

Validação do sistema de análise de imagens Vigor-S para a determinação de fitotoxicidades em plântulas de soja

LEITE, C. A. M.¹; FRANÇA-NETO, J. B.²; KRZYZANOWSKI, F. C.²; GOMES JUNIOR, F. G.³

¹Unifil, Londrina, PR, ca.moreir@hotmail.com; ²Pesquisador, Embrapa Soja; ³Professor, USP/ESALQ.

Introdução

Os possíveis efeitos fitotóxicos do tratamento de sementes de soja interferem no desempenho da mesmas, reduzindo a germinação e a emergência de plântulas. Essas fitotoxicidades podem causar engrossamento, encurtamento, fissuras longitudinais e rigidez de hipocótilo, atrofia do sistema radicular, curvatura da raiz principal, ausência ou pouco desenvolvimento de raízes secundárias, retardamento no desenvolvimento e crescimento da parte aérea, podendo reduzir o estabelecimento de estande e a produtividade da cultura (França-Neto et al., 2000).

Dentre os herbicidas utilizados em pré-colheita, o glifosato é tido como um agente extremamente fitotóxico, podendo resultar em sérios problemas de anormalidade das plântulas de soja, mediante o encurtamento do seu sistema radicular e abortamento de raízes secundárias (Daltro et al., 2010; Toledo et al., 2014).

Dentre os fungicidas, os triazóis são tidos como passíveis de serem fitotóxicos às plântulas de soja, quando utilizados no tratamento das sementes. Um exemplo marcante disso foi observado com a contaminação do fungicida Rhodiauram (thiram) pelo bromuconazole (França-Neto et al., 2000). Um dos testes que pode ser utilizado para detecção dos possíveis sintomas de fitotoxicidade em plântulas é o teste de comprimento de plântulas, conforme metodologia relatada por Nakagawa (1999). Este teste mostra valores em unidades de medida de hipocótilo e raízes com possíveis encurtamentos e atrofias, permitindo a comparação de plântulas com fitotoxicidade e plântulas normais (França-Neto et al., 2000).

Vários testes têm sido utilizados há vários anos para a determinação do vigor em sementes, como por exemplo, o teste de tetrazólio (França-Neto et al., 1998), envelhecimento acelerado, teste de condutividade elétrica (Krzyzanowski et al., 1999). Embora os testes já utilizados apresentem resultados confiáveis e já estejam estabelecidos, universidades e órgãos públicos e privados de pesquisas estão preocupados em buscar novas informações e tecnologias como indicativos de vigor, que sejam úteis no controle interno de qualidade de empresas.

Alguns desses testes de vigor estão sendo aprimorados, utilizando as facilidades e precisão propiciadas pela análise computadorizada de imagens. Dentre eles, destaca-se o Sistema de Análise Computadorizada de Imagens de Plântulas (SVIS[®]), desenvolvido pela Universidade Estadual de Ohio/EUA, que fornece dados referentes ao índice de vigor, à uniformidade de desenvolvimento e ao crescimento de plântulas (Marcos-Filho et al., 2006). Esse teste foi recentemente aperfeiçoado para a determinação do vigor em plântulas de soja (Marcos-Filho et al., 2009).

Recentemente, Silva e Gomes Júnior (2014) relataram um novo software para a avaliação automatizada do vigor de sementes de soja, chamado de "Vigor-S". O sistema foi desenvolvido em conjunto pela Embrapa Instrumentação, localizada em São Carlos, SP, e pela Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP/ESALQ), em Piracicaba, SP. Esse software permite a determinação do índice de vigor e do comprimento de plântulas de soja com grande rapidez e precisão. Além disso, os sistemas que utilizam análise de imagens computadorizadas têm a vantagem de eliminar possíveis erros cometidos por humanos, dando confiabilidade e possibilitando a imagem de ser salva e ser comparada a outras imagens posteriormente (Gomes Junior; Chamma, 2008).

Levando-se em consideração esses aspectos, o objetivo do presente trabalho foi validar o sistema Vigor-S, visando à determinação de possíveis efeitos fitotóxicos às plântulas de soja, provenientes do tratamento de sementes com diferentes princípios ativos.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Sementes do Núcleo Tecnológico de Sementes e Grãos Nilton Pereira da Costa, da Embrapa Soja, em Londrina, PR, no período de dezembro de 2017 a abril de 2018. Foram utilizadas sementes de soja da cultivar BRS 284, com germinação superior a 90%.

