

VALIDAÇÃO DO MÉTODO PADRÃO PARA AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO PRÉ-COLHEITA EM GENÓTIPOS DE TRIGO - RESULTADOS PRELIMINARES

Eliana Maria Guarienti¹, João Leonardo Fernandes Pires¹, Ricardo Lima de Castro¹, Matheus Bristot², Luiz Gustavo de Mello²

¹Eng. –Agr., Pesquisador(a) da Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo - RS. E-mail: eliana.guarienti@embrapa.br

²Acadêmico de Agronomia da UPF/Bolsista da Embrapa Trigo.

Variáveis climáticas de ocorrência errática, zonais e sazonais, podem afetar tanto o rendimento de grãos das lavouras de trigo quanto a qualidade do produto colhido. Entre os danos inclui-se o início do processo de germinação dos grãos ainda na espiga. Estes danos refletem-se negativamente na qualidade tecnológica das farinhas, que, assim, têm a sua comercialização inviabilizada em função do padrão de qualidade abaixo do mínimo exigido pelo mercado. Por outro lado, destaca-se a dificuldade dos assistentes técnicos e dos produtores rurais na escolha das cultivares de trigo a serem usadas em cada safra, pois, na prática, esta não é suficiente para garantir a não ocorrência da germinação pré-colheita. Além disso, as empresas que mantêm programas de melhoramento genético voltados à criação de cultivares de trigo utilizam diferentes métodos para selecionar e caracterizar seus materiais, e estes, por não serem adequadamente descritos, acabam não sendo passíveis de reprodução. Nesse caso, a utilização de um método formalmente descrito e validado para avaliar a germinação pré-colheita em genótipos de trigo permite maior segurança no uso das informações geradas, além de possibilitar uso universal, dando maior confiabilidade na comparação de informações; diferentemente do que acontece atualmente. De acordo com a norma NBR ISO/IEC 17025, “a validação de métodos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. Desta forma, foi escolhido o estudo do parâmetro precisão como evidência objetiva da validação do método analítico. De acordo com Albano & Raya-Rodriguez (2009) a precisão reflete a concordância

entre vários valores experimentais obtidos e quanto menor for a amplitude das medidas, maior será a precisão. Os parâmetros estatísticos relacionados com a precisão são a repetitividade e a reprodutibilidade. Segundo estes mesmos autores a repetitividade é definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Já, a reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

O objetivo do trabalho foi validar o método padrão para avaliação da germinação pré-colheita em trigo.

Como parte das atividades do projeto “Manejo integrado da germinação pré-colheita em trigo no Brasil” que está sendo desenvolvido pela Embrapa, em 27 e 28 de novembro de 2012 foi realizado um Workshop sobre métodos para avaliação da germinação pré-colheita em trigo envolvendo pesquisadores de diferentes Instituições/Obtentoires vegetais (Embrapa, COODETEC, Biotrigo Genética Ltda, IAPAR e CCGL/TEC). Na oportunidade, cada participante apresentou e pôs em discussão os métodos utilizados na caracterização de cultivares de trigo. A partir dos relatos foi elaborado um “método padrão” a ser avaliado/validado pela Embrapa para futura utilização na classificação de cultivares e outras avaliações que necessitem caracterização da germinação pré-colheita em trigo. O planejamento de validação do método foi discutido e aprovado pelos obtentoires (Embrapa, COODETEC, Biotrigo Genética Ltda, OR – Melhoramento de Sementes Ltda, CCGL/TEC e FEPAGRO), em Workshop realizado em 28 de maio de 2013. As etapas do método, bem como resultados preliminares de validação são descritos na sequência. Uma coleção de cultivares de trigo com comportamento conhecido em relação à germinação pré-colheita (S = suscetível, MS = moderadamente suscetível e MR = moderadamente resistente) foi cultivada na área experimental da Embrapa Trigo em Coxilha, RS na safra 2014. A coleção foi composta pelas seguintes cultivares e respectiva classificação preliminar: BRS Louro – S, BRS 220 – S, BRS Guamirim – S, BRS 220 – MS, Mirante – MS, CD 121 – MS, Quartzo – MR, Frontana – MR e BRS Galha-Azul – MR. Os genótipos de trigo foram semeados em duas épocas diferentes, em função do ciclo, de forma a permitir a coleta das amostras de toda a coleção no menor espaço de tempo possível. Na maturação fisiológica foram coletadas amostras de

