sementes obtidas pela análise de imagens foram correlacionados com os parâmetros do teste de germinação e vigor dispostas nas figuras abaixo. Linhas vermelhas indicam correlação negativa e

verdes correlações positivas, enquanto a espessura da linha indica a magnitude da correlação, ou seja, a ausência de linha significa que não há correlação significativa.

Na Figura 5, nota-se que o escore de classificação CI apresentou correlação significativa positiva (em verde), em relação ao tom médio de vermelho no tecido vivo (V1 a V5) e negativa (vermelho) em relação à porcentagem de tecido morto (PM1 a PM5 e PMT) das sementes. O que é esperado, já que a viabilidade das sementes pelo tetrazólio está diretamente ligada à intensidade da coloração vermelha dos tecidos vivos e a não viabilidade ligada à deterioração e morte dos tecidos. Dessa forma, sementes de maior qualidade apresentam melhor escore de classificação quanto aos tons de vermelho e quanto maior a presença de tecido morto pior é o escore de classificação.

Quanto à separação das sementes em vigorosas, viáveis e inviáveis, observa-se que a maior porcentagem de tons médio de vermelho, nas regiões críticas do embrião (V1 e V2), e a ausência de tecido morto (PM1 a PM5 e PMT) foram as variáveis que melhor se correlacionaram com o vigor e, conseqüentemente, as que mais contribuíram para essa classificação (Figura 5B).

Figura 5. Representação gráfica da estimativa de correlação da classificação média dos lotes, quanto ao escore (CI.), porcentagem de sementes vigorosas, viáveis e inviáveis em relação às porcentagens de tecido vivo (V1 a V5) e tecido morto (PM1 a PM5 e PMT).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

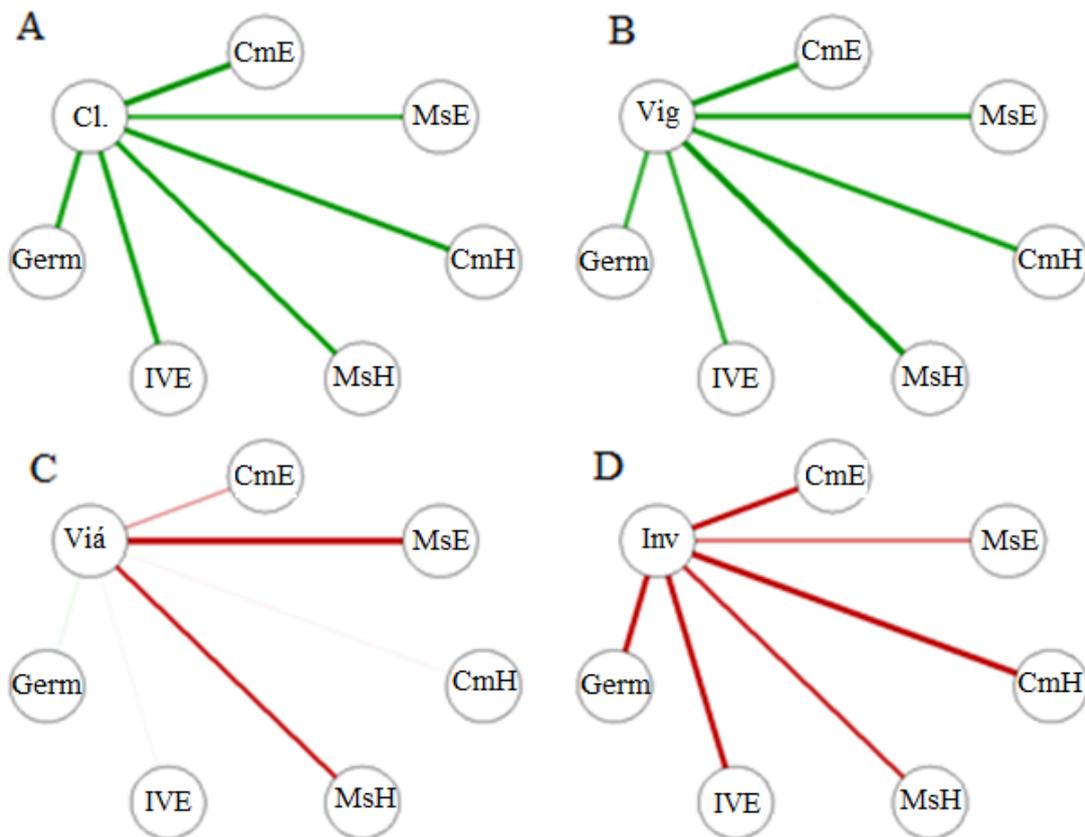
Por outro lado, é possível observar que as sementes viáveis se correlacionaram positivamente de forma mais significativa com o tecido vivo (V1 a V5) em relação ao tecido morto PM (1 a 5) (Figura 5C). Isso ocorre porque sementes viáveis englobam todas as sementes vivas que germinam, inclusive,

aquelas que apresentam danos em seus cotilédones, como tecido morto ou em deterioração, desde que não ocorra em elevada proporção ou em regiões vitais.

Algumas espécies nativas com sementes de grandes cotilédones, mesmo apresentando consideráveis áreas de tecido morto, ainda germinam em condições favoráveis, desde que as áreas críticas do embrião estejam vivas (MATTHEWS & POWELL, 2006). Em contrapartida, os danos, quando ocorrem em partes do embrião essenciais à germinação, mesmo que seja apenas uma pequena lesão ou ponta quebrada em uma região vital, as sementes podem ser consideradas inviáveis e não germináveis ainda que as demais áreas da semente permanecem vivas (MARIN *et. al.*, 2018).

Portanto é possível notar que a maior porcentagem de tecido morto está presente nas regiões não vitais do cotilédone (PM4 E PM5) e, em menor quantidade nas demais regiões, que, neste caso, podem estar localizadas nas bordas da semente e não afetar a viabilidade. Por fim, as sementes inviáveis estão relacionadas à menor porcentagem de vermelho, partes vivas, nas regiões V1 e V2 e maiores estimativas de tecido morto em toda a semente (Figura 5D).

Figura 6. Representação gráfica da estimativa de correlação da classificação média dos lotes, quanto à classificação das RNAs (Cl.), porcentagem de sementes vigorosas, viáveis e inviáveis em relação aos parâmetros do teste de germinação. Linhas vermelhas indicam correlação negativa e verdes correlações positivas. A espessura da linha indica a magnitude da correlação.

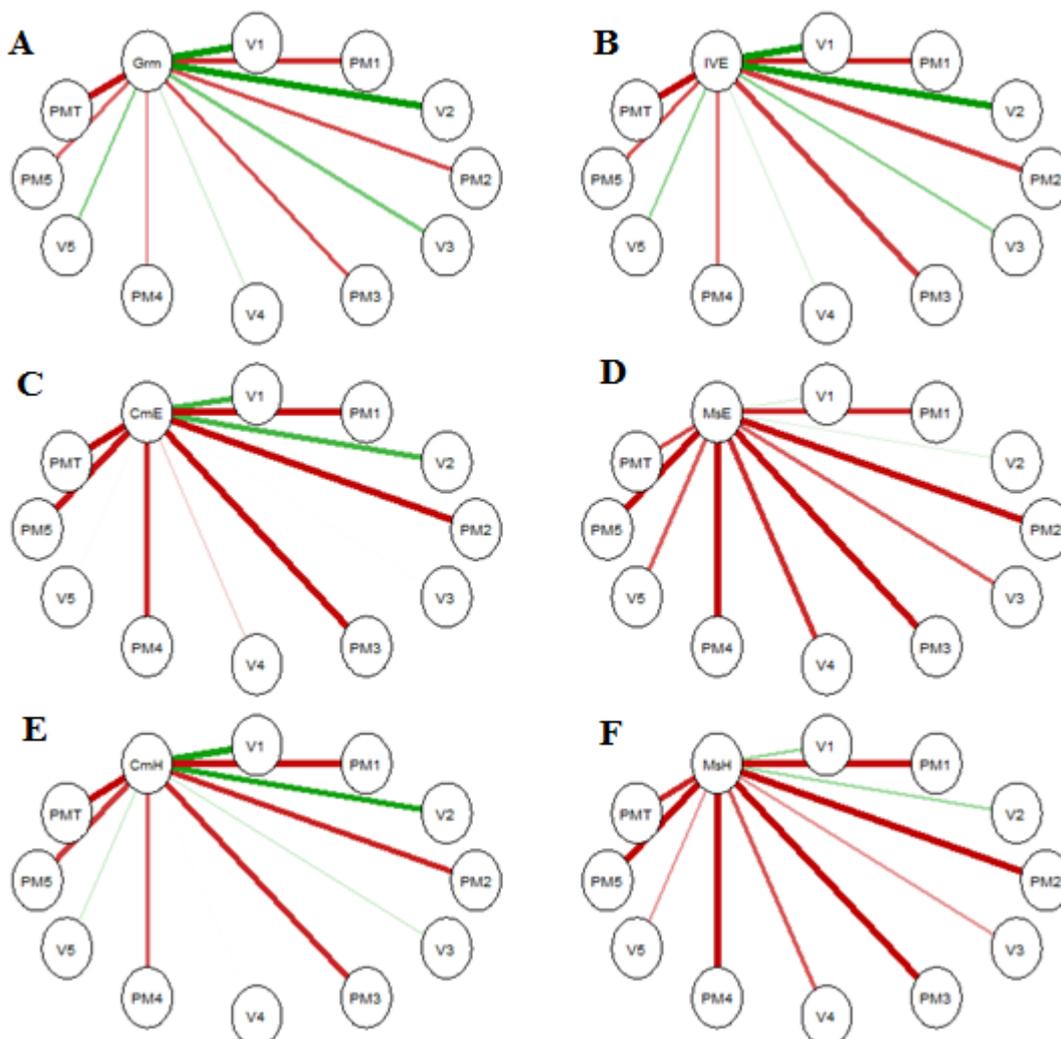


Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Na Figura 6, é possível observar a comparação das estimativas dos parâmetros da classificação de imagens (Cl, porcentagem de vigor, viabilidade e inviabilidade) em relação à porcentagem de

germinação, IVE, MSH, MSE, CME e CMH. Nota-se que a maior estimativa do escore CI, bem como a maior porcentagem de sementes vigorosas, estão diretamente relacionadas às maiores estimativas do teste de germinação e do vigor associado a ela. No entanto, na Figura 6C, a porcentagem de germinação, IVE e CMH apresentaram baixa magnitude de correlação em relação à viabilidade, em que a maior porcentagem de sementes viáveis correlacionou-se negativamente com a massa seca e CME, ou seja, a maior estimativa de sementes viáveis pode não estar associada ao maior vigor quanto ao comprimento e massa seca de plântulas. Já a estimativa de sementes inviáveis correlacionou-se negativamente com todos os parâmetros do teste de germinação, em que quanto maior a porcentagem de sementes inviáveis, menor é a qualidade fisiológica e potencial germinativo.

Figura 7. Representação gráfica da estimativa de correlação de descritores da qualidade fisiológica pelo teste de germinação em relação aos parâmetros estimados pelas RNAs.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Na Figura 7, nota-se que, para uma maior porcentagem de germinação e IVE, é mais importante se ter maiores porcentagens de tons médio de vermelho, principalmente, nas regiões V1, V2 e V3 da

semente pelas maiores estimativas de correlação. Esse mesmo comportamento pode ser verificado para o comprimento de epicótilo e hipocótilo, para as regiões V1 e V2, entretanto, a presença de vermelho nas demais regiões da semente (V3, V4 e V5), não apresentaram correlação significativa com esta característica. É importante ressaltar que a presença de tecido morto, nas regiões V1 e V2, é bastante prejudicial à semente, considerada região vital em que se encontram o eixo embrionário e a região de inserção da radícula com o cotilédono, a qual é fundamental no processo de mobilização de reservas durante a germinação.

Por outro lado, a massa seca de epicótilo e hipocótilo é influenciada negativamente pela presença de tecido morto quanto às cinco partes da semente de maneira mais significativa que pela presença de tecido vivo. A semente excessivamente vermelha pode estar sofrendo algum tipo de estresse, resultando em uma maior taxa respiratória, em consequência, elevação da taxa de deterioração, podendo induzir, portanto, ao menor vigor quanto à massa seca de epicótilo e hipocótilo. Todavia, é importante ressaltar que a massa seca de hipocótilo foi a variável do teste de germinação mais eficiente na estratificação de vigor dos lotes e, provavelmente, mais sensível à ocorrência de estresse.

Medeiros *et al.* (2018) também obtiveram correlação positiva significativa entre a análise de imagem e os testes de germinação e vigor, utilizados tradicionalmente, ao avaliar o potencial fisiológico de sementes e plântulas de quatro lotes de milho. Trujillo, Junior & Cicero (2019), afirmam que a análise de imagens de plântulas é uma ferramenta eficiente para definir o vigor de lotes de sementes de café (*Coffea arabica* L).

Os testes de viabilidade de semente são utilizados para determinar se a semente está viva ou morta. Contudo, no teste de tetrazólio, a classificação de viabilidade leva em consideração todas as sementes vivas com potencial germinativo, englobando as vigorosas e as viáveis não vigorosas (em deterioração ou lesionadas), conforme classificação da Figura 1. Dessa forma, apesar da semente ainda germinar em condições favoráveis (MATTHEWS; POWELL, 2006), o vigor é afetado, em virtude da redução dos nutrientes de reserva, como açúcares, proteínas e amido, refletindo no tempo de germinação e vigor de plântulas (MARCOS FILHO, 2015).

Além disso, os testes de vigor, baseados no desempenho de plântulas, como o comprimento e massa seca, levam em consideração apenas as plântulas normais do teste de germinação e partem do princípio de que sementes mais vigorosas, como as de maior tamanho e peso, originam plântulas mais desenvolvidas e com maior acúmulo de matéria seca que as menores, pela maior quantidade de nutrientes de reserva, bem como maior capacidade de mobilização desses nutrientes, para o eixo embrionário, durante o crescimento inicial (STEINER *et al.*, 2019; SNIDER *et al.*, 2014).

Contudo, sementes fisiologicamente envelhecidas ou mais deterioradas apresentam baixo potencial fisiológico, visto que os primeiros sinais de deterioração estão associados à baixa velocidade de germinação, decorrente da perda da integridade do sistema de membranas celulares, enquanto a ocorrência de anormalidades nas plântulas está relacionada aos estágios finais desse processo pela morte dos tecidos, principalmente os meristemáticos, em diferentes partes das sementes (BIABANI *et al.*, 2011; MARCOS FILHO, 2015).

4 CONCLUSÕES

A maior porcentagem de germinação, IVE, Comprimento de epicótilo e hipocótilo estão relacionados à maior porcentagem de tons de vermelho, nas regiões vitais da semente (V1 e V2), pela maior estimativa de correlação. A massa seca, entretanto, está relacionada às menores porcentagens de tecido morto, em todas as regiões da semente, apresentando correlação significativa e negativa em relação às partes mortas (PMT).

A análise de imagens computacional, por meio de Redes Neurais Artificiais, é uma alternativa eficaz, para avaliar o teste de tetrazólio, quanto à qualidade fisiológica de sementes de *A. cearensis*.

5 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E.M.D.F.L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p.325-354, 2007.

ALMEIDA, J.P.N.D.; LESSA, B.F.D.T.; PINHEIRO, C.L.; GOMES, F.M.; MEDEIROS FILHO, S; SILVA, C.C. Germination and development of *Amburana cearensis* seedlings as influenced by seed weight, light and temperature. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 39, n. 4, p.525-533, 2017.

ARANTES, C.R.D.A.; FAVA, C.L.F.; CAMILI, E.C.; SCARAMUZZA, W.L.M.P. Seed Germination and Seedling Vigor of *Magonia pubescens*. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 4, 2019.

ARAÚJO, R.F.; ZONTA, J.B.; ARAÚJO, E.F.; DONZELES, S.M.; COSTA, G.M. Teste de condutividade elétrica para sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Idesia (Arica)**, v. 29, n. 2, pp.79-86, 2011.

ARIN, M.; LAVERACK, G.; POWELL, A.A.; MATTHEWS, S. Potential of the electrical conductivity of seed soak water and early counts of radicle emergence to assess seed quality in some native species. **Seed Science and Technology**, v. 46, n. 1, p.71-86, 2018.

BIABANI, A.; CARPENTER BOGGS, L.; KATOZI, M.; SABOURI, H. Effects of Seed Deterioration and Inoculation with *Mesorhizobium cicer* on Yield and Plant Performance of Chickpea. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 1, p.66, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.662-666, 2010.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n.2, p.326-342, 2010.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 3, p. 359-366, 2019.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U., COSTA, E. M. T.; SANTOS-MOURA, S. S.; SILVA, R. D. S., CRUZ, F. R. S. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, 2013.

IOSSI, E.; MÔRO, F.V.; FERRARI, R.A.; BARBOSA, R.M.; VIEIRA, R.D. Composição química, anatomia do embrião e viabilidade pelo teste de tetrazólio em pirênios de *Euterpe edulis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 11, n. 4, p.310-316, 2017.

KAPADIA, S. V.N.; PATIL, K. Seed Image Analysis and Its Application in Seed Science Research. **Advances in biotechnology and microbiology**, v. 7, n.2, nov. 2017.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 382p. 1992.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5ª ed. Nova Odessa: Inst. Plantarum, vol. 1, 248p., 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512p. 2002.
- LUCIO, A. A.; ARAUJO, M. N.; SILVA, F. F. S.; DANTAS, B. F. Effect of storage in different environments and packages on germination of *Amburana cearensis* (Allemao) AC Smith. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)**, v. 1, n. 4, Nov. 2016.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seeding emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 76-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.
- MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia agricola**, Piracicaba – SP, v. 72, n. 4, p.363-374, July/Aug., 2015.
- MATTHEWS, S.; POWELL, A. Electrical conductivity vigour test: physiological basis and use. **Seed Testing International**, v. 131, p. 32-35, 2006.
- MCDONALD JR, M. B.; PHANEENDRANATH, B. R. (1978) VIGOR TESTS: Potential for standardization **Journal of Seed Technology**, v. 3, n. 1, p. 27-37, 1978.
- MEDEIROS, A.D.; PEREIRA, M.D.; SOARES, T.F.S.N.; NORONHA, B.G.; PINHEIRO, D.T. Computer Vision as a Complementary Method to Vigour Analysis in Maize Seeds. **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 1-8, 2018.
- PARAÍSO, H.A.; JUNIOR, D.D.S.B.; AVELAR, R.I.S.; COSTA, C.A.; DE PAULA GOMES, L.S.; NASCIMENTO, W.M. Adjustments in the tetrazolium test methodology for assessing the physiological quality of chickpea seeds. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 1, p.007-012, 2019.
- PEREIRA, D. F.; SAITO, P.; BUGATTI, P. H. An image analysis framework for effective classification of seed damages. In: **Proceedings of the 31st Annual ACM Symposium on Applied Computing ACM**, p. 61-66, abr. 2016.
- PINTO, C.A.G.; CARVALHO, M.L.M.D.; ANDRADE, D.B.D.; LEITE, E.R.; CHALFOUN, I. Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds¹. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p.319-328, 2015.
- SABANCI, K.; TOKTAS, A.; KAYABASI, A. Grain classifier with computer vision using adaptive neuro-fuzzy inference system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3994–4000, 2017.
- SNIDER, J.L., COLLINS, G.D., WHITAKER, J., CHAPMAN, K.D., HORN, P. AND GREY, T.L. Seed size and oil content are key determinants of seedling vigor in *Gossypium hirsutum*. **Journal of Cotton Science**, v. 18, n. 1, p.1-9, 2014.
- STEINER, F.; ZUFFO, A.M.; BUSH, A.; OLIVEIRA SOUSA, T.; ZOZ, T. Does seed size affect the germination rate and seedling growth of peanut under salinity and water stress?. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 49, p. 54353, 2019.
- TRUJILLO, H.A.; JUNIOR, F.G.G.; CICERO, S.M. Digital images of seedling for evaluating coffee seed vigor. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 1, p.60-68, 2019.

APÊNDICE A –Análise de variância do fatorial para a padronização do teste de Tetrazólio quanto ao Vigor e Viabilidade de três lotes de *A. cearensis*

ANAVA-Vigor					
	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Escarificação	1	12696.0	12696.0	82.5607	<0.001
Temperatura	2	709.3333	354.6667	2.3064	0.1283
Escarif*Temp	2	304.0000	152.0000	0.9884	0.3915
Resíduo	18	2768.0000	153.7778		
Total	23				
C.V. (%)	32.92				

ANAVA- Viabilidade					
	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Escarificação	1	8.816,7	8816.7	63.6838	<0.001
Temperatura	2	681.3333	340.6667	2.4607	0.1136
Escarif*Temp	2	105.3333	52.6667	0.3804	0.6889
Resíduo	18	2492.0000	138.4444		
Total	23				
C.V. (%)	19.34				

APÊNDICE B –Análise de variância para o Vigor e Viabilidade de três lotes pelo do teste de Tetrazólio de três lotes de *A. cearensis*

ANAVA - Vigor					
	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	394.67	197.33	10.571	0.38692
Resíduo	9	1680.00	186.67		
Total	11	2074.67			
CV (%)	25.94				

ANAVA - Viabilidade					
	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	714.67	357.3333	76.571	0.011421
Resíduo	9	420.00	46.67		
Total	11	1134.67			
C.V. (%)	9.27				

APÊNDICE C - Análise de variância para a porcentagem de germinação após o Envelhecimento Acelerado (EA)

Anava - Envelhecimento Acelerado					
	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	2	0.7752	76.571	<0.001
Resíduo	9	0,875	0,0097		
Total	11				
C.V.(%)	17,03				

APÊNDICE D – Média dos lotes de *Amburana cearensis* para o teste de Condutividade elétrica (CE) em 4 tempos de embebição.

Condutividade elétrica					
Lotes	12	24	36	48	60
I	51 a	96.4 b	136.2 b	193.4 b	230.4 b
II	89.2 a	194.8 b	258.6 b	327.8 b	403 b
III	223.4 a	647.4 a	895.6 a	1033.6 a	1168 a
C.V.(%)	18.18				

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

APÊNDICE E - Coeficientes de correlação linear simples, para o tetrazólio (TZ vigor e TZ viabilidade), em relação à qualidade física (comprimento e peso de mil sementes) e fisiológicos: porcentagem de germinação (G%), massa seca de epicótilo (MSEp) e hipocótilo-radícula (MSHip), comprimento de epicótilo (CEp) e hipocótilo-radícula (CHip), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), primeira contagem (1ª cont) e germinação pelo envelhecimento acelerado (G env) de três lotes de *A. cearensis*.

Variáveis	P1000	COM P	G%	CEp	MSEp	CHip	MSHi p	IVE	1cont.	G env
TZVigor	0,958*	0,917*	0,785*	0,912 *	0,974 *	0,753*	0,999*	0,636	0,569*	0,881 *
TZViab	0,775*	0,694*	0,962*	0,999 *	0,814 *	0,947*	0,928*	0,883	0,840*	0,633 *
COMP	0,993*	1,000*	0,473 ⁿ _s	0,672 *	0,983 *	0,428 ⁿ _s	0,913*	0,276 ⁿ _s	0,193 ⁿ _s	0,997 *
P1000	1,000*	0,993*	0,575*	0,756 *	0,998 *	0,533 ⁿ _s	0,955*	0,389 ⁿ _s	0,309 ⁿ _s	0,980 *

* Significativo; ^{ns} Não significativo pelo teste T ($P \leq 0,05$).