Três tratamentos de sementes foram avaliados, visando impor possíveis efeitos fitotóxicos: fungicida Ciproconazol, do grupo dos triazóis; herbicida Glifosato; e testemunha não tratada. As sementes foram tratadas com o fungicida Ciproconazol na dose de 100 g.L⁻¹ de sementes. Para o tratamento com o Glifosato, as sementes foram inicialmente dispostas em rolos de papel de germinação umedecido com uma solução do herbicida (Glifosato 720 g.Kg⁻¹), na concentração de 0,6% em água do Equivalente Ácido (EA), num volume equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato seco (papel de germinação). Cinquenta sementes de soja foram semeadas por rolo de germinação, que foram deixados em germinador em condições de ausência de luz, durante um período de embebição de 16 h. Após esse período, as sementes pré-embebidas na solução de Glifosato foram transferidas para outros rolos de germinação, conforme metodologia descrita a seguir.

Uma vez que as sementes a serem utilizadas apresentaram grau de umidade de 9,0%, determinado por meio do determinador digital (Agrosystem-GAC[®] 2100), visando prevenir quanto à possível ocorrência de danos de embebição às sementes, foi realizado o pré-condicionamento das mesmas antes da implementação dos testes de pré-embebição em Glifosato e os de germinação e de comprimento de plântula. Conforme prescrições contidas na Instrução Adicional nº 70 das Regras para Análise de Sementes (Regras, 2009). Para isto, as sementes foram colocadas sobre telas de alumínio e fixadas no interior de caixas plásticas do tipo “gerbox” (do tipo utilizado no teste de envelhecimento acelerado, medindo 11 x 11 x 3,5 cm), contendo 40 mL de água destilada, mantidas em germinador pelo período de 24 h à temperatura de 25 °C. Após esse período, o grau de umidade das sementes chegou a cerca de 20%, sendo, então, as sementes semeadas em rolo-de-papel de germinação, para a realização dos seguintes testes de avaliação de qualidade.

Comprimento de plântulas: conduzido com cinco subamostras (rolos de papel) com vinte sementes cada, distribuídas em duas linhas intercaladas com dez sementes, com a micrópila direcionada para a parte inferior do papel, em rolos de papel-toalha, umedecidos com 2,5 vezes a massa do substrato seco, sendo duas folhas em baixo e uma em cima para cobrir a semente. Posteriormente, foram montados os rolos, agrupados cinco rolos com atilhos de borracha e envolvidos com sacos plásticos para manter os rolos umedecidos e colocados em pé dentro do germinador em condições de ausência de luz, durante cinco dias a 25 °C para a produção das plântulas.

Comprimento de plântulas pelo Vigor-S: as plântulas foram obtidas conforme metodologia descrita acima, após um período de germinação de três dias, no escuro, a 25 °C. Em seguida, as plântulas foram transferidas dos rolos de papel de germinação para uma folha de papel de coloração azul com as dimensões de 30 x 22 cm, que correspondente ao tamanho da área útil atingida pelo scanner invertido, colocado sobre a plataforma interna da caixa metálica. Um grupo de 20 plântulas foi escaneado por foto obtida. As imagens escaneadas foram salvas em uma pasta específica do disco rígido do computador. Posteriormente, as imagens capturadas pelo escâner foram operadas pelo software Vigor-S, instalado em computador da marca DELL, core i5, CPU de 2,30 GHz, Windows 7. Após o software analisar a imagem, o hipocótilo das plantas foi marcado em azul e as raízes em vermelho, sendo as plântulas anormais identificadas e anotadas como tal pelo sistema e as sementes mortas da mesma maneira. Em algumas plântulas, houve a necessidade da realização de correção das marcações, efetuada com o auxílio do mouse e do teclado. Findo esse processo e obtendo-se todas as plântulas marcadas corretamente, o sistema gerou valores de índices de vigor e de uniformidade das plântulas, variando de 0 a 1000, o tamanho do hipocótilo, da raiz e o comprimento total da plântula, relatados em cm. Após a análise no sistema, os valores gerados foram transferidos automaticamente para uma planilha de Excel. O tempo entre escanear as plântulas e a análise no software foi inferior a 5 minutos.

