

UNIVERSIDADE VILVA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**MORFOANATOMIA CELULAR VEGETAL DO MILHO (*Zea mays*) SOB
IMPACTO DO GLIFOSATO ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE IMAGEM
AUTOMATIZADA**

GEANDERSON DOS SANTOS RODRIGUES

VILA VELHA-ES
AGOSTO/2019

UNIVERSIDADE VILVA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**MORFOANATOMIA CELULAR VEGETAL DO MILHO (*Zea mays*) SOB
IMPACTO DO GLIFOSATO ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE IMAGEM
AUTOMATIZADA**

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.

GEANDERSON DOS SANTOS RODRIGUES

VILA VELHA-ES
AGOSTO/2019

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R696r Rodrigues, Geanderson dos Santos.
Morfoanatomia celular vegetal do milho (*zea mays*) sob
impacto do glifosato através de citometria de imagem
automatizada / Geanderson dos Santos Rodrigues – 2019.

37 f. : il.

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

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Milho – Cultivo.
I. Lez, Dominik. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 660.603

GEANDERSON DOS SANTOS RODRIGUES

**MORFOANATOMIA CELULAR VEGETAL DO MILHO (*Zea mays*) SOB
IMPACTO DO GLIFOSATO ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE IMAGEM
AUTOMATIZADA**

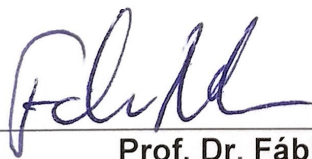
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Vegetal, para obtenção do
grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal

Aprovado em 16 de agosto de 2019,

Banca examinadora:



Prof. Dra. Viviana Borges Corte – (UFES)



Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga – (UVV)



Prof. Dr. Dominik Lenz – (UVV)
(Orientador)

“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! Por que quem compreendeu a mente do Senhor? ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém”.
(Bíblia – Versão ACF; Romanos 11:33-36)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por consolidar em minha vida este ciclo, ciente de não ser merecedor de tamanha graça e grato por Seu amor que nos surpreende todos os dias.

Agradeço a minha esposa, Thais. Nenhuma palavra será capaz de representar todo o seu papel neste período.

Agradeço ao meu pai, Binair, por seus esforços em me auxiliar e em estimular minhas atividades, bem como, a todo o recurso financeiro, tanto para pesquisa quanto para o cuidar do meu lar neste período.

Agradeço ao meu filho, Benício, instrumento de Deus para nos abençoar com tanto aprendizado.

Agradeço a toda minha família (mãe, irmão, irmã, sogro e sogra, cunhados), aos irmãos em Cristo (são muitos), aos colegas discentes (Gabriely, André, Fernando, Iêda, Maria Beatriz, Geardson e Vivian-UENF), aos professores (Solange e Ary), aos alunos de iniciação científica (Érika, João e Lara), ao técnico de laboratório (Luciano) e equipe do Biopráticas pelas diversas ações promovidas ao longo destes anos de trabalho. A Maria Beatriz pela parceria desde o início das atividades.

Agradeço ao amigo Pedro Luiz Ferro pelo incentivo ao mestrado.

Agradeço aos coordenadores Prof.a. Christiane Mileib (UVV) e Prof. Fábio Olivares (UENF) pela condução ao longo dos estudos.

Agradeço ao orientador, Dominik Lenz, por todo acompanhamento ao longo do mestrado.

Que Deus possa fazê-los alcançar seus sonhos assim como possibilitou a mim. Muito obrigado a todos. Estas poucas palavras são apenas um símbolo de tudo que fizeram por mim.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
INTRODUCTION	09
MATERIALS AND METHODS	11
CONCLUSIONS	14
LITERATURE CITED	15
APÊNDICE – TABLES, FIGURES AND LEGENDS	18
Análises comparativas da morfoanatomia celular vegetal sob impacto do glifosato	23
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 Cultivo do milho e tratamentos com glifosato	27
2.2 Preparo das amostras	28
2.3 Registro de imagem	28
2.4 Análise de imagens	28
3 RESULTADOS	31
4 DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

RESUMO

GEANDERSON DOS SANTOS RODRIGUES, Universidade Vila Velha – ES, agosto de 2019. MORFOANATOMIA CELULAR VEGETAL DO MILHO (*Zea mays*) SOB IMPACTO DO GLIFOSATO ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE IMAGEM AUTOMATIZADA. Orientador: Dominik Lenz.

Premissa do estudo: A análise quantitativa de células vegetais foi limitada à Citometria de Fluxo por um longo período de tempo. Uma possível razão para esta quantidade limitada de estudos pode resultar da dificuldade em preparar amostras de tecido celular para análise de citometria de fluxo. Métodos e Resultados: O objetivo deste estudo foi, portanto, preparar seções de folhas de milho (*Zea mays*), a fim de permitir uma identificação automatizada máquina de aprendizagem baseada, segmentação e posterior análise de células. No presente estudo, o método desenvolvido foi preparar tecidos vegetais para posterior análise quantitativa de imagens teciduais. Conclusões: Os resultados demonstram que a metodologia desenvolvida neste estudo é reprodutível e rentável.

Palavras chaves: automatizado; cellprofiler; citometria de imagem; tecido vegetal.

ABSTRACT

GEANDERSON DOS SANTOS RODRIGUES, University of Vila Velha – ES, august of 2019. MAIZE VEGETABLE CELL MORPHOANATOMY (*Zea mays*) UNDER IMPACT OF GLYPHOSATE THROUGH AUTOMATED IMAGE CYTOMETRY. Advisor: Dominik Lenz.

Premise of the study: Quantitative analysis of plant cells was limited to Flow Cytometry for a long time. A possible reason for this limited amount of studies may result from the difficulty to prepare cell tissue samples for Flow Cytometry analysis. *Methods and Results:* The aim of this study was therefore to prepare root sections from corn (*Zea mays*) in order to enable an automated based learning machine identification, segmentation and subsequent analysis of cells. In the present study, the method developed was to prepare plant tissues for subsequent quantitative analysis of tissue images. *Conclusions:* The results demonstrate that the methodology developed in this study is reproducible and cost effective.

Key words: automated; cellprofiler; image cytometry; plant tissue.

1 INTRODUCTION

The quantitative analysis of plant cells was limited to Flow Cytometry (FCM) for a long time (Ochatt, 2008). Most plant studies reported briefly about DNA content (Bass et al., 2014; Galbraith et al., 2014). A possible reason for a limited amount of studies about quantitative analysis of plant cells may result from the difficulty to prepare tissue samples for FCM (Thornthwaite et al., 1980; Heiden et al., 1998). Recent progress in image cytometry using based learning machine software, such as CellProfiler (CP) not only allows analysis of tissue samples (Buzin et al., 2017; Macedo et al., 2017) but also cell fluorescence intensities (Nunes et al., 2017), morphological features and classification of different cell types and subtypes (Hamilton et al. 2007; Tozetti et al. 2014; Buzin et al., 2015). Gerstner et al. (2006) stated Image Cytometry being an “alternative approach to fill the gap between high throughput multiparametric cytometry on the one hand and detailed morphological analysis and documentation on the other hand”. In addition to tissue and cell morphological, frequency and classification analysis, these software are reproducible, accessible, and requires a lower amount of reagent and cell samples for the analysis to work with similar results in comparison with FCM. (Lenz et al., 2005a; Lenz et al., 2005b; Laffers et al., 2006; Mittag et al., 2006; Tozetti et al., 2014; Melzer et al., 2016; Nunes et al. 2017).

The present study shows the possibility of to prepare maize (*Zea mays*) root tissue to enable and automated and cost-effective segmentation and analysis CP with reproducible results. The experiments were conducted by using different sections of leaves' maize, the recording of the images was performed using a cam coupled to a microscope electronic and the image. The authors also present an alternative for sample preparation that allows an easy cell segmentation, even without a DNA or cytoplasm marker in order to work more cost-effective. Segmentation and classification

of entire cells with the lowest possible number of artifacts would allow a complete morphological cell analysis. It should be noted that all specific markers could be used in this study.

2 MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted in the laboratory of Vila Velha University, Brazil. Corn leaves were selected from plants without any type of chemical treatment.

Paradermic sections were applied in the middle thirds of the leaves, in adaxial surface. The cuts were made free handed using commercial razor blades. After the cut, the material *in vivo* was fixed in the slide with water and protected with a coverslip. The slides were analyzed under the microscope (Olympus CX23LED RFS1). Some of the samples were stained (Safranina P.A. PM 350,86). Images from the slides with the leaf samples were taken with a digital camera (Motorola 5S Full HD 1080p) connected to the microscope with a 10x objective lens selected. The images were saved and stored individually in the *.tiff format.

The images were analyzed using free image analysis softwares CellProfiler (CP) (version 2.1.1) and CellProfiler Analyst (CPA) (version 2.0 r11710). CP is capable of cytometric analysis based on an algorithm created by the user that allows sets of images to identify, segment, filter and analyze objects. (Carpenter et al., 2006; Lamprecht et al., 2007; Mittag et al., 2011). CPA, created by the same group (Jones et al., 2008), complements the data extracted from CP allowing objects classification throughout a machine-based learning process and figures (e.g. scatter plots, histograms and tables) based on the results from the experiment. CPA can strongly be used to calculate sensitivity (Melzer et al, 2016).

Three images were analyzed using the same pipeline algorithm (table 1) in CP. Five key modules were employed in the analysis of these images this study. After processing the images in CP, the data of interest were exported to CPA using a SQLite format, in order to try to differentiate cells of the different samples via supervised

machine learning. The reproducibility of manual preparation was verified by analyzing various sections of the same plant. The classifier function of CPA could not differentiate cells of different samples from the same plant.

The paradermic section was efficient in the preparation of images and samples. It was evidenced a delineation of the cellular contour at the epidermal level on the adaxial side of the leaf (Figure 1). There was slight overlap of other tissues and presence of chloroplasts. The shear thickness was not a limiting factor in this section. The use of dyes and stains was tested. There was no expressivity in the application of dye and stain (Figure 2). The contrast presented on the cell profile from the *in vivo* material without dye was similar the analysis from the same material when added the stain safranin, demonstrating that the methodology does not necessarily require the use dyes in the preparation of samples, which reduces possible costs with reagents. The images from the paradermics sections of leaf epidermis were submitted to be analyzed in CP and CPA. CPA was not able to differentiate tissues from the epidermis of leaves from the same plant. Three different preparations were tested under the same algorithms applied to CP and classified with CPA (Figures 3 and 4).

It was described that the preparation of plant tissue for FCM is complex, tedious and time-consuming (Thornthwaite et al., 1980; Heiden et al., 1998). Therefore, the present study aimed to develop an easy, reproducible and cost-effective method to prepare plant tissue for cellular analysis via image analysis of light microscopic using machine-learning based programs, in order to avoid the obstacle of tissue preparation for FCM. Another advantage of image cytometry at this point is the substantial decrease of the expenses for both, equipment and reagents (Lenz et al., 2005a; Lenz et al., 2005b; Laffers et al., 2006; Mittag et al., 2006; Mittag et al., 2011; Tozetti et al., 2014; Nunes et al., 2016; Melzer et al., 2016; Jacob et al., 2018). In a high throughput inhibition

assay to study the interactions of MERS-CoV antibodies using image cytometry, Rosen et al. (2018) also found advantages of using this technique, where parameters could be optimized faster in ELISA compared to flow cytometry, such as seed density, cell type, protein selection and staining methods. Consequently, the proposed method of image cytometry can reduce experimental costs by allowing multiple repetitions and multiple comparisons on a single plate.

In a high throughput inhibition assay to study the interactions of MERS-CoV antibodies using image cytometry, Rosen et al. (2019) also found advantages of using this technique, where parameters could be optimized faster in ELISA compared to flow cytometry, such as seed density, cell type, protein selection and staining methods. Consequently, the proposed method of image cytometry can reduce experimental costs by allowing multiple repetitions and multiple comparisons on a single plate.

CONCLUSIONS

The present study suggests the replacement of MHR by light microscopy using free software for cellular and tissue analysis. Still, the cytometry image demonstrated the possibility of morphological cellular analysis of cells and tissues in plants.

The method used materials common in laboratory and the pigment can be dispensed. Moreover, the results of the images allowed for the reproducibility of the analyses in CP and CPA software. These points show that it makes possible analysis of plant tissue without a difficult preparation process and without cost-effective equipment, proving to be reproducible, simple and not time consuming.

LITERATURE CITED

- Bass, H. W., Wear, E. E., Lee, T., Hoffman, G. G., Gumber, H. K., Allen, G. C., Hanley-bowdoin, L. (2014). A maize root tip system to study DNA replication programmes in somatic and endocycling nuclei during plant development. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2747–2756. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert470>
- Buzin, A. R., Macedo, N. D., de Araujo, I. B. B. A., Nogueira, B. V., Andrade, T. U. De, Endringer, D. C., & Lenz, D. (2017). Automatic detection of hypoxia in renal tissue stained with HIF-1alpha. *Journal of Immunological Methods*, 444, 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.02.005>
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*, 7(10), R100.1-11. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
- Galbraith, D. W. (2014). Endoreduplicative Standards for Calibration of Flow Cytometric C-Value Measurements. *Cytometry Part A*, 85A(4), 368–374. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22440>
- Gerstner, A. O. H., Mittag, A., Laffers, W., Dähnert, I., Lenz, D., Bootz, F., ... Tárnok, A. (2006). Comparison of immunophenotyping by slide-based cytometry and by flow cytometry ☆. *Journal of Immunological Methods*, 311(1–2), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.01.012>
- Hamilton, N. A., Pantelic, R. S., Hanson, K., & Teasdale, R. D. (2007). Fast automated cell phenotype image classification. *BMC Bioinformatics*, 8(110), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-110>
- Heiden, T., Castro, J., Graf, B. M., & Tribukait, B. (1998). Comparison of routine flow cytometric DNA analysis of fresh tissues in two laboratories: Effects of differences in preparation methods and background models of cell cycle calculation. *Cytometry*, 34(4), 187–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980815\)34:4<187::AID-CYTO3>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980815)34:4<187::AID-CYTO3>3.0.CO;2-D)
- Jacob, M. L. P., Nunes, C. S. M., Borba, P. C. D. O., Ribeiro, G. P., Andrade, T. U. De, Endringer, D. C., & Lenz, D. (2018). Hematological value references for free-living

saffron finch (*Sicalis flaveola*) using a machine-learning-based classifier. *Comparative Clinical Pathology*, 1–5.

Jones, T. R., Kang, I. H., Wheeler, D. B., Lindquist, R. A., Papallo, A., Sabatini, D. M., Carpenter, A. E. (2008). CellProfiler Analyst : data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics*, 9(482), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-482>

Laffers, W., Mittag, A., Lenz, D., Tarnok, A., & Gerstner, A. O. H. (2006). Iterative Restaining as a Pivotal Tool for n-Color Immunophenotyping by Slide-Based Cytometry. *Cytometry Part A*, 69A, 127–130. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20216>

Lamprecht, M. R., Sabatini, D. M., & Carpenter, A. E. (2007). Short Technical Reports CellProfilerTM : free , versatile software for automated biological image analysis Short Technical Reports. *BioTechniques*, 42(1), 71–75. <https://doi.org/10.2144/000112257>

