

Aplicativos e programas de processamento de imagem como ferramentas para a determinação da área foliar em capim setária

Yara Beatriz Moreira⁽¹⁾, Julieta de Jesus da Silveira Castor⁽²⁾, Antônio Vander Pereira⁽³⁾, Juarez Campolina Machado⁽³⁾, Cristiano Amancio Vieira Borges⁽²⁾, Leônidas Paixão Passos^(3,4)

⁽¹⁾Graduanda em Engenharia da Produção – UFJF, Juiz de Fora, MG. Bolsista Pibic Fapemig. E-mail: yara.beatriz@engenharia.ufjf.br, ⁽²⁾ Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: julieta.silveira@embrapa.br; cristiano.borges@embrapa.br, ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite. e-mail: vander.pereira@embrapa.br; juarez.machado@embrapa.br, ⁽³⁾ Orientador. E-mail: leonidas.passos@embrapa.br

Resumo- A determinação da área foliar e medidas correlatas constitui um importante indicador na avaliação do crescimento e desenvolvimento de vegetais. Todavia, o custo relativamente elevado de equipamentos disponíveis para a medição direta dessa variável representa uma limitação para que o acesso a esse indicador se torne mais generalizado. Neste trabalho, objetivou-se utilizar aplicativos e programas de processamento de imagem para a medição da área foliar, visando substituir os aparatos existentes, conferindo assim redução de custos e maior mobilidade para a obtenção dessa categoria de dados. Para tanto, foram comparadas as determinações feitas com os aplicativos Canopeo, Digimizer e ImageJ, a partir de imagens fotografadas com câmera digital de alta resolução, em plantas de capim setária submetidas aos desafios de encharcamento e seca. Constatou-se que os três aplicativos são uma alternativa viável para substituir os medidores físicos. Os testes estatísticos revelaram que o Digimizer e o ImageJ, independentemente do cenário simulado, apresentaram maior concordância entre si. O Canopeo, por outro lado, apresenta maior facilidade e agilidade considerando situações com grandes diferenças de altura entre plantas e, tendo ainda a vantagem de ser aplicativo de smartphone, propiciando a aquisição da imagem e sua análise no mesmo aparato, resultando em maior mobilidade, rapidez e conforto no manuseio.

Termos para indexação: área foliar, Canopeo, Digimizer, ImageJ, fisiologia vegetal, *Setaria sphacelata*.

Image processing applications and programs as tools for determining leaf area in common setaria

Abstract- Determining leaf area and related measurements constitutes an important indicator in evaluating plant growth and development. However, the relatively high cost of the apparatuses available for direct measurement of this variable represents a limitation for the access to this indicator to become more widespread. The objective of this work was to use image processing applications and programs to measure leaf area, aiming to replace existing devices, thus providing cost reduction and greater mobility for obtaining this category of data. To this end, determinations made with Canopeo, Digimizer and ImageJ applications were compared, based on images photographed with a high-resolution digital

camera, on common setaria plants exposed to challenges of waterlogging or drought. Results indicate the three applications are a viable alternative to replacing physical meters. Statistical tests revealed that Digimizer and ImageJ, regardless of the simulated scenario, showed greater agreement between each other. Canopeo, on the other hand, allows greater ease and agility considering situations with large height differences among plants and, because it is a smartphone application, thus enabling image acquisition and analysis on the same device, resulting in greater mobility, rapidity of use and comfort in handling.

Index terms: Canopeo, Digimizer, ImageJ, leaf area, plant physiology, *Setaria sphacelata*.

Introdução

O monitoramento da área foliar é um indicador fisiológico importante para diversas avaliações agrônomicas, notadamente na produção de forragens. A área foliar pode ser calculada por métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos tradicionais são mais precisos, porém têm as desvantagens de serem destrutivos e consumirem tempo, fatores estes que limitam seu uso em larga escala (Kaur et al., 2014). Uma alternativa tem sido os medidores comerciais de área foliar (Wilhelm et al., 2000), os quais utilizam diodos emissores de luz (LEDs) de banda estreita e detectores emparelhados no cabeçote de varredura. Os LEDs e os detectores registram a largura, enquanto o cabo de codificação registra o comprimento e, dessa forma, o instrumento calcula comprimento, largura e área a partir desses dados. O uso desses aparatos tem sido relativamente disseminado, mas eles têm elevado custo de aquisição e manutenção e causam, em vista do peso, desgaste ao usuário em medições prolongadas e na avaliação de plantios em áreas extensas. Para essas medições, em geral, os pesquisadores coletam um determinado número amostral de folhas, separam os limbos das demais partes, e então medem a área de cada folha para assim obterem a área foliar média ou a área foliar total por planta.

Por outro lado, métodos indiretos para estimar a área foliar têm sido utilizados com crescente frequência, com os benefícios de serem não destrutivos, propiciarem rápida execução e, portanto, serem viáveis para uso em larga escala (Baret et al., 2004). Esses métodos têm a vantagem adicional de permitirem o monitoramento da expansão foliar em uma dada planta ou conjunto de plantas ao longo do ciclo de crescimento, até a colheita. Nesse particular, aplicativos e programas de processamento de imagem têm sido utilizados de forma crescente e com alta repetibilidade em comparação com os medidores comerciais, destacando-se, recentemente, o Canopeo (Patrignani et al., 2015), o Digimizer (Carvalho et al., 2017) e o ImageJ (Santana et al., 2018). Esses três métodos produzem resultados altamente correlacionados ($r > 0,96$) com as determinações efetuadas com o aparelho LICOR em diferentes espécies vegetais, tais como o ImageJ em aveia (Martin et al., 2020) e jambolão (Farias et al., 2020), o Canopeo em soja (Shepherd et al., 2018), o Canopeo e o ImageJ em bluestem amarelo (XIONG et al. 2019), e o Digimizer em *Crotalaria* (Carvalho et al., 2017).

O programa de melhoramento genético de capim setária (*Setaria sphacelata* (Schumach.) Moss var. sericea (Strapf Clayton) da Embrapa Gado de Leite tem buscado a produção de indivíduos com características desejáveis para as condições brasileiras, dentre elas a tolerância conjunta à seca e ao encharcamento. Nessas abordagens, a rápida e precisa determinação da área foliar em populações recombinantes é uma necessidade

premente. Para tanto, a utilização de aplicativos e programas de processamento de imagem para a determinação da área foliar apresenta-se como alternativa promissora.

Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi comparar aplicativo (Canopeo) e programas (Digimizer e ImageJ) disponíveis gratuitamente na Internet para a determinação da área foliar de capim setária cultivado em condições normais, sob seca ou sob encharcamento. Os resultados expostos a seguir vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, contribuindo para o alcance dos seguintes objetivos específicos: ODS 2 - Erradicação da fome: acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal. Foram germinadas as sementes de capim setária em recipientes de 200 mL contendo vermiculita e dispostos em uma câmara de crescimento sob condições climáticas (temperatura, U.R. e fotoperíodo) controladas. Após um período de aclimação, as plântulas foram distribuídas ao acaso para a aplicação dos tratamentos de encharcamento, seca e testemunha.

Após 90 dias as plantas foram submetidas às avaliações. Primeiramente, foi aferida a altura da maior planta, e mensurado o teor de clorofila (SPAD) das cinco maiores plantas. Em seguida, foi realizado o corte padronizado em 1/3 da altura da maior planta de cada pote, e realizadas as medidas de área foliar (AF) utilizando os aplicativos Canopeo (Oklahoma State University; aplicativo de *smartphone* com uso liberado após registro no portal), Digimizer (MedCalc Software Ltd., Bélgica; programa de computador com versão de avaliação por 30 dias) e ImageJ (National Institutes of Health, EUA; programa de computador de domínio público). As principais características de cada aplicativo estão apresentadas no Anexo 1. As instruções de trabalho (ITs) de cada aplicativo estão descritas, nos Anexos 2 (ImageJ), 3 (Digimizer) e 4 (Canopeo). Os dados de AF e área foliar total (AFT) foram importados e submetidos à análise estatística.

