

## SISTEMI DI ANALISI DI IMMAGINE PER VALUTARE L'ACCRESIMENTO DI MAIS DISERBATO CON ERBICIDA CONTENENTE L'ANTIDOTO CYPROSULFAMIDE, A CONFRONTO CON ERBICIDA STANDARD

A. ALTISSIMO<sup>1</sup>, R. BORTOLASO<sup>1</sup>, R. FRIEDE<sup>1</sup>, D. GIACOMELLO<sup>1</sup>,  
C. BACCHIOCCHI<sup>2</sup>, P. OFFREDI<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Landlab srl, Via Quintarello 12/A, 36050 Quinto Vicentino -VI

<sup>2</sup>Bayer CropScience S.r.l., Viale Certosa 130 – 20156 Milano  
r.bortolaso@landlab.net

### RIASSUNTO

L'applicazione di alcuni principi attivi in associazione ad uno specifico antidoto è finalizzata all'incremento della selettività e dello sviluppo iniziale del mais. La tecnica di *phenotyping* mediante analisi di immagini 2D in pieno campo, può essere utilizzata per valutare in modo non distruttivo lo sviluppo dell'area delle piante. Sono state eseguite due prove parallele in 2 località della Pianura Padana con i seguenti erbicidi: Adengo (isossafutolo + thien carbazone-methyl e l'antidoto cyprosulfamide), a 2 L/ha, e Erbicida Standard (mesotrione + s-metolachlor + terbutilazina), a 4 L/ha. Prima e dopo l'applicazione degli erbicidi, in aggiunta ai rilievi tradizionali sono state raccolte immagini digitali sempre nelle stesse porzioni di parcella, utilizzando un box chiuso e illuminato a LED. Queste immagini sono state ritoccate per eliminare le infestanti presenti e processate con il software WinCam (Regent Instruments) al fine di calcolare l'area fogliare della pianta di mais e di analizzare la distribuzione di colori. L'analisi delle immagini e la statistica applicata hanno consentito di valutare con precisione le differenze di sviluppo della coltura nelle diverse tesi, confermando che Adengo<sup>®</sup> applicato in post-emergenza precoce allo stadio di 2 foglie, induce un significativo aumento della superficie fogliare e della quantità di clorofilla rispetto allo standard di confronto.

**Parole chiave:** antidoto, phenotyping, post-emergenza precoce

### SUMMARY

#### SYSTEMS OF IMAGE ANALYSIS TO EVALUATE THE DEVELOPMENT OF CORN TREATED WITH AN HERBICIDE BASED ON CYPROSULFAMIDE, COMPARED WITH STANDARD HERBICIDE

The application of certain active ingredients in combination with a specific adjuvant aims at increasing the selectivity and the early development of maize. The phenotyping technique by 2D image analysis, in open field, can be used to evaluate the real surface development of plants in a non-destructive way. Two field trials were carried out in parallel in 2 locations of the Po Valley with the following herbicides: Adengo (isoxaflutole + thien carbazone-methyl and the adjuvant cyprosulfamide), at 2 L/ha, and Standard product (mesotrione + s-metolachlor + terbutylazine) at 4 L/ha. Before and after the application, besides the standard assessments, digital images taken in the same plot place using a LED-lit closed box were collected. These images of the same plants were re-modeled to remove existing weeds and processed using WinCam (Regent Instruments) software in order to calculate the leaf area of the plant and analyze the color distribution. The analysis of images and the applied statistics enable to precisely evaluate the differences in the development of the crop among the different treatments, confirming that Adengo<sup>®</sup> applied in early post-emergence at 2-leaf stage, induces a significant increase of leaf surface and chlorophyll content compared to the standard product.

**Keywords:** adjuvant, phenotyping, early post emergence

## INTRODUZIONE

La coltura del mais nell'ambiente padano richiede, per ragioni tecniche ed economiche, una sempre maggiore efficienza a livello agronomico ottenibile, laddove necessario, con l'impiego di erbicidi che assicurino il controllo delle malerbe nelle fasi di sviluppo iniziale della coltura.

Alcuni moderni erbicidi associano nella loro formulazione finale sostanze attive erbicide e antidoti. In particolare Adengo® contiene l'antidoto cyprosulfamide (Darren E. Robinson et al, 2013; Lanlan Sun et al, 2016; Kolesnik, S.A. Stashkevich, A.V., 2010; Chris Rosinger et al, 2012; Chris Rosinger, 2014; G. Tracchi et al., 2010). Al fine di valutare gli effetti di applicazioni di erbicidi sulla selettività della coltura, è stata messa a punto una tecnologia per valutare l'incremento di area fogliare e eventuali differenze nella colorazione nelle prime fasi di sviluppo della coltura. Questa tecnologia, basata sulla cattura e successive analisi di immagini digitali non è distruttiva e consente di effettuare anche rilievi successivi laddove necessario.

La tecnica di "Phenotyping" basata sull'acquisizione, mediante sensori di diverso tipo, di immagini in RGB o Infrarosso vicino delle piante per determinare le loro risposte a trattamenti e/o a stress abiotici imposti, consente di verificare differenze, anche modeste, di sviluppo areale della pianta e mediante la classificazione dei pixel, confermare se l'applicazione di erbicidi abbia o meno un effetto sulla colorazione delle foglie, indice indiretto della quantità di clorofilla presente.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in parallelo in due località della pianura padana e precisamente: Gradella - Cremona (N 45° 25' 30.731 E 9° 32' 1.679) e Leno - Brescia (N 45° 21' 31.735 E 10° 15' 45.668), su mais di primo raccolto, seminato alla densità di 75.000 piante/ha, rispettivamente alle seguenti date: 1/4/2017 CR e 14/4/2017 BS. In tutte le località, alla coltura sono stati applicati i seguenti trattamenti erbicidi in post emergenza precoce, allo stadio di 2 foglie aperte: 1) Adengo alla dose di 2 L/ha, 2) Erbicida Standard alla dose di 4 L/ha, 3) non trattato. I prodotti sono stati distribuiti con attrezzatura a spalla e veicolati con 300 L/ha di acqua. Ogni tesi è stata ripetuta 4 volte secondo uno schema a blocchi randomizzati. I rilievi sono stati eseguiti ai seguenti stadi di sviluppo della coltura: 4 foglie aperte (BBCH 14) e 5 foglie aperte (BBCH 15). A queste date si è rilevato il numero di piante emerse, il livello di infestazione presente per superficie coperta e il contributo specifico delle diverse infestanti. Sempre alle stesse date e mediante l'impiego di Box chiuso PHD13810 della dimensione di cm 130x85x103, con illuminazione costante a LED, fotocamera Reflex opportunamente settata (Manuale, esposizione +1/3, zoom 18mm) sono state raccolte le immagini delle piante.

Tabella 1. Località, tesi ed immagini raccolte

Località	n. tesi	n. ripetizioni	n. rilievi	n. immagini/parcella	n. totale immagini
Cremona	3	4	2	5	120
Brescia	3	4	2	5	120

Data la variabilità di emergenza e la non linearità delle file di mais (ad esempio per il terreno sassoso nella prova di Cremona, per il tipo di precessione e delle diverse tipologie di infestanti presenti), le 240 immagini prelevate sono state sottoposte a selezione secondo criteri che consentissero di avere, in ogni immagine, almeno sei piante intere anche all'ultima data, danni

fogliari (dovuti a gelate) limitati, presenza di infestanti tali da non coprire la pianta di mais e che, comunque, la rendessero distinguibile. In questo modo si è giunti a selezionare 32 immagini per località (16 per data), che sono state sottoposte a “pulizia” grafica delle infestanti, mediante software di elaborazione di immagini e successivamente ad analisi di immagine in RGB con il software WinCam (Regent Instruments -Canada). Si è così determinata l’area fogliare complessiva della pianta, espressa in cm<sup>2</sup>, che è stata considerata indice della biomassa aerea. Inoltre tutti i pixel corrispondenti ai toni del verde sono stati raggruppati in 3 categorie denominate: Verde Scuro, Verde Medio, Verde Chiaro. In questo modo l’area fogliare è stata suddivisa in tre sub-aree, considerate indice indiretto della clorofilla. Le superfici complessive ottenute e le superfici per singolo gruppo di “verde” sono state sottoposte ad analisi statistica per il fattore principale “Trattamento diserbante” mediante il software Statistica by StatSoft.

Figura 1. Immagine da drone all’altezza di m. 25 dell’area sperimentale di Brescia, dove sono ben visibili le 4 parcelle non trattate con erbicidi



## RISULTATI

Nel presente lavoro vengono discussi i risultati raccolti nelle due località in provincia di Cremona e Brescia. Si discutono poi i dati di analisi di immagine relative ai due “prelievi” di immagini ovvero a stadio 4 foglie aperte (BBCH 14) e 5 foglie aperte (BBCH 15).

La tabella 2 mostra il tipo e l’andamento della flora infestante ed il controllo determinato dall’impiego dei due erbicidi nelle rispettive località.

Tabella 2. Rilievo effettuato sulla flora infestante allo stadio BBCH 14 nella prova di Brescia e BBCH 15 in quella di Cremona. I valori nel Non Trattato si riferiscono alla % di copertura delle infestanti, mentre sono relativi alla % di efficacia per le tesi Adengo e Erbicida Standard.

Tesi	Dose formulato L/ha	Rilievo BBCH 14 (BS)			Rilievo BBCH 15 (CR)		
		<i>Solanum nigrum</i>	<i>Stellaria media</i>	<i>Chenopodium album</i>	<i>Abutilon theophrasti</i>	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	<i>Portulaca oleracea</i>
		%	%	%	%	%	%
Non Trattato	-	30	21	3	2	1	1
Adengo	2	100	100	100	100	100	100
Standard	4	100	100	100	100	100	100

Per quanto riguarda i dati relativi all'analisi di immagine, la tabella 3 riporta l'analisi della varianza a due vie con i valori di LGC (Living Ground Cover) mediati sopra le due località. I valori sono espressi in termini di LGC intesa come cm<sup>2</sup> di area fogliare di sei piante di mais, costituita da pixel il cui colore sia nella scala del verde.

Tabella 3. Analisi di LGC allo stadio BBCH 14 e BBCH 15, dati mediati di Brescia e Cremona. Analisi di confronti multipli col test di Duncan, livello di significatività 5%. A lettere uguali corrispondono differenze non statisticamente significative secondo il test di Duncan (p≤0,05)

Tesi	BBCH 14		BBCH 15	
	LGC – cm <sup>2</sup> -		LGC – cm <sup>2</sup> -	
Non Trattato	719,0	ns	1552,5	ab
Adengo	740,1	ns	1758,0	b
Standard	608,7	ns	1436,5	a

ns = non significativo

Sui pixel processati dal software, trasformati in cm<sup>2</sup> di superficie fogliare verde, si è eseguita l'analisi della varianza ad una via che viene riportata di seguito in tabella 4.

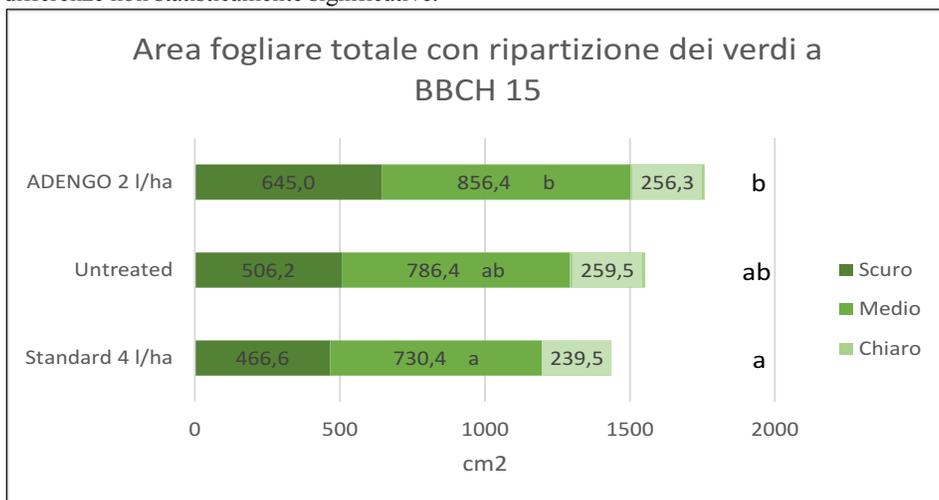
Tabella 4. Prodotti, località e cm<sup>2</sup> di LGC (Living Ground Cover) in 2 diversi momenti (stadio BBCH 14 e 15). Analisi di confronti multipli col test di Duncan, livello di significatività 5%. A lettere uguali corrispondono differenze non statisticamente significative secondo il test di Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Tesi	Località	BBCH 14 LGC – cm <sup>2</sup> -		BBCH 15 LGC – cm <sup>2</sup> -	
Non Trattato	Brescia	728,2	ns	1490,7	a
	Cremona	709,2	ns	1614,3	ab
Adengo 2 L/ha	Brescia	695,7	ns	1649,9	ab
	Cremona	784,5	ns	1866,1	b
Standard 4 L/ha	Brescia	585,2	ns	1444,7	a
	Cremona	632,3	ns	1428,3	a

ns = non significativo

L'area complessiva è stata poi ripartita in 3 classi di colore verde, denominate rispettivamente Verde Scuro, Verde Medio e Verde Chiaro, ed i dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza per prodotto, località e data e separatamente per prodotto sopra le località e per singola data. In figura 2, sono riportati i dati ottenuti mediando i dati delle due località allo stadio BBCH 15, ovvero all'ultimo rilievo eseguito.

Figura 2. Prodotti, area fogliare complessiva e ripartizione in classi di verde. Analisi di confronti multipli col test di Duncan, livello di significatività 5%. A lettere uguali corrispondono differenze non statisticamente significative.



Le diverse tonalità di verde hanno 3 descrittori principali: tonalità, saturazione e intensità. Per ognuna di queste caratteristiche, con il software WinCam (Regent Instruments - Canada), si possono impostare diversi livelli di tolleranza, che vanno da 0 a 100%. Vengono così definiti i colori da analizzare in tutte le immagini, divisi poi nelle tre classi principali di verdi: Scuro, Medio, Chiaro.

## DISCUSSIONE

La coltura del mais, durante la primavera 2017, in ambiente Padano e quindi anche in tutte e due le aree di prova, è stata soggetta ad un evento di gelo tardivo (15-16/04/17) che ha causato danni alla parte aerea ed un forte rallentamento dello sviluppo del mais. Questo evento, peraltro, non ha avuto influenza sulla validità della prova. I dati riportati in tabella 3 e tabella 4 con l'analisi di LGC allo stadio BBCH 14 e BBCH 15 mostrano come tra le due date, ovvero nel passaggio dalla 4<sup>a</sup> alla 5<sup>a</sup> foglia, vi sia stato, in tutte le località un consistente aumento dell'area fogliare, con un incremento da un valore medio di tutte le tesi e tutte le località di 689,2 cm<sup>2</sup> a 1.582,3 cm<sup>2</sup>. Nella prova di Cremona, il differenziale tra la tesi con minore area fogliare, riferita all'Erbicida Standard e quella con maggiore area fogliare relativa al prodotto Adengo - è passato, tra la prima e la seconda data, dal 24% al 30%. Nella prova di Brescia il differenziale di area fogliare tra le stesse due tesi, alle due ultime date è risultato essere rispettivamente del 18% e del 14%. La prova eseguita nella zona di Cremona quindi è risultata essere quella con la maggiore differenza tra le tesi trattate con erbicida, con valori doppi, all'ultima data, rispetto all'altra località. Questo risultato è probabilmente dovuto alla condizione più critica della prova di Cremona, che si è svolta su di un suolo a scheletro prevalente (figura 3).

Figura 3. Immagini rappresentative del suolo presente a Brescia (immagine a sinistra) e Cremona (immagine a destra)



Non vi è peraltro un effetto "località", poiché i valori medi di area fogliare sono alla prima data di 670 e 708 cm<sup>2</sup> e alla seconda data di 1528 e 1636 cm<sup>2</sup> rispettivamente nelle località di Brescia e di Cremona. Inoltre, alla prima data, sia per l'analisi a due vie che per singole tesi e nonostante il differenziale, non si è rilevata nessuna differenza significativa sia tra le tesi con erbicida e sia verso il Non Trattato. Alla seconda data, invece, e con un campo di variabilità di analoga ampiezza, le differenze sono risultate significative e anche nell'ambito di ogni singola località (dati non mostrati). In particolare, sempre nella seconda data, la tesi con l'erbicida contenente l'antidoto cyprosulfamide, ha fatto registrare, come media di entrambe le località, un'area fogliare, determinata mediante analisi di immagine, significativamente superiore alla tesi trattata con Erbicida standard, con valori rispettivamente di 1436,5 e 1758.0 cm<sup>2</sup>, pari ad una differenza del 18%. La tesi Non Trattato si è collocata, con 1552,5 cm<sup>2</sup>, tra quelle con i due erbicidi. Analizzando tutti i dati raccolti, le differenze sono risultate significative solo al rilievo a 5 foglie (BBCH 15) e, come già osservato, con un differenziale tra Erbicida Standard ed Adengo, del 30%, nella prova di Cremona, è del 14% nella prova di Brescia. Le tesi con Erbicida Standard hanno fatto riscontrare un'area fogliare minore, seguite dal Non Trattato.

Nel caso della prova di Cremona, dove si è osservata l'area fogliare mediamente superiore, il differenziale statisticamente significativo è probabilmente spiegabile con un certo effetto depressivo dovuto all'applicazione con Erbicida Standard; questo effetto è stato invece effettivamente mitigato dall'antidoto presente nella tesi Adengo. L'azione dell'antidoto ha determinato un incremento tendenziale di superficie fogliare anche rispetto alla tesi Non Trattato. Le tesi con l'antidoto, si collocano ai primi due posti in entrambe le località.

Passando a discutere i dati relativi alla ripartizione della superficie fogliare complessiva in toni del colore Verde è da evidenziare come questa sia avvenuta raggruppando in 3/3 il continuum di toni del verde rilevati dal software di analisi di immagine ed abbia portato a 3 gruppi che sono stati definiti come: scuro, medio e chiaro. L'uso dei toni del verde per determinare l'attività fotosintetica è già diffusamente utilizzato, ma l'impiego dell'indice di NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) potrebbe dare risultati più solidi, anche se probabilmente non diversi.

Si è perciò impiegata l'analisi di immagine, perché più accessibile anche tecnicamente e perché simula, in modo oggettivo, ripetibile e non distruttivo, la valutazione degli agricoltori in campo, durante l'osservazione delle colture e quindi si avvicina alle stime visuali eseguite anche dai tecnici.

Anche in questo caso l'analisi dei dati, riportati in figura 2 mostra come la tesi con l'antidoto, abbia, allo stadio BBCH 15, un'area fogliare nella classe "scuro" superiore alla tesi Erbicida Standard, con rispettivamente 645,0 e 466,6 cm<sup>2</sup> che derivano da una superiore area fogliare complessiva per una % superiore di pixel nella classe "scuro", corrispondenti al 35,8% contro il 31,8 %.

La differenza dei verdi *medi*, dove la tesi Adengo si dimostra statisticamente diversa dalla tesi Erbicida Standard presenta una maggiore significatività statistica.

Per quanto riguarda la tesi Adengo, le differenze sono inferiori per la classe di pixel *verde chiaro*, ad indicare un probabile spostamento del colore verso la classe "*medio-scuro*" e ciò indica, indirettamente, un aumento del contenuto in clorofilla.

Il differenziale è già presente anche allo stadio BBCH 14 ma, come per l'area fogliare, le differenze sono presenti e nello stesso ordine, ovvero con Adengo che ha una maggiore % di *pixel* nella classe "*scuro*" ma non significative.

Come riportato in alcuni lavori scientifici, le classi di verde costituiscono un indice in grado di descrivere, indirettamente, il contenuto di clorofilla (Salvatore, Karl Guillard et al., 2005). Le varie gradazioni di verde sono un buon indicatore dello stato di salute della pianta e anche per questo aspetto è stata riportata in diversi studi una buona affidabilità del rilievo visivo nella stima della concentrazione di clorofilla (John et al., 2003; e Ian e Miller et al., 2000).

## CONCLUSIONI

In questo lavoro eseguito nel 2017 in più località e con rilievi agli stessi stadi di sviluppo, dopo un primo test di messa a punto nell'anno precedente, si è cercato di avere, in pieno campo, la risposta ad un duplice esigenza: 1) disporre di una metodica di *phenotyping* mediante analisi di immagine, semplice e discretamente speditiva, che consenta, anche in pieno campo, di determinare in modo non distruttivo e quindi rilevando i dati sempre sulle stesse piante, l'andamento della biomassa, generando una "biomassa digitale", per valutare gli effetti che eventi diversi possono avere sull'area fogliare; 2) dimostrare che l'impiego di erbicidi contenenti antidoti abbia in effetti la capacità di ridurre i danni generati dall'applicazione delle sostanze attive erbicide.

Considerate anche le affinità delle risposte ottenute nei due anni, si può concludere che è possibile effettuare un'analisi di "Phenotyping" anche in pieno campo ed anche con tecnica di

analisi di immagine (DIA) in RGB 2D. L'esito di questo lavoro fornisce una conferma alle prime indicazioni ottenute nel 2016 (dati non mostrati) e indica come, effettivamente, l'aggiunta dell'antidoto cyprosulfamide alla formulazione di Adengo, sia in grado di ridurre la depressione fisiologica determinata dalle sostanze attive dell'erbicida stesso, quando applicato in post-emergenza precoce.

Rimane da verificare, con prove che arrivino fino al termine del ciclo della coltura e quindi con altre determinazioni biometriche, se questa riduzione del ritmo di sviluppo od addirittura di stimolazione della fisiologia, possa avere effetti anche sulla produzione finale.

#### LAVORI CITATI

- Chris Rosinger, Klaus Bartsch, and Wolfgang Schulte, 2012, Safeners for Herbicides. Modern Crop Protection Compounds, Volumes 1-3, Second Edition: 371-397.
- Chris Rosinger, 2014, Cyprosulfamide: A new benchmark for flexible safening. 13TH IUPAC INTERNATIONAL CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY, August 10-14, 2014 - San Francisco, California, USA. Abstract Agro 943: 241.
- Darren E. Robinson, Nader Soltani, Christy Shropshire and Peter H. Sikkema, 2013. Cyprosulfamide Safens Isoxaflutole in Sweet Corn (*Zea mays* L.). *HortScience*, vol. 48 no. 10 1262-1265.
- Ian R. Rodriguez, Grady L. Miller, 2000. Using a Chlorophyll Meter to Determine the Chlorophyll Concentration, Nitrogen Concentration, and Visual Quality of St. Augustinegrass. *HortScience*, 35(4):751-754.
- John J. Read, Eric L. Whaley, K. Raja Reddy, and Lee Tarpley, 2003. A Hand-Held Radiometer for Assessment of Nitrogen and Potassium Status in Cotton. In USDA-ARS, Crop Sciences Research Lab, Mississippi State, MS, SpectrumTechnologies, Inc., Lawrenceburg, TN, Dept. of Plant and Soil Sciences, Mississippi State University, MS, and Texas A e M Research and Extension Center, Beaumont, TX.
- Kolesnik, S.A. Stashkevich, A.V., 2010. Adengo as a new perspective herbicide in maize crops. National Academy of Sciences. Scientific and Practical Center for Arable Farming (Belarus). Institute of Plant Protection.
- Lanlan Sun, Renhai Wu, Wangcang Su, Zenggui Gao and Chuantao Lu, 2016. Herbicide Safeners Increase Waxy Maize Tolerance to Nicosulfuron and Affect Weed Control. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 6 (2016) 386-393.
- Salvatore S. Mangiafico, Karl Guillard, 2005. Turfgrass Reflectance Measurements, Chlorophyll, and Soil Nitrate Desorbed from Anion Exchange Membranes. *Crop Science*, 45:259-265.
- Tracchi G., Arcangeli G., Boebel A., Campani E., Cauzzi D., Gualco A., Cantoni A., 2010. thien carbazone-methyl (Adengo®), nuovo erbicida di pre e post emergenza del mais. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2010, 1, 339-346.