Lenz, D., Barten, M. J., Hiller, S., Tarnok, A., & Sack, U. (2005). Regenerative and Predictive Medicine of Cardiovascular Disease : The 9th Leipziger Workshop and the 2nd International Workshop on Slide Based Cytometry. *Cytometry Part A*, 64A, 110–114. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20115>

Lenz, D., Lenk, K., Mittag, A., Adams, V., Kränkel, N., Boldt, A., Tarnok, A. (2005). Detection of endothelial progenitor cells by flow cytometry and laser scanning cytometry. *Cytometry*, 19, 1–9.

Macedo, N. D., Buzin, A. R., Araujo, I. B. B. A. de, Nogueira, B. V., Andrade, T. U. De, Endringer, D. C., & Lenz, D. (2017). Objective detection of apoptosis in rat renal tissue sections using light microscopy and free image analysis software with subsequent machine learning Detection of apoptosis in renal tissue. *Tissue and Cell*, 49(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.12.006>

Melzer, S., Nunes, C. S. M., Endringer, D. C., Andrade, T. U. De, Tarnok, A., & Lenz, D. (2016). Trypan Blue as an Affordable Marker for Automated Live-Dead Cell Analysis in Image Cytometry. *Scanning*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/sca.21335>

Mittag, A., Lenz, D., Gerstner, A. O. H., & Tarnok, A. (2006). Hyperchromatic Cytometry Principles for Cytomics Using Slide Based Cytometry. *Cytometry Part A*, 69A, 691–703. <https://doi.org/10.1002/cyto.a>

Mittag, A., Pinto, F. E., Endringer, D. C., Tarnok, A., & Lenz, D. (2011). Cellular Analysis by Open-Source Software for Affordable Cytometry. *Scanning*, 33(1), 33–40. <https://doi.org/10.1002/sca.20220>

Nunes, C. S. M., Tarnok, A., Mittag, A., Andrade, T. U. De, Endringer, D. C., & Lenz, D. (2017). Differentiation of populations with different fluorescence intensities with a machine-learning based classifier. *Comparative Clinical Pathology*, 26, 385–389. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2388-9>

Ochatt, S. J. (2008). Flow Cytometry in Plant Breeding. *Cytometry Part A*, 73A, 581–598. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20562>

Rosen, O., Chan, L. L., Abiona, O., Gough, P., Wang, L., Shi, W., Corbett, K. S. (2018). A high-throughput inhibition assay to study MERS-CoV antibody interactions using image cytometry. *Journal of Virological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.11.009>

Stanciu, C. E., Kwon, Y. J., & Ehrhardt, C. J. (2016). Forward-scatter and side-scatter dataset for epithelial cells from touch samples analyzed by flow cytometry. *Data in Brief*, 6, 416–418. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.027>

Thornthwaite, Jerry T; Sugarbaker, Everett V; Temple, W. J. (1980). Preparation of Tissues for DNA Flow. Cytometry, 1(3), 229–237. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/cyto.990010309>

Tozetti, P. B., Lima, E. M., Nascimento, A. M., Endringer, D. C., Pinto, F. E., Andrade, T. U., Lenz, D. (2014). Morphometry to identify subtypes of leukocytes. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 7(2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2013.11.005>

Nota: Normas de apresentação conforme revista “Applications in Plant Sciences (APPS)”, Official publication of the Botanical Society of America. Title: Reproducible quantitative analysis of plant tissue using a free based learning machine software. Authors: Geanderson dos Santos Rodrigues, Gabrielly Ribeiro, João Vitor Soares de Souza, Erika Belotti Merísio, Renata Alves Mazuco, Celio Siman, Tadeu Ugger de Andrade, Denise Coutinho Endringer, Dominik Lenz.

APÊNDICE – TABLES, FIGURES AND LEGENDS

Table 1. Algorithms used for the image analysis with CellProfiler.

Module	Operation
1 – LoadImages	Identify and load the *.tiff images Name the load objects: i1
2 – ColorToGray	Select the input image: i1 Conversion method: Combine Name the output image: i2 Image type: RGB
3 – ApplyThreshold	Select the input image: i2 Name the output image: i3 Select the output image type: Binary (black and White) Threshold strategy: Automatic
4 – IdentifyPrimaryObjects	Select the input image: i3 Name the primary objects to the identify: i4 Typical diameter of objects, in pixel units (Min, Max): 40 to 100 Threshold strategy: Adaptive Theshould Method: MoG Method: Shape
5 MeasureObjectSizeShape	– Select objects to measure: i4

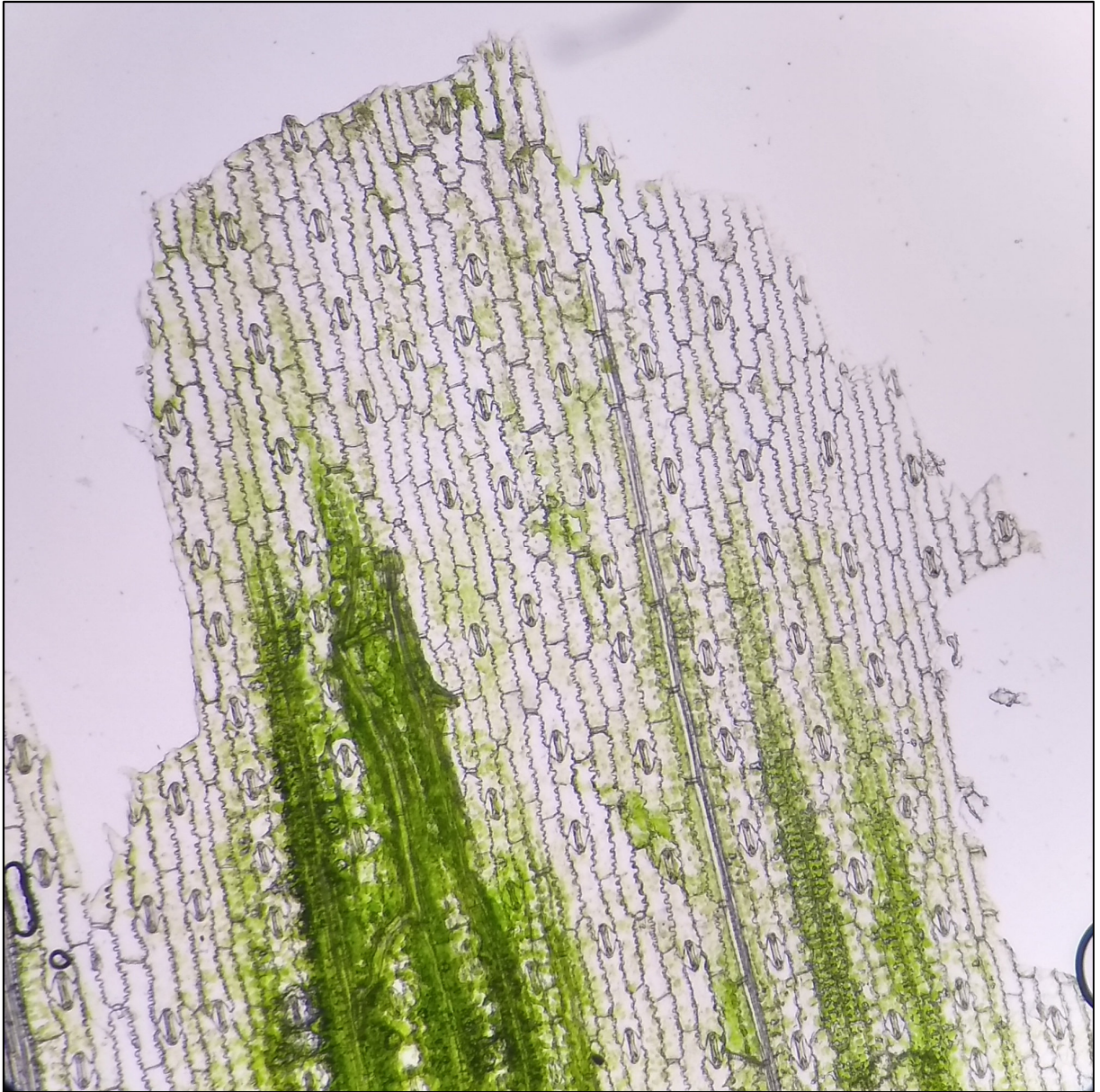


Figure 1. Paradermic section from maize in epidermal. The manual cut was sufficient to expose tissues of the sample in a regular manner with the possibility of the register of image being analyzed in the CellProfiler.

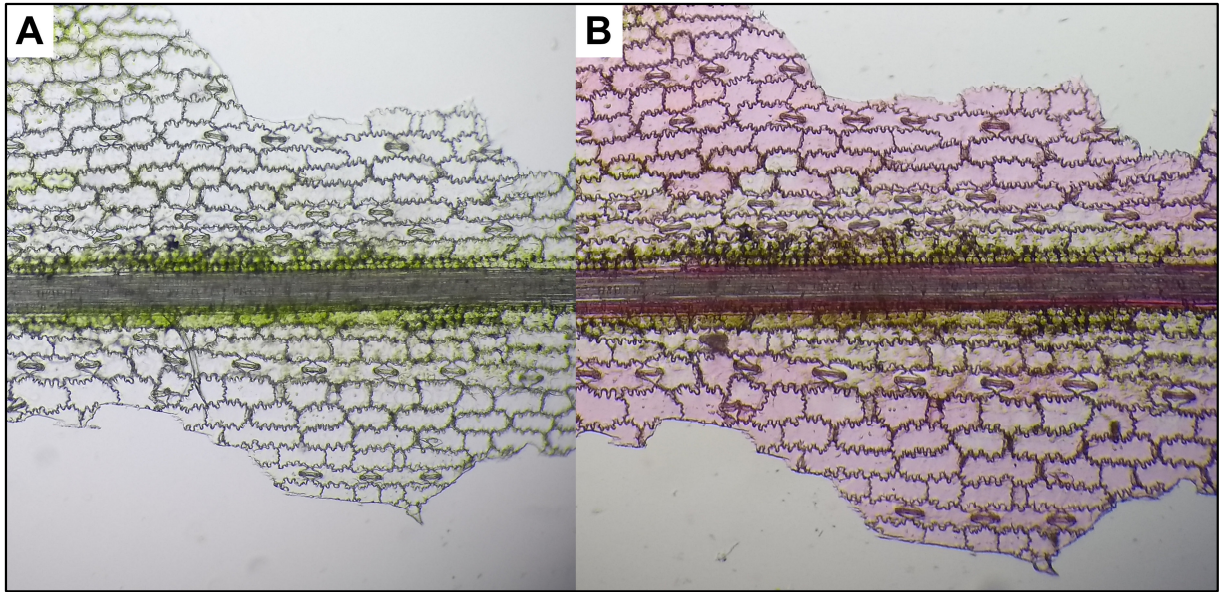


Figure 2. Comparison of cuts *in vivo* with and without dye: (A) Without dye; and (B) Dyed safranin. The contrast visualized in figure 2-A (without dye) was sufficient to generate sample analyzes in the CellProfiler.

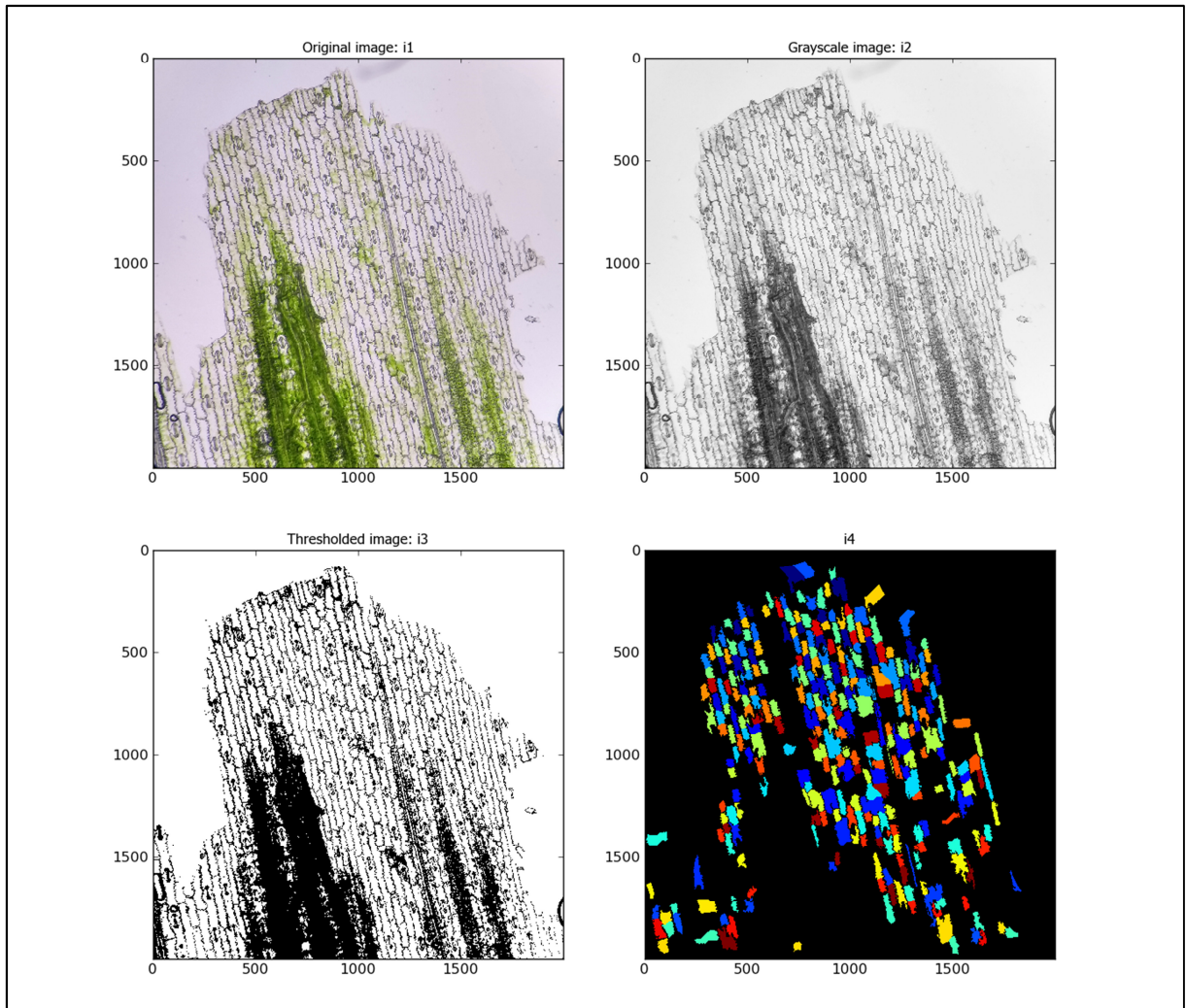


Figure 3. Analysis in CellProfiler with a sample. The image describe the sequence of analysis according Table 1. Steps: 'LoadImages' for Original Image: i1; 'ColorToGray' for Grayscale i2; 'ApplyThreshold' for Thesholded image i3; and 'IdentifyPrimaryObjects' for i4. The three samples were analyzed following this same.

