



Utilização do Corante Toluidina na Determinação de Parâmetros Radiculares pelo Software Siarcs 3.0

Elisete Pains Rodrigues¹
Gabriela Cavalcanti Alves²
Verônica Massena Reis³

A utilização de parâmetros radiculares tem sido considerada relevante na medida do crescimento vegetal. As raízes de plantas cultivadas em sistemas *in vitro* são muito finas, claras e delicadas, o que inviabiliza sua leitura pelo scanner e utilização de programa de captura desta imagem. Na tentativa de contornar esta dificuldade, procurou-se elaborar um método de coloração de raízes finas que possibilitasse obter imagens pelo scanner. Este trabalho descreve a metodologia de coloração bem como o processo de análise das imagens pelo programa SIARCS versão 3.0 para a determinação do comprimento e da área radicular de plantas pré-germinadas e cultivadas em sistema estéril.

O programa SIARCS (Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo) é um instrumento utilizado no processamento de imagens que pode ser aplicado em várias situações de experimentação agrícola tais como: a análise de incidência de doenças e pragas foliares, porosidade do solo, cobertura do solo, densidade de raízes em perfis, medidas do comprimento e diâmetro de raízes, sementes e frutos e também para obtenção de informações sobre distribuição de chuva ou de irrigação (Crestana et al., 1994).

O experimento ao qual desejou-se avaliar dados do crescimento radicular foi conduzido em tubos de ensaio com capacidade de 120 mL contendo 60 mL de solução de Hoagland's com 6 g de agar L⁻¹, tampado com rolha de algodão e esterilizado em autoclave a 110 °C a 1,2 atm por 20 min. As sementes da cultivar de arroz IR42 foram descascadas e desinfestadas com solução de estreptomicina (0,1 %) contendo 2 gotas de detergente comercial, sob agitação de 100 rpm, durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com água destilada estéril e imersas em solução HgCl₂ (solução estoque a 0,1 %) diluído 1000 vezes em água estéril, sob agitação de 100 rpm por 20 min. Ao final as sementes foram lavadas 8 vezes em água destilada estéril, sob agitação de 100 rpm por 10 min cada série (Dobereiner et al., 1995). Para seleção das sementes viáveis e estéreis, o lote foi distribuído em placas de petri contendo meio sólido agar-água (1% de Agar) para pré-germinar por três dias à 30°C. Na capela de fluxo laminar, as plântulas sadias foram transferidas cuidadosamente para a superfície do meio de cultivo, dentro do tubo de ensaio. Em seguida, o experimento foi mantido sob irradiação de luz ultravioleta por 30 minutos, visando manter as condições estéreis no processo de transferência.

¹ Pós-graduando do curso de Agronomia – Ciências do solo/UFRRJ/CAPES/Embrapa Agrobiologia

² Estagiária Embrapa Agrobiologia

³ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia

Os tubos contendo meio de cultivo e plântulas de arroz foram cobertos com rolha de algodão e mantidos em câmara de incubação com fotoperíodo de doze horas e temperatura de 28°C. Aos 30 dias após o plantio foi realizada a coleta das raízes para análise da área e comprimento radicular através da análise das imagens no programa SIARCS versão 3.0.

As raízes de arroz foram lavadas em água corrente, umedecidas com solução de formol a 2 %, embaladas em sacos plásticos e mantidas em câmara fria (10 °C), para melhor conservação. Na coloração das raízes de arroz foi utilizado o corante toluidina (solução estoque a 1 %) diluído em partes iguais com água destilada. No preparo da solução estoque, dissolveu-se 5 g de bórax (tetraborato de sódio— $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) em ½ litro de água destilada sob agitação por 2 horas. Em seguida 5 g de toluidina azul em pó foi adicionada e a solução foi mantida sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Ao final, filtrou-se a solução final em papel Whatman™ nº 01 utilizando 2 folhas para filtragem (Haddad, 1998). Esta solução estoque pode ser mantida à temperatura ambiente por tempo ilimitado.

As raízes foram imersas nesta solução diluída por 30 s, secas e dispostas sobre o Scanner HP ScanJet 3400C para obtenção das imagens, utilizando como referência uma escala quadriculada de 1 cm (Figura 1).

As raízes utilizadas na leitura eram raízes de coloração creme muito claro e o scanner utilizado possui um ajuste automático da imagem, foi necessária a inclusão, durante o procedimento de leitura da raiz, de um parâmetro físico utilizado pela máquina para comparação de tonalidade. A utilização de um elástico de borracha permitiu que eventuais riscos ou outras sujeiras presentes na visualização da imagem, fossem desconsiderados pelo scanner, permitindo desta forma uma melhor definição das imagens.