O estudo foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso, considerando um fatorial 3 (aplicativos) x 3 (tratamentos - seca, encharcamento e testemunha, condições normais de cultivo) e oito repetições. Cada parcela experimental foi constituída de um recipiente contendo 10 plantas.

Resultados e discussão

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Figura 1 e na Tabela 1. Foi empregado, o teste t pareados pelo método de Bonferroni (Figura 1) o qual evidenciou maior concordância para o Digimizer e Image J em relação ao Canopeo. Portanto, nos estudos em que ocorrerem contrastes entre médias pouco discrepantes o Canopeo deve ser evitado. No entanto, nos casos, principalmente a campo, em que ocorrerem contrastes discrepantes, como é o caso da seleção fenotípica para caracteres quantitativos em populações segregantes, a praticidade permitida pelo Canopeo será fator importante para agilização do processo e ganho da precisão.

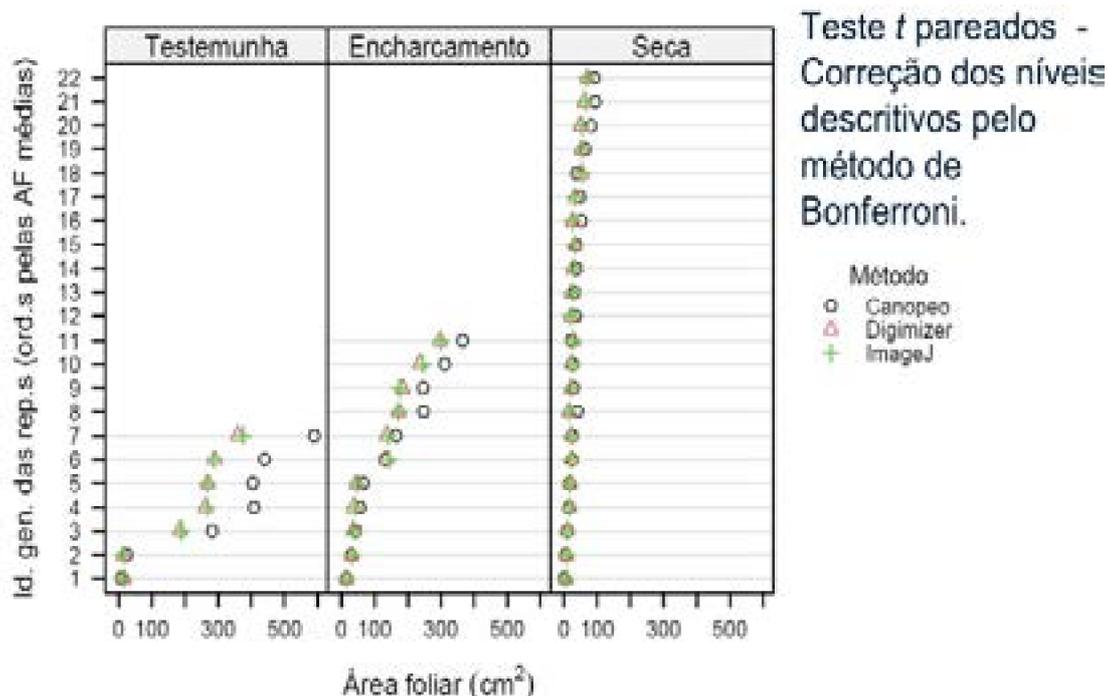


Figura 1. Teste t pareado dos tratamentos x aplicativos.

Tabela 1. Tabela comparativa do uso dos aplicativos em cada tratamento.

Comparação	Cond. ambiental	n	AFT Média (cm²)	Viés* (cm²)	Viés ** (cm²)	IC _{95%} para viés (cm²)		estat t	p valor original	p valor corrigido Bonferroni
Canopeo x Digimazer	Normal	7	253,6	108,7	43%	30,9	186,4	3,42	0,014	0,042
	Encharcamento	11	136,7	31,5	23%	10	53	3,26	0,0085	0,026
	Seca	22	8,2	22	24%	2,4	14	2,95	0,0076	0,023
Canopeo x Image J	Normal	7	255,1	105,8	41%	31,9	179,7	3,50	0,013	0,038
	Encharcamento	11	137,7	29,4	21%	7,2	51,7	2,95	0,0015	0,044
	Seca	22	33,7	7,8	23%	2,1	13,4	2,87	0,0091	0,027
Digimazer x Image J	Normal	7	200,7	-2,9	-1,4%	-8,7	3,0	-1,20	0,28	0,83
	Encharcamento	11	121,9	-2,1	-1,7%	-5,4	1,2	-1,39	0,19	0,58
	Seca	22	29,6	-0,4	-1,4%	-1,3	1,5	-0,95	0,36	1

* Média das diferenças par a par, do primeiro aplicativo em relação ao segundo.

** Viés expresso em % da AFT média, supondo viés fixo.

Verifica-se (Tabela 1) que o Canopeo reportou medidas de área foliar total (AFT) em torno de 40% maiores, em média, do que o Digimazer e o ImageJ, quando sob condições normais (testemunha), e em torno de 20% maiores quando as plantas foram estressadas por "encharcamento" ou por "seca". Já entre o Digimazer e o ImageJ, em qualquer dos três cenários simulados, o viés foi não significativo ($p > 0,57$), não tendo ultrapassado, em média, a 1,5%.

Os resultados indicam que é possível a substituição do LI-COR por qualquer um dos softwares utilizados neste trabalho, confirmando estudos anteriores realizados com outras espécies (Patrignani et al., 2015; Carvalho et al., 2017; Santana et al., 2018; Shepherd et al., 2018; Farias et al., 2020; Martin et al., 2020). Em relação ao uso rotineiro, o que diferencia um aplicativo do outro é o tempo de processamento e a praticidade. O Canopeo se mostrou eficaz neste sentido, pois calcula a porcentagem de área coberta de forma

instantânea enquanto os demais demandam mais tempo para executar o cálculo da área. Desta forma, se o trabalho for a campo recomenda-se aplicativo Canopeo, pois o mesmo permite aferir em tempo real e é o mais prático. Já para trabalhos que exigem posteriores análises no computador das imagens digitais, o ideal é a utilização do ImageJ e Digimizer. No anexo I encontra-se o quadro comparativo entre os aplicativos em que se percebe que entre os três aplicativos o mais eficiente é o Canopeo.

Conclusões

Independentemente do cenário simulado, os aplicativos Digimizer e ImageJ mostram maior concordância entre si e menor com o Canopeo. No entanto, o Canopeo apresenta maior praticidade e agilidade durante o uso para contextos em que há grande discrepância de altura entre as plantas, podendo ser utilizado tanto para trabalhos feitos em tempo real, no campo, quanto para trabalhos posteriores utilizando o computador, diferentemente do Digimizer e do ImageJ que tem o uso restrito ao computador. Concluiu-se que os aplicativos testados podem ser utilizados como uma alternativa viável e de baixo custo para medidas de área foliar acelerando o processo de seleção de plantas para o melhoramento vegetal, devendo ser observada a finalidade do uso de cada aplicativo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Sebastião de Castro Evaristo e Mário Baesso Tristão pela prestimosa colaboração na condução dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e da Fapemig, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. (a) Parte do projeto “Desenvolvimento de populações sintéticas de capim setária (*Setaria sphacelata* Schumach.) para adaptação as condições ambientais de frio, seca e solos úmidos”, liderado por Antônio Vander Pereira,

Referências

- BARET, F.; COPPIN, P.; FLECK, S.; JONCKHEERE, I.; MUYS, B.; NACKAERTS, K.; WEISS, M. Review of methods for in situ leaf area index determinations . Part I. Theories, sensors and hemispherical photography. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 121, p. 19-35, 2004. doi:10.1016/j.agrformet.2003.08.027
- CARVALHO, J. O.; TOEBE, M.; TARTAGLIA, F. L.; BANDEIRA, C. T.; TAMBARA, A. L. Leaf estimation from linear measurement in different ages of *Crotalaria juncea* plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 1851-1868, 2-17. DOI:10.1590/0001-3765201720170077
- FARIAS, C. B. M.; CORREA, A. S. A. S.; SILVA, M. C. M.; CRUZ, R. R.; RAMOS, L. P. N.; SOUZA, S. A. M. (2020). Estimation of the foliar area of jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) by different methods. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, p. 13–16, 2020. DOI:10.36560/131020201109
- KAUR, G.; DIN, S.; BRAR, A. S.; SINGH, D. Scanner image analysis to estimate leaf area. **International Journal of Computer Applications**, v. 107, p. 5-10, 2014. DOI:10.5120/18729-9963
- MARTIN, N. M.; FILPKE, G. M.; WINK, J. E. M.; MARCHESI, J. A. ImageJ software as an alternative method for estimating leaf area in oats. **Acta Agronomica**, v. 89, p. 162-169, 2020. DOI:10.15446/acag.v69n3.69401
- PATRIGNANI, A.; OCHSNER, T. E. Canopeo: a powerful new tool for measuring fractional green canopy cover. **Agronomy Journal**, v. 107, p. 2312-2320, 2015. DOI:10.2134/agronj15.0150
- SANTANA, H. A.; REZENDE, B. R.; SANTOS, W. V.; SILVA, A. R. Models for prediction of individual leaf area of forage legumes. **Revista Ceres**, v. 65, p. 204-209, 2018. DOI:10.1590/0034-737X201865020013

SHEPHERD, M. J.; LINDSEY, L. E.; LINDSEY, A. J. Soybean canopy measured with Canopeo compared with light interception. **Agricultural & Environmental Letters**, v. 3, 180031, 2018. DOI:10.2134/ael2018.06.0031

WILHELM, W. W.; RUWE, K.; SCHLEMMER, M. R. Comparison of three leaf area index meters in a corn canopy. **Crop Science**, v. 40, p. 1179-1183, 2000.

XIONG, Y.; WST, C. P.; BROWN, C. P.; GREEN, P. E. Digital image analysis of old world bluestem cover to estimate canopy development. **Agronomy Journal**, v. 111, p. 1247-1253, 2019. DOI:10.2134/agronj2018.08.0502

ANEXO 1

Características Principais dos Aplicativos

Aspecto	 Canopeo	 Digimizer	 ImageJ
Dimensões foliares	Porcentagem	cm ²	cm ²
Calibração	Não é necessário	É necessário	É necessário
Dificuldade de uso	Transformar a porcentagem em cm ²	Criar uma planilha auxiliar para realizar o somatório das áreas	Dificuldade está em seleccionar cada folha da imagem para mensurar a área.
Limitação	Não se aplica	Uso em laboratório (computador) para analisar imagens futuras	Uso em laboratório (computador) para analisar imagens futuras

ANEXO 2

Instrução de Trabalho - ImageJ

1 - Objetivo

Descrever o método de operação do aplicativo ImageJ para medida de área foliar em forrageiras.

2 - Descrição

O aplicativo ImageJ é executado como um applet on-line ou como um aplicativo para download. O ImageJ pode exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8 bits, 16 bits e 32 bits e suporta a maioria dos principais formatos, incluindo TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS e "raw". A principal aplicação do ImageJ é que ele pode calcular valores de área em pixel que podem ser úteis para designers gráficos e para auxiliar em laboratórios ou campos experimentais em substituição a equipamentos de custo mais elevado.

Para realizar as medidas no computador no modo "offline", primeiramente, deve-se realizar o "download" do programa na versão "free" disponível na internet na página <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

Após a instalação clicar no ícone (Figura 1) para iniciar as medidas.



Figura 1. Ícone do programa ImageJ

Em seguida, abrirá o menu (Figura 2) com os comandos a serem executados.



Figura 2. Menu de comandos ImageJ

- No menu clicar em “File”, depois clicar em “Open”;
- Em seguida, abrir a pasta (Figura 3) onde se encontram as fotos a serem analisadas;

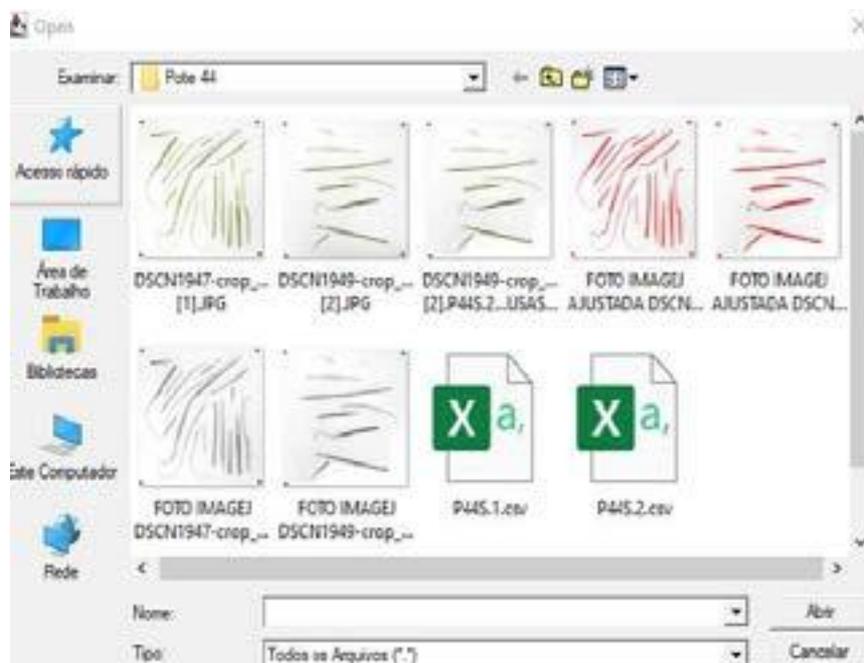


Figura 3. “Open” pasta do arquivo

- Após clicar na imagem original escolhida (Figura 4);



Figura 4. Foto original da forrageira

- No Menu, pressionar no ícone “Image” (Figura 5), depois “Type” e “ e selecionar 8 Bits, a Figura 5 fica no formato abaixo:



Figura 5. Foto da forrageira em 8 bits

- No Menu, pressionar no ícone “Image” (Figura 6), depois “Ajuste” e “Threshold” para realizar os ajustes de cor necessários. E a foto ficará no formato da Figura 7.



Figura 6. Menu com ícone Image



Figura 7. Foto ajustada em "Threshold"

- No menu na seta (Figura 8) para ajustar a escala da figura, e após clicar em "Analyse" e em "Set Scale" (Figura 9), colocando no campo "known distance" a distância dos pontos na foto realizada anteriormente e em "Unit of length" colocar a unidade em "cm".

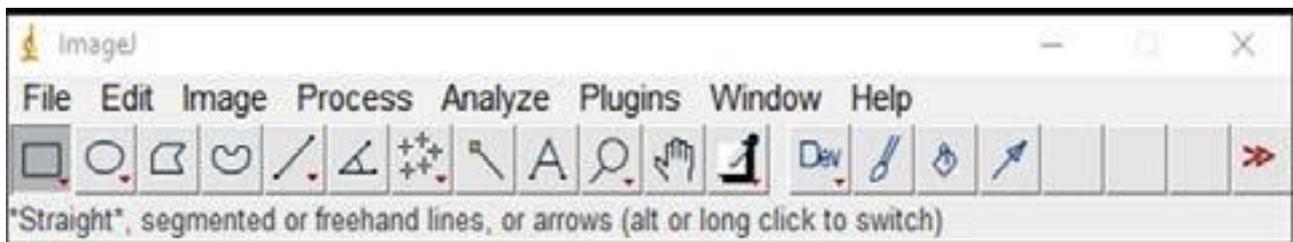


Figura 8. Ícone Seta para marcar os pontos da escala

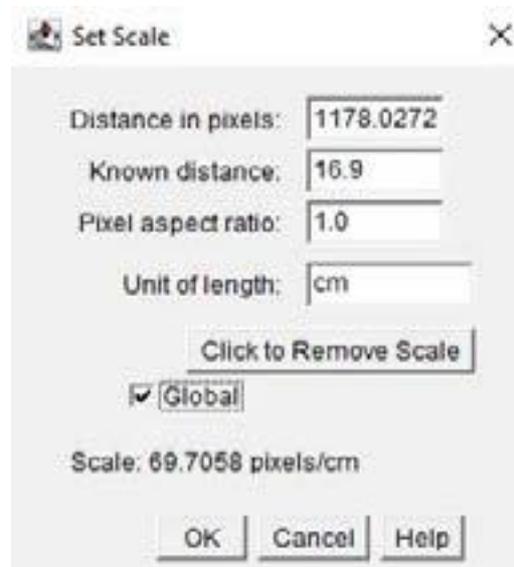


Figura 9. Set Scale

- Para medir as folhas pressionar o ícone “varinha” (Figura 10) para marcar a área a ser medida (Figura 11);



Figura 10. Ícone Varinha



Figura 11. Folha marcada de amarelo será medida

- Em seguida, clicar em “Analyze”, depois “Measure” e os resultados (Figura 12) aparecerão em uma tela separadamente, em cm².

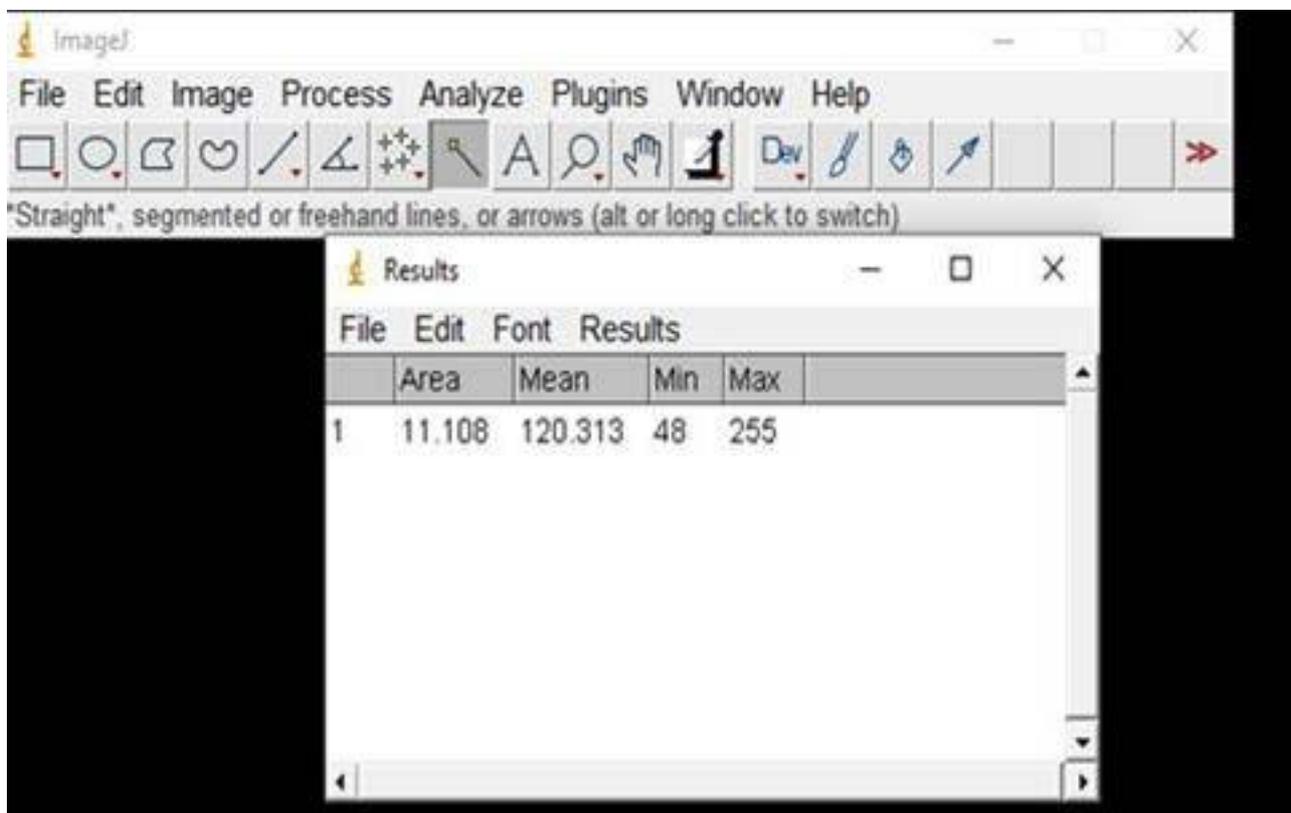


Figura 12. Resultados da medida de área foliar em cm²

Os resultados podem ser salvos em formato csv.

ANEXO 3

Instrução de Trabalho - Digimizer

1 - Objetivo

Descrever o método de operação do aplicativo Digimizer para medida de área foliar em forrageiras, utilizando uma fotografia.

2 - Descrição

O Digimizer é um de software de análise de imagem flexível e fácil de usar que permite medições manuais precisas.

Para realizar as medidas no computador no modo “off-line”, primeiramente, deve-se realizar o “download” do programa disponível na internet na página <https://www.digimizer.com/download/>.

Após a instalação clicar no ícone (Figura 1) para iniciar as medidas.



Figura 1. Ícone do programa Digimizer

Em seguida, abrirá o menu (Figura 2) com os comandos a serem executados.

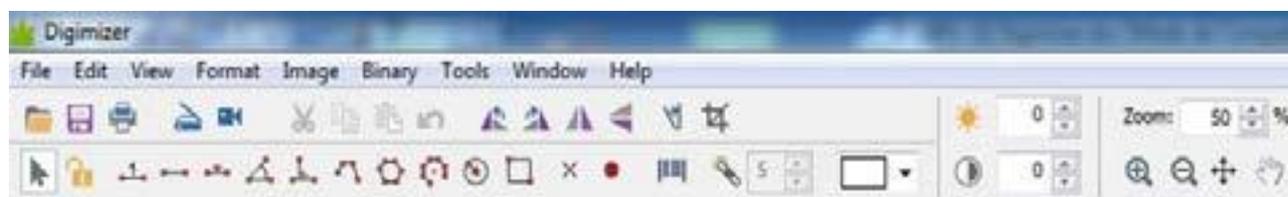


Figura 2 .Menu de comandos Digimizer

- No menu clicar em “File”, depois clicar em “Open Image...”;
- Em seguida, abrir a pasta (Figura 3) onde se encontram as fotos a serem analisadas;

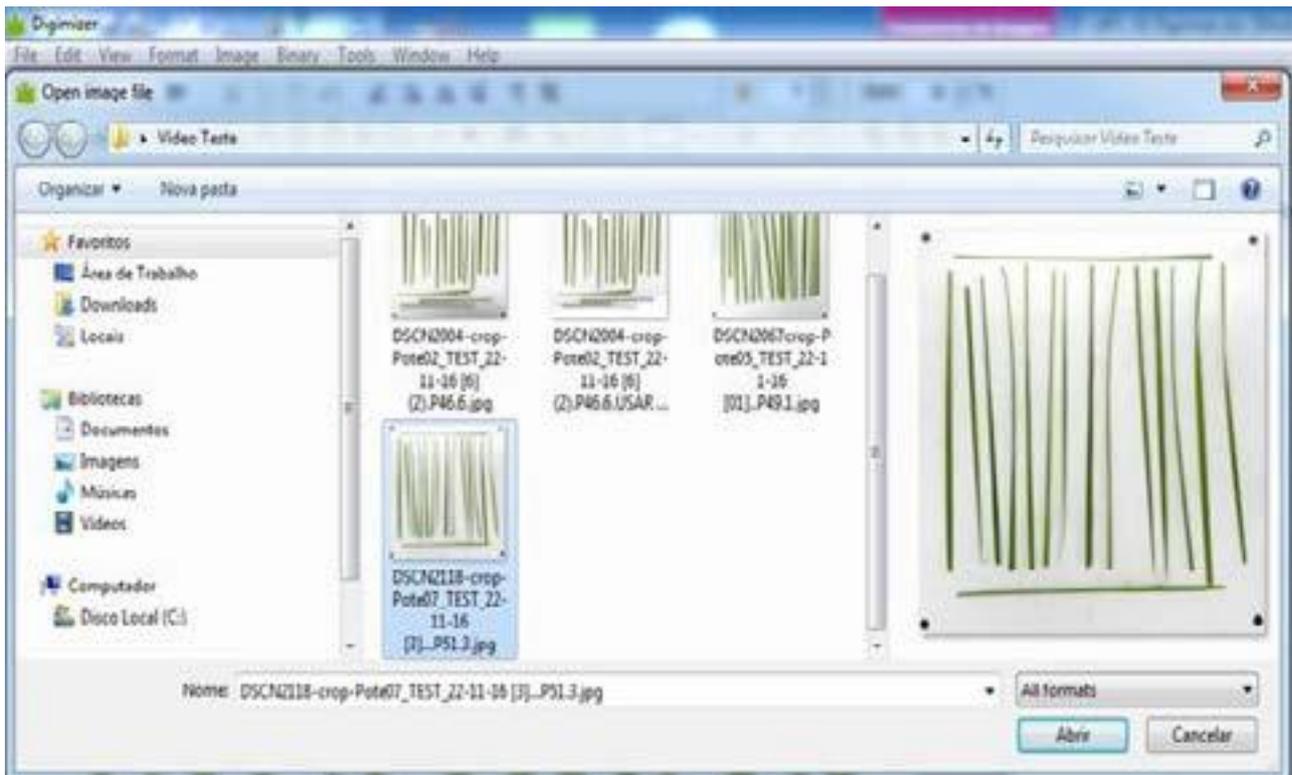


Figura 3. “Open Image...” pasta do arquivo

- Depois clicar na imagem original escolhida (Figura 4);



Figura 4. Foto original da forrageira

- Dessa forma teremos a seguinte tela do programa Digimazer (Figura 5):

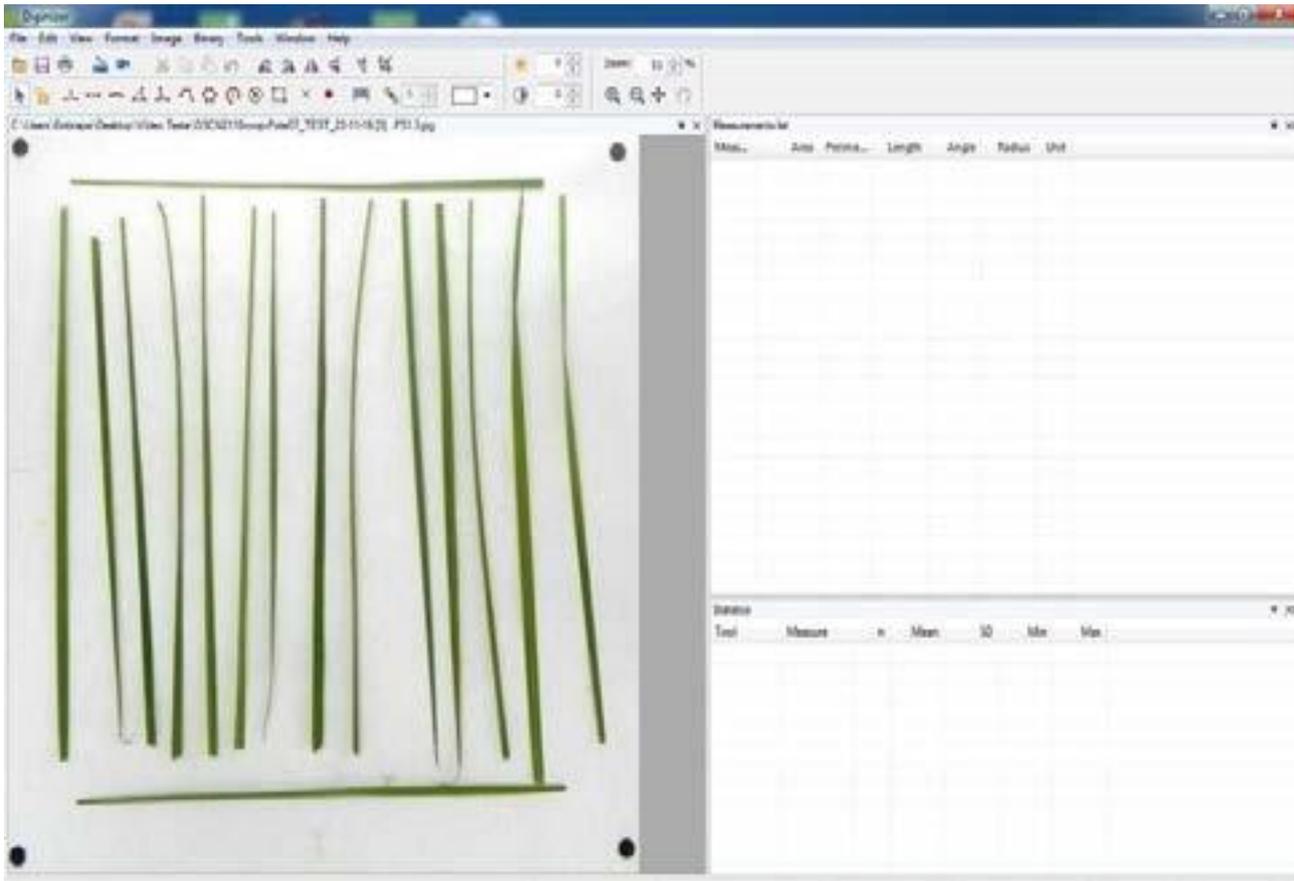


Figura 5. Tela do programa Digimazer

No Menu, pressionar no ícone “Unit” (Figura 6), depois traçar uma reta ligando os dois pontos da imagem (o lado do quadrado) e inserir a real medida na unidade desejada.

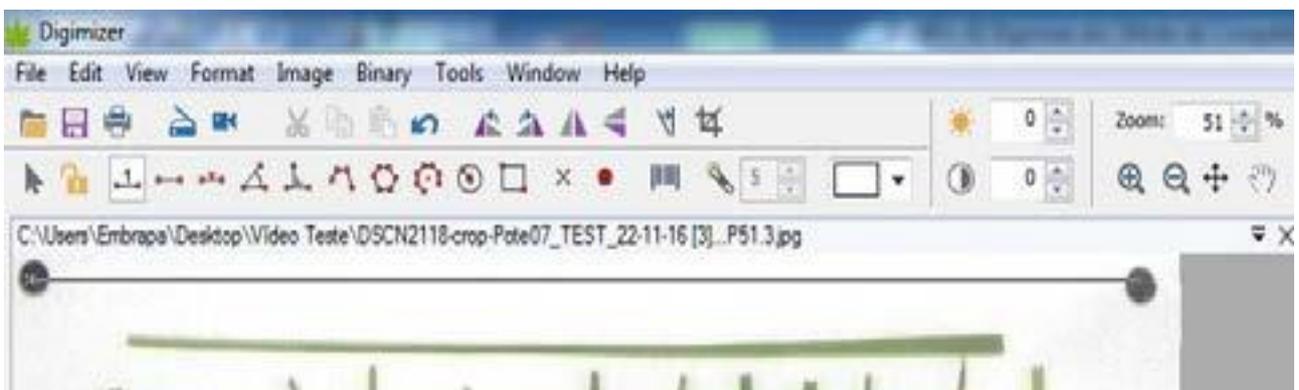
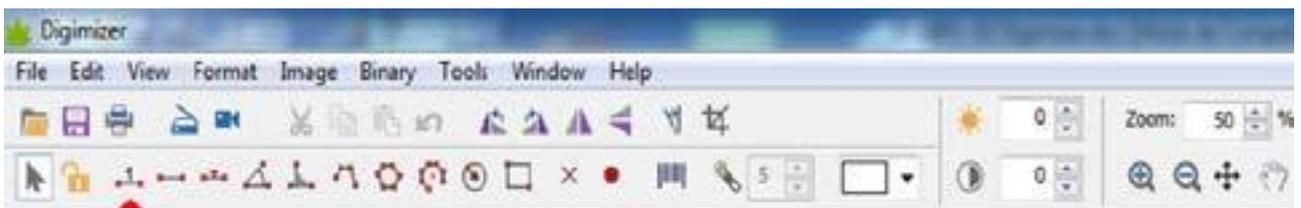




Figura 6. Foto do menu: seleção "Unit"

No Menu, pressionar no ícone "Binary" (Figura 7), depois "Binarization..." para realizar os ajustes de cor necessários. E a foto ficará no formato da Figura 7.

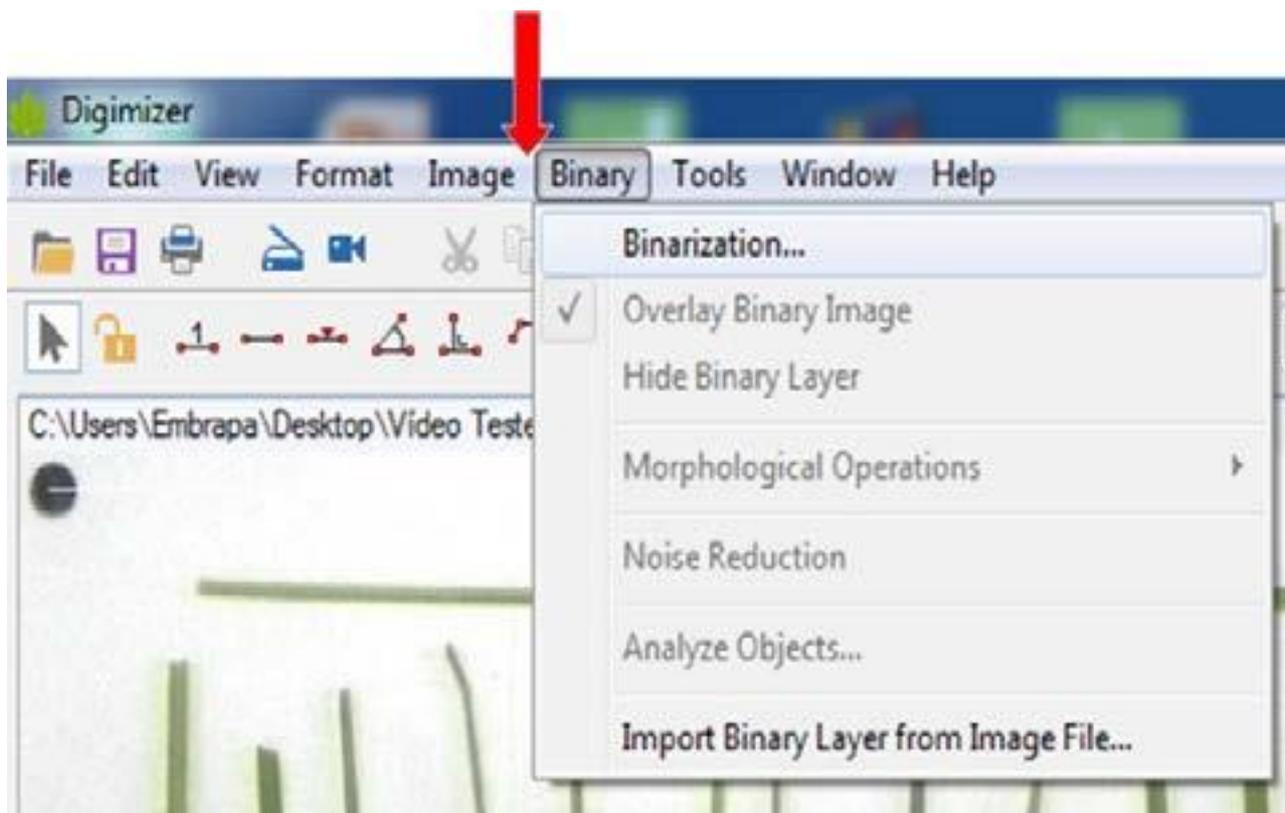


Figura 7. Seleção “Binary”

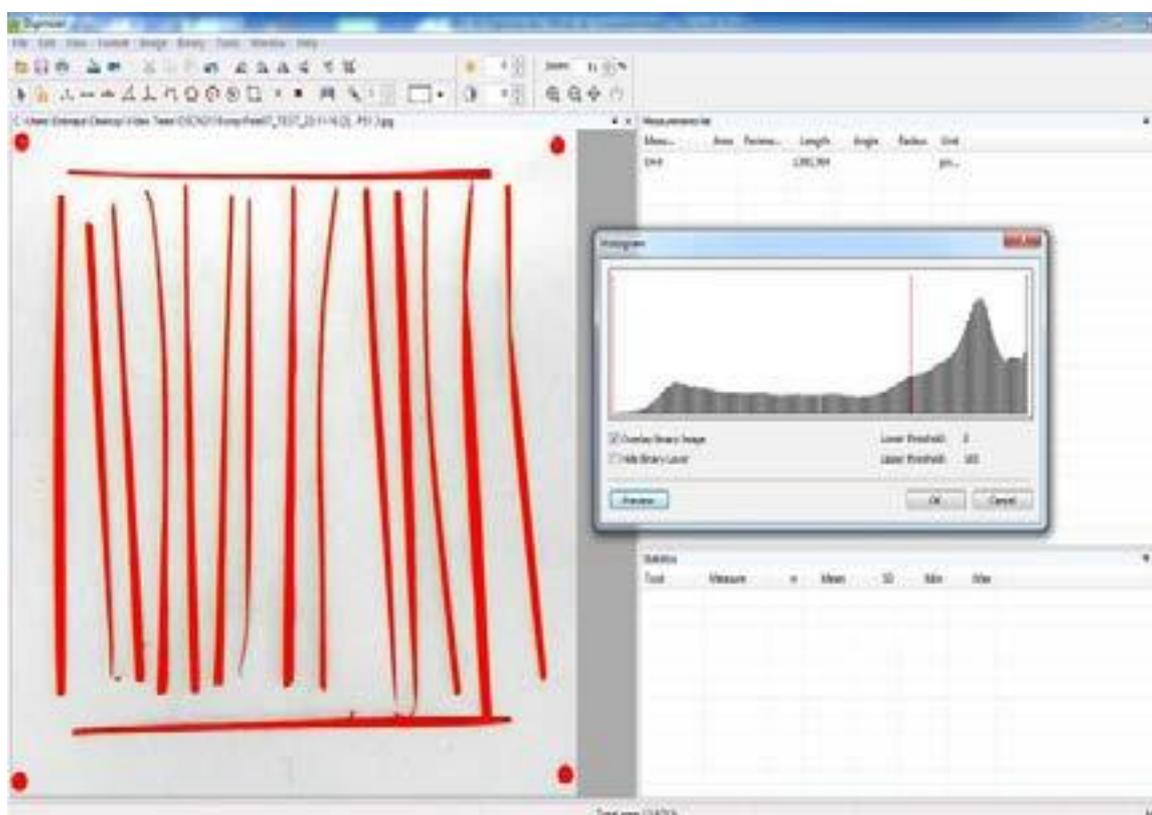


Figura 8. Foto ajustada em “Binarization”

- Selecionar “Ok” da janela Histogram.

No menu, indicado pela seta vermelha (Figura 9) selecionar “Binary” e em seguida “Analyze Objects...” e na janela “Analyze Objects” selecionar “ok.”

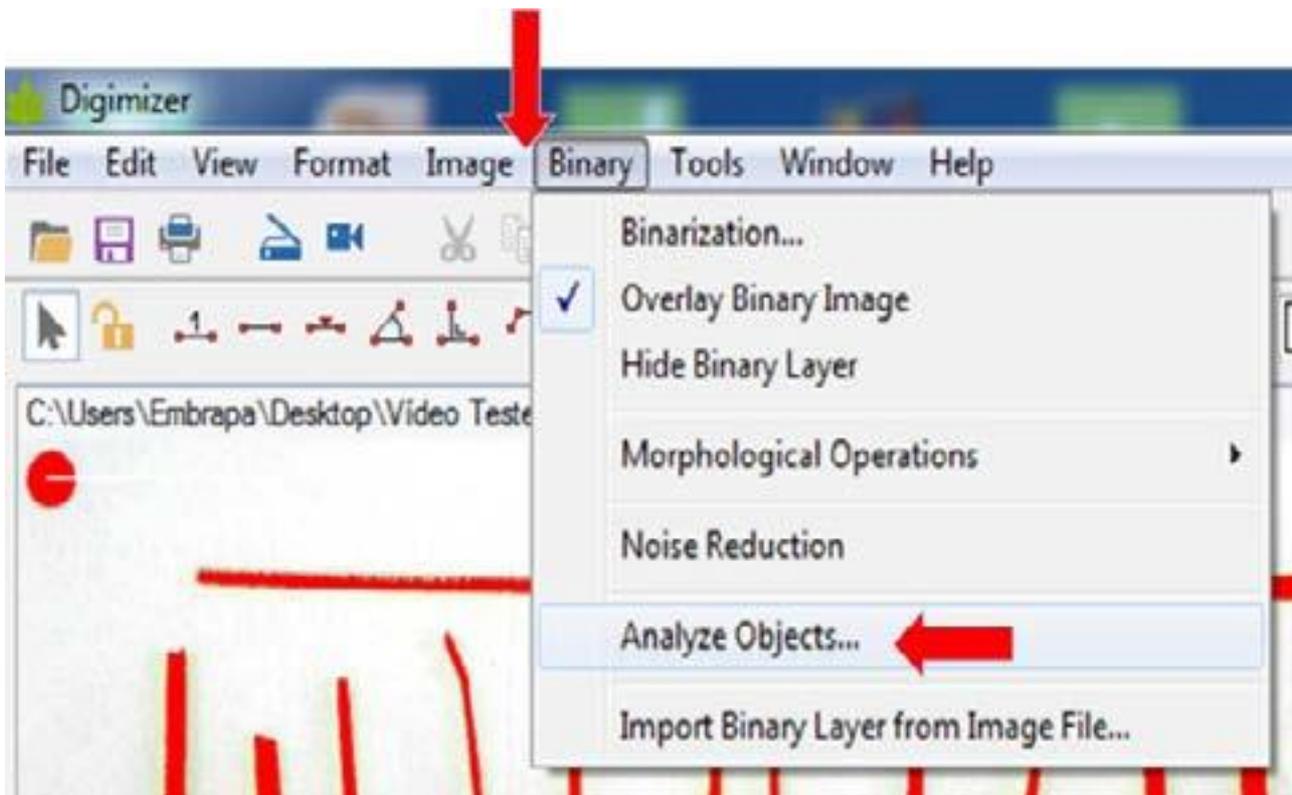


Figura 9. Seleção "Binary" e "Analyze Objects..."

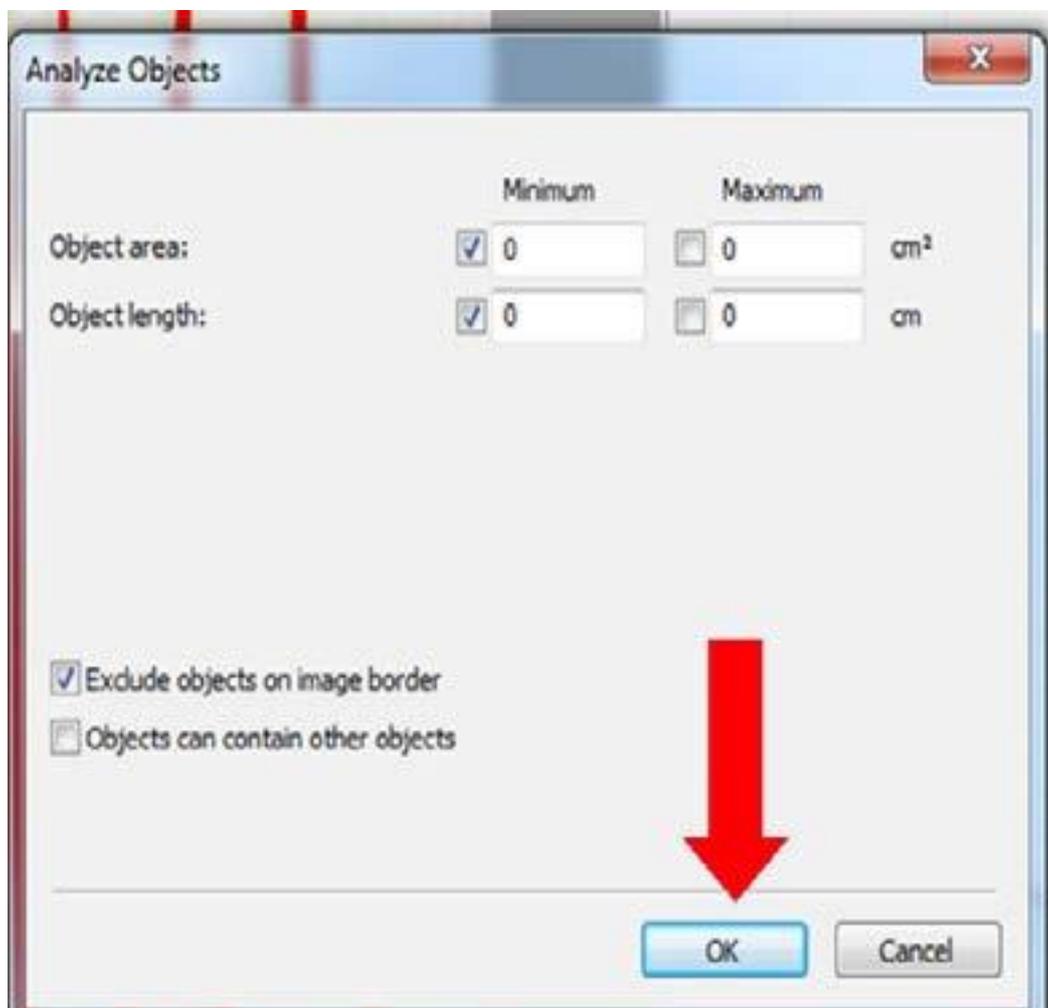


Figura 9. Seleção "Binary" e "Analyze Objects..."

- Dessa forma, a área de cada objeto (folha) aparecerá do lado esquerdo da tela. Assim:

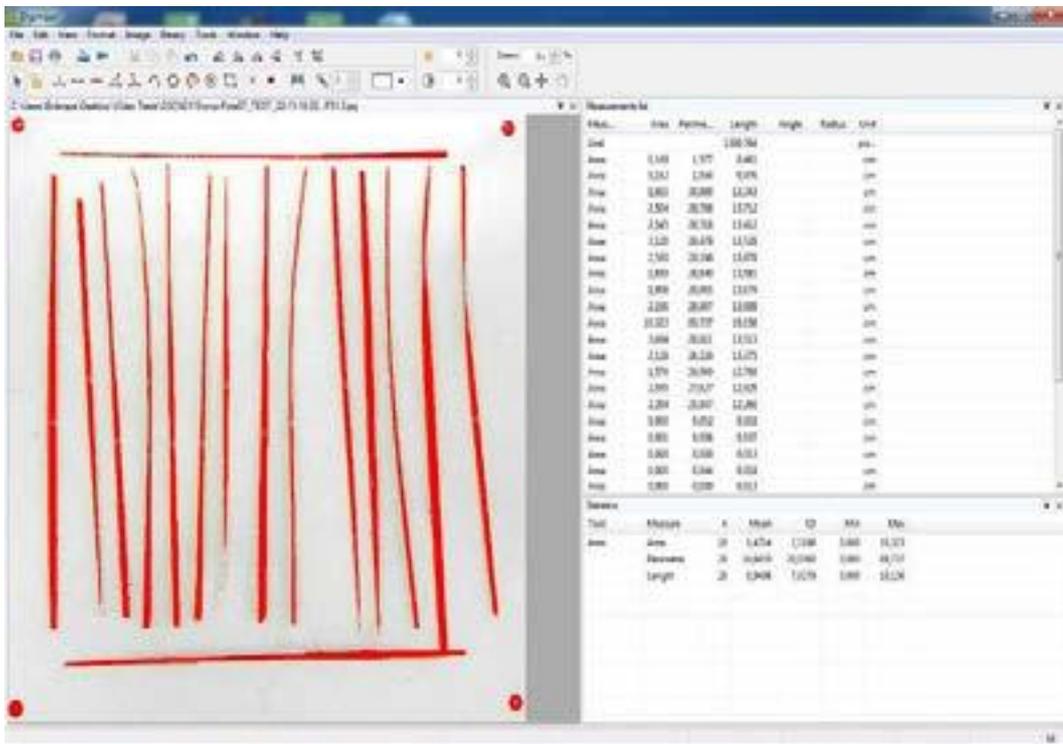


Figura 10. Resultados da medida de área foliar em cm²

- Cada circunferência pode ser excluída clicando-se em cima da linha ou em cima da circunferência e clicando em “delete”
- Os resultados podem ser salvos e exportados para formato em xlsx.

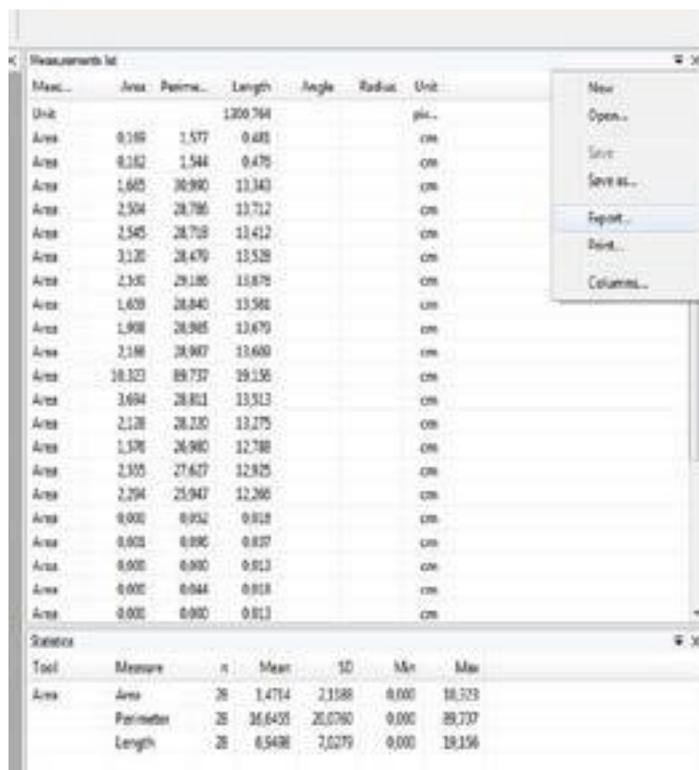


Figura 11. Como exportar arquivo

- Para obter a área total aplica-se a função soma do Excel no arquivo exportado.

ANEXO 4

Instrução de trabalho - Canopeo

1 - Objetivo

Descrever o método de operação do aplicativo Canopeo versão 1.1.7 para medida de área foliar em forrageiras, utilizando uma fotografia.

2 - Descrição

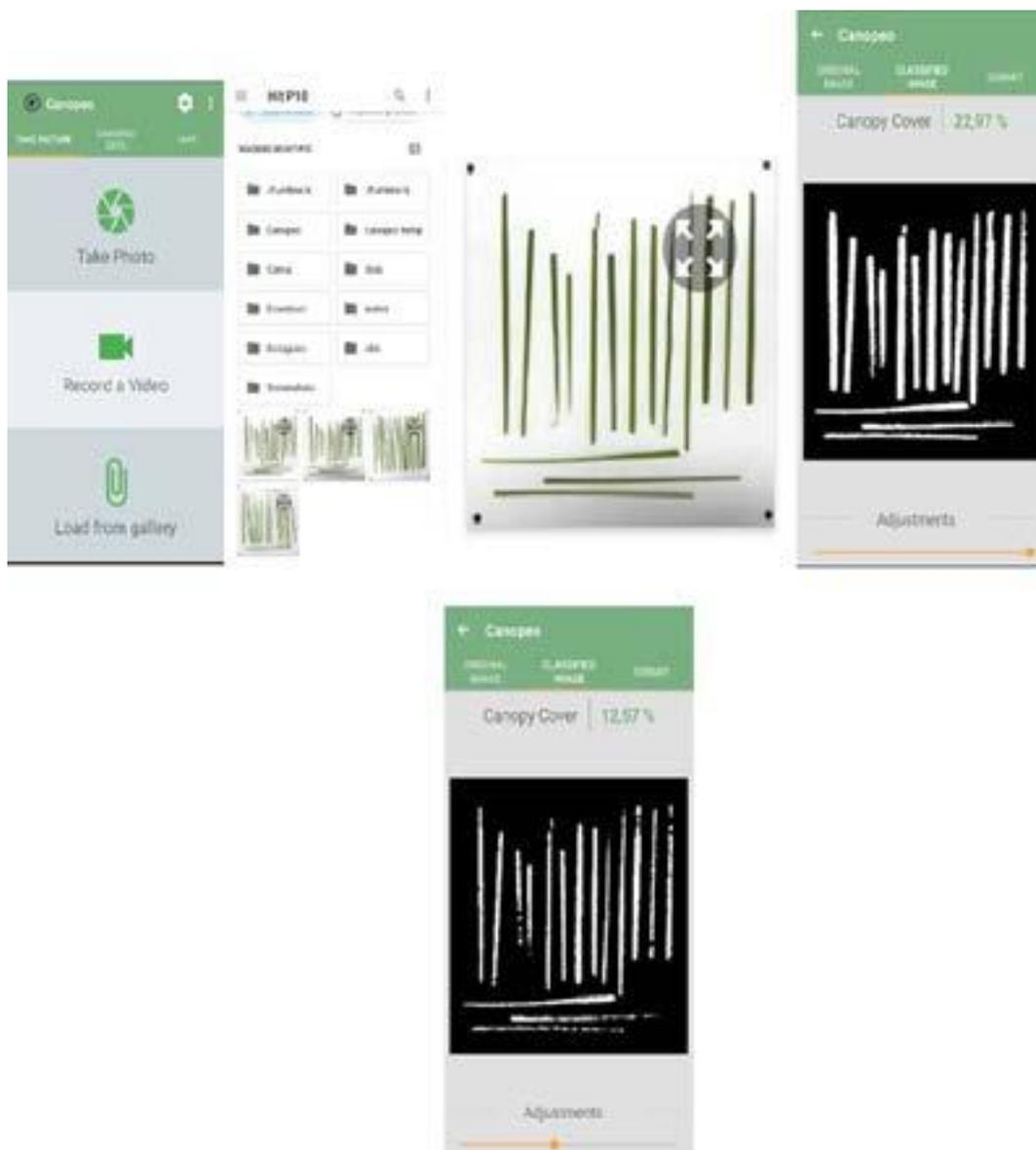
“O Canopeo® é uma ferramenta que possibilita a análise dos pixels utilizando o sistema Red-Green-Blue (RGB) (Patrignani; Ochsner, 2015) e estima a cobertura verde do dossel. O aplicativo foi desenvolvido na Universidade de Oklahoma, e está disponível como aplicativo para dispositivos Android e IOS e permite ao usuário determinar a porcentagem de cobertura verde em tempo real (Patrignani; Ochsner, 2015), o que pode permitir a tomada de decisões de gerenciamento de forma bastante ágil.”

O Download pode ser realizado pelo site: <https://canopeoapp.com/#/login>. É necessário criar uma conta para efetuar login no aplicativo.



Figura 1. Ícone do programa Canopeo

- Após instalação e criação da conta abrir o aplicativo e selecionar a fotografia. Assim:



- No menu clicar em “Load from gallery”.

- Clicar na imagem que deseja mensurar a área.

- Na próxima tela, comparar a imagem de cor com a imagem processada para ver se as configurações padrão são capazes de capturar os pixels verdes corretamente. Na imagem processada, os pixels brancos devem coincidir com os pixels verdes na imagem original. Caso você ache que pequenos ajustes são necessários para coincidir com as imagens, basta mover os ajustes do controle deslizante para corrigir a imagem processada. Normalmente, as configurações padrão fornecem estimativas precisas do dossel. Ajustar em “Adjustments” de acordo com a necessidade.

- Anotar em um caderno a porcentagem para posteriores cálculos.