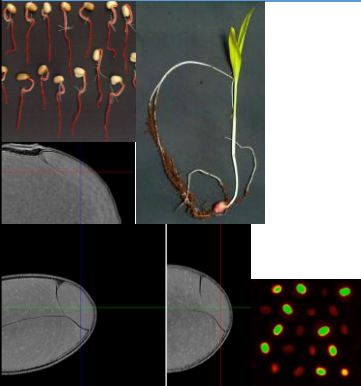


Produção de Sementes (LPV-5705)
Pós-Graduação – Fitotecnia
Primeiro Semestre de 2020

ANÁLISE DE IMAGENS EM TECNOLOGIA DE SEMENTES



Francisco Guilhien Gomes Junior
Tecnologia de Sementes
Depto de Produção Vegetal
USP/ESALQ



Análise de imagens de sementes e plântulas

- **Procedimentos não destrutivos para avaliação da qualidade de sementes**
 - Raios X
 - Microtomografia computadorizada de raios X
 - Imagem por ressonância magnética
 - Fluorescência de clorofila
 - Imagens multi e hiperespectrais
 - Outros (termografia infravermelho médio, biospeckle)
- **Avaliação de características físicas e morfológicas de sementes e de plântulas**
 - Descritores de cor, forma e tamanho das sementes
 - Avaliação do vigor de sementes com base em imagens digitais de plântulas

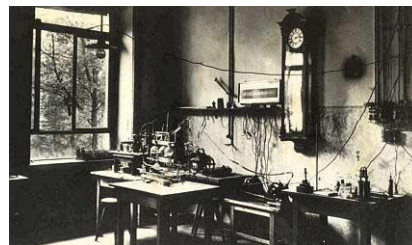
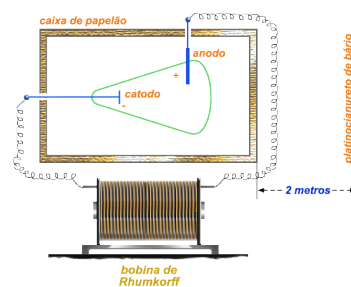


Descoberta dos raios X

- Físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923)



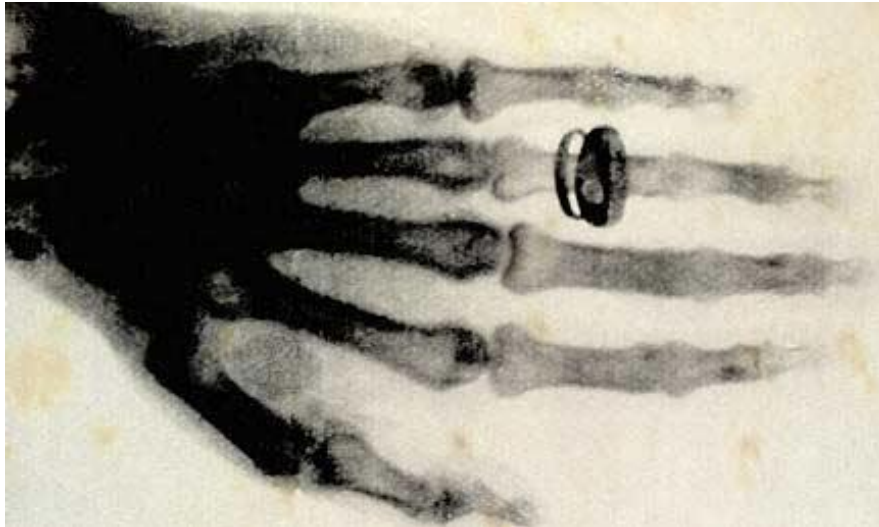
Fonte: google



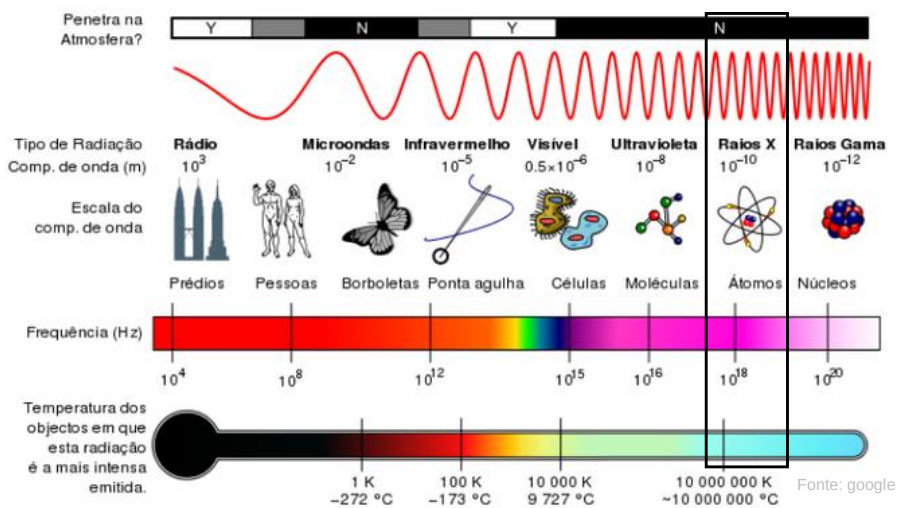
Laboratório de Röntgen (Alemanha)

O fortuito 8 de novembro de 1895

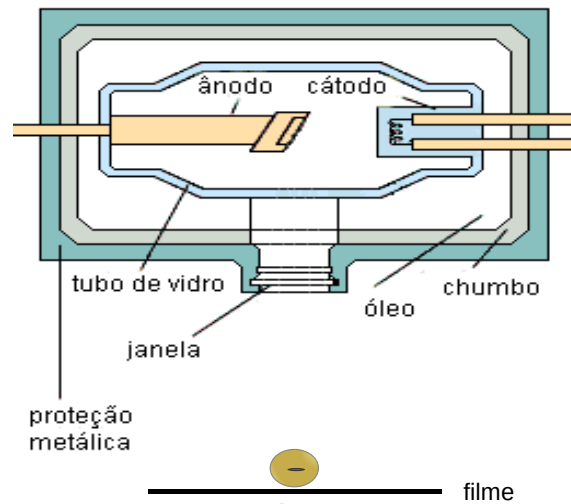
■ 8 de novembro de 1895: primeira chapa de raios X



Características dos raios X



Como os raios X são gerados?



Fatores que afetam o nível de absorção dos raios X pela **semente**

Espessura e densidade dos tecidos



Fonte: google

Composição química da semente

Principais reservas armazenadas em sementes de algumas espécies de interesse econômico

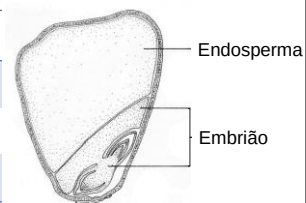
Espécie	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)	Estrutura
Algodão	39	15	33	Embrião
Amendoim	31	12	48	Embrião
Arroz	8	65	2	Endosperma
Ervilha	25	52	6	Embrião
Feijão	23	56	1	Embrião
Girassol	17	19	46	Embrião
Mamona	18	0	64	Endosperma
Milho	10	80	5	Endosperma
Soja	37	26	17	Embrião
Trigo	12	75	2	Endosperma

Adaptado de Bewley e Black (1985)

Composição porcentual de reservas armazenadas em diferentes partes da semente de milho, cv. Iowa 939

Reserva	Semente	Endosperma	Embrião
Proteínas	8	7	19
Amido	74	88	9
Lipídios	4	<1	31

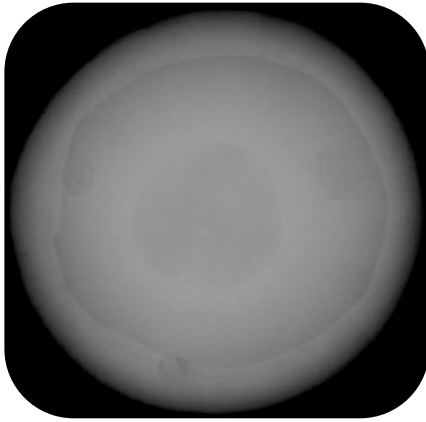
Bewley e Black (1985)



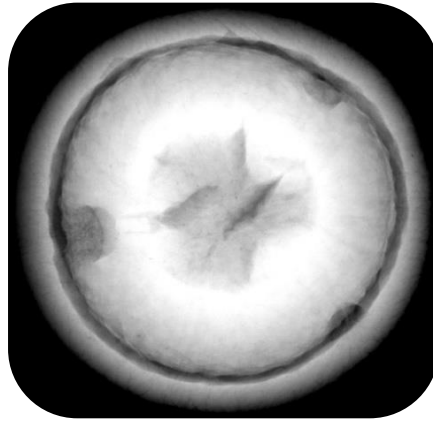
A composição química da semente define seu grau de aidez por água

O teor de água da semente influencia a densidade óptica

Imagens radiográficas de sementes de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) apresentando diferentes graus de umidade

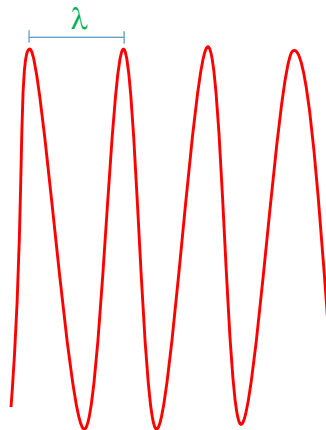


35% de água

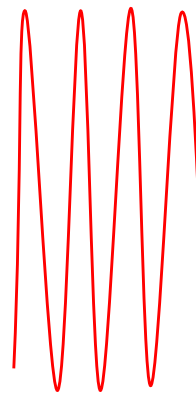


15% de água

Comprimento de onda (λ) da radiação ionizante



objetos menos densos



objetos mais densos

Raios X de **menor** comprimento de onda possuem **maior** poder de penetração

O TESTE DE RAIOS X interpretação

- Conhecer a morfologia interna
- Conhecer o princípio do teste

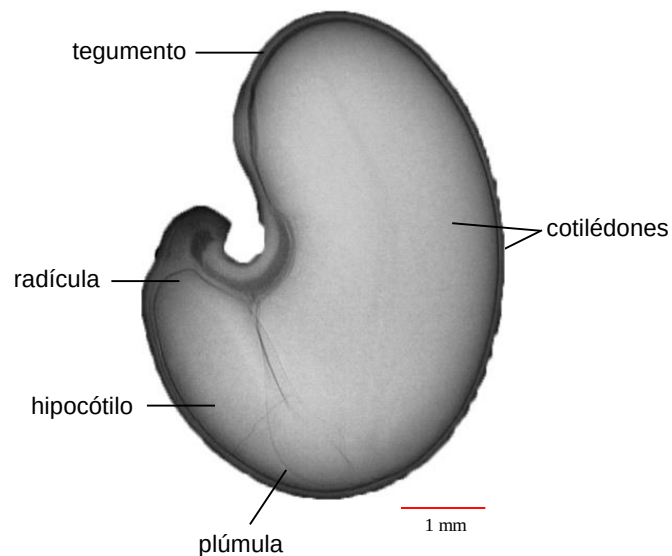


ISTA (2003) e RAS (2009)

Recomendado com a finalidade básica de detectar sementes cheias, vazias, com injúrias mecânicas ou atacadas por insetos



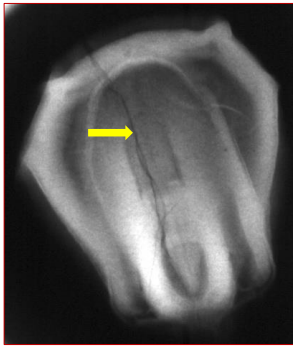
Crotalaria juncea L.



Viabilidade da utilização de raios X em sementes

Não provoca mutação: a pequena dose de radiação usada durante o teste não exerce influência negativa sobre a germinação

CAUSA



Radiografia de semente de milho doce

EFEITO



Gomes-Junior e Cicero (2012)

Não inviabiliza a semente (**método não destrutivo**): relações de causas e efeitos

Finalidades da utilização do teste de raios X em Tecnologia de Sementes

- Detecção de anormalidades em embriões
- Determinação do estágio de desenvolvimento das sementes
- Estudos de alterações fisiológicas durante os processos de maturação, secagem, germinação ou condicionamento fisiológico
- Identificação de injúrias mecânicas, injúrias causadas por insetos ou injúrias decorrentes de outros fatores adversos em pré e pós-colheita
- Seleção de sementes cheias

Raios X

Detecção de anormalidades em embriões

Tecoma stans

Embrião deformado

Embrião com pequeno defeito

Embrião sem defeito

PA

PA

PN

Socolowski e Cicero (2008)

Raios X

Identificação de injúrias mecânicas

Plântula anormal

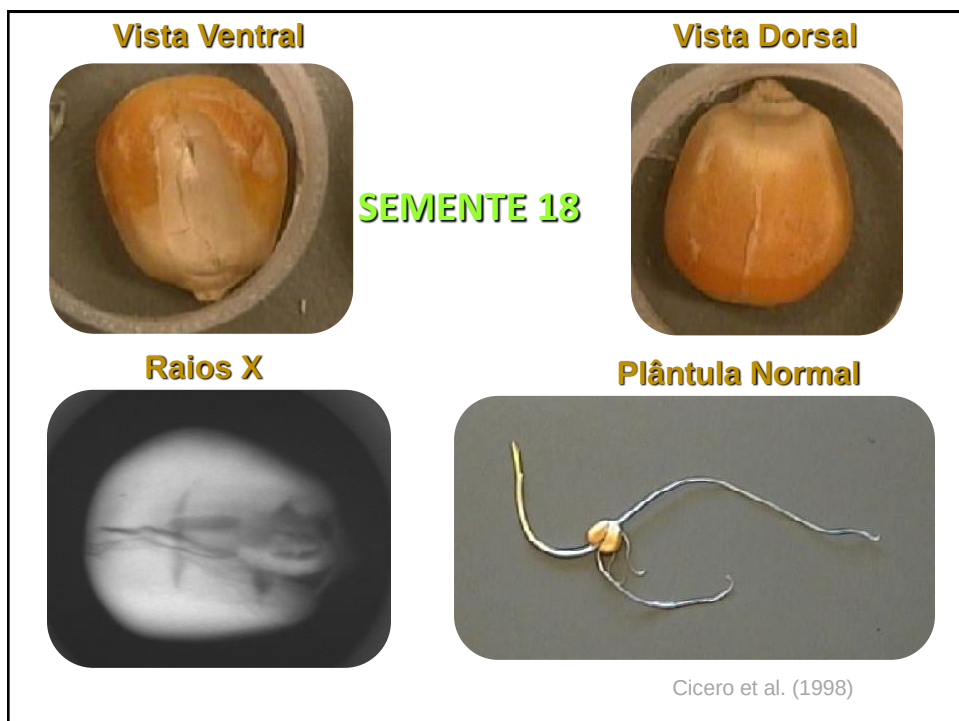
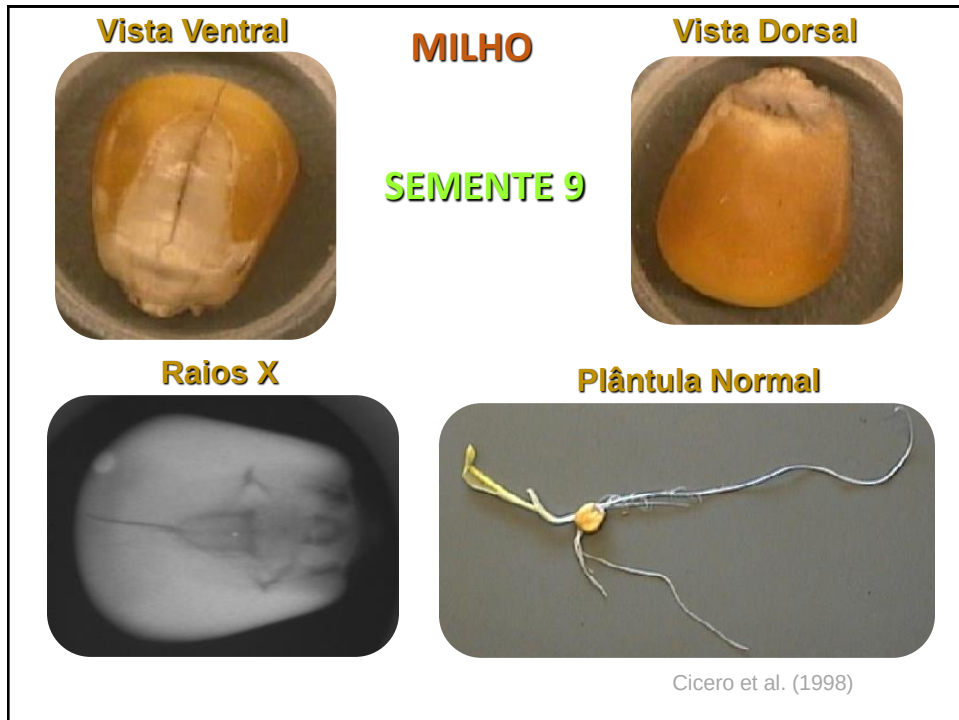
milho doce

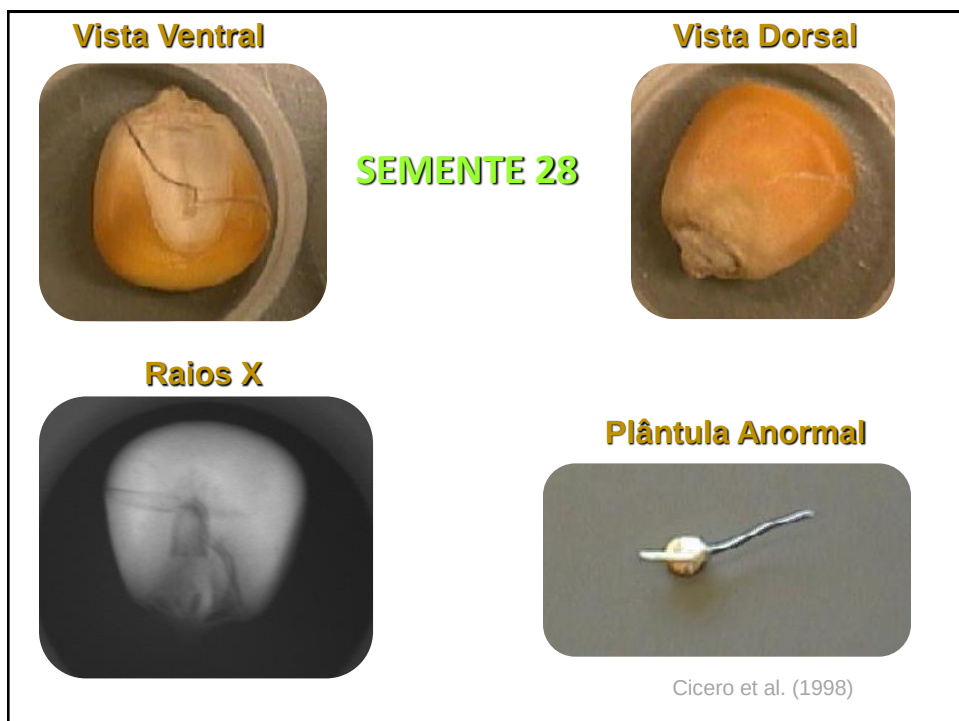
Gomes-Junior e Cicero (2012)

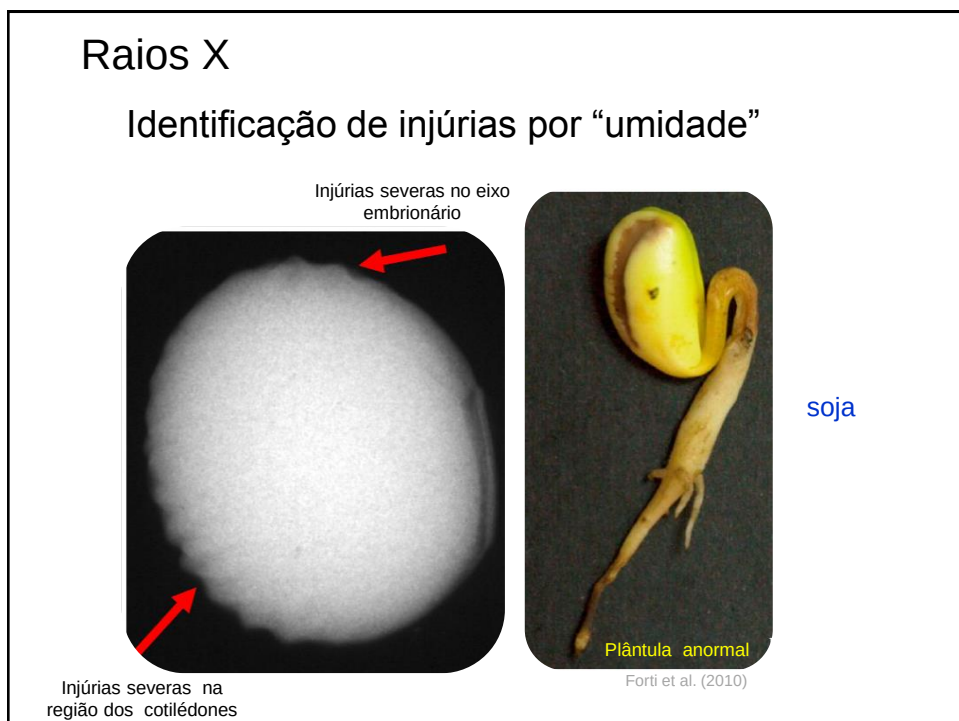
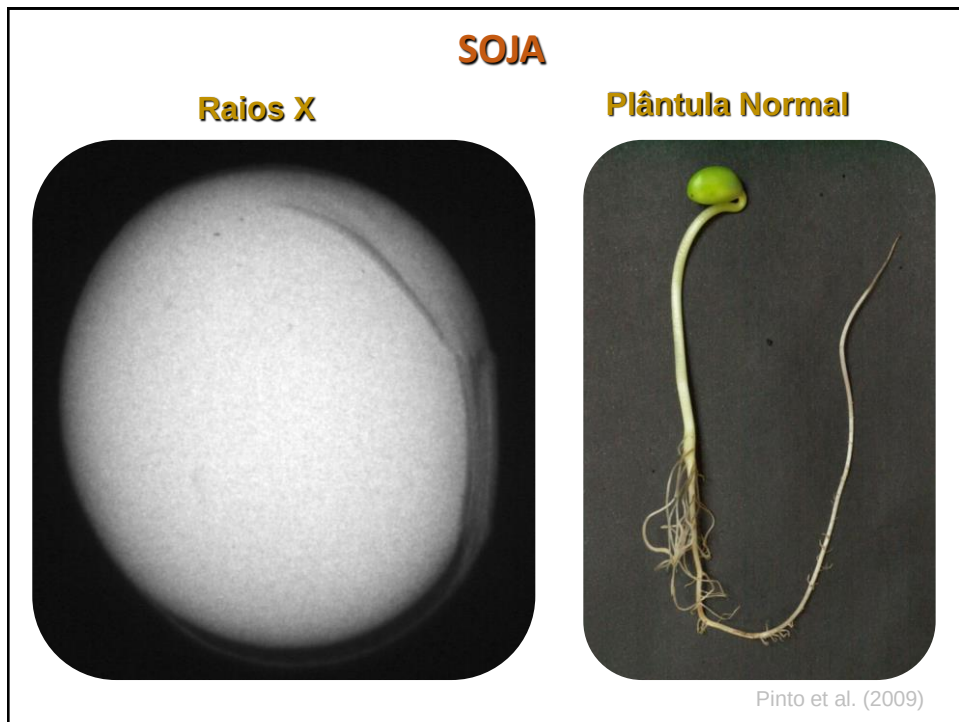
Plântula anormal

soja

Flor et al. (2004)







ARROZ

Secagem a 32° C

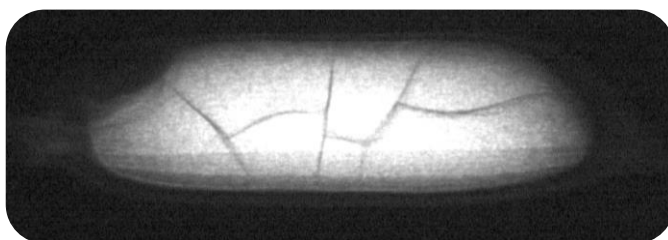
Raios X

Plântula normal

Menezes et al. (2012)

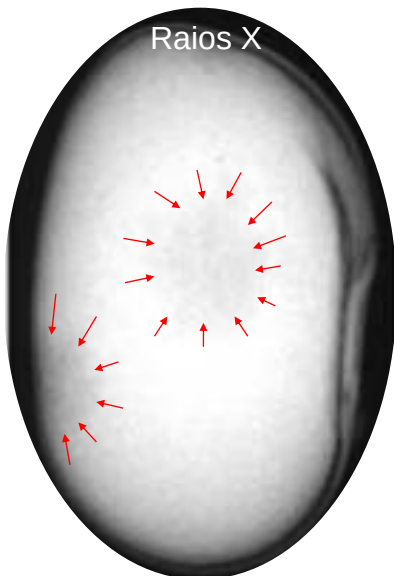
Raios X

Identificação de injúrias causadas por secagem

Semente de
arroz: secagem
a 50° C

Menezes et al. (2012)

Ataque de percevejo



Plântula Anormal

Forti et al. (2008)

Ataque de caruncho

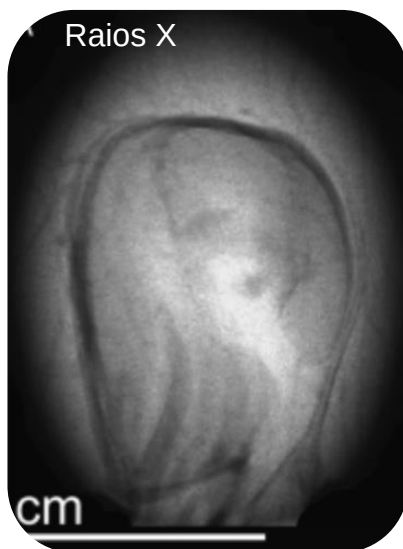
feijão-caupi



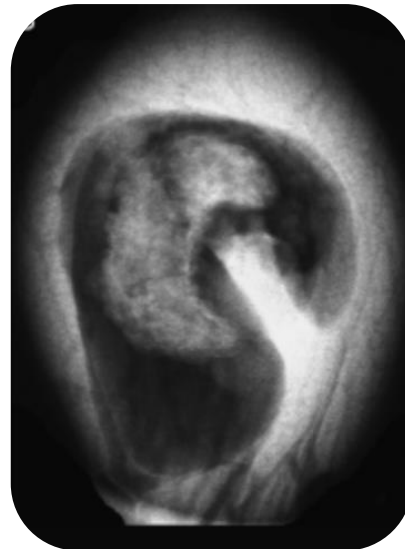
Plântula Anormal

Melo et al. (2010)

Predação: Curculionidae

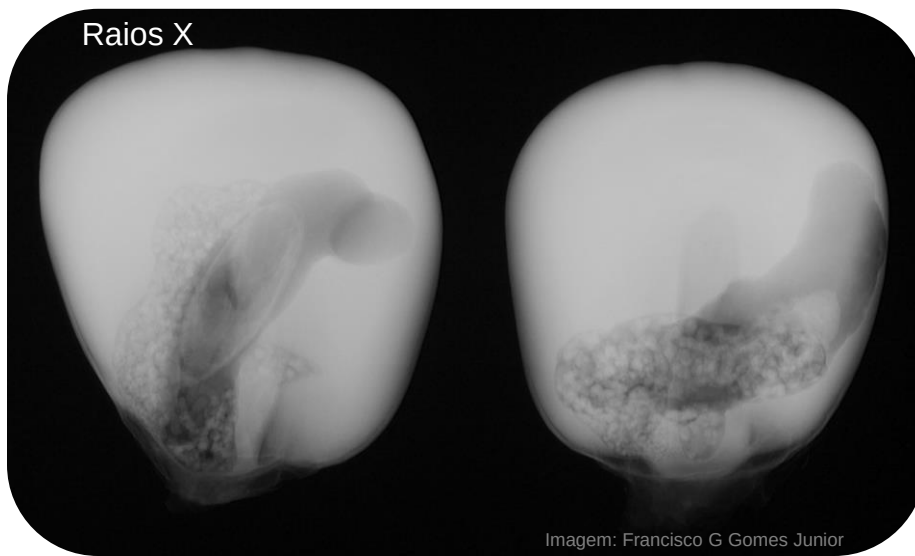


Syagrus romanzoffiana Cham. (Arecaceae)



Brancalion et al. (2011)

Sitophilus zeamais



Raios X

Seleção de sementes cheias



Sementes
de mamona



Totalmente formada



Parcialmente formada

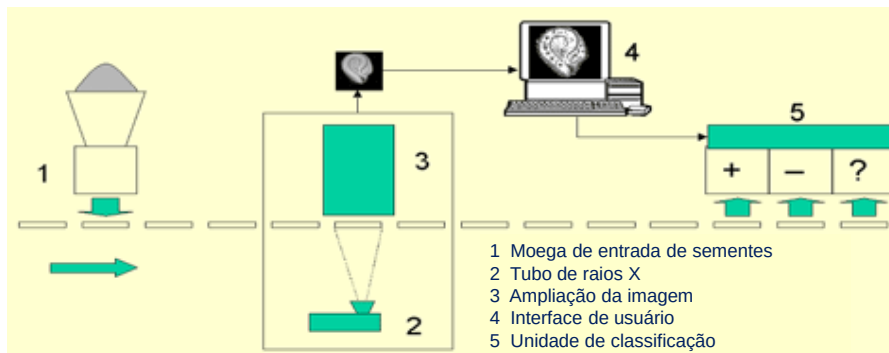


Não formada

(Carvalho et al., 2010)

Raios X no controle de qualidade da indústria de sementes

Posicionamento da semente → Obtenção da imagem radiográfica → Análise e processamento dos dados → Classificação

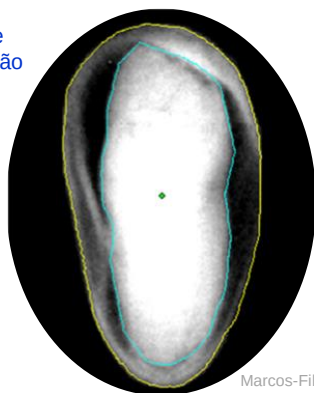


Fonte: google (adaptado)

Raios X

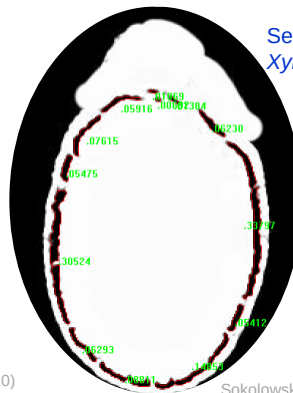
Base para utilização de programas computadorizados na avaliação de alterações da morfologia interna

Semente de algodão



Área do embrião = 57%

Semente de *Xylopia aromatica*



Espaço livre interno total = 1,28 mm²

VARIAÇÕES NA ÁREA EMBRIONÁRIA EM LOTE COMERCIAL DE SEMENTES DE ALFACE

Aumento da área ocupada pelo embrião

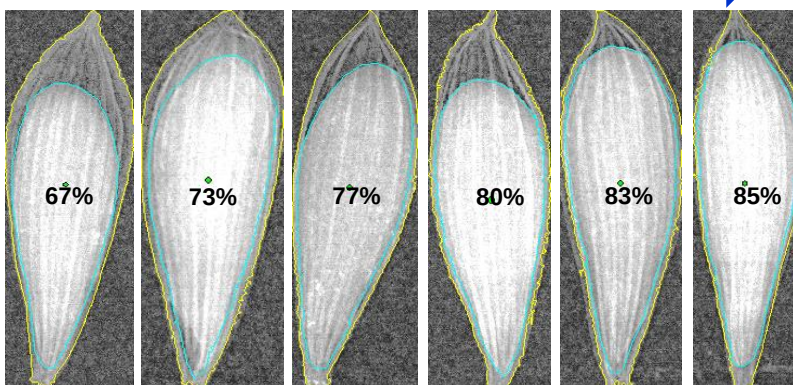


Imagem: Francisco G. Gomes Junior

EFEITOS SOBRE O DESEMPENHO DAS PLÂNTULAS?

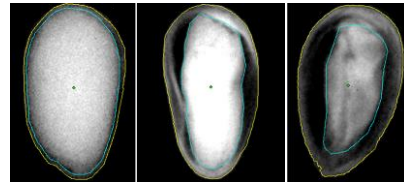
TOMATO ANALYZER



Brewer et al. (2008)

"Pericarp Area" = 0,14 "Pericarp Area" = 0,43 "Pericarp Area" = 0,59
 Área do embrião = 86% Área do embrião = 87% Área do embrião = 41%

Semente
de algodão



Marcos-Filho et al. (2010)

IMAGE-PRO® PLUS

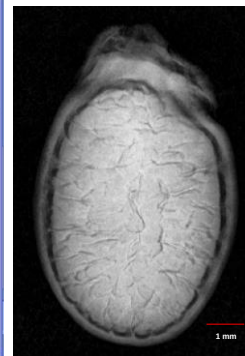
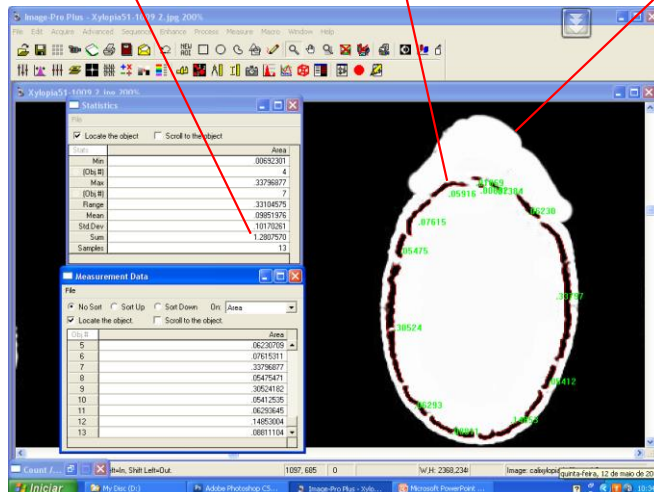
Espaço livre interno
total = 1,2807570 mm²

Espaço livre interno =
0,05916 mm²

Xylopia aromatica
(anonaceae)

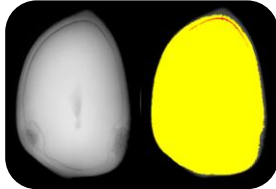
Imagem processada
e analisada

Imagem radiográfica
original

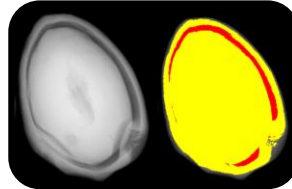


Socolowski et al. (2011)

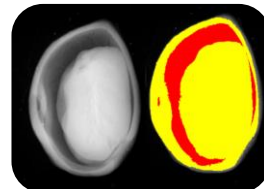
SENSIBILIDADE DE SEMENTES DE PUPUNHA À DESSECAÇÃO



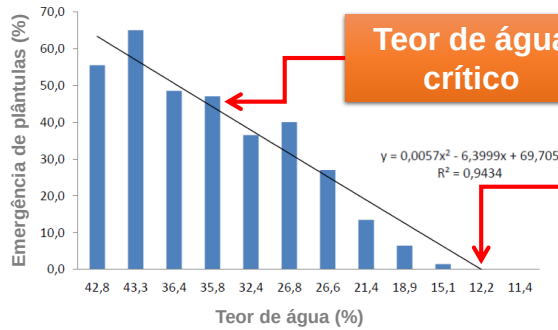
Espaço livre interno = 0,5%
Teor de água = 43,3%



Espaço livre interno = 7,2%
Teor de água = 35,8%



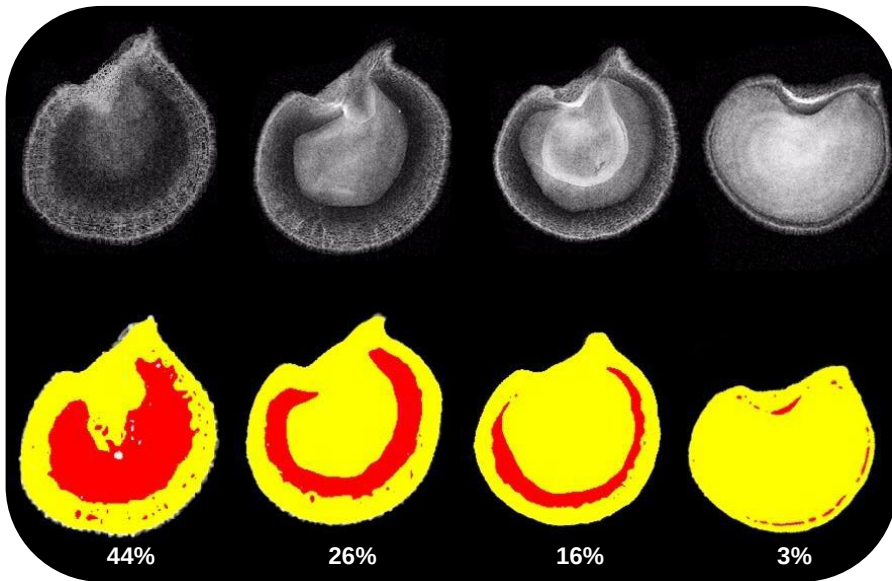
Espaço livre interno = 23,2%
Teor de água = 12,2%



Morte da semente

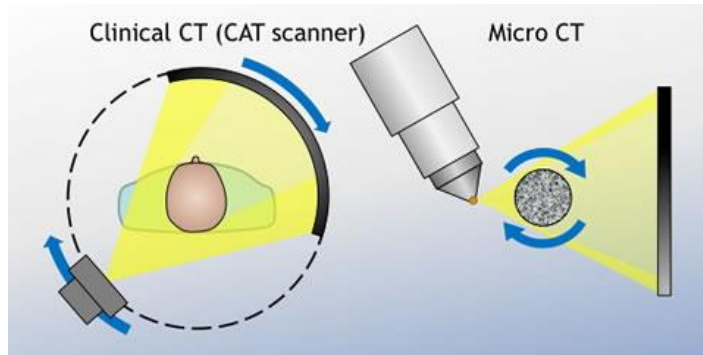
Parmeijani (2013)

MATURAÇÃO DE SEMENTES DE PIMENTÃO



Carvalho (2014)

Tomografia (TC) e microtomografia (micro-TC) computadorizada de raios X

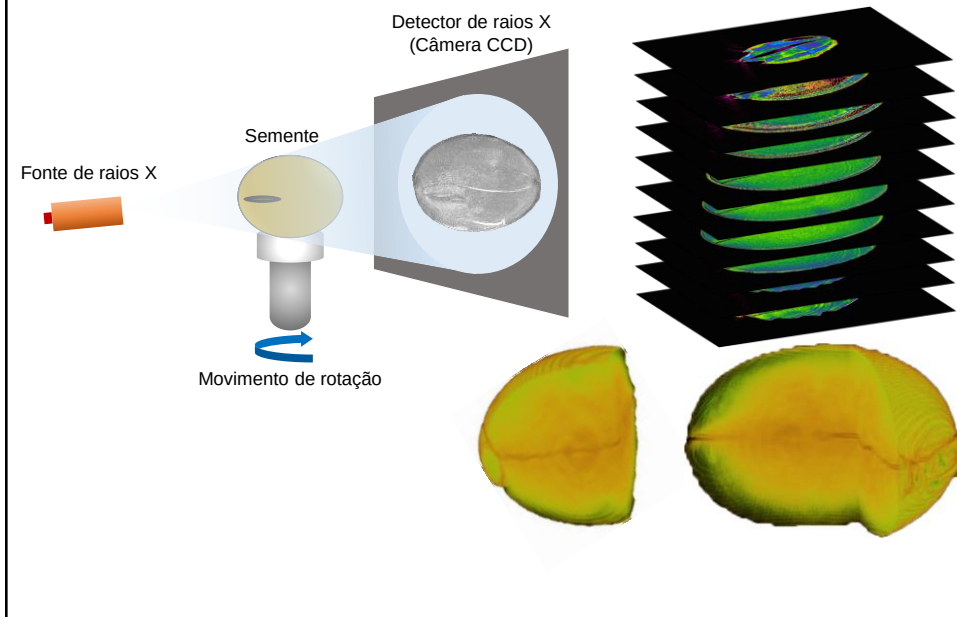


- Diferença da micro-TC em relação à TC consiste no grau de resolução da imagem e no tamanho do objeto a ser analisado

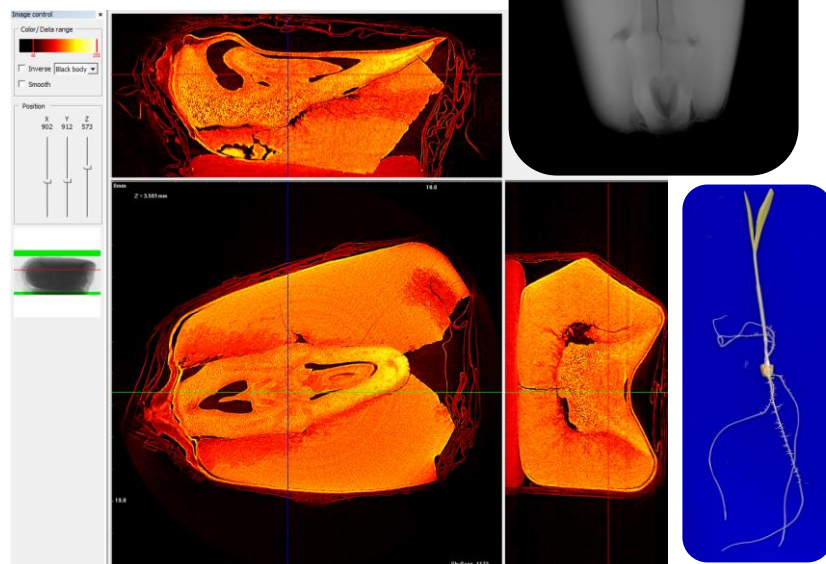
Microtomografia computadorizada de raios X (micro-TC)

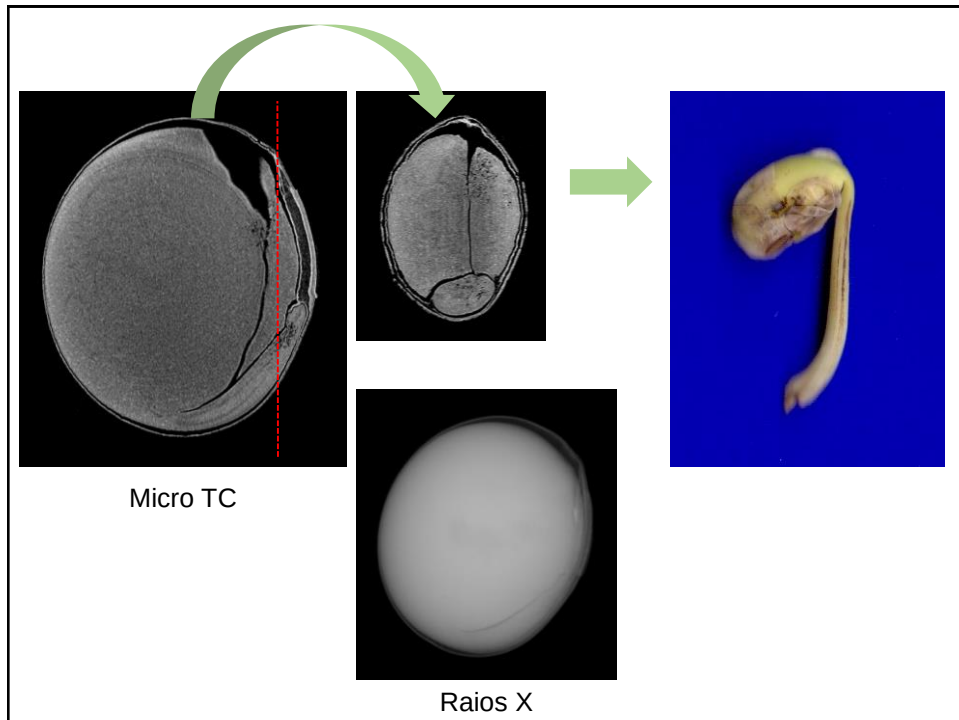
- É uma técnica que permite a visualização de **seções transversais** (cortes internos) de um objeto de forma não destrutiva
- A captura é feita através de uma série de **pequenas rotações**
- As informações de atenuação da radiação que atravessa o objeto são gravadas para um plano de interesse
- Um algoritmo processa os dados para formar uma imagem 2D
- A combinação dessas imagens pode gerar a visualização em 3D

Como a micro-TC funciona?



Comparação entre raios X e micro-TC





Tomografia por ressonância magnética

- ➡ Método não invasivo
- ➡ Informações sobre o estado químico e físico dos materiais
- ➡ Informações sobre o estado fisiológico e as condições de metabolismo em sistemas biológicos
- ➡ Não emprega radiação ionizante
- ➡ Diferencia claramente cada tipo de tecido mole, mesmo que estes tecidos tenham a mesma densidade, quando seus estados fisiológicos diferem entre si

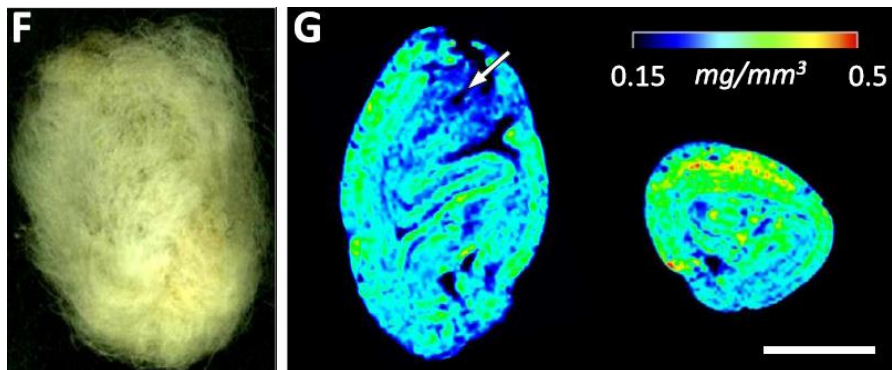
Imagem por Ressonância Magnética

Princípio

Se baseia na aplicação de ondas de radiofrequência que interagem com o momento magnético dos átomos de hidrogênio dos tecidos para produzir imagens

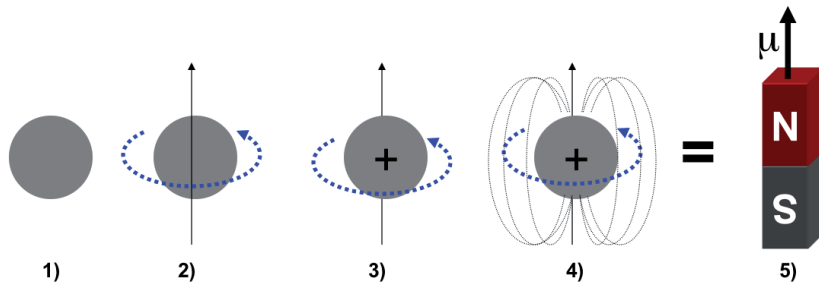
Imagem por Ressonância Magnética

Deposição de lipídios no interior da semente de algodão



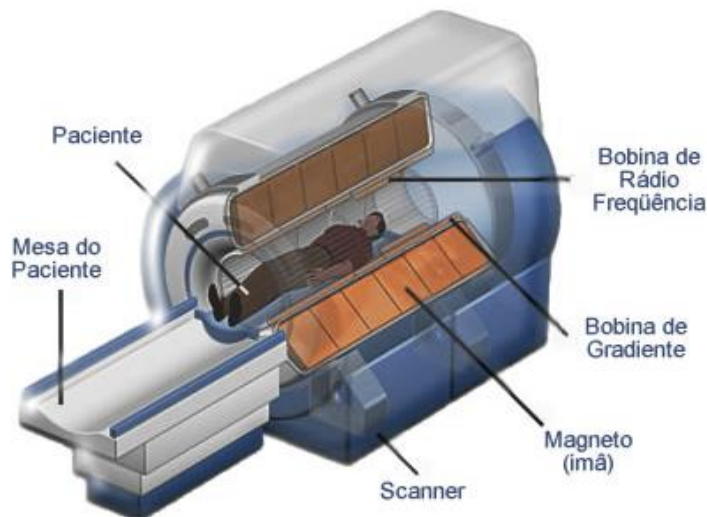
Horn et al. (2012)

Spin e momento magnético do átomo de hidrogênio

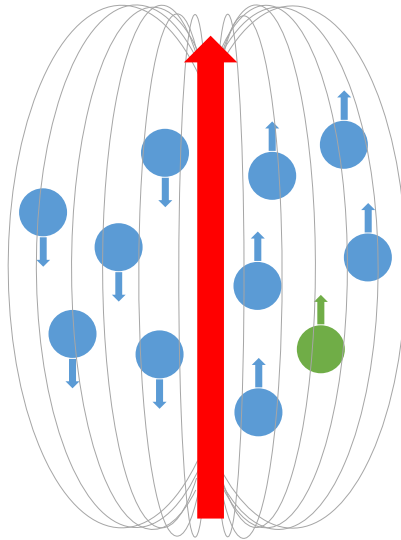


- 1) Próton de hidrogênio como uma pequena esfera
- 2) Possui movimento de giro, ou spin, em torno do seu próprio eixo
- 3) É uma partícula carregada positivamente
- 4) Possui campo magnético próprio ao seu redor
- 5) Comporta-se como um ímã com momento magnético (μ) associado

Corte de um equipamento de ressonância magnética

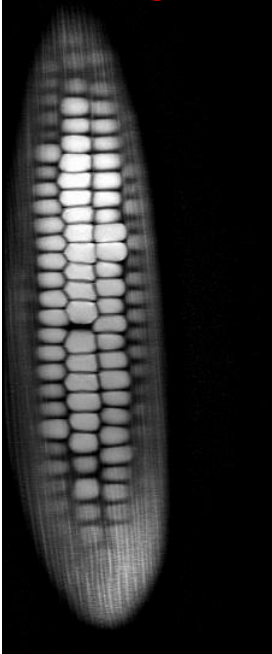


Prótons de hidrogênio sob ação do campo magnético externo



Campo magnético

Tomografia por ressonância magnética

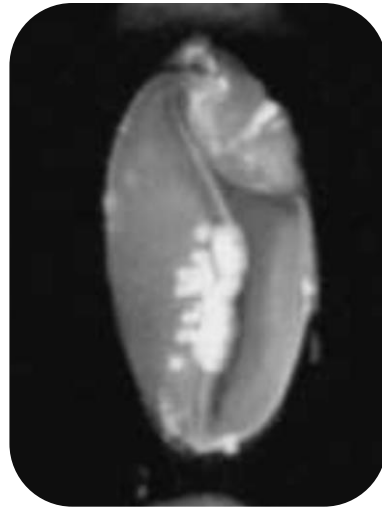


- A tomografia por ressonância magnética utiliza fortíssimos campos magnéticos e ondas de rádio para formar imagens de uma amostra
- São utilizados os pulsos de radiofrequência direcionados somente ao **hidrogênio** contido na amostra
- O excesso de energia liberado pelos prótons de hidrogênio quando o pulso de radiofrequência é desligado emite um sinal de uma bobina para o computador
- Por meio de cálculos matemáticos os sinais são transformados em uma imagem

Identificação de fungos



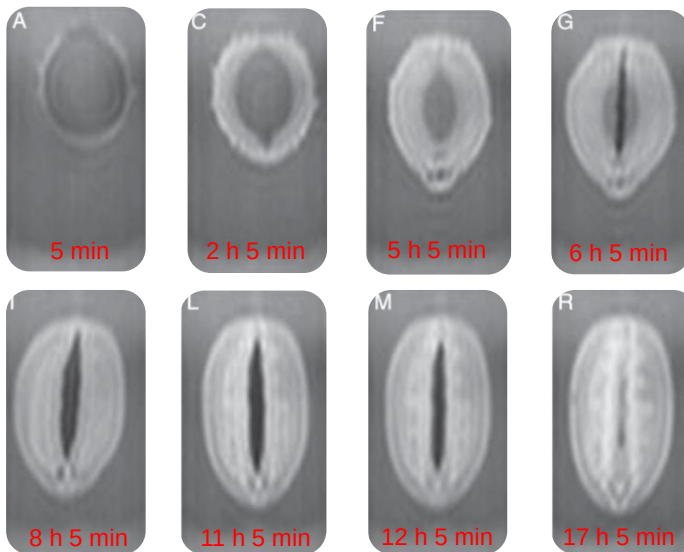
Semente de trigo não infectada



Köckenberger et al. (2004)

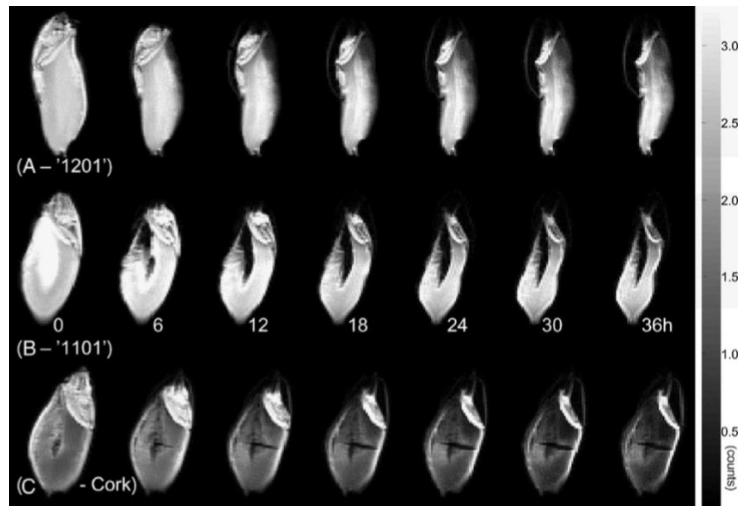
Semente de trigo infectada por *Penicillium aurantiogriseum*

Monitoramento da hidratação de sementes de soja



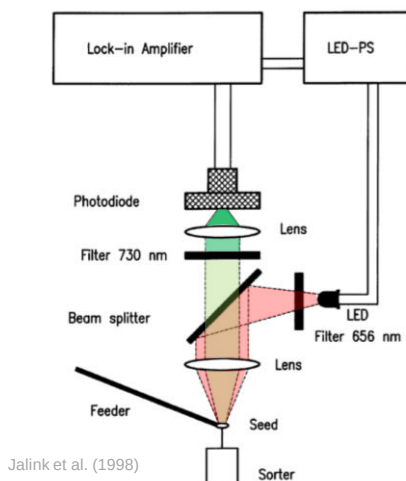
Koizumi et al. (2008)

Monitoramento da secagem de sementes de cevada



Seefeldt et al. (2007)

Fluorescência de clorofila

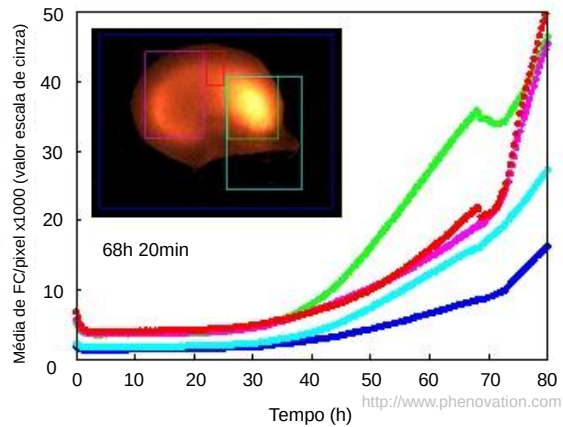


Jalink et al. (1998)

A clorofila **fluoresce** quando excitada em um determinado comprimento de onda

1. Um laser ou uma luz de LED excita a clorofila
2. Um filtro de largura de banda estreita filtra a fluorescência
3. A clorofila da semente é determinada

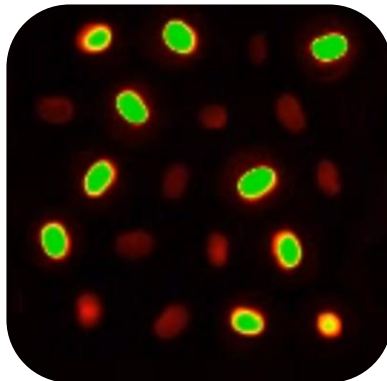
Fluorescência de clorofila em semente de pimenta durante a germinação



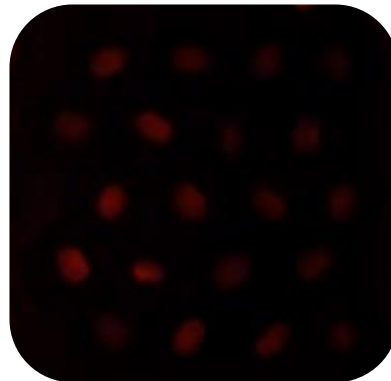
Fluorescência de clorofila em sementes de soja <https://www.youtube.com/watch?v=cMLUCq1LPqI>

Sinal de fluorescência, baixo para alto

preto → vermelho → laranja → amarelo → verde

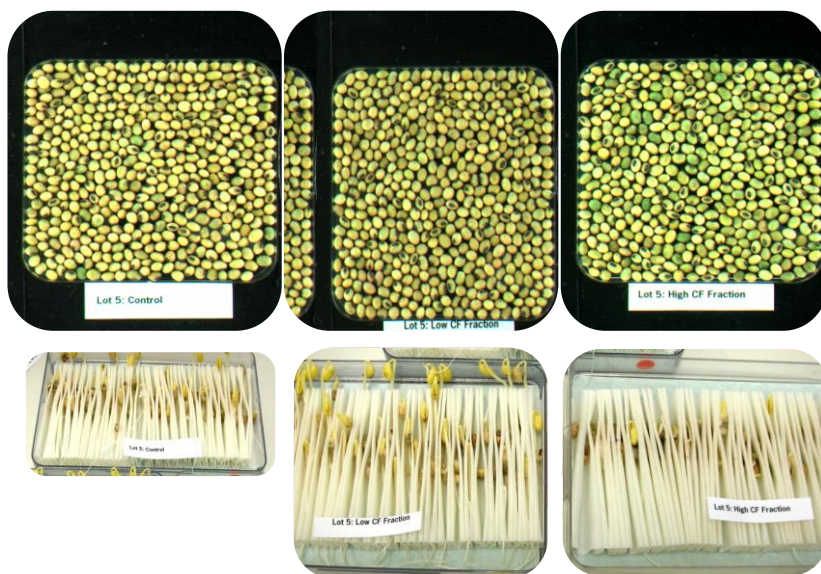


Lote de baixo vigor
Ocorrência de sementes esverdeadas



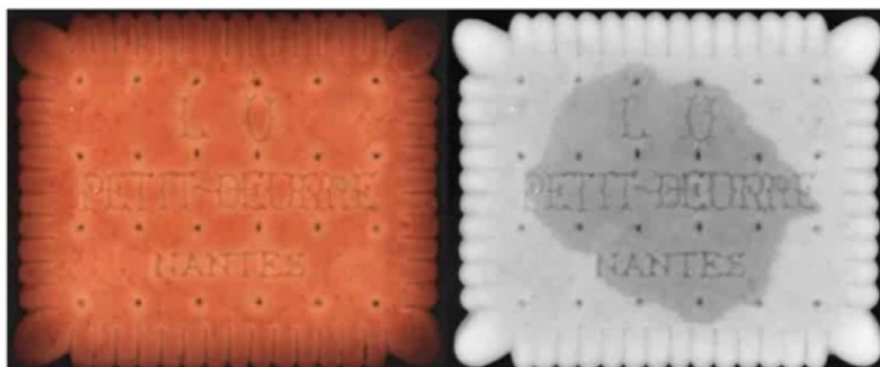
Lote de alto vigor

Fluorescência de clorofila em sementes de soja



Cicero et al. (2009)

Imagem multiespectral

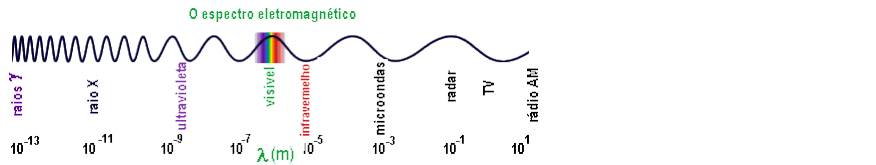


luz ambiente

660nm (banda específica para água)

Câmera multispectral

Imagem multispectral



Imagens de um **mesmo objeto**, tomadas com **diferentes comprimentos de ondas** eletromagnéticas (luz visível, infravermelha, ultravioleta, raios X ou qualquer outra faixa do espectro)

Imagem colorida tradicional

Utiliza três filtros para as bandas **Red**, **Green** e **Blue**

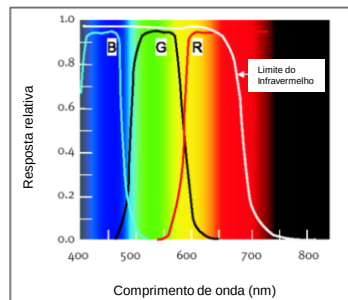
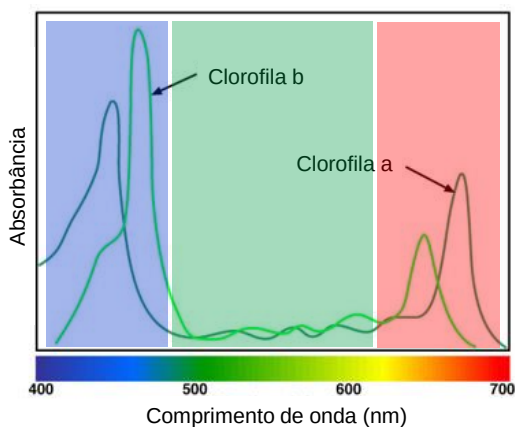


Imagem RGB



Imagem colorida tradicional

Espectro de absorção da clorofila



Clorofilas a e b
apresentam quase
o mesmo sinal
RGB

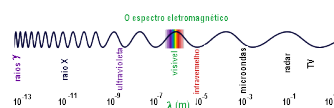


Imagem multiespectral

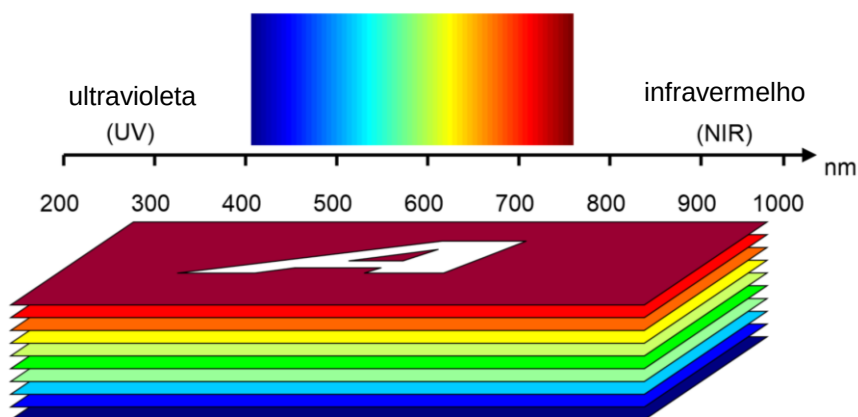
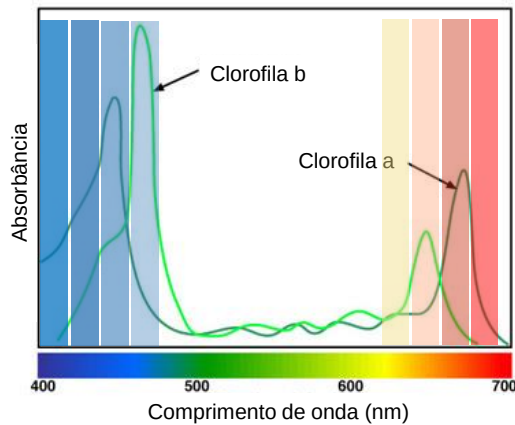


Imagem multiespectral

Espectro de absorção da clorofila



Em comprimentos de onda específicos as clorofilas a e b apresentam diferentes sinais e podem ser identificadas

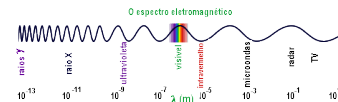
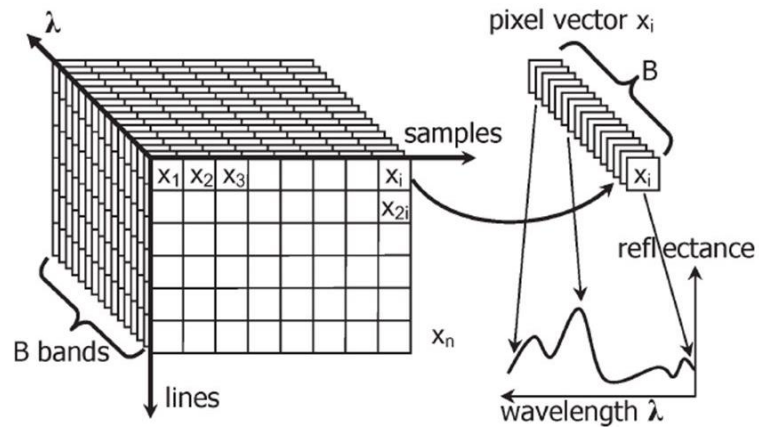
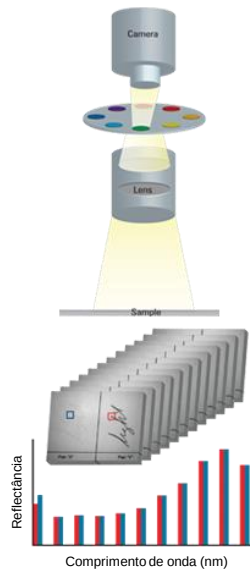


Imagem multiespectral
e
Imagem hiperespectral

Imagem hiperespectral

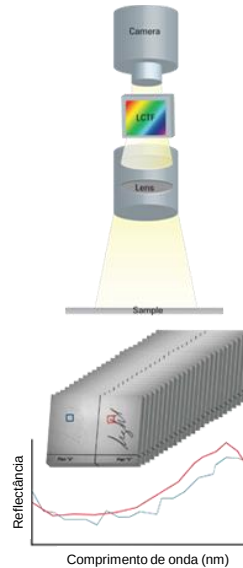


MULTIESPECTRAL



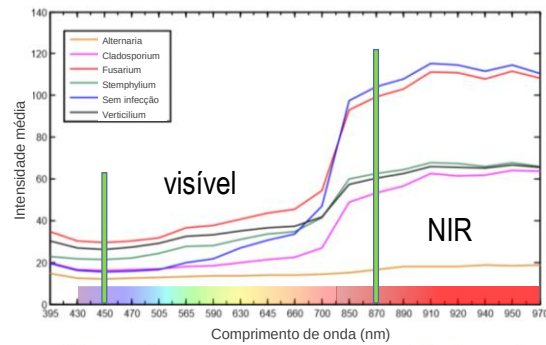
Cada pixel tem uma banda espectral discreta

HIPERESPECTRAL



Cada pixel tem espectro contínuo

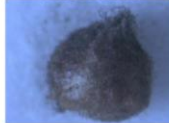
Identificação de fungos em sementes de espinafre



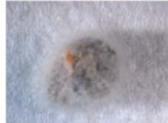
Stemphylium



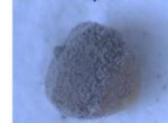
Alternaria



Fusarium



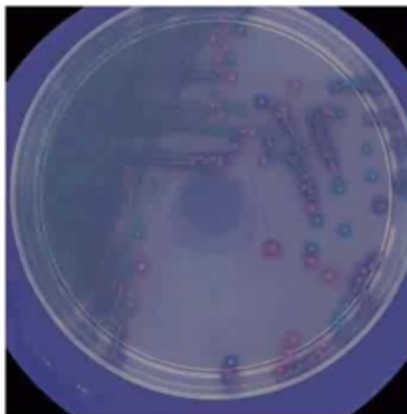
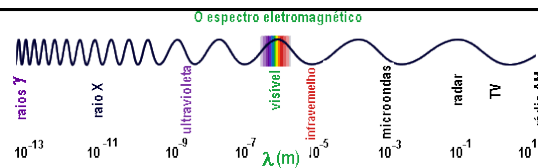
Cladosporium



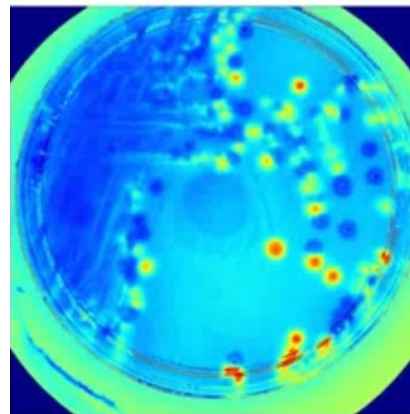
Verticillium



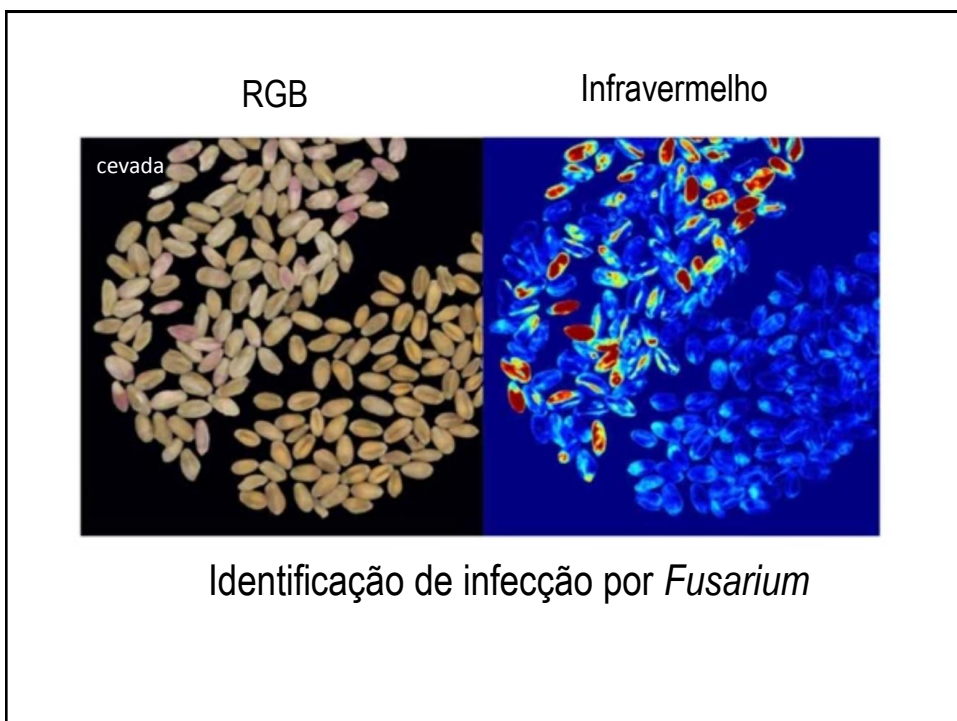
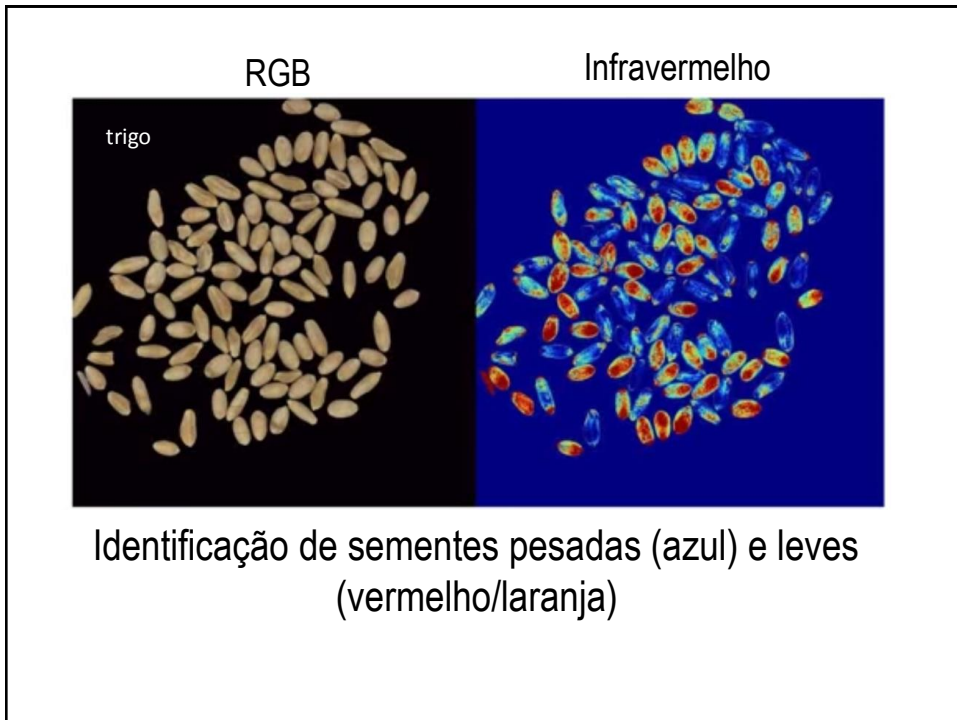
Olesen et al. (2011)



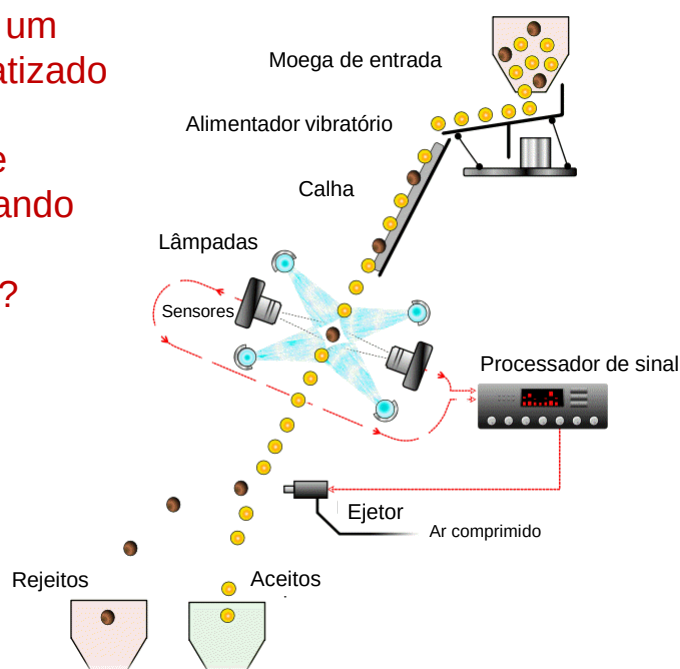
Dois tipos de colônia bacterianas (bandas RGB)



Identificação das colônias (banda infravermelha)

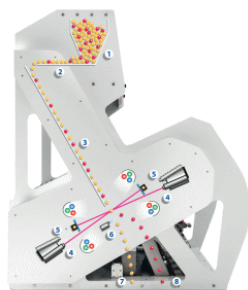


Como funciona um sistema automatizado industrial para classificação de sementes utilizando câmeras hiperespectrais?



Classificação de sementes por imagens

Sensor CCD RGB (2048 pixels)

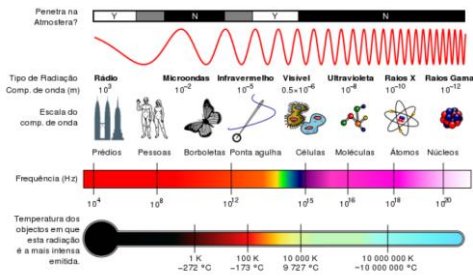


Rejeitos

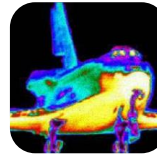
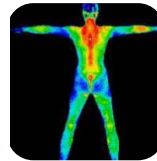
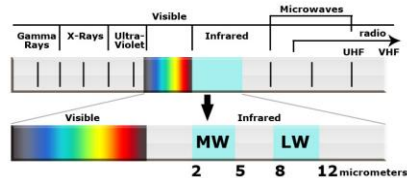


Aceitos

Termografia do infravermelho médio



Utiliza a energia térmica da banda do infravermelho e transforma as informações adquiridas em uma imagem visível

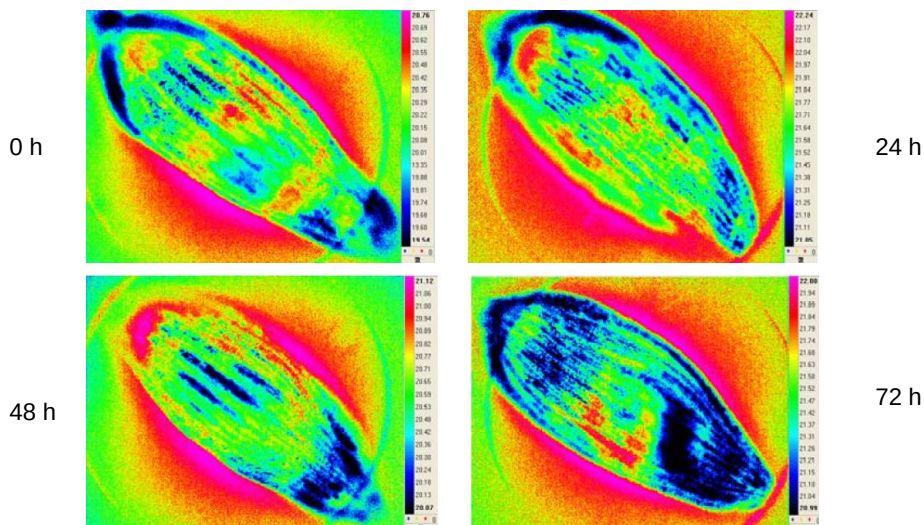


Todos os corpos emitem radiação infravermelha quando acima do zero absoluto (0 Kelvin ou -273,15°C)



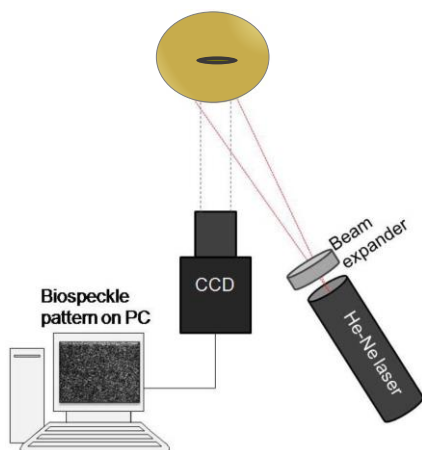
Termografia do infravermelho médio

Envelhecimento artificial de sementes de alface



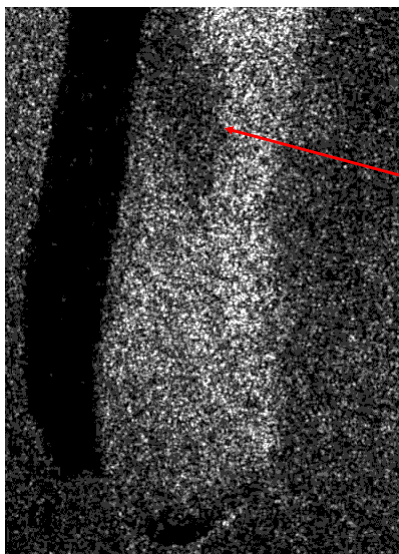
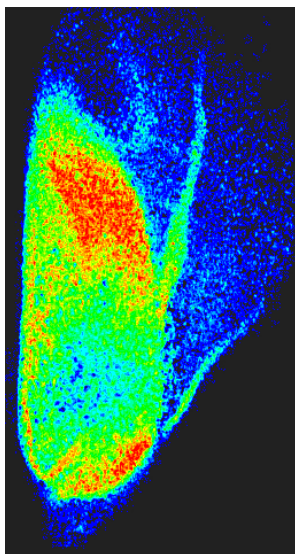
Kim et al. (2013)

Análise de imagens de sementes por tecnologia a laser (Biospeckle)



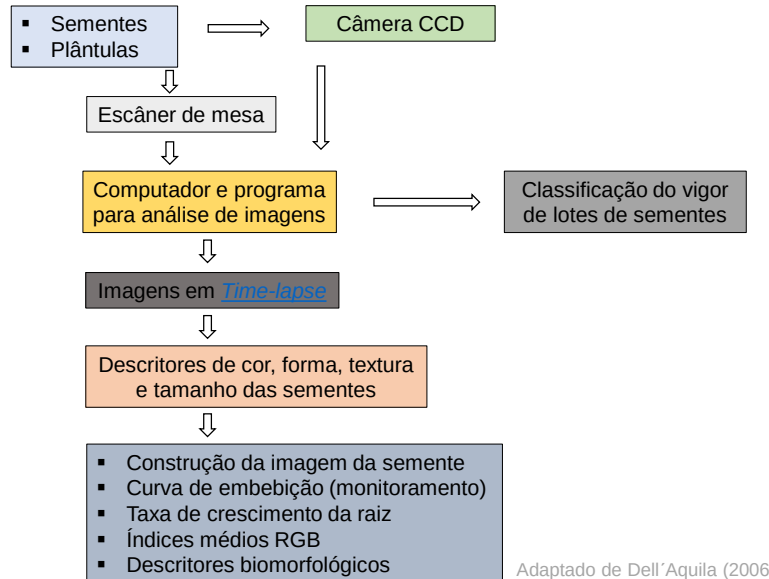
Fenômeno óptico de interferência que ocorre quando a luz laser incide sobre uma superfície onde se desenvolve um processo dinâmico biológico ou não biológico

Avaliação de semente de milho por tecnologia a laser



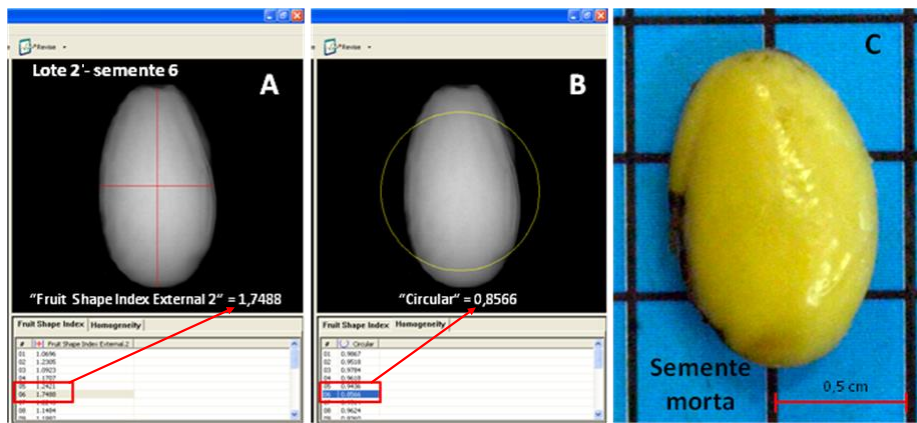
Áreas pontilhadas mais escuras apresentam maior atividade biológica

Avaliação de características físicas de sementes e plântulas



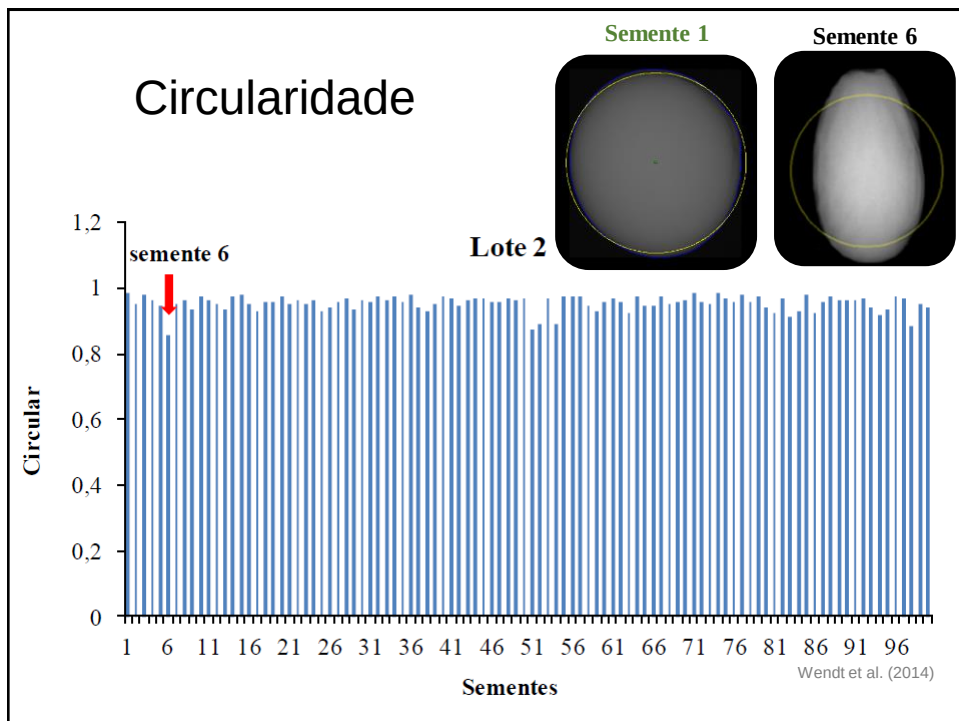
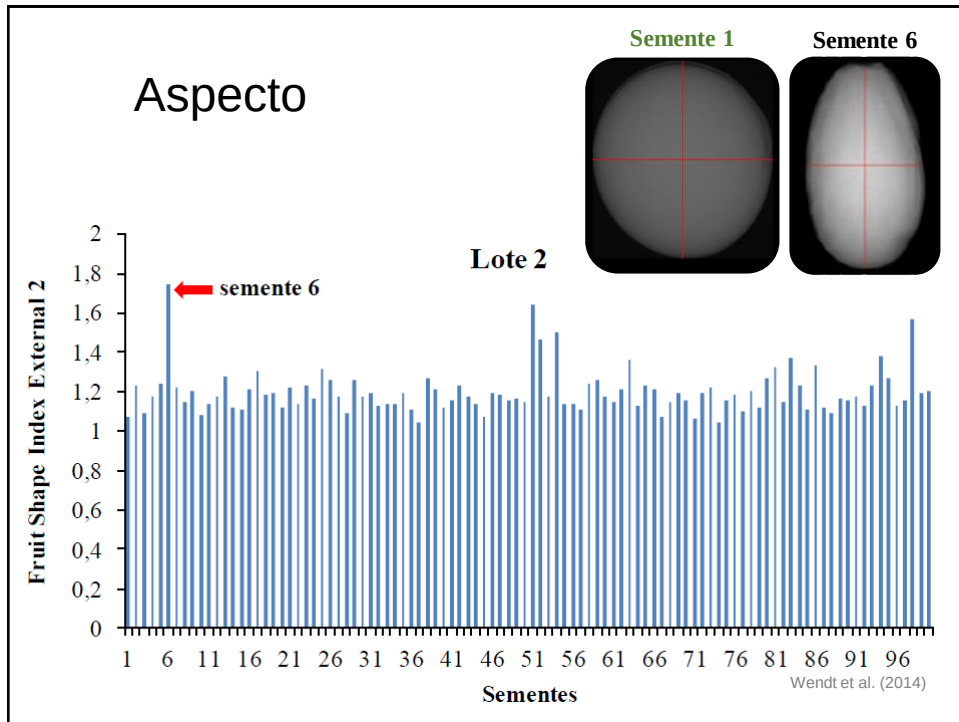
Homogeneidade de sementes de soja

Características morfológicas

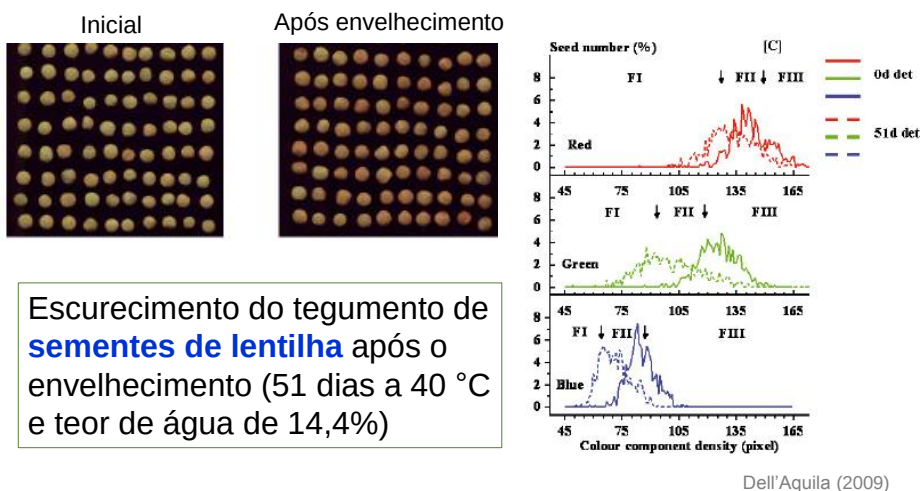


Software Tomato Analyzer

Wendt et al. (2014)

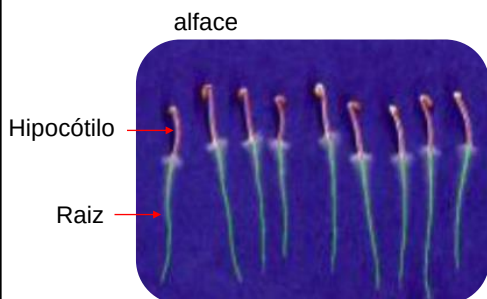


Índices **RGB** como indicadores da viabilidade de sementes



Avaliação automatizada do vigor de sementes

(Baseado em características morfológicas de plântulas)



soja

Baalbaki et al. (2009)



Marcos-Filho et al. (2009)

Programas

- *Seed Vigor Imaging System (SVIS)*
- *Análise Automatizada do Vigor de Sementes (Vigor-S)*

Determinação de índices (escala de 0 a 1000)

- Crescimento
- Uniformidade de desenvolvimento
- Vigor

Determinação do comprimento médio das plântulas da amostra

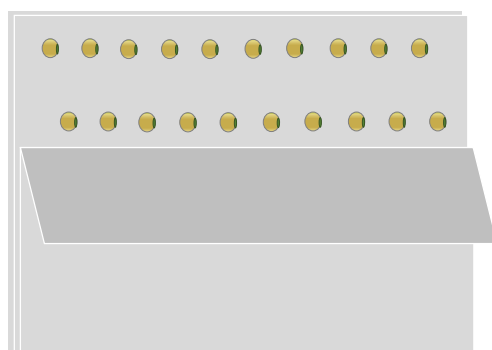
Semeadura e posicionamento do substrato

Germinação:

20 a 25 sementes por repetição

Temperatura constante

Substrato posicionado com angulação próxima da vertical (75 a 80 ° em relação à horizontal)



Seed Vigor Imaging System (SVIS)

Imagens de plântulas digitalizadas por meio de escâner:
as partes são identificadas e marcadas por software
específico

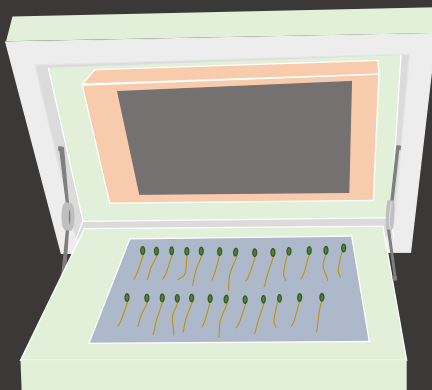


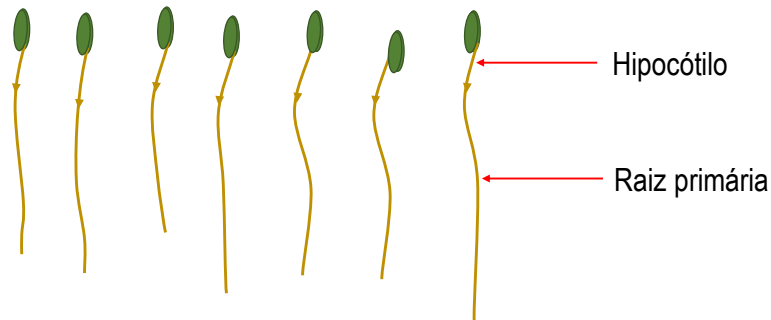
Imagem: Francisco G Gomes-Junior

escâner instalado na
posição invertida no interior
de uma caixa metálica



plântulas são transferidas
para a base da caixa
metálica

Obtenção de dados de comprimento da raiz primária, do hipocótilo, das plântulas e da relação raiz/hipocótilo



Normalmente, são avaliadas plântulas com 3 e 4 dias de idade

Outros resultados fornecidos pelo SVIS

Índice de vigor: calculado com base na rapidez e uniformidade de desenvolvimento das plântulas da amostra, em relação ao máximo valor estimado para plântulas com idade pré-estabelecida na programação do software

Resultados variam na escala de 0 a 1000

Eficiência comprovada do SVIS®

Alface - Sako et al. (2001)
Soja - Hoffmaster et al. (2003); Marcos Filho et al. (2009)
Milho - Otoni e McDonald (2005)
Milho doce - Gomes Junior et al. (2009); Alvarenga et al. (2012)
Melão - Marcos Filho et al. (2006)
Crotalária - Silva, C.B. et al. (2012)
Pepino - Chiquito et al. (2012)
Amendoim - Marchi et al. (2011)
Trigo - Silva, V.N. et al. (2012)
Girassol - Rocha (2012)
Tomate e berinjela - Silva, V.N. (2012)
Quiabo - Kikuti e Marcos Filho (2013)
Algodão - Alvarenga (2013)
Arroz - Gomes Junior et al. (2013)
Feijão - Gomes Junior et al. (2014)

Cuidados: SVIS

- Temperatura no germinador

Parâmetros SVIS	Temperatura °C					
	Milho			Soja		
	24	25	26	24	25	26
Crescimento	531 b	459 b	734 a	612 b	573 b	731 a
Uniformidade	832 b	861 a	859 a	867 a	872 a	870 a
Vigor	621 b	579 b	765 a	739 b	722 b	800 a

Otoni e McDonald et al. (2005)

SVIS: índices de vigor para soja (plântulas com três dias de idade)

Proposta da Ohio Seed Improvement Association

Alto vigor: > 500

Vigor médio: 200 - 500

Baixo vigor: < 200

Proposta da Ohio State University

Vigor excepcional: 800 - 1000

Alto vigor: 600 - 799

Bom vigor: 400 - 599

Baixo vigor: 200 - 399

Grãos: < 200

Avaliação do vigor de sementes de feijão: SVIS X métodos tradicionais

Lote	G	PCG	EA	EPA	VEP	CE
	----- % -----				(índice)	$\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$
1	80 b*	60 c	44 b	79 ab	5,5 bc	86,3 c
2	85 ab	73 b	44 b	84 ab	5,8 b	85,7 bc
3	80 b	54 c	22 c	65 b	4,2 c	77,8 ab
4	96 a	83 a	85 a	93 a	7,5 a	72,6 a
5	96 a	93 a	89 a	94 a	7,6 a	72,8 a
C.V. (%)	7,1	6,4	9,5	11,9	10,1	4,8

* Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) Gomes-Junior et al. (2014)



Avaliação automatizada do vigor de sementes de feijão (programa SVIS)

Baixo vigor



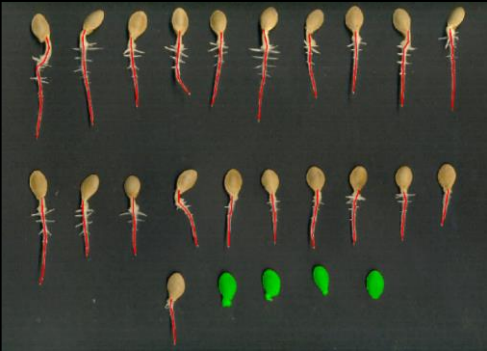
Comp. plântula em azul: 4,5 cm
 Índice de Crescimento: 435
 Índice de Uniformidade: 925
 Índice de Vigor: 582

Alto vigor



Comp. plântula em azul: 7,8 cm
 Índice de Crescimento: 837
 Índice de Uniformidade: 947
 Índice de Vigor: 870

Gomes-Junior et al. (2014)



Abóbora

(3 dias de idade)

Índice de vigor: 973

Crescimento: 995

Uniformidade: 924

↓

↑

Índice de vigor: 613

Crescimento: 541

Uniformidade: 782

SVIS



Imagens: Francisco G. Gomes Junior



Chiquito et al. (2012)

SVIS

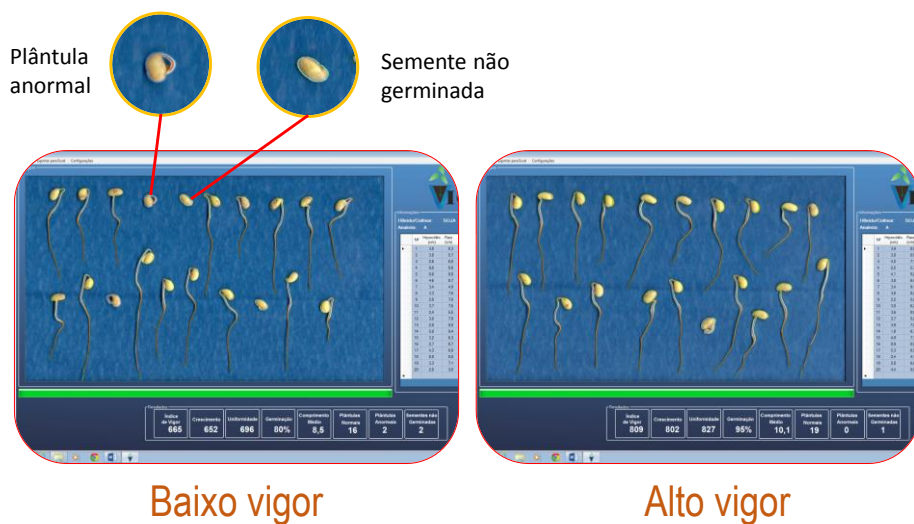
Pepino

(3 dias de idade)

Comprimento da raiz primária da plântula em destaque: 97,03 mm



Análise de plântulas de dois lotes de sementes de soja: Vigor-S



Cuidados SVIS e Vigor-S

- Uniformidade de umedecimento do substrato
- Grau de umidade e tamanho das sementes
- Horário de instalação e digitalização da imagens
- Sementes dormentes
- Diferenças na taxa de crescimento entre genótipos

Vantagens da análise automatizada do vigor de sementes

- maior rapidez nos resultados. Ex.: envelhecimento acelerado para soja = 7 dias; teste de frio para milho = 14 dias
- Os resultados são gerados por programa computadorizado, eliminando os erros de interpretação humana
- Possibilita o arquivamento das imagens das plântulas após a germinação, que é mais vantajoso em relação ao arquivamento de dados numéricos
- É um método direto para avaliação do vigor pois determina o desempenho das plântulas

