

Comunicado 120

Técnico

ISSN 1808-6802
Julho, 2012
Bento Gonçalves, RS

Foto: Silvio A. M. Alves



Metodologia para elaboração de escalas diagramáticas para avaliação de doenças em plantas

Silvio André Meirelles Alves¹
Claudia Cardoso Nunes²

Introdução

A quantificação de doenças de plantas é parte fundamental para a correta interpretação de estudos de controle e epidemiologia. As medidas mais utilizadas são a incidência e a severidade. A decisão sobre qual tipo de medida utilizar dependerá das características da própria doença e do tempo disponível para a avaliação.

O tipo de dado gerado pela quantificação também poderá limitar ou não o método estatístico na comparação dos resultados.

A incidência é definida como a porcentagem (frequência) de plantas doentes ou partes de plantas doentes em uma amostra ou população (AMORIM, 1995). A quantificação da incidência é mais simples e rápida em relação à severidade e é adequada a doenças de solo, viroses sistêmicas e doenças que geram dano direto ao produto final (VALE et al., 2004).

A severidade é definida como a porcentagem da área ou do volume de tecido coberto por sintomas (AMORIM, 1995). É uma medida adequada a doenças da parte aérea. A sua quantificação é mais trabalhosa e depende de treinamento prévio do avaliador. O avaliador deve ser capaz de reconhecer as características da doença, tais como sua distribuição na planta e na parcela avaliada, a existência de variações entre folhas novas e velhas, e ter habilidade de estimar com precisão e acurácia a porcentagem da área coberta com os sintomas.

Embora a severidade seja uma variável mais difícil de ser obtida, ela apresenta melhor ajuste em estudos de eficiência de controle, condições favoráveis a epidemias e em estudos de danos (VALE et al., 2004; NUTTER et al., 2006).

A obtenção de dados de severidade ao longo do tempo permite a construção de curvas de progresso

¹Eng. Agrôn., Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado, Caixa Postal 1513, CEP 95200-000, Vacaria, RS. E-mail: silvio@cnpuv.embrapa.br.

²Bolsista Fapergs, Acadêmica do curso de Tecnologia em Fruticultura, UERGS, Vacaria, RS. E-mail: cldc.nunes@gmail.com.

da doença, o que representa a integração do efeito do hospedeiro, patógeno e ambiente (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Matematicamente, a severidade é calculada dividindo-se a área doente da folha (I^2) pela área total da folha (L^2) multiplicada por 100, ou seja, (severidade = $I^2/L^2 * 100$). Nutter et al. (2006) considera as medidas de número de lesões/folha e número de lesões/cm² como medidas da severidade. Porém, essas medidas não geram dados como a definição matemática prevê. Uma solução para esse impasse é determinar inicialmente o tamanho médio de lesão da doença para depois calcular-se a severidade (ALVES et al., 2006).

A quantificação de doenças causadoras de galhas em caules e raízes ou podridões em frutos deveria ser feita pela proporção do volume do órgão afetado (usando equação de volume do cilindro ou esfera), como é usada em epidemiologia humana com tumores de câncer (NUTTER et al., 2006).

Devido à dificuldade de obter-se a severidade, várias estratégias já foram propostas. As principais são as chaves descritivas, as escalas diagramáticas e a análise de imagem por computador (AMORIM, 1995).

A popularização dos computadores e das máquinas fotográficas digitais facilitou o desenvolvimento de escalas diagramáticas e também o uso de análise de imagens para a quantificação da severidade. Esse último método permite a medição da severidade, o tamanho da lesão, a classificação das lesões por tamanho e o número de lesões por folha ou por área.

Além da quantificação direta da doença, a análise de imagens pode auxiliar o desenvolvimento de uma nova escala diagramática.

Considerando-se as vantagens e as aplicações do uso de escalas diagramáticas para a estimativa da severidade de doenças, o objetivo deste comunicado foi o de apresentar a metodologia para auxiliar a sua elaboração.

Como desenvolver uma escala diagramática

Uma escala diagramática é a representação gráfica de uma série de plantas, ou partes de plantas com sintomas em diferentes níveis de severidade da doença. Na Figura 1, é ilustrado um exemplo de escala diagramática recentemente desenvolvida para avaliação de entomosporiose em folhas de pereira (NUNES; ALVES, 2011).

Para se desenvolverem escalas diagramáticas de qualidade, deve-se levar em consideração características próprias do hospedeiro e da doença.

Os diagramas devem reproduzir o formato da folha ou do órgão da planta afetada (de preferência, utilizando a mesma linha de contorno do órgão para todos os diagramas), além de considerar o tamanho e a distribuição das lesões. As doenças de clima temperado aumentam sua severidade pela formação de novas lesões, enquanto que doenças típicas de clima tropical possuem também o crescimento da lesão como estratégia de aumento da severidade (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). Assim, deve-se considerar o número de lesões por folha e as suas coalescências.

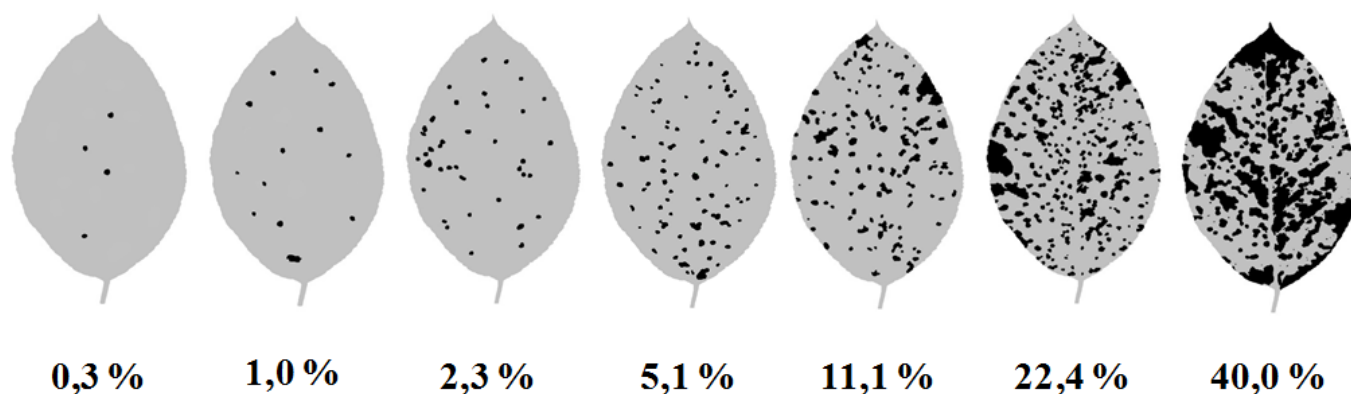


Fig. 1. Escala diagramática com sete níveis para quantificação da severidade de entomosporiose (*Entomosporium mespili*) em folhas de pereira.

O número de lesões por folha é especialmente importante em doenças que possuem lesões pequenas, como a ferrugem da soja, ferrugem de cereais de inverno, entomosporiose em pereira, entre outras. As estimativas de severidade de doenças com lesões pequenas tendem a ser superestimadas. O estímulo de muitas lesões pequenas cria a ilusão de maior porcentagem de área afetada pela doença (VALE et al., 2004).

Quando a escala desenvolvida é bastante criteriosa no tamanho e no formato das lesões, mesmo em condições de pouco treinamento, é possível realizarem-se avaliações precisas e acuradas.

A precisão de uma avaliação é definida como a falta de variação na estimativa de uma unidade amostral, seja ela de diferentes avaliadores ou a repetibilidade de um avaliador em particular (CAMPBELL; MADDEN, 1990; NUTTER et al., 1993). A acurácia é outra medida utilizada para descrever-se a exatidão de uma avaliação e diz respeito à proximidade dos valores quantificados em uma amostra em relação aos valores verdadeiros. Para se avaliar a precisão e a acurácia de um avaliador ou método, deve-se fazer a regressão linear entre os dados estimados e os reais.

Os valores reais de severidade podem ser obtidos de diferentes métodos. Medições obtidas por meio do planímetro e medidores de área foliar foram bastante utilizadas no passado. Mais recentemente, a medição através da análise de imagens digitais tem sido a mais usual.

Análise de imagem para obtenção da severidade real

O primeiro passo é a aquisição da imagem, que pode ser feita por scanner ou câmera digital (Figura 2). Nessa etapa, é importante que a imagem possua resolução suficiente para quantificar as áreas de interesse. Na prática, podemos recomendar a resolução de 100 pixels por cm (254 dpi), seja via scanner ou fotografia digital.

Medidas simples na aquisição da imagem, como oferecer uma boa iluminação e utilizar um fundo de cor contrastante entre o órgão e a área doente serão úteis na fase seguinte. Como sugestão, também pode ser acoplado um suporte à câmera fotográfica, para que seja mantida a mesma distância focal entre todas as imagens obtidas (Figura 3).

Após a aquisição, a imagem passará por diferentes etapas de processamento, dependendo do resultado de interesse. Nos casos em que há interesse de medição de características da lesão, como tamanho, formato e classes de tamanho, é necessário fazer a calibração da imagem. A calibração pode ser efetuada em diferentes softwares de manipulação de imagem, como Photoshop® e Gimp®. Nessa etapa, a imagem é aumentada ou reduzida para obter-se um tamanho conhecido do pixel. Ou seja, se a imagem adquirida possuir mais de 100 pixel/cm, esta pode ser reduzida até chegar a essa resolução (como na sugestão acima), na qual cada pixel tem o tamanho de 0,1 mm. Assim, uma imagem de 2,0 Megapixels (1600 x 1200 pixels) pode cobrir uma área de 16 x 12 cm.

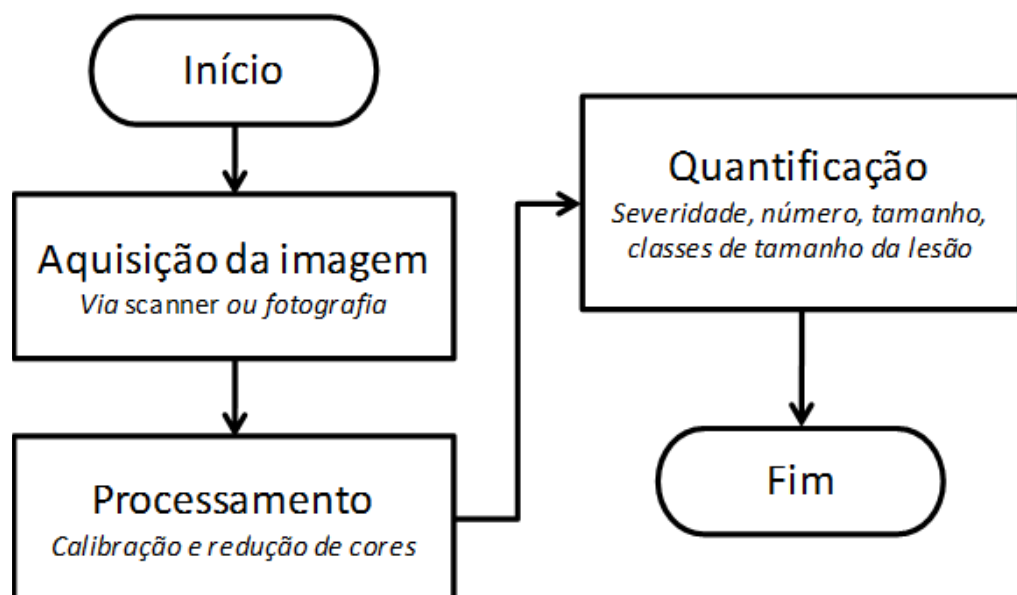


Fig. 2. Fluxograma para a análise de imagem em computador.

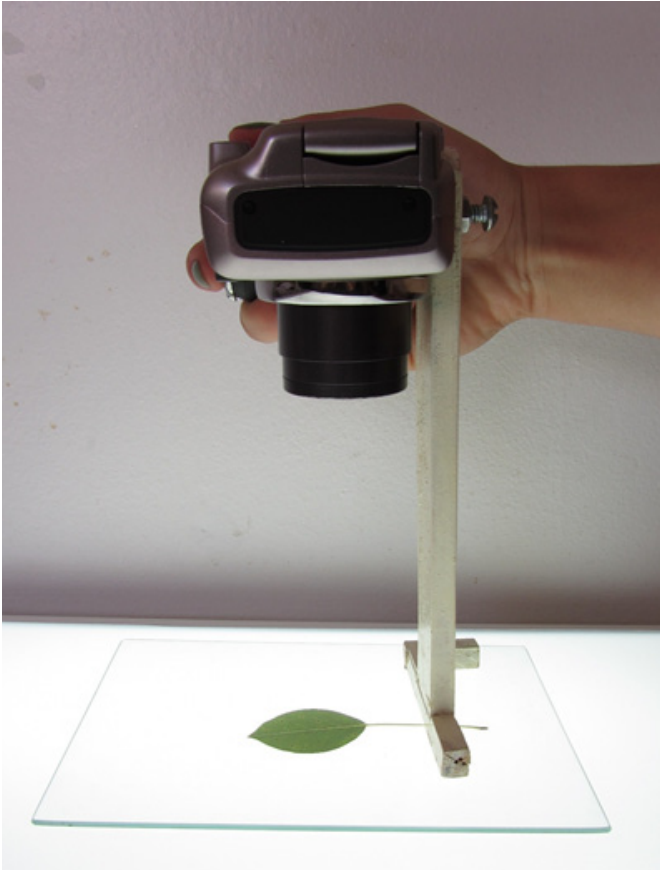


Fig. 3. Sugestão de aquisição de imagem para facilitar a etapa de processamento.

A etapa seguinte é a de redução no número de cores. Essa transformação da imagem também pode ser feita nos softwares mencionados anteriormente. O objetivo dessa etapa é obter-se uma imagem com uma cor para as lesões e com outra cor para o tecido sadio (Figura 4A).

Existem softwares que são capazes de quantificar várias cores ao mesmo tempo, mas outros só analisam imagens binarizadas, ou seja, com pixels brancos e pretos.

Uma vez obtida a imagem com poucas cores (ou binarizada), procede-se com a quantificação dessas áreas. Existem softwares como o Quant e o Assess que foram desenvolvidos especificamente para a avaliação de doenças de plantas. Eles facilitam, por diferentes métodos, a realização das etapas de aquisição, processamento e quantificação.

Alternativamente, podem-se utilizar softwares gratuitos, como o Image Tool 3.0 (WILCOX et al., 2002). Esse software possui menos recursos em

relação aos pagos, porém, permite determinar a porcentagem de tecido doente, o número de lesões e o tamanho médio de lesão (Figura 4).

Na Figura 4, a janela *Results* mostra as informações necessárias para a obtenção da severidade da folha que está sendo quantificada. Na coluna *Black Count*, a linha 1 representa a área das lesões (I^2), e a linha 2 a área total da folha (L^2). Utilizando-se a fórmula da severidade ($I^2/L^2 * 100$), obtém-se o valor de 7,23, ou seja, a severidade da folha é de 7,23%.

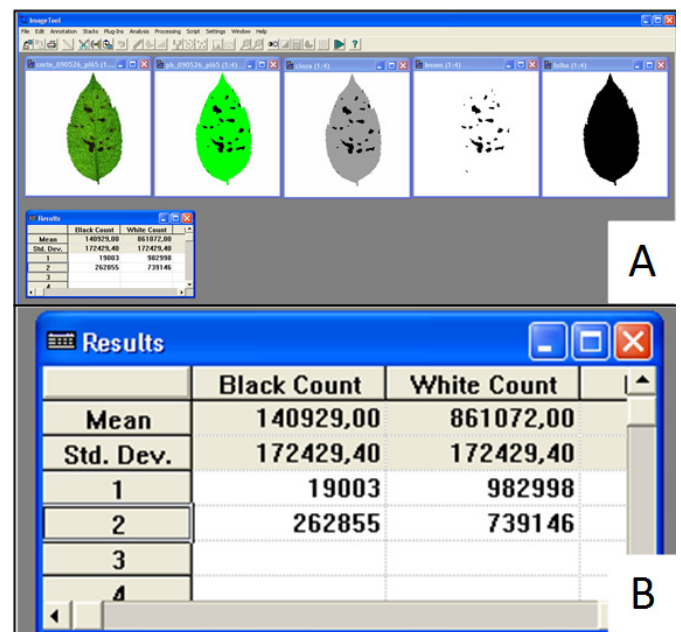


Fig. 4. Tela do software Image Tool. (A) imagens em diferentes etapas de processamento e (B) detalhe da janela de resultados.

Validação da escala

Para se propor uma nova escala diagramática, é importante que ela possua os diagramas que contenham a severidade mínima e máxima observada, apresente alta precisão na representação da doença e que as subdivisões de preferência respeitem a lei de acuidade visual proposta por Weber-Fechner (HORSFALL; BARRATT, 1945). Além disso, a escala diagramática deve ser validada.

A validação de uma escala compreende basicamente a realização de duas avaliações da severidade de um determinado número de folhas doentes por um determinado número de avaliadores, primeiramente sem a escala e em seguida com a utilização da mesma. Decorrido algum tempo após a segunda, pode ser realizada ainda uma terceira avaliação,

também com o uso da escala e pelos mesmos avaliadores, para avaliar-se a repetibilidade das estimativas geradas. É possível, também, separar os avaliadores em grupos de experientes e inexperientes. Durante a validação, serão utilizados métodos estatísticos para verificar-se quanto ela melhora a qualidade da avaliação. O método mais utilizado é a regressão linear simples entre as estimativas e a severidade real.

Os parâmetros e estatísticas utilizados para comparar-se a repetibilidade de avaliadores em diferentes métodos e/ou avaliadores são: inclinação da reta, intercepto, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de variação (cv) e erro padrão da estimativa para Y (SE_{Ey}). Uma inclinação significativamente maior ou menor que 1,0 demonstra a presença de erro sistemático. Um intercepto significativamente maior ou menor que 0,0 indica a presença de outro erro que é constante para todos os níveis de doença avaliados. Os valores de R^2 , cv e SE_{Ey} estão mais relacionados à precisão das estimativas.

Considerações finais

A análise de imagem em computador permite a avaliação direta da severidade e facilita a criação de escalas diagramáticas, podendo também ser utilizada em outras áreas da pesquisa, como a avaliação de área foliar, área de raízes, gotas de pulverização, etc.

A tendência futura na avaliação da severidade é a automatização da etapa de processamento, na qual um algoritmo faria a separação das áreas sadias e doentes (CAMARGO; SMITH, 2009). A dificuldade de implementação desse método está no reconhecimento dos tipos de tecidos. É comum na aquisição das imagens a obtenção de intensidades de cores semelhantes entre o tecido doente e sadio. Isso ocorre quando lesões claras ficam com cores semelhantes a áreas sadias com brilho, ou lesões escuras se confundem com áreas de nervuras. Como resultado disso, o algoritmo ou função discriminante comumente reconhece tecidos doentes como sadio e vice-versa.

Atualmente, as escalas diagramáticas têm sido o método mais utilizado para avaliação da severidade em diferentes patossistemas (AMORIM, 1995). Elas são preferidas por proporcionarem avaliação rápida

e com boa precisão. Além disso, os dados gerados permitem a aplicação de procedimentos estatísticos avançados, como os aplicados no desenvolvimento de modelos de danos ou de seleção de estratégias de controle de doenças.

Referências bibliográficas

ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem soja. In: FERRUGEM asiática da soja. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2006. p. 37–59.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: MANUAL de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 647–671.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronomica Ceres, 1996. 289 p.

CAMARGO, A.; SMITH, J. An image-processing based algorithm to automatically identify plant disease visual symptoms. **Biosystems Engineering**, v. 102, n. 1, p. 9–21, 2009.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1. ed. New York: John Wiley, 1990. 532 p.

HORSFALL, J. G.; BARRATT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, v. 35, p. 655, 1945.

NUNES, C. C.; ALVES, S. A. M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da severidade de entomosporiose em folhas de pereira. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 585, 2011.

NUTTER, F. W.; ESKER, P. D.; COELHO NETTO, R. A. **Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data**. Plant disease epidemiology: facing challenges of the 21st Century. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 95–103.

NUTTER, F. W.; GLEASON, M. L.; JENCO, J. H.; CHRISTIANS, N. C. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease

assessment systems. **Phytopathology**, v. 83, p. 806–812, 1993.

VALE, F. X. R. do; JESUS JUNIOR, W. C. de; LIBERATO, J. R.; SOUZA, C. A. de. **Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro**. In:

EPIDEMIOLOGIA aplicada ao manejo de doenças de plantas. Belo Horizonte: Perfíl, 2004. p. 91–121.

WILCOX, D.; DOVE, B.; MCDAVID, D.; GREER, D. **UTHSCSA Image Tool 3.0**. San Antonio, TX: UTHSCSA, 2002.

Comunicado Técnico, 120

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS

Fone: (0xx) 54 3455-8000

Fax: (0xx) 54 3451-2792

<http://www.cnpuv.embrapa.br>

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição

Comitê de Publicações

Presidente: Mauro Celso Zanus

Secretária-Executiva: Sandra de Souza Sebben

Membros: Alexandre Hoffmann, César Luís Girardi, Flávio Bello Fialho, Henrique Pessoa dos Santos, Kátia Midori Hiwatashi, Thor Vinícius Martins Fajardo e Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Expediente

Formatação: Alessandra Russi

Normatização bibliográfica: Kátia Midori Hiwatashi