60 espigas da área útil de cada parcela. A secagem das amostras foi realizada em ambiente coberto, ventilado, com temperatura inferior a 30 °C, até a secagem das espigas. Após a secagem, cada amostra foi dividida em dois feixes menores com 30 espigas: um para o teste com simulação de chuva e o outro para a análise de Número de Queda inicial (enviado ao Laboratório de Qualidade Tecnológica de Grãos da Embrapa Trigo). Foram utilizadas cinco repetições de cada cultivar para o teste de simulação de chuva que foi realizado em câmara de simulação de chuva da Embrapa Trigo. A câmara de simulação de chuva foi ajustada para operar com umidade relativa do ar igual ou superior a 90% e temperatura entre 20 e 23 °C. O sistema de irrigação para simular chuva foi ajustado para proporcionar precipitação pluvial de 640 mm em 64 horas (10 mm/hora). O período de precipitação foi de 64 horas ou o necessário para que a cultivar suscetível atingisse a nota de germinação com observação direta na espiga igual a 5 (da escala de McMaster e Derera, 1976). Após encerrada a chuva, as espigas foram retiradas, separando-se 10 espigas por amostras (aleatoriamente) e realizada avaliação com nota de germinação com observação direta da espiga (1 a 5 da escala de McMaster e Derera, 1976). Na sequência, as espigas foram colocadas em estufa para secagem com circulação de ar com temperatura inferior ou igual a 40 °C por 60 horas. As espigas foram retiradas da estufa, trilhadas e limpas manualmente. Da amostra de grãos limpos, foram separados, aleatoriamente, 100 grãos para contagem de grãos germinados e não germinados (com lupa) e o restante dos grãos foram encaminhados ao laboratório para avaliação de número de queda, utilizando o método 56-81B da American Association of Cereal Chemists (APPROVED methods, 2000). O método foi repetido por três vezes e utilizados dois avaliadores para tornar possível a avaliação da sua precisão (repetitividade e reprodutibilidade). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, calculando-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada genótipo.

Os resultados da avaliação de repetitividade (Tabela 1) que indica a precisão do método quando é repetido com os mesmos equipamentos e mesmo analista, indicaram que foi possível diferenciar corretamente os genótipos S, MS e MR, com valores, em média, dentro dos intervalos estabelecidos no método para percentagem de grãos germinados e número de queda. Já para avaliação direta da espiga os valores foram diferentes da escala proposta inicialmente. Analisando-

se o coeficiente de variação, observa-se que o maior valor foi obtido para percentagem de grãos germinados na média das cultivares MR. Todos os demais valores ficaram abaixo deste patamar, indicando que podem ser aceitáveis para este tipo de avaliação. No caso da avaliação direta da espiga, apesar de valores baixos de coeficiente de variação, a falta de precisão na separação dos genótipos é fato que deve ser levado em consideração para a decisão ou não de utilização desta avaliação como critério de classificação. Por ser uma avaliação visual que leva em conta somente a presença de radícula e não o grão rompido, este critério corre o risco de subestimar a germinação. Os resultados da avaliação de reprodutibilidade (Tabela 2) que indica a precisão do método quando é repetido com os mesmos equipamentos e diferentes analistas, indicaram que o método pode ser empregado por diferentes analistas (laboratórios). Ao aplicarem o método em dois momentos distintos e avaliarem dois lotes diferentes, os dois avaliadores encontraram resultados bastante similares para percentagem de grãos germinados e avaliação direta da espiga. Isso fica evidente pelos valores absolutos das quantificações efetuadas onde o operador A foi sempre um pouco mais rigoroso do que o operador B, mas os valores variaram pouco, com coeficientes de variação baixos, com máximo de 10%. Novamente a nota de avaliação direta da espiga mostrou-se pouco precisa e subestimou a resposta das cultivares. Por esse critério todas as cultivares seriam classificadas como MR. Já, os resultados de percentagem de grãos germinados possibilitou a diferenciação das cultivares, permitindo classificá-las corretamente segundo a escala proposta pelo método.