As imagens obtidas das raízes no scanner foram salvas no formato bitmap (bmp) utilizando a resolução 200 dpi e tipo de saída “desenho em branco e preto” (Figura 2).

Utilizando o programa SIARCS versão 3.0, a cor da área foi estimada no filtro “Threshold” em seleção ordenada, selecionando-se a cor preta pois a imagem foi salva com desenho branco e preto. Em seguida, definiu-se a unidade e a dimensão da escala marcada e a imagem foi binarizada. Após este processo pôde-se então realizar a determinação da área radicular, escolhendo na caixa de contagem de pixels a opção de medida e unidade (área e cm^2). Para a contagem do comprimento das raízes (cm), antes foi necessário o afinamento das imagens.



Figura 1: Imagem obtida pelo scanner das raízes de arroz coradas com toluidina no tipo de saída “Fotografia Colorida de Melhor Qualidade”

A obtenção de imagens de raízes finas e claras como o utilizado neste experimento só foi possível através da coloração das raízes, sendo a utilização do corante toluidina eficiente para este fim.

A concentração do corante (1%) diluído em partes iguais com água destilada foi adequada pois se conseguiu obter raízes coradas em pouco tempo (30 s) sem danificar o tecido vegetal. Em concentrações superiores (sem diluição) as raízes ficaram quebradiças o que impossibilitou o seu manuseio no scanner. Por outro lado, em concentrações menores, as raízes não ficaram coradas de forma homogênea mesmo com 1 minuto de imersão na solução. A utilização do formato bitmap (bmp), da resolução 200 dpi e do

tipo de saída “desenho em branco e preto” (Figura 2) foram necessários pois desta forma o tamanho da figura ficou reduzido sendo compatível com a capacidade do computador utilizado e o formato aceito pelo software SIARCS 3.0 (Jorge & Crestana, 1996).

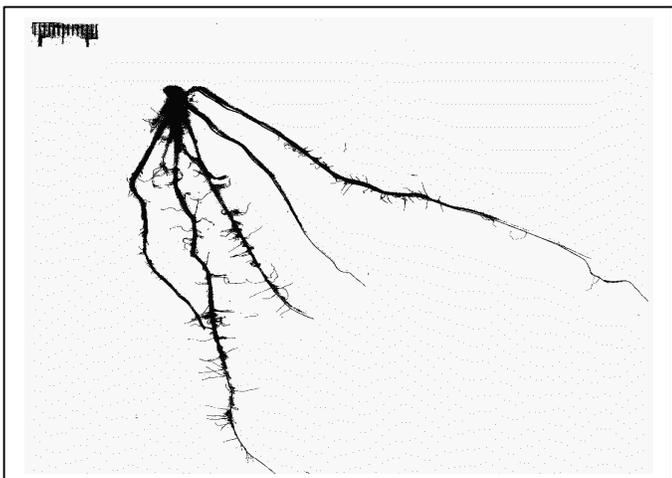


Figura 2: Imagem obtida pelo scanner das raízes de arroz coradas com toluidina no tipo de saída “Desenho em Branco e Preto”

Referências Bibliográficas

- CRESTANA S.; GUIMARÃES M. F.; JORGE, L. A. C.; RALISCH, R.; TOZZI, C. L.; TORRE, A.; VAZ, C. M. P. Avaliação da distribuição de raízes no solo por processamento de imagens digitais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 365-371, 1994.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa- CNPAB, 1995, 60 p.
- HADDAD, A. Obtenção e coloração de cortes semifinos. In: SOUZA, W., (Ed.). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. P. 29-31.
- JORGE, L. A. C.; CRESTANA, S. SIARCS 3.0: Novo aplicativo para análise de imagens digitais aplicado a ciência do solo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 1., SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 4., 1996, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** Águas de Lindóia, SP: USP / SLCS / SBCS, 1996. 5 p. CD-ROM.

Comunicado Técnico, 58



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Governo
Federal

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 47
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2003): 50 exemplares

Comitê de publicações

José Ivo Baldani (Presidente)
José Antônio Ramos Pereira
Marcelo Grandi Teixeira
Robert Michael Boddey
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero
Verônica Massena Reis
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Marcelo Grandi Teixeira
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia