

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**ANÁLISE AUTOMÁTICA DE IMAGEM EM TECIDO VEGETAL DE  
CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL: MILHO (*ZEA MAYS*)**

**MARIA BEATRIZ FRAGA COSTA**

**VILA VELHA**  
**AGOSTO/2019**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**ANÁLISE AUTOMÁTICA DE IMAGEM EM TECIDO VEGETAL DE  
CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL: MILHO (*ZEA MAYS*)**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

**MARIA BEATRIZ FRAGA COSTA**

**VILA VELHA**  
**AGOSTO/2019**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C837a Costa, Maria Beatriz Fraga.  
Análise automática de imagem em tecido vegetal de cultivo orgânico e convencional: milho (*Zea mays*) / Maria Beatriz Fraga Costa. – 2019.

35 f. : il.

Orientador: Dominik Lenz.  
Dissertação (mestrado em Biotecnologia Vegetal)  
Universidade Vila Velha, 2019.  
Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Célula. 3. Morfologia.  
4. Planta. I. Lenz, Dominik. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 660.603

**MARIA BEATRIZ FRAGA COSTA**

**ANÁLISE AUTOMÁTICA DE IMAGEM EM TECIDO VEGETAL DE  
CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL: MILHO (*ZEA MAYS*)**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

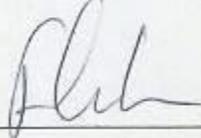
Aprovado (a) em 16 de agosto de 2019,

Banca Examinadora:



---

**Profa. Dra. Viviana Borges Corte (UFES)**



---

**Prof. Dr. Fabio Ribeiro Braga (UVV)**



---

**Prof. Dr. Dominik Lenz (UVV)**

**Orientador**

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e amigos, que sempre me apoiaram nos estudos e na realização desse sonho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me conceder forças e discernimento em toda minha caminhada.

Não existem palavras suficientes para descrever a gratidão que eu sinto pela família e amigos que tenho. Sou profundamente grata aos meus pais, Ivana e Abner pela educação que me deram. Sou grata aos meus tios Eliana e Carmindo, a querida afilhada Nicolle e a prima-irmã Giullia por serem meu segundo lar. Agradeço aos meus avós, Maria e João, pelo exemplo de como ser forte.

Um agradecimento em especial ao meu irmão Abner e a minha cunhada Thadilla, por me levarem e buscarem na fazenda tantas e tantas vezes e por todo suporte dado nessa fase tão corrida da minha vida. Agradeço a minha prima Paula por me “salvar com as tecnologias”, perdi as contas de quantas vezes te perturbei e você sempre esteve lá.

Agradeço as amigas Juliana e Vanessa que mesmo de longe nunca deixaram de me amparar e de dar bons conselhos. Às amigas “aqui de perto”, Tessy, Debora, Fernanda e Suher agradeço por todo carinho. E claro, as amigas de “muito perto” Bruna e Victória agradeço também pelo carinho e por serem ótimas ouvintes.

Muito obrigada a todos por me apoiarem, compreenderam minha ausência nas datas comemorativas, pelo carinho, dedicação e principalmente pela paciência comigo nesses dois anos.

Agradeço aos colegas de profissão que sempre me incentivaram e me deram forças nos momentos mais cansativos e estressantes do dia a dia. Aos colegas do mestrado, Geanderson, André, Geardson, Ieda, Fernando, Carol, Ana Carol e Renata agradeço por toda parceria, força e auxílio.

Aos amigos Nathania e George: terei uma gratidão eterna pelo que fizeram por mim; a sabedoria é o bem mais precioso que temos, e vocês dividiram comigo esse bem. Não há nada no mundo que pague o tempo que vocês dispuseram, dedicando a me ajudar.

Agradeço também as minhas alunas Duda e Vitória por participarem comigo na coleta das amostras (em pleno verão), sacrificando seus dias de férias em troca de experiência e aprendizado; vocês serão recompensadas.

Agradeço ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) de Domingos Martins-ES, por meio do responsável Jacimar Luiz de Souza, que forneceu insumos para presente pesquisa.

Ao querido professor Rivelino Rovetta pela preciosa ajuda com o planejamento estratégico do cultivo e por me abrir as portas da Eco Fazenda UVV fica o meu “muito obrigada”, não esquecendo do nosso grande auxiliar: Sr Valdeci e de todo o pessoal da fazenda.

Agradeço ao meu orientador Dominik Lenz pelos ensinamentos, pela oportunidade e pela confiança em mim depositada.

Agradeço a toda equipe do programa de Biotecnologia Vegetal da UVV e da UENF pela dedicação, compromisso e incentivo.

Cada um de vocês deixou um pedacinho de si nesse trabalho, contribuindo de alguma forma. Obrigada a todos!

“Só tenho para oferecer sangue, sofrimento, lágrimas e suor... Unamos as nossas forças e caminhemos juntos”

**Winston Churchill**

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>.....</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>.....</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>.....</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	14
2.2 MATERIAIS PARA CULTIVO.....	14
2.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	14
2.4 CULTIVO .....	15
2.5 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	15
2.6 PREPARO DAS IMAGENS.....	16
2.7 ANÁLISE DAS IMAGENS .....	17
2.8 APRENDIZADO DA MÁQUINA.....	19
2.9 ESTUDO ESTATÍSTICO .....	19
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 IMAGENS OBTIDAS .....	20
2.2 ANÁLISE AUTOMÁTICA COM O CP .....	21
2.3 CLASSIFICAÇÃO COM O CPA .....	22
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
<b>7 ANEXO .....</b>	<b>35</b>

## ABREVIATURAS E SIGLAS

t/ha – Tonelada por hectare

CP – *Cellprofiller*

CPA – *Cellprofiller Analyst*

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

ACBO - Area covered by objects

## RESUMO

COSTA, Maria Beatriz Fraga, Universidade Vila Velha – ES, agosto de 2019. **Análise automática de imagem em tecido vegetal de cultivo orgânico e convencional: milho (*Zea mays*)**. Dominik Lenz.

O milho (*Zea mays*) é uma das maiores fontes de alimentação atual movimentando bilhões de dólares/ano em indústrias alimentícias. A grande exigência de um manejo sanitário tem facilitado o surgimento e inserção de novas tecnologias. Entretanto, modelo agrícola atual vem gerando sérios problemas de degradação ambiental e sistemas de produção sustentáveis precisam se tornar o novo foco na agricultura. A introdução de novas tecnologias microscópicas permitiu um salto nos estudos celulares. A citometria de imagem é uma dessas novas técnicas utilizada para auxiliar análises laboratoriais e no controle de qualidade em exames histopatológicos e citológicos. Apesar do seu uso rotineiro na medicina, esse método é pouco aplicado quando se refere a pesquisas com vegetais. O objetivo do presente estudo foi identificar a possibilidade de análises morfológicas automáticas do vegetal *Zea mays* (milho) por meio de citometria de imagem, associada à aprendizagem da máquina e classificação celular. Esse estudo foi realizado a partir de plantios programados do milho sob três aplicações. A primeira aplicação com sementes e adubos de origem orgânica (EMCAPA-201) e baseada em sistema de produção orgânico em solo não impactado com fertilizantes químicos e/ou defensivos agrícolas, o segundo plantio com o mesmo tipo de semente, com tratamento não orgânico, cultivado sob sistema de produção convencional e o terceiro plantio se fez também com cultivo convencional. O órgão vegetal de escolha foi a folha e duas amostras de cada plantio foram coletadas, ao acaso, no tempo de trinta dias. Realizou-se a citometria de imagem para essa pesquisa através de dois *softwares* gratuitos de livre acesso, o *CellProfiler* e o *CellProfiler-Analyst*. Esses programas foram capazes de identificar e classificar objetos predeterminados em imagens microscópicas das amostras de tecido foliar vegetal, implementando um passo de sucesso no processamento automático de imagem e avaliação morfológica celular comparada em diferentes culturas utilizando metodologia reprodutível e de baixo custo.

**Palavras chaves:** célula, citometria de imagem, morfologia, planta

## **ABSTRACT**

COSTA, Maria Beatriz Fraga, Universidade Vila Velha – ES, agosto de 2019.  
**Automatic image analysis in plant tissue of organic and conventional cultivation: corn (Zea mays).** Dominik Lenz.

Corn (*Zea mays*) is one of the largest sources of food today moving billions of dollars a year in food industries. The high demand for sanitary management has facilitated the emergence and insertion of new technologies. However, the current agricultural model has been generating serious problems of environmental degradation and sustainable production systems must become the new focus in agriculture. The introduction of new microscopic technologies has allowed a leap in cellular studies. Image cytometry is one of these new techniques used to assist laboratory analysis and quality control in histopathological and cytological examinations. Despite its routine use in medicine, this method is not widely used when referring to plant research. The aim of the present study was to identify the possibility of automatic morphological analysis of the *Zea mays* (corn) vegetable by image cytometry, associated with machine learning and cell classification. This study was conducted from programmed maize plantations under three applications. The first application with seeds and fertilizers of organic origin (EMCAPA-201) and based on organic production system in soil not impacted with chemical fertilizers and / or pesticides, the second planting with the same type of seed, under non-organic treatment, cultivated under conventional production system and the third planting was also under conventional cultivation. The plant organ of choice was the leaf and two samples from each planting were randomly collected within thirty days. Image cytometry was performed for this research using two free open-source software, CellProfiler and CellProfiler-Analyst. These programs were able to identify and classify predetermined objects in microscopic images of plant leaf tissue samples, implementing a successful step in automatic image processing and comparative cell morphological evaluation in different cultures using reproducible and low cost methodology.

**Keywords:** cell, image cytometry, morphology, plant

# 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma das maiores fontes de alimentação atual sendo cultivado em todo o mundo. Movimenta um mercado de aproximadamente quarenta bilhões de dólares anualmente nas indústrias de alimentos. Segundo a USDA, o Brasil produz mais de 90 milhões de toneladas de milho por ano (Carneiro *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2015).

Trata-se de um vegetal pertencente à família *Gramineae/Poaceae* de caráter monóico. Sua morfologia característica resulta da supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas. É uma das mais eficientes plantas armazenadoras de energia existentes na natureza (Aldrich *et al.*, 1982).

A grande exigência de um manejo sanitário de qualidade dentro o mercado de nutrição torna altamente relevante que um controle de pragas no cultivo do milho seja implantado em todo o sistema produtivo visando a garantia de maior valor agregado. Esse fato tem facilitado o surgimento e inserção de novas tecnologias (Colli, 2011), pois para muitas espécies vegetais, o desenvolvimento de programas de melhoramentos específicos se justifica para obtenção de variedades adaptadas ao sistema de manejo (Oliveira *et al.*, 2011).

O modelo agrícola atual vem gerando sérios problemas de degradação ambiental e por esse motivo, sistemas de produção sustentáveis precisam se tornar o novo foco para produtividade e qualidade na agricultura (Souza, 2015). Entretanto, o comportamento das espécies utilizadas em produção orgânica necessita de mais estudos científicos, para que se possa viabilizar melhor a técnica aumentando o rendimento e a qualidade dos produtos, adequando os mesmos às exigências de mercado e tornando fonte de referência para produtores e técnicos (Souza, 2005).

Alguns objetivos dos programas de melhoramento vegetal são compartilhados entre os sistemas de produção orgânica e convencional, como por exemplo, a produtividade e resistência a doenças, no entanto, outras prioridades podem ser diferentes dependendo do sistema a ser adotado (Lammerts van Bueren *et al.*, 2001).

A introdução de novas tecnologias aperfeiçoando as técnicas microscópicas

permitiu um salto desde as pequenas observações de cavidades na célula vegetal até a identificação de toda a arquitetura molecular da célula (De Roberts, 2014). A citometria é uma dessas novas técnicas microscópicas que permitiu a identificação e caracterização de micropartículas dos seres vivos (Bertho, 2015). Ela se refere a biologia quantitativa celular (Tarnok, 2012) tratando de calcular medidas espaciais e densitométricas de células individuais e tecidos (Greilhuber, 2008).

A citometria de imagem é utilizada para contar, analisar e classificar partículas microscópicas estáticas (Tarnok, 2012; Bertho, 2015) e tem sido usada com sucesso em países desenvolvidos como técnica auxiliar para análises laboratoriais e no controle de qualidade em exames histopatológicos e citológicos (Bocking *et al.*, 1994). Isso ocorre devido a maiores possibilidades de *softwares* para análises das imagens de tecidos, se destacando dentro da pesquisa médica e científica (Tozetti *et al.*, 2014). Ela permite a contagem de itens subcelulares (Tarnok, 2012) e pode ser utilizada em um pequeno número de células, possibilitando medidas seletivas, identificação de possíveis eventos e o controle de qualidade para imagens histológicas (Bocking, 1995; Carey, 1994).

Apesar do uso rotineiro da citometria de imagem na medicina, esse método é pouco aplicado quando se refere a pesquisas com vegetais (Vilhar, 2001). Segundo Greilhuber (2008) os métodos de citometria de imagem (densitometria) podem proporcionar aos estudos em plantas um incremento de dados nas análises citológicas. Isso se deve pela alta precisão de seus dados, demonstrando enorme relevância na contribuição em pesquisas nas mais diversas áreas (Bertho, 2015).

Sendo assim, objetivo do presente estudo foi identificar a possibilidade de análises morfológicas automáticas do vegetal *Zea mays* (milho) por meio de citometria de imagem, associada à aprendizagem da máquina e classificação celular. Propor métodos de baixo custo com microscopia leve e programas gratuitos de livre acesso, para a realização de diagnósticos de morfologia celular, baseado em imagens, em tecido foliar vegetal de diferentes origens e culturas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido na Eco Fazenda Experimental da Universidade Vila Velha (UVV) no município de Guarapari, ES, no ano agrícola 2018/2019. O local situa-se na latitude de 20°35'30"S e longitude de 40°27'26"W.

A topografia da região é considerada plana e o clima é classificado como Aw (clima tropical com estação seca de inverno) de acordo com Köppen e Geiger. No inverno existe muito menos pluviosidade que no verão sendo a pluviosidade média anual de 1084 mm<sup>3</sup> e a temperatura média anual de 24.4 °C, variando 5.3°C.

As análises físico-químicas de macronutrientes do solo foram feitas pelo Laboratório Agrolab Análises e Controle de Qualidade Ltda (ANEXO). Os plantios foram realizados no Campo Agrostológico da fazenda e o processamento das amostras, no Laboratório Experimental de Parasitologia.

### 2.2 MATERIAIS PARA CULTIVO

As sementes orgânicas utilizadas para o plantio do vegetal foram fornecidas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) de Domingos Martins-ES. A cultivar do milho utilizado foi o EMCAPA-201, de múltipla aptidão com 18 cultivos entre os anos de 1992 a 2009 (Souza, 2015). O milho de origem não orgânica foi aquele que se utiliza em alimentação animal adquirido em comercio local.

### 2.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O delineamento experimental do estudo foi realizado a partir de plantios programados do milho sob três aplicações variadas. A primeira aplicação, denominada "Orgânico" foi realizada com sementes e adubos de origem orgânica (EMCAPA-201) e baseada em um sistema de produção orgânico segundo Souza (2015) em solo não impactado com fertilizantes químicos e/ou defensivos agrícolas.

O segundo plantio, denominado "Não orgânico-1" foi realizado com o mesmo tipo de semente de origem orgânica (EMCAPA-201), sob tratamento não orgânico, cultivado sob sistema de produção convencional, ou seja, em solo impactado com

fertilizantes químicos e defensivos agrícolas. O terceiro plantio se fez também sob cultivo convencional, porém, com sementes de origem não orgânica, denominado “Não orgânico-2”.

Duas amostras de cada plantio foram coletadas, ao acaso. O tempo considerado para a coleta e análise nesse estudo foi de 30 (trinta) dias.

Todos os dados foram organizados conforme Tabela 1:

Tipo de Cultivo	Nome da amostra	Tempo 1: 30 dias
Orgânico	A1	A1.1
	A2	A2.1
Não orgânico-1	B1	B1.1
	B2	B2.1
Não orgânico-2	C1	C1.1
	C2	C2.1

Tabela 1: Organização das análises conforme cultivo, amostra e tempo de coleta.

## 2.4 CULTIVO

No local onde se instalou o experimento foi realizado o sistema de plantio direto, em área onde havia anteriormente cultura de pastagem.

A metodologia para execução dos plantios e obtenção das amostras foi baseado em Souza (2015) para todos os cultivos, da seguinte forma: Plantio em sulcos. Semeadura de 2 sementes a cada 20 cm, desbastando-se para 1 planta após emergência, estabelecendo densidade de 5 sementes por metro linear. Adubação a lanço, na base de 10 t/ha<sup>-1</sup>, em toda área, antes do sulcamento. Sem controle fitossanitário.

O plantio de todas as amostras foi realizado de forma idêntica do modo a buscar um padrão no desenvolvimento do vegetal, oferecendo as mesmas condições hídricas, temperatura e luminosidade.

## 2.5 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

O cultivo transcorreu por 30 trintas até que se coletaram as primeiras amostras, escolhendo a planta e o ramo foliar aleatoriamente para a análise morfológica celular do tecido vegetal coletado (Figura 1).

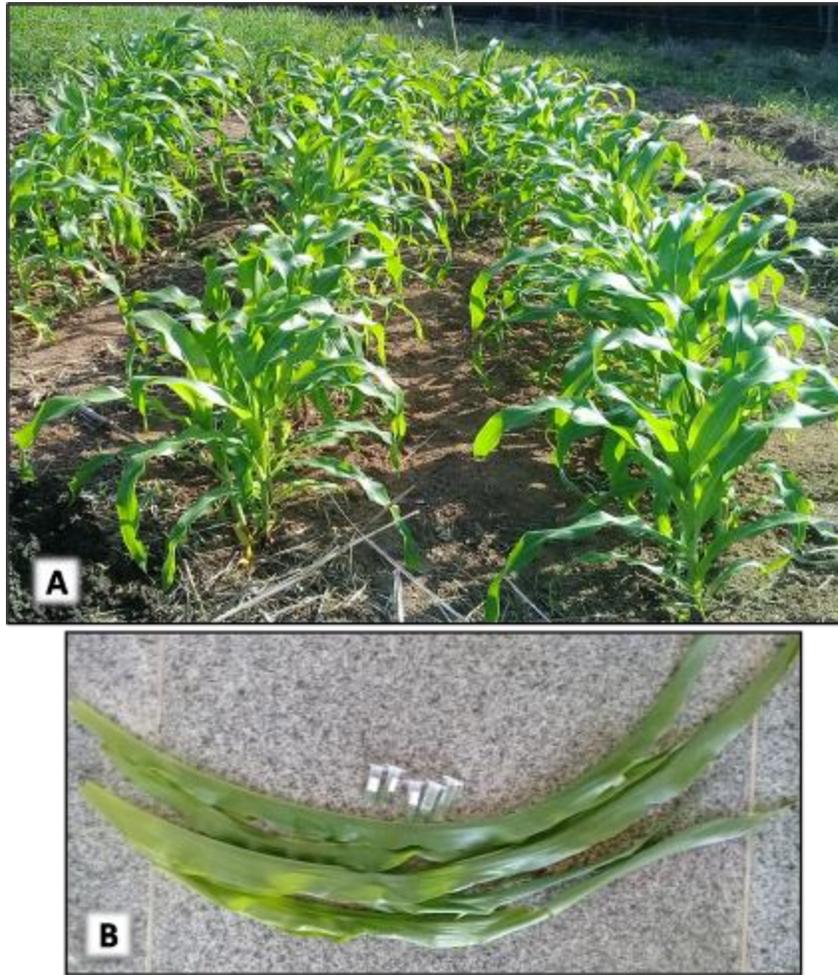


Figura 1: Cultivo do milho orgânico e coleta das amostras. A) Cultivo do milho orgânico aos 30 (trinta) dias. B) Amostras de folhas coletadas.

Optou-se pela montagem de lâminas temporárias a fresco utilizando água destilada como meio e cobrindo as mesmas com lamínulas. O material selecionado foi seccionado à mão livre com lâmina cortante, corte do tipo para dérmico da superfície adaxial da folha, escolhendo os cortes mais finos e transparentes. Após este procedimento, o material preparado foi levado para observação direta em microscópio óptico binocular, sem a necessidade de coloração prévia.

## 2.6 PREPARO DAS IMAGENS

Para a digitalização das imagens foi utilizado um microscópio óptico (Leica Galen III) e uma câmera digital conectada, com a qual foram realizadas fotografias dos cortes. As lâminas histológicas do tecido vegetal foram fotografadas com o aumento de 10x por meio de fotografia digital onde, para cada amostra, escolheu-se a imagem mais nítida e com menor sobreposição celular.

As imagens foram processadas de forma padronizada com o tamanho 240 x 300 pixels, no campo onde houvesse menos sobreposição celular (Figura 2) e ajustou-se com menos brilho (-30) por meio do programa ImageJ. Posteriormente foram armazenadas sem perda de qualidade e salvas em formato de arquivo \*.tif.

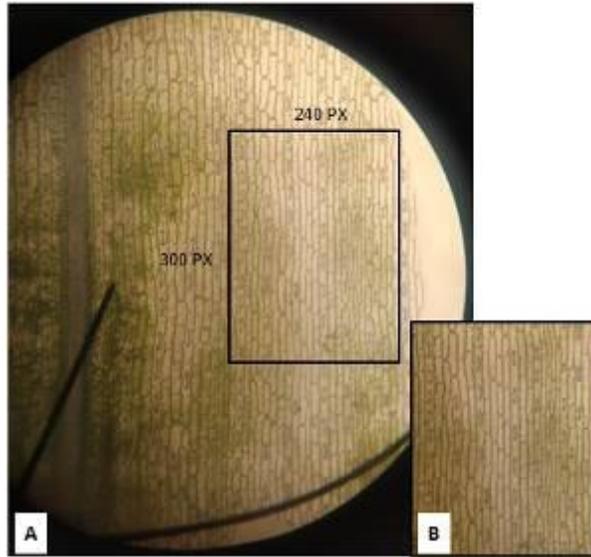


Figura 2: Corte paradérmico da folha do vegetal *Zea mays* em lâmina histológica. A) Imagem digitalizada no microscópio óptico com aumento de 10x. B) Posterior corte no campo com menor sobreposição celular no tamanho 240 x 300 pixels.

## 2.7 ANÁLISE DAS IMAGENS

As imagens obtidas foram analisadas através dos *softwares* gratuitos *CellProfiler* (versão 3.1.5) (<https://cellprofiler.org/>) e *CellProfiler-Analyst* (versão 2.2.1) (<https://cellprofiler.org/cp-analyst/>). A avaliação dos parâmetros anatômicos do vegetal (morfologia celular) foi feita por meio do *CellProfiler* (CP), programa de análise automatizada de imagens de microscopia óptica, e a partir deste, foram classificadas pelo *CellProfiler-Analyst* (CPA), ambos processos associados a aprendizagem da máquina.

O *software* CP possui um conjunto de módulos configuráveis para análise de imagem, que são executados consecutivamente em um *pipeline* (Figura 3). O *pipeline* de cada análise pode ser armazenado e usado para projetos continuados ou futuros.

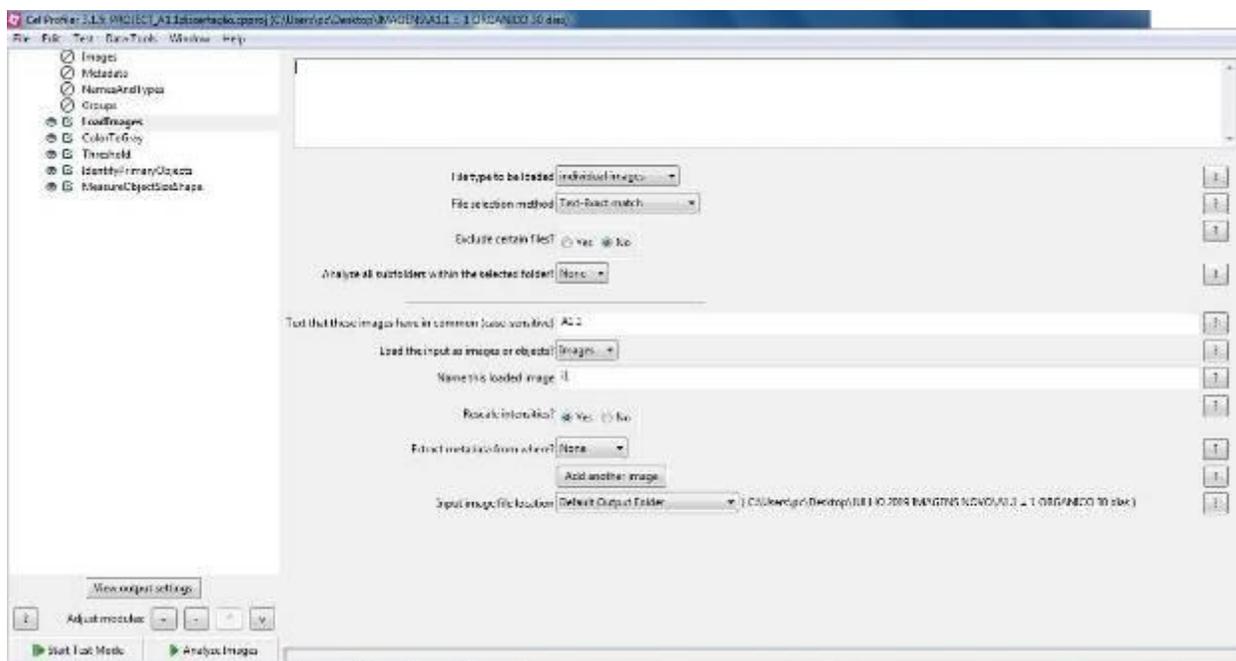


Figura 3: Interface de usuário para o *CellProfiler* 3.1.5

No *software* CP foi preparado um algoritmo para que se realizasse análise das imagens e o pipeline utilizado neste estudo empregou 5 (cinco) módulos, descritos na Tabela 2.

1) LoadImages			
Individual images		i1	
2) ColorToGray			
i1		i2	
Conversion method: Split	Image type: RGB	Convert blue	
3) Threshold			
i2		i3	
Adaptative	Two classes	0.0-1.0	
Size of adaptative window: 50			
4) IdentifyPrimaryObjects			
i3	cella	10-40 pixels	automatic
5) MeasureObjectSizeShape			
cella			

Tabela 2: Algoritmo *CellProfiler* para processamento das imagens. 1) carregar imagens; 2) inversão da coloração da imagem para tons de cinza; 3) produção de imagem em preto e branco com base em um limite pré-selecionado; 4) identificação do primeiro objeto – célula; 5) mensuração de tamanho e forma do objeto - célula/parede celular.

Após a realização das análises no *software* CP, de acordo com a programação especificada, todos os dados obtidos ficam salvos. Em seguida, os dados são convertidos para o formato “SQLite” e exportados através de um banco de dados para um outro *software*, o CPA, que seleciona o objeto a ser exportado. Nesse caso, exportaram-se dados do objeto “cella” (célula), onde a marcação para classificação foi feita identificando a mesma, excluindo-se os objetos considerados artefatos (não célula).

## 2.8 APRENDIZADO DA MÁQUINA

O *software* CPA separa classes de objetos com um classificador podendo agrupar objetos diferentes de uma mesma imagem ou identificar e classificar objetos em imagens diferentes. A classificação agrupou os objetos para cada imagem que possuísem características semelhantes para que as informações obtidas fossem usadas no aprendizado de máquina envolvendo um procedimento de treinamento de *software* para reconhecer os padrões. Em seguida, calculou-se a sensibilidade e especificidade das imagens.

O CPA possui ferramentas chamadas “Score All” e “Score Image” que permitem análises quantitativas e qualitativas, respectivamente, dos objetos de imagem.

Através do “Score All”, quantificou-se o número total de objetos em cada imagem, comparando-as entre si. A ferramenta “Score Image” foi usada para visualizar a classificação. Ela permite que o analista veja os objetos identificados em toda a extensão da imagem de acordo com os dados apresentados por cada aplicação diretamente conectados à informação fornecida ao *software* pelo mesmo.

## 2.9 ESTUDO ESTATÍSTICO

A análise estatística foi proporcionada pelo programa CPA com o algoritmo “Classificador de Floresta Aleatório” (Random Forest Classifier) por meio de um modelo paramétrico. O analista pode determinar a quantidade de parâmetros a serem randomizados pelo programa CPA a partir dos dados calculados e fornecidos pelo CP. Para este estudo optou-se por randomizar 20 itens (`display*topfeatures`).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 IMAGENS OBTIDAS

Por meio do corte paradérmico da folha do vegetal foi possível observar ao microscópio óptico a presença da epiderme que é a primeira camada de células junto à presença de estômatos (Figura 4). Foi a partir desse tipo de imagem, destacando-se somente a camada celular e excluindo os estômatos, que se realizou a análise automatizada do tecido foliar vegetal (*Zea mays* - milho) para identificação morfológica celular, por meio de citometria de imagem, associada à aprendizagem da máquina.

Sendo assim, a utilização de lâminas histológicas temporárias, sem uso de produtos químicos ou reagentes mostrou-se viável para observação do tecido vegetal e obtenção das imagens corroborando com a intenção de se fazer uma pesquisa de valor acessível.

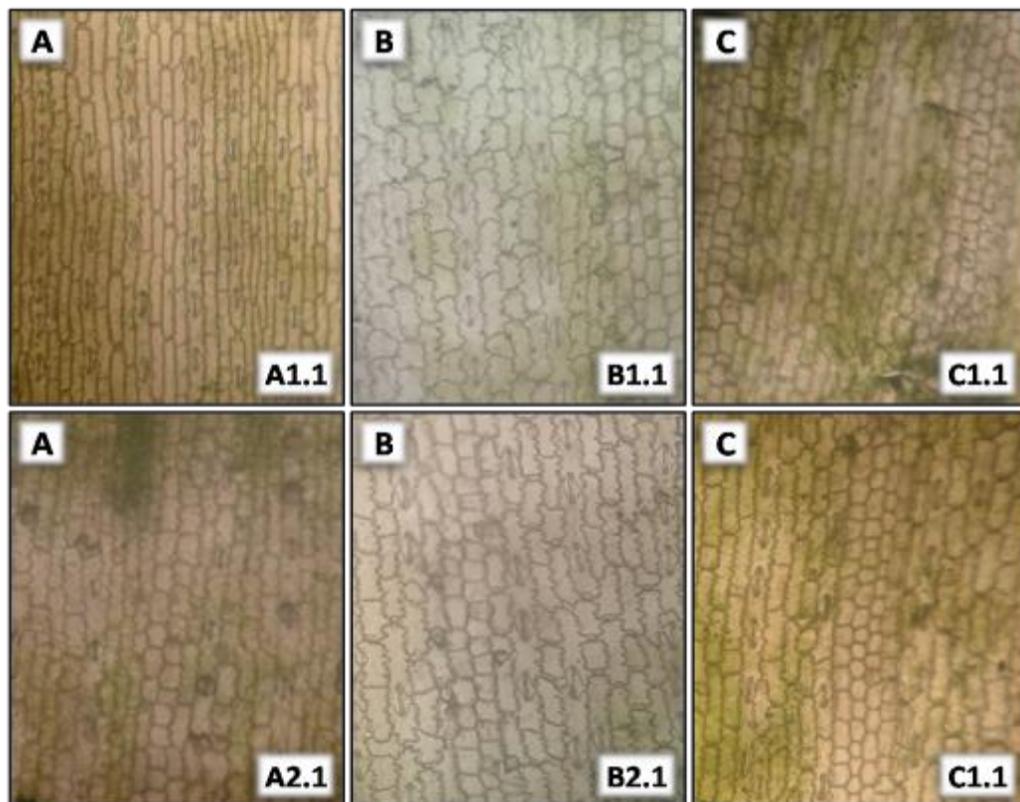


Figura 4: Imagens obtidas das amostras após o corte com o programa ImageJ. A) Amostras orgânicas; B) Amostras não orgânicas-1; C) Amostras não orgânicas-2.

#### 3.2 ANÁLISE AUTOMÁTICA COM O CP

O CP foi usado para criar o pipeline e processar as imagens. O programa foi capaz de analisar as imagens microscópicas das amostras deste estudo, implementando um passo de sucesso no processamento automático de imagem em tecido vegetal (Figura 5).

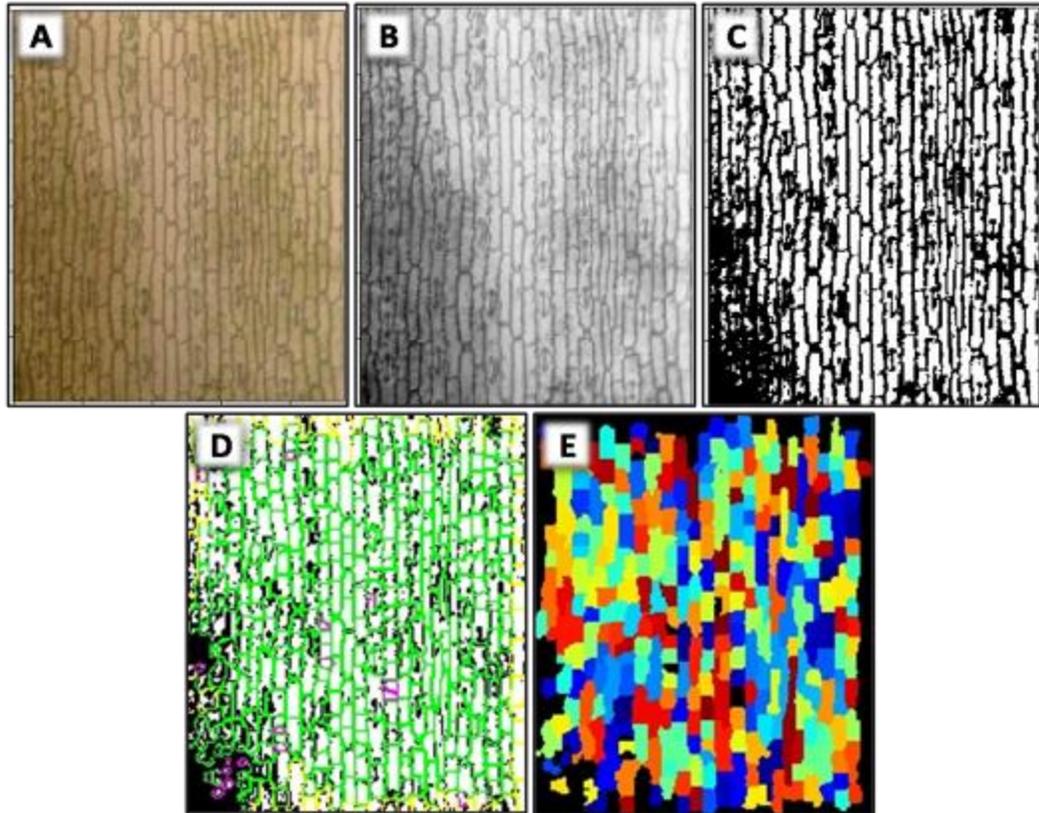


Figura 5: Identificação de objetos na imagem A1.1 usando o pipeline do CP. A) Imagem original carregada no programa; B) Inversão da coloração da imagem para tons de cinza =  $i_2$ ; C) Produção da imagem em preto e branco com limite pré-selecionado (threshold) =  $i_3$ ; D) Identificação do objeto célula: “cella”; os objetos identificados de acordo com o tamanho e a forma máximos e mínimos são mostrados em verde; objetos que não estavam dentro dos parâmetros estabelecidos são mostrados em rosa; E) Objetos identificados a partir da imagem D. Nesta etapa o CP realiza mensuração de tamanho, forma, contagem de objetos aceitos e exclusão de objetos sem informações compatíveis.

Os objetos identificados nesse estudo, denominados “cella” (célula), foram identificados em todas as imagens e, para cada amostra, calculou-se parâmetros como, número total de objetos aceitos, área da imagem convertida em objeto entre outros. Os parâmetros calculados estão representados na Tabela 3:

IdentifyPrim Obj	A1.1		A2.1		B1.1		B2.1		C1.1		C2.1	
Accepted objects	302		230		203		198		252		226	
10th pctile diameter	11,6		13		14,0		12,8		12,9		13,1	
Median diameter	14,8		16,8		18,3		18,0		16,3		16,4	
90th pctile diameter	19,4		22,8		24,2		25,8		21,9		23,1	
ACBO (%)	80,0		77,6		81,8		80,4		82,4		79,2	
Feature	Mean	Median										
Eccentricity	0,80	0,85	0,71	0,74	0,71	0,74	0,72	0,73	0,68	0,70	0,68	0,70
Major Axis Length	23,26	20,34	22,41	20,51	24,51	23,18	24,76	22,12	21,53	19,88	22,68	20,83
Minor Axis Length	11,34	11,04	14,34	13,87	15,86	15,68	15,56	15,66	14,47	14,02	14,74	14,26
Orientation	-1,36	-14,44	-9,82	-15,97	-2,53	-17,27	29,37	50,53	-24,87	-57,00	-13,65	-37,52
Compactness	1,44	1,28	1,20	1,14	1,20	1,16	1,22	1,17	1,18	1,13	1,21	1,12
Area	191,03	171,00	242,80	220,50	290,28	262,00	292,38	254,50	235,32	208,50	252,18	211,50
Center_X	122,21	122,00	119,96	116	128,87	138,00	128,75	130,50	112,62	116,00	116,85	117,50
Center_Y	146,65	143,50	146,89	147,00	152,00	155,00	147,98	139,00	148,23	145,00	149,46	152,50
Center_Z	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Extent	0,75	0,76	0,69	0,70	0,66	0,67	0,66	0,66	0,69	0,70	0,66	0,67
Perimeter	64,22	57,69	68,69	64,66	77,48	73,28	79,32	71,62	66,89	63,12	69,42	64,40
Solidity	0,88	0,89	0,87	0,88	0,86	0,86	0,85	0,86	0,87	0,89	0,87	0,88
FormFactor	0,61	0,63	0,64	0,65	0,61	0,60	0,59	0,59	0,65	0,66	0,65	0,66
EulerNumber	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MaximumRadius	5,26	5,00	6,48	6,3	6,99	7,00	6,79	7,04	6,47	6,32	6,62	6,32
MeanRadius	2,34	2,35	2,72	2,68	2,88	2,87	2,81	2,82	2,71	2,67	2,75	2,69
MedianRadius	2,07	2,00	2,42	2,24	2,57	2,83	2,51	2,24	2,43	2,24	2,45	2,24
MinFeretDiameter	10,60	10,00	14,08	13,53	16,00	15,65	15,59	15,53	14,11	13,36	14,60	13,91
MaxFeretDiameter	22,52	19,79	22,65	21,10	24,92	23,60	25,08	22,67	21,83	20,62	22,95	20,84
Zernike_0_0	0,52	0,54	0,60	0,60	0,59	0,60	0,58	0,59	0,62	0,63	0,61	0,63

Tabela 3: Mensuração de parâmetros dentre os objetos aceitos realizada pelo CP.

### 3.3 CLASSIFICAÇÃO COM O CPA

Depois de identificar e analisar o objeto de interesse no CP, os dados foram exportados para o CPA, no formato “SQLite”, como arquivo único com as imagens selecionadas aos pares, para cada classificação e posterior comparação entre elas. A comparação se fez entre as duas amostras orgânicas (A1.1 e A2.1), entre uma amostra orgânica (A1.1) e as duas outras convencionais (B1.1 e C1.1) e por último entre as duas amostras convencionais.

A classificação foi realizada da seguinte forma: através da especificação do programador, 200 objetos foram selecionados pelo programa. Em seguida criou-se duas classes “Image1\_\*” e “Image2\_\*”, onde para cada imagem, 50 objetos “cella” foram identificados, separados e colocados em sua determinada classe de acordo com a imagem de origem (Figura 6).

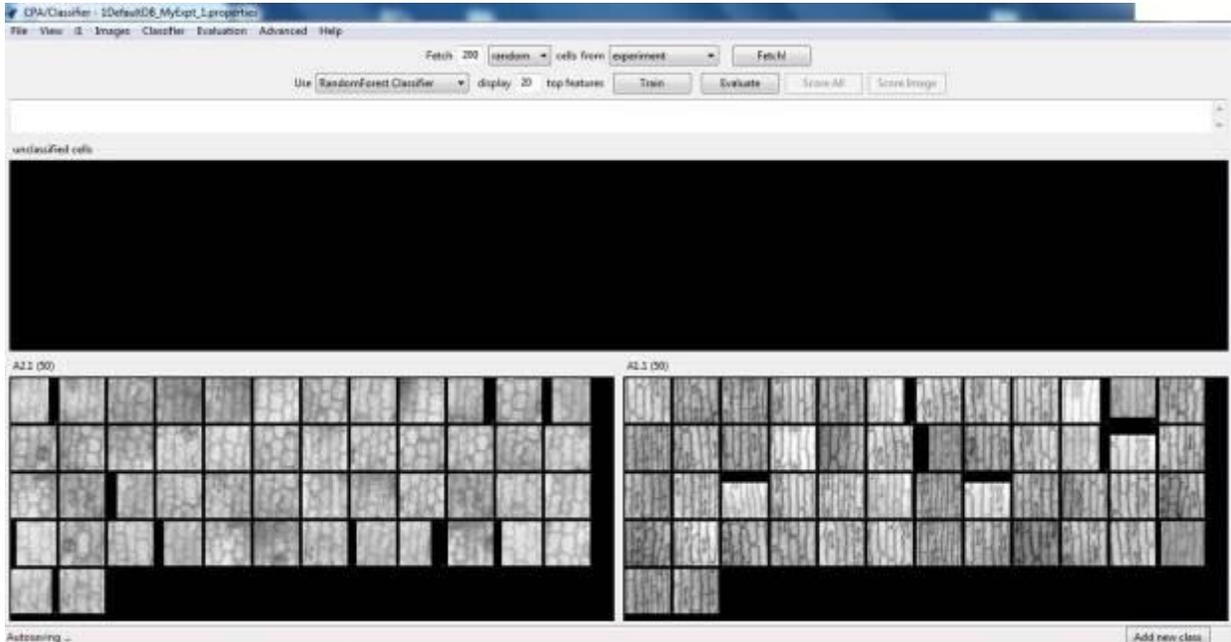


Figura 6: Interface de usuário para classificação no CPA

As informações obtidas envolveram um procedimento de treinamento de *software* para reconhecer os padrões. Este processo agrupou os objetos de cada amostra com características semelhantes e excluiu os objetos de configurações não compatíveis (artefatos). A aprendizagem da máquina se realizou então formando uma família de algoritmos e a programação converteu dados paramétricos randomizados em análise estatística

Após o aprendizado da máquina e posterior classificação, a sensibilidade, especificidade e o desvio padrão foram calculados para cada análise comparativa entre as imagens. A ferramenta "Score All" foi utilizada para obter o número de objetos classificados em cada imagem de acordo com a comparação entre as classes, isto é, o resultado quantitativo. Em seguida, a ferramenta "Score Image" foi usada para identificar e corrigir erros de classificação celular. Este processo envolveu uma comparação qualitativa entre a imagem original e a imagem classificada com base nas informações fornecidas ao programa.

Os dados de cada análise comparativa são demonstrados nas Figuras 7, 8, 9 e 10:

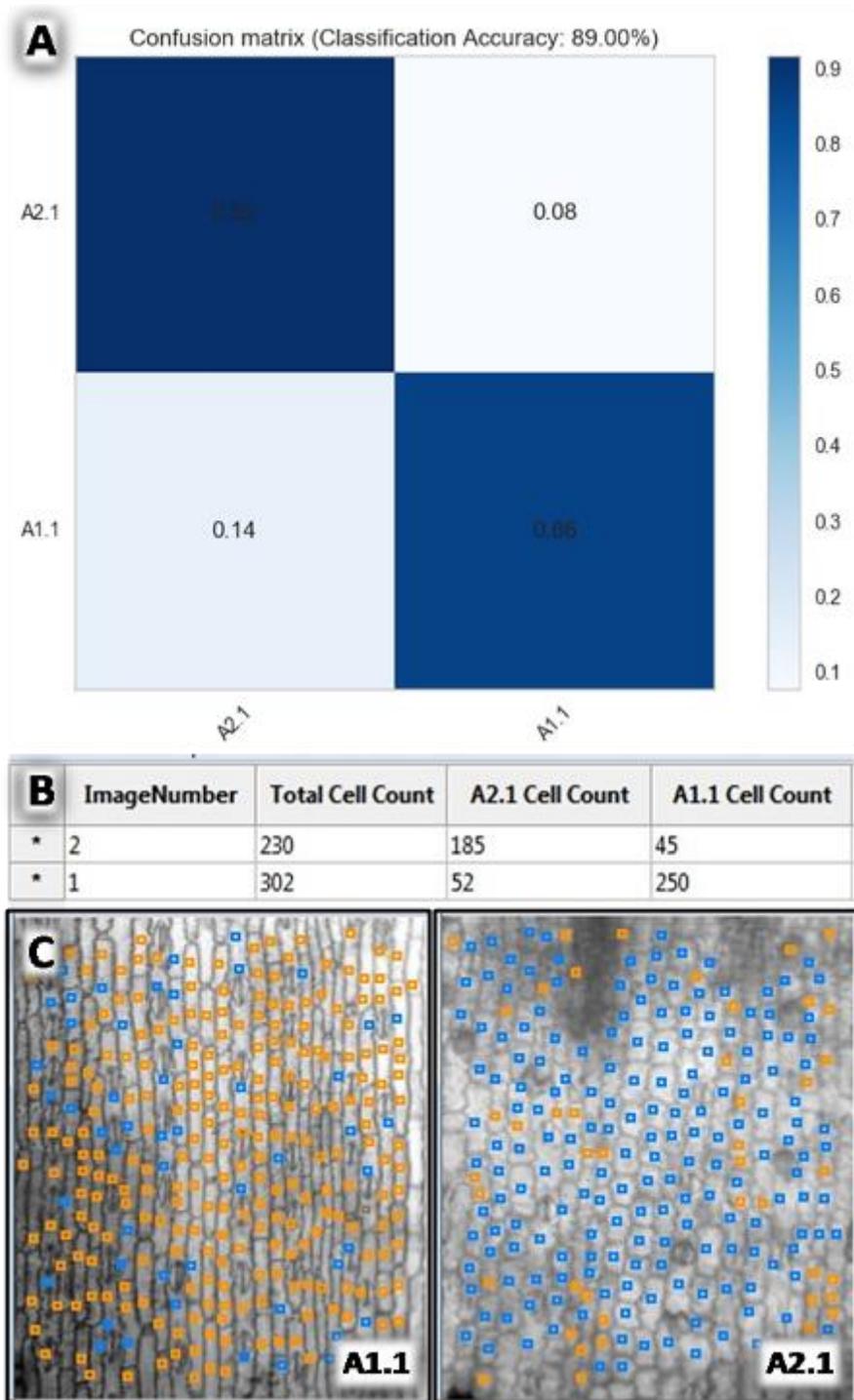


Figura 7: Comparação entre as imagens A1.1 e A2.1; A) Precisão em 89%; Especificidade de 0,92 e sensibilidade de 0,86; Desvio padrão de 0,08 e 0,14 respectivamente. B) Dados de “Score All”. Na amostra A1.1 (ImageNumber\_1), 52 de 302 objetos classificados (equivalente a 17,2%) demonstraram semelhança com a amostra A2.1; Na amostra A2.1 (ImageNumber\_2), 45 de 230 objetos classificados (equivalente a 19,6%) demonstraram semelhança com a amostra A1.1. C) Dados de “Score Image”. Cor laranja: A1.1 / Cor azul: A2.1.

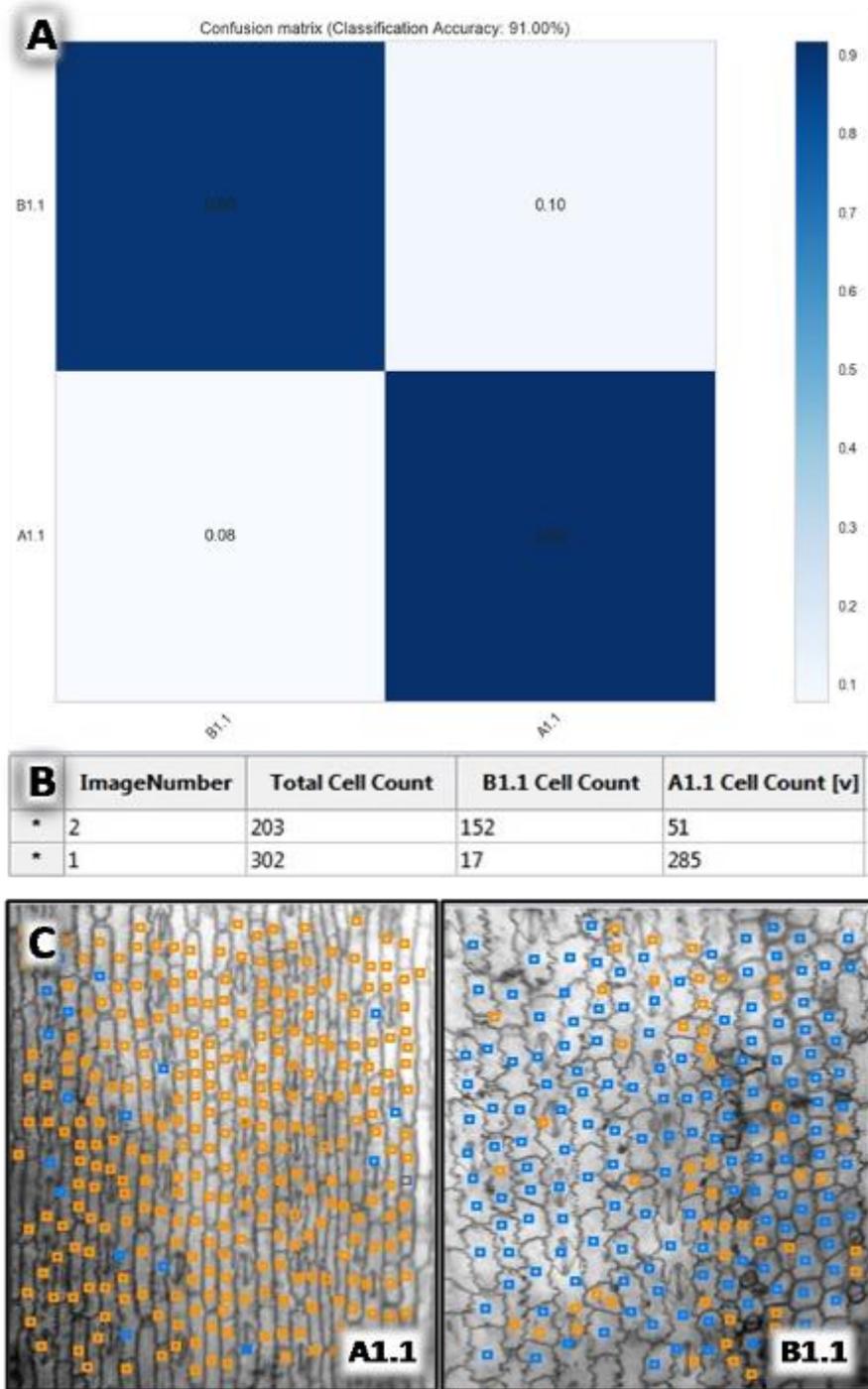


Figura 8: Comparação entre as imagens A1.1 e B1.1; A) Precisão em 91%; Especificidade de 0,90 e sensibilidade de 0,92; Desvio padrão de 0,10 e 0,08 respectivamente. B) Dados de “Score All”. Na amostra A1.1 (ImageNumber\_1), 17 de 302 objetos classificados (equivalente a 5,6%) demonstraram semelhança com a amostra B1.1; Na amostra B1.1 (ImageNumber\_2), 51 de 230 objetos classificados (equivalente a 25,1%) demonstraram semelhança com a amostra A1.1. C) Dados de “Score Image”. Cor laranja: A1.1 / Cor azul: B1.1.

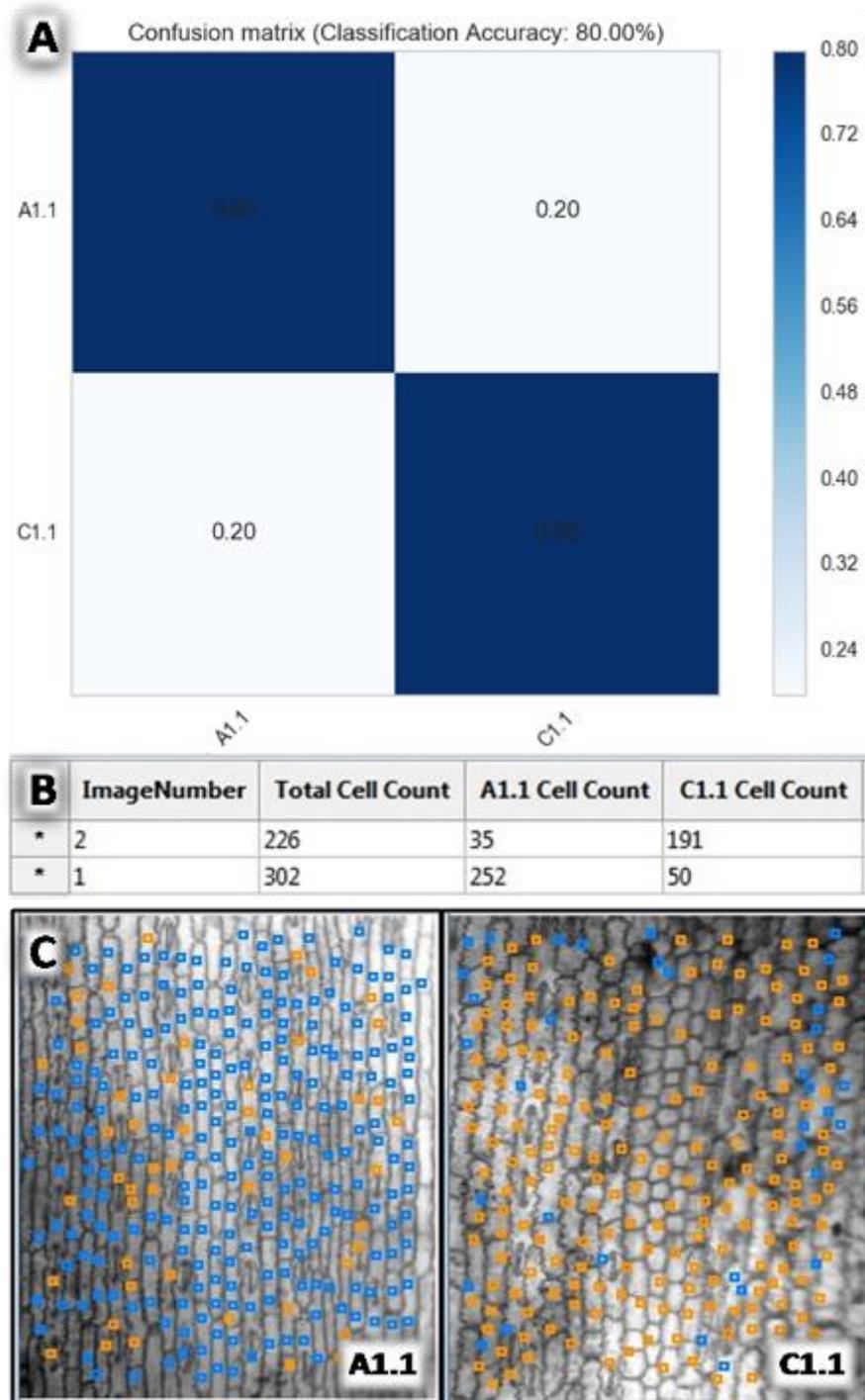


Figura 9: Comparação entre as imagens A1.1 e C1.1; A) Precisão em 80%; Especificidade de 0,80 e sensibilidade de 0,80; Desvio padrão de 0,20. B) Dados de “Score All”. Na amostra A1.1 (ImageNumber\_1), 50 de 302 objetos classificados (equivalente a 16,5%) demonstraram semelhança com a amostra C1.1; Na amostra C1.1 (ImageNumber\_2), 35 de 226 objetos classificados (equivalente a 15,5%) demonstraram semelhança com a amostra A1.1. C) Dados de “Score Image”. Cor azul: A1.1 / Cor laranja: C1.1.

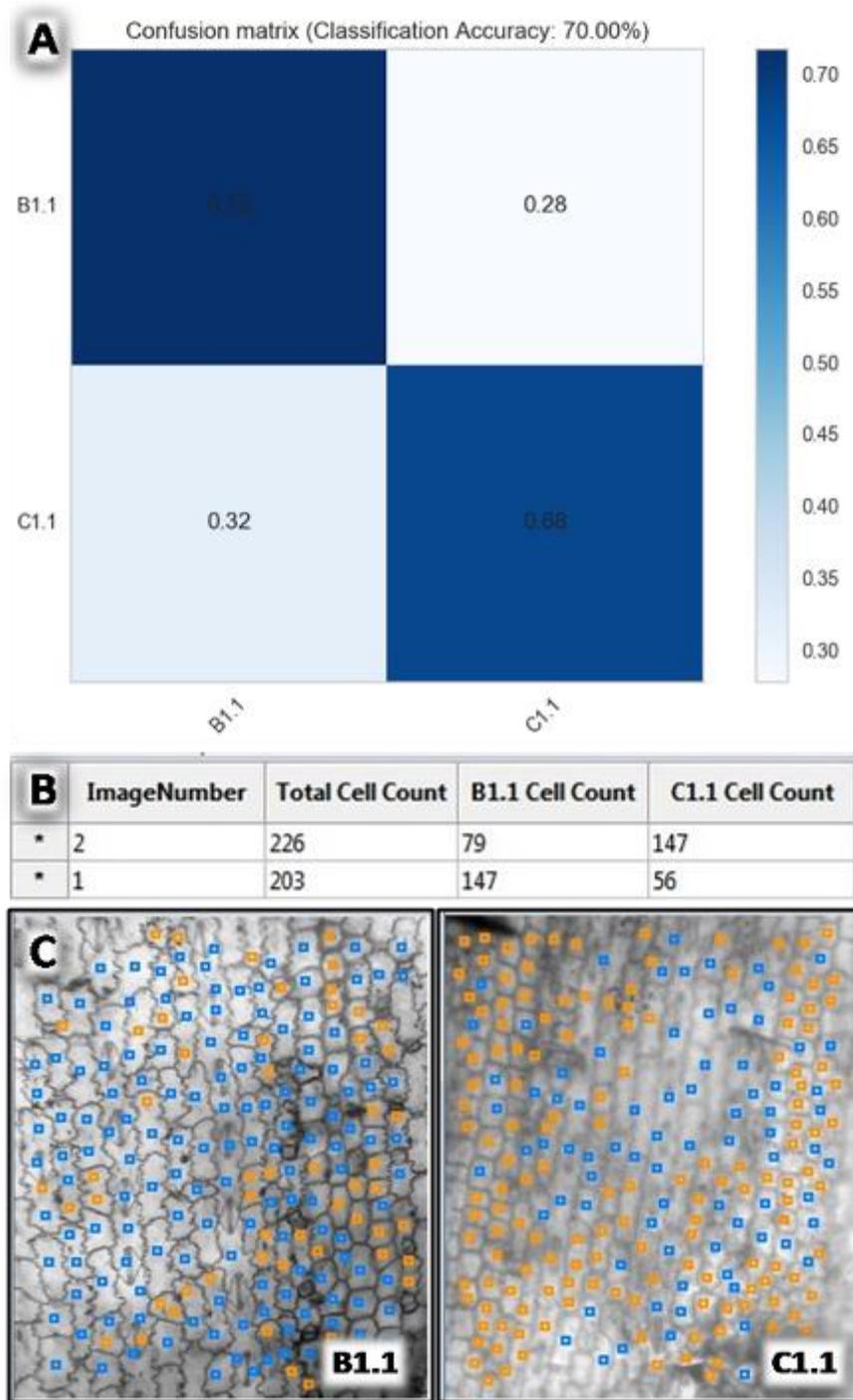


Figura 10: Comparação entre as imagens B1.1 e C1.1; A) Precisão em 70%; Especificidade de 0,72 e sensibilidade de 0,68; Desvio padrão de 0,28 e 0,32 respectivamente. B) Dados de “Score All”. Na amostra B1.1 (ImageNumber\_1), 56 de 203 objetos classificados (equivalente a 27,6%) demonstraram semelhança com a amostra C1.1; Na amostra C1.1 (ImageNumber\_2), 79 de 226 objetos classificados (equivalente a 35%) demonstraram semelhança com a amostra A1.1. C) Dados de “Score Image”. Cor azul: B1.1 / Cor laranja: C1.1.

## 4 DISCUSSÃO

A metodologia desenvolvida para a pesquisa mostrou-se reprodutível e pouco dispendiosa, com obtenção de imagens microscópicas do órgão vegetativo do milho (folha) a partir da confecção de lâminas temporárias simples feitas com cortes à mão livre. Por meio da citometria de imagem com os *softwares* livres gratuitos *CellProfiler* e *CellProfiler-Analyst*, promoveu-se a análise automática de imagem para avaliar morfologia celular em tecido vegetal.

A identificação do nível nutricional da planta somente é possível pela análise química da mesma, porém ocorrem certos sintomas (inclusive morfológicos) característicos de uma ou outra desordem manifestadas nos casos mais graves, e o órgão de controle escolhido para observação dessas desordens geralmente é a folha, uma vez que ela é a fonte do metabolismo da planta e nela se reflete qualquer mudança nutricional (Coelho *et al.*, 2007). Por isso se faz importante o desenvolvimento de técnicas de imagem que não exijam o uso da análise química.

A análise foliar utilizada como método diagnóstico de alterações nutricionais se baseia no fato da existência de uma relevante relação entre o suprimento de nutrientes e os níveis de elementos presentes, onde a elevação ou redução de suas concentrações são correspondentes ao aumento ou diminuição do nível de produção do vegetal (Alvarez *et al.*, 1999; Coelho *et al.*, 2007), fundamentando então, a escolha da folha como órgão vegetal de estudo para essa pesquisa.

O *CellProfiler* é uma ferramenta de *software* de código aberto versátil para quantificar dados de imagens biológicas, particularmente em experimentos de alto rendimento (Carpenter, 2006; Kamensky, 2011). Enquanto isso, o *CellProfiler-Analyst* permite que se explore os dados, classificando-se, incluído um sistema supervisionado de aprendizado da máquina que pode ser treinado para calcular a precisão da classificação (Jones, 2009).

A Citometria de imagem é uma tecnologia considerada recente que obteve grandes avanços no decorrer das últimas décadas, uma vez que aperfeiçoamentos de *softwares* e *hardwares* ainda surgem e conduzem a novas técnicas para análise celular (Tarnok, 2012). Por esse motivo ela se torna facilmente empregável nas análises laboratoriais histológicas para uma identificação de parâmetros morfológicos (Tozetti *et*

*al.*, 2014; Buzin *et al.*, 2015) além de proporcionar uma despesa significativamente mais baixa, pois, sua utilização requer amostras menores e utiliza menos reagentes (Lenz *et al.*, 2005; Laffers *et al.*, 2006; Mittag *et al.*, 2006).

Segundo Greilhuber (2008) o método de citometria de imagem (densitometria) pode proporcionar aos estudos em plantas um incremento de dados nas análises fitoquímicas, biomoleculares e citológicas. Isso se deve pela alta precisão de seus dados, demonstrando enorme relevância na contribuição em pesquisas nas mais diversas áreas (Bertho, 2015).

Ao conhecimento dos autores, este estudo se faz precursor quando se trata de uma combinação entre microscopia óptica, análise de imagem automatizada e classificação celular baseado na aprendizagem da máquina realizado em tecido vegetal.

A princípio, uma comparação entre três diferentes métodos de produção do vegetal pode se mostrar importante na busca de maiores informações a respeito dos organismos utilizados em culturas orgânicas, uma vez que sistemas de produção sustentáveis se tornaram de grande destaque na prática da agricultura. Ao mesmo tempo, se faz necessária a possibilidade de criação de novos métodos para avaliação de impactos a partir da morfologia celular do vegetal, principalmente no que diz respeito à adubação química e aos defensivos agrícolas utilizados em cultivos convencionais.

## 5 CONCLUSÃO

A citometria de imagem possibilitou análises morfológicas automatizadas em tecido vegetal, associada à aprendizagem da máquina e classificação celular por meio dos *softwares CellProfiler e CellProfiler-Analyst*. Esses programas foram capazes de identificar e classificar objetos predeterminados em imagens microscópicas das amostras avaliando a morfologia celular de forma comparada em diferentes culturas utilizando metodologia reprodutível e de baixo custo.

As limitações do presente estudo podem resultar da falta de literatura em revisões paritárias a cerca da utilização dos *softwares* CP e CPA em análises de tecido de origem vegetal. Mais estudos são necessários para obter maiores conhecimentos sobre a utilização destes programas em plantas, especialmente sobre sua capacidade de analisar imagens de forma comparativa, tendo em vista a necessidade de inovações tecnológicas a cerca do comportamento de culturas, como as do milho orgânico e convencional, dentro de uma produção mundial.

## 6 REFERÊNCIAS

Aldrich SR, Scott WO, Leng ER. 1982. Modern corn production. 2.ed. Champaign: A & L Publication, 371p.

Alvarez VVH, Novaes RF, Barros NF, Cantarutti RB, Lopes AS. 1999. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: Ribeiro AC, Guimaraes PTG, Alvarez VVH. Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5<sup>o</sup> Aproximação. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 25-32.

Alves BM, Filho AC, Burin C, Toebe, M. & Silva, L.P. 2015. Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e à qualidade nutricional. *Ciência Rural*, 45(5).

Bertho AL. 2015. Citometria de fluxo. Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz. Acesso em 16 de abril de 2018. Disponível em <https://pt.scribd.com/document/104114813/Apostila-Bertho-Citometria-de-Fluxo>

Bocking A, Giroud F, Reith A. 1994. Static DNA cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. In.: Wied, G.L.; Bartels, P.H.; Rosenthal, D.L.; Schenck, U. Compendium on the Computerized Cytology and Histology Laboratory. Tutorial of Cytology. Chicago, USA.

Bocking A. 1995. DNA measurement: When and why? In.: Compendium on Quality Assurance, Proficiency Testing and Workload Limitations in Clinical Cytology, Chicago.

Buzin AR, Pinto FE, Nieschke K., Mittag A, Andrade TU, Endringer DC, Tarnok A, Lenz D. 2015. Replacement of specific markers for apoptosis and necrosis by nuclear morphology for affordable cytometry. *J. Immunol. Methods* 420, 24–30.

Carey FA. 1994. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens principles and applications. *The Journal of Pathology*, 172, 307-312.

Carneiro AA, Carneiro NP, Carvalho CHS, Vasconcelos MJV, Paiva E, Lopes MA. 2000. Milho Transgênico: Melhoria da qualidade nutricional do grão. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 3(15), 42-46.

Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, JH Chang, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM. 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 7:R100.

Coelho AM, França GE, Pitta GVE, Alves VMC, Hernani LC. 2007. Cultivo do Milho. *Embrapa Milho e Sorgo*. 3a edição. Sistemas de Produção, Versão Eletrônica.

Colli W. 2011. Organismos transgênicos no Brasil: regular ou desregular?. *Revista Universidade de São Paulo*, n.89, 148- 173.

De Robertis EM, Hib J. 2014. *Biologia Celular e Molecular*. 14ª Ed. Editora Guanabara Koogan, São Paulo.

Greilhuber J. 2008. Cytochemistry and C-values: The less-well-know world of nuclear DNA amounts. *Ann. Bot.* 101:791-804.

Jones TR, Carpenter AE, Lamprecht MR, Moffat J, Silver S, Grenier J, Raiz D, Golland P, Sabatini DM. 2009. Scoring diverse cellular morphologies in image-based screens with iterative feedback and machine learning. *PNAS* 106(6):1826-1831.

Kamentsky L, TR Jones, Fraser A, Bray MA, Logan D, K Madden, Ljosa V, Rueden C, Harris GB, Eliceiri K, Carpinteiro AE. 2011. Improved structure, function, and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 27(8):1179-1180.

Laffers W, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Gerstner AO. 2006. Interactive restaining a pivotal tool for n-color immunophenotyping by slide-based cytometry. *Cytometry A*, 69(3), 127-130.

Lammerts van Bueren ET, Jones SS, Tamm L, Murphy KM, Myers JR, Leifert C, Messmer MM. 2001. The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: A review. *NJASW ageningen Journal of Life Sciences*, 58(3), 193-205.

Lenz D, Lenk K, Mittag A, Adams V, Krankel N, Boldt A, Gerstner AO, Raida M, Weiss T, Hambrecht R, Tranok A. 2005. Detection and quantification of endothelial progenitor cells by flow and laser scanning cytometry. *J. Biol.Regul. Homeost. Agents* 19, 180-187.

Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Tarnok A. 2006. Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. *Cytometry A* 69 (7), 691–703.

Oliveira LRD, Miranda GV, Delima RO, Souza LVD, Galvão JCC, Santos ICD. 2011. Combining ability of tropical maize cultivars in organic and conventional production systems. *Ciência Rural*, 41(5), 739-745.

Souza JL, Araújo JBS, Balbino JMS, Costa H, Prezotti LC, Ventura JÁ, Borel RMA, Garcia RDC. 2005. *Agricultura orgânica: tecnologias para a produção de alimentos saudáveis*. Vitória: Incaper, 257 p. 2 v.

Souza JL & Pereira VA. 2015. *Comportamento de espécies em sistema orgânico de produção. Agricultura Orgânica Tecnologias para a produção de alimentos saudáveis*. 3v, 371p.

Tarnok A. 2012. *Innovations in Image Cytometry*. International Society for Advancement of Cytometry.

TozettiPB, Lima EM, Nascimento AM, Endringer DC, Pinto FE, Andrade TU, Mittag A, Tarnok A, Lenz D. 2014. Morphometry to identify subtypes of leukocytes. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* 7 (2), 69–75.

Vilhar B, Greilhuber J, Koce JD, Temsch EM, Dermastia M. 2001. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany*, 87, 719-728.

## 7 ANEXO

### l) Análises físico-químicas de macroatmentos: N<sup>o</sup>: 4715/18-001.1 Rev.00

#### 2. Identificação da Amostra

**MATRIZ: SOLO**

PONTO DE COLETA: CAMPO AGROSTOLÓGICO

PROPRIEDADE: ECO FAZENDA LIVV

CULTURA EXISTENTE: PASTAGEM

DATA E HORA DA COLETA: 24/10/2018 - 09:00 h

PROFUNDIDADE: 0-20 cm

CULTURA A SER PLANTADA: MILHO

#### 3. Condições de Apresentação

EMBALAGEM PLÁSTICA, LACRADA, NÃO REFRIGERADA.

#### 4. Data do Recebimento

25/10/2018

#### 5. Data de Início das Análises

25/10/2018

#### 6. Resultados

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS		
Parâmetro	Unidade	Resultado
Acidez Potencial (H+Al)	cmol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>	3,15
Alumínio total	cmol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>	0,209
Cálcio	cmol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>	2,36
Capacidade de Troca de Cátions (CTC)	cmol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>	7,53
Fósforo total	mg / dm <sup>3</sup>	78,9
Magnésio	cmol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>	1,73
Matéria Orgânica	dag / dm <sup>3</sup>	1,52
pH 10% em água	-	4,92
Potássio	mg / dm <sup>3</sup>	104,0
Saturação em bases (V)	%	58,17
Soma de bases (SB)	cmol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>	4,36

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Parâmetro analisado	Expressão	Muito baixo	Baixo	Médio	Alto	Muito Alto
Textura argilosa	mg/dm <sup>3</sup>	-	≤ 5	6 - 10	> 10	-
Fósforo Textura média			≤ 10	11 - 20	> 20	
Textura arenosa			≤ 20	21 - 30	> 30	
Potássio	mg/dm <sup>3</sup>	-	≤ 30	31 - 60	> 60	-
Cálcio	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	-	≤ 1,5	1,6 - 4,0	> 4,0	-
Magnésio	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	-	≤ 0,5	0,6 - 1,0	> 1,0	-
Alumínio	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	-	≤ 0,3	0,4 - 1,0	> 1,0	-
Matéria Orgânica	dag/dm <sup>3</sup>	-	≤ 1,5	1,6 - 3,0	> 3,0	-
Acidez Potencial	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	-	≤ 2,5	2,6 - 5,0	> 5,0	-
Soma de Bases	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	-	≤ 2,0	2,1 - 5,0	> 5,0	-
Capacidade de Troca de Cátions (CTC)	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	-	≤ 4,5	4,6 - 10	> 10	-
Saturação de Bases	%	≤ 25	26 - 50	51 - 70	71 - 90	> 90
pH em H <sub>2</sub> O	<b>Acidez</b>			<b>Neutro</b>	<b>Alcalinidade</b>	
	Elevada <5,0	Média 5,1 - 5,9	Fraca 6,0 - 6,9	7,0	Fraca 7,1 - 7,8	Elevada >7,8

Fonte: INCAPER - Manual de Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado do Espírito Santo. 4ª Aproximação. Vitória 2001.