Procedimento estatístico: o delineamento experimental constou de três tratamentos impostos às sementes (testemunha não tratada, Ciproconazol e Glifosato), dispostos em blocos ao acaso, com seis repetições por tratamento, resultando num total de 18 unidades experimentais. Foram feitas análises

de variância, com a comparação de médias feita pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Foram também realizadas Análises de Regressão dos dados obtidos pelo teste tradicional de comprimento de plântula, com os valores obtidos pelo Vigor-S, para a confirmação da confiabilidade do sistema de imagens.

Resultados e Discussão

De acordo com os dados de análise laboratorial no método tradicional (Tabela 1), observa-se pelos testes realizados de comprimento de plântulas (CP), comprimento de hipocótilo (CH) e comprimento de raiz (CR), que o tratamento testemunha apresentou-se com as maiores médias. Isso indica que quando as sementes são expostas a resíduos de pesticidas, como por exemplo, fungicidas triazois, que podem causar danos mais acentuados nos hipocótilos, com sintomas de engrossamento e encurtamento, e herbicida (Glifosato), que pode causar danos mais acentuados nas raízes, como atrofia da raiz principal e ausência de raízes secundárias, os respectivos valores de comprimento de plântulas são afetados negativamente.

Resultados similares foram relatados por França-Neto et al. (2000), em que compararam plântulas das cultivares BRS 133 e COODETEC 202, com a ocorrência de fitotoxicidade em decorrência de tratamento de sementes com o fungicida Rhodiauran contaminado com o bromuconazole, do grupo dos triazois. Nessa situação, as plântulas apresentaram-se sensíveis ao fungicida, apresentando comprimento de plântulas menores, tendo os seus hipocótilos engrossados e muitas vezes com uma fissura longitudinal.

Tabela 1. Resultados do teste de comprimento de plantulas (CP), comprimento de hipocótilo (CH) e comprimento de raiz (CR), determinados pelo método tradicional, avaliado aos cinco dias após a montagem dos testes.

Tratamento	CP	CH	CR
	----- cm -----		
Fungicida	9,66 b ¹	1,78 c	7,87 b
Herbicida	4,82 c	3,22 b	1,61 c
Testemunha	28,37 a	8,74 a	19,62 a
CV	8,62%	11,20%	8,47%

¹Valores seguidos pela mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos por meio da leitura do software Vigor-S (Tabela 2), apresentaram as mesmas tendências dos obtidos pelo método tradicional, ou seja, os tratamentos impostos com fungicida e herbicida tiveram valores de CP menores que o tratamento com as sementes não tratadas (tratamento testemunha), repetindo os mesmos efeitos para os valores de CH, com hipocótilos encurtados e engrossados, e CR que também se encontrava encurtada e com ausência de raiz secundária. Os resultados obtidos confirmam a teoria encontrada na literatura, de que quando há presença de molécula de pesticidas, estes se concentram nas zonas meristemáticas das plântulas, inibindo a formação de aminoácidos essenciais, os quais estão envolvidos na síntese de proteínas, responsáveis pelo processo de crescimento de plântula (Zablutowicz; Reddy, 2004). Dessa maneira, uma vez que as zonas meristemáticas são comprometidas, a fisiologia da plântula é afetada, acarretando em baixa taxa de germinação e lento crescimento de plântulas.

Tabela 2. Resultados do teste de comprimento de plântulas (CP), comprimento de hipocótilo (CH) e comprimento de raiz (CR), determinados pelo software Vigor-S, avaliados com três dias após a montagem do teste.

Tratamentos	CP		CH		CR	
	cm					
Fungicida	3,62	b1	1,39	c	2,21	b
Herbicida	3,16	b	2,08	b	1,14	c
Testemunha	7,58	a	2,45	a	5,12	a
CV	8,94%		11,13%		10,00%	

¹ Valores seguidos pela mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Comparando os dois métodos utilizados nas avaliações por meio de análises de regressões (Figura 1), verificou-se que o método do software Vigor-S é confiável, pois os resultados obtidos em comparação com o método tradicional apresentaram regressões com coeficientes de determinação elevados (CP = 0,963; CH = 0,644; e CR = 0,967), o que indica que o método do Vigor-S é viável e pode ser utilizado para este fim, evitando erros humanos, além de diminuir o tempo de obtenção dos resultados.

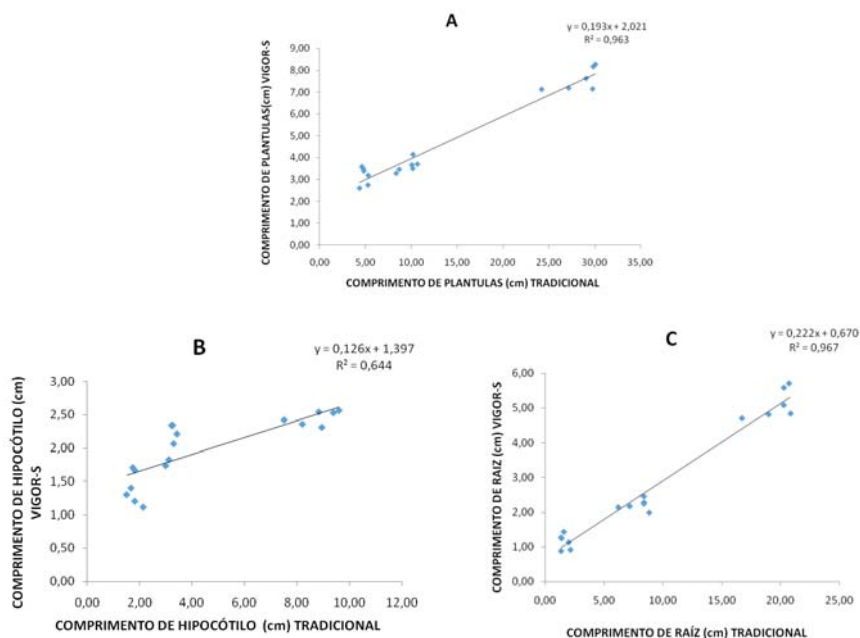


Figura 1. Análises de regressão dos dados, comparando os valores de A (comprimento de plântula), B (comprimento de hipocótilo) e C (comprimento de raiz) entre o método tradicional de determinação do comprimento de plântula e o software Vigor-S.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que: o software Vigor-S é eficaz na detecção de possíveis efeitos fitotóxicos em plântulas de soja, causados pelo tratamento das sementes com o fungicida Ciproconazol e com o herbicida Glifosato, conforme comparado com o método tradicional, com medição manual; as determinações realizadas pelo sistema Vigor-S são mais precisas, confiáveis e requerem menor tempo de trabalho para a sua obtenção.

Referências

DALTRO, E. M. F.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; FRANÇA-NETO, J. B.; GUIMARÃES, S. C.; GAZZIERO, D. L. P.; HENNING, A. A. Aplicação de dessecantes em pré-colheita: efeito na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 111-122, 2010.

FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T. **Caracterização dos problemas de fitotoxicidade de plântulas de soja devido ao tratamento de sementes com fungicida Rhodiauram 500 SC, na safra 2000/01**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2000. 24 p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 27).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72 p. (Embrapa Soja. Documentos, 116).

GOMES JUNIOR, F. G.; CHAMMA, H. M. C. P. Eficiência de um sistema computadorizado de processamento de imagens para avaliação do vigor de sementes de feijão. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, p. 685-688, 2008.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

MARCOS-FILHO, J.; BENNETT, M. A.; MCDONALD, M. B.; EVANS, A. F.; GRASSBAUGH, E. M. Assessment of melon seed vigour by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. **Seed Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 485-497, 2006.

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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. de B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-19.

REGRAS para análise de sementes. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 395p.

SILVA, G. G.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação automatizada do vigor de sementes de soja utilizando o software Vigor-S. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UNIVERSIDADE SÃO PAULO, 2014. **Resumos...** São Paulo: USP, 2014. p.1-4.

TOLEDO, M. Z.; ISHIZUKA, M. S.; CAVARIANI, C.; FRANÇA-NETO, J. B.; PICOLI, L. B. Pre-harvest desiccation with glyphosate and quality of stored soybean seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.2, p.765-774.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis; with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 825-831, 2004.