Os resultados obtidos até o momento permitem inferir que o método foi eficiente em reproduzir padrões de sensibilidade variando de MR até S que já eram previamente conhecidos. Alguns ajustes são necessários na escolha das testemunhas que se mostraram instáveis variando entre S e MS. Também merece análise a necessidade de realizar todas as avaliações previamente definidas. Parece claro que a avaliação direta da espiga não acrescenta precisão ao método e poderia ser suprimida. Acredita-se que o método desenhado inicialmente está bem próximo do ideal para a avaliação da germinação pré-colheita.

Referências bibliográficas

ALBANO, F.M.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T. Validação e garantia da qualidade de ensaios Laboratoriais. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009. 136p.

APPROVED methods. 10. ed. Saint Paul: **American Association of Cereal Chemists**, 2000.1 CD-ROM.

McMASTER, G.J; DERERA, N.F. Methodology and sample preparation when screening for sprouting damage in cereals. **Cereal Research Communications**, v. 4, n. 2, p. 251-254, 1976.

Tabela 1. Resultados dos testes de “repetitividade” para percentagem de grãos germinados, nota de germinação com observação da espiga e número de queda de cultivares de trigo após simulação de chuva. Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2015.

% grãos germinados⁽¹⁾	Genótipos S⁽²⁾	Genótipos MS⁽³⁾	Genótipos MR⁽⁴⁾
Média global	49,6	31,7	14,4
Desvio padrão das médias	10,6	9,5	5,2
Coeficiente de variação	19,3	24,2	30,3
Nota MacMaster e Derera (1976)⁽¹⁾	Genótipos S⁽²⁾	Genótipos MS⁽³⁾	Genótipos MR⁽⁴⁾
Média global	2,9	2,2	1,6
Desvio padrão das médias	0,9	0,6	0,4
Coeficiente de variação	20	18,6	19
Número de queda⁽¹⁾	Genótipos S⁽²⁾	Genótipos MS⁽³⁾	Genótipos MR⁽⁴⁾
Média global	91,3	140,1	234,1
Desvio padrão das médias	19,4	43,3	41,4
Coeficiente de variação	24,4	25,7	12,4

⁽¹⁾Média de três lotes com cinco repetições por genótipo em cada lote. ⁽²⁾Média de BRS Louro, BRS 220 e BRS Guamirim; ⁽³⁾Média de Mirante, CD 121 e BR 18; ⁽⁴⁾Média de Frontana, Quartzo e BRS Galha-Azul.

Tabela 2 - Resultados dos testes de “reprodutibilidade” para percentagem de grãos germinados e nota de germinação com observação da espiga de cultivares de trigo após simulação de chuva. Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2015.

% grãos germinados⁽¹⁾	Genótipos S⁽²⁾	Genótipos MS⁽³⁾	Genótipos MR⁽⁴⁾
Operador A – tempo “X”	41,7	24,9	12,2
Operador B – tempo “X”	40,3	22,9	10,3
Operador A – tempo “Y”	45,5	28,2	11,5
Operador B – tempo “Y”	41,9	25,3	9,7
Média geral	42,3	25,3	10,9
Desvio padrão geral	2,25	2,2	1,13
Coeficiente de variação geral	5,31	8,7	10,4
Nota MacMaster e Derera (1976)⁽¹⁾	Genótipos S⁽²⁾	Genótipos MS⁽³⁾	Genótipos MR⁽⁴⁾
Operador A – tempo “X”	2,3	1,8	1,3
Operador B – tempo “X”	1,8	1,4	1,2
Operador A – tempo “Y”	2,5	2,0	1,4
Operador B – tempo “Y”	2,1	1,6	1,2
Média geral	2,2	1,7	1,3
Desvio padrão geral	0,29	0,25	0,09
Coeficiente de variação geral	13,4	14,9	7,2

⁽¹⁾Média de dois lotes com cinco repetições por genótipo em cada lote e dois avaliadores. ⁽²⁾Média de BRS Louro, BRS 220 e BRS Guamirim; ⁽³⁾Média de Mirante, CD 121 e BR 18; ⁽⁴⁾Média de Frontana, Quartzo e BRS Galha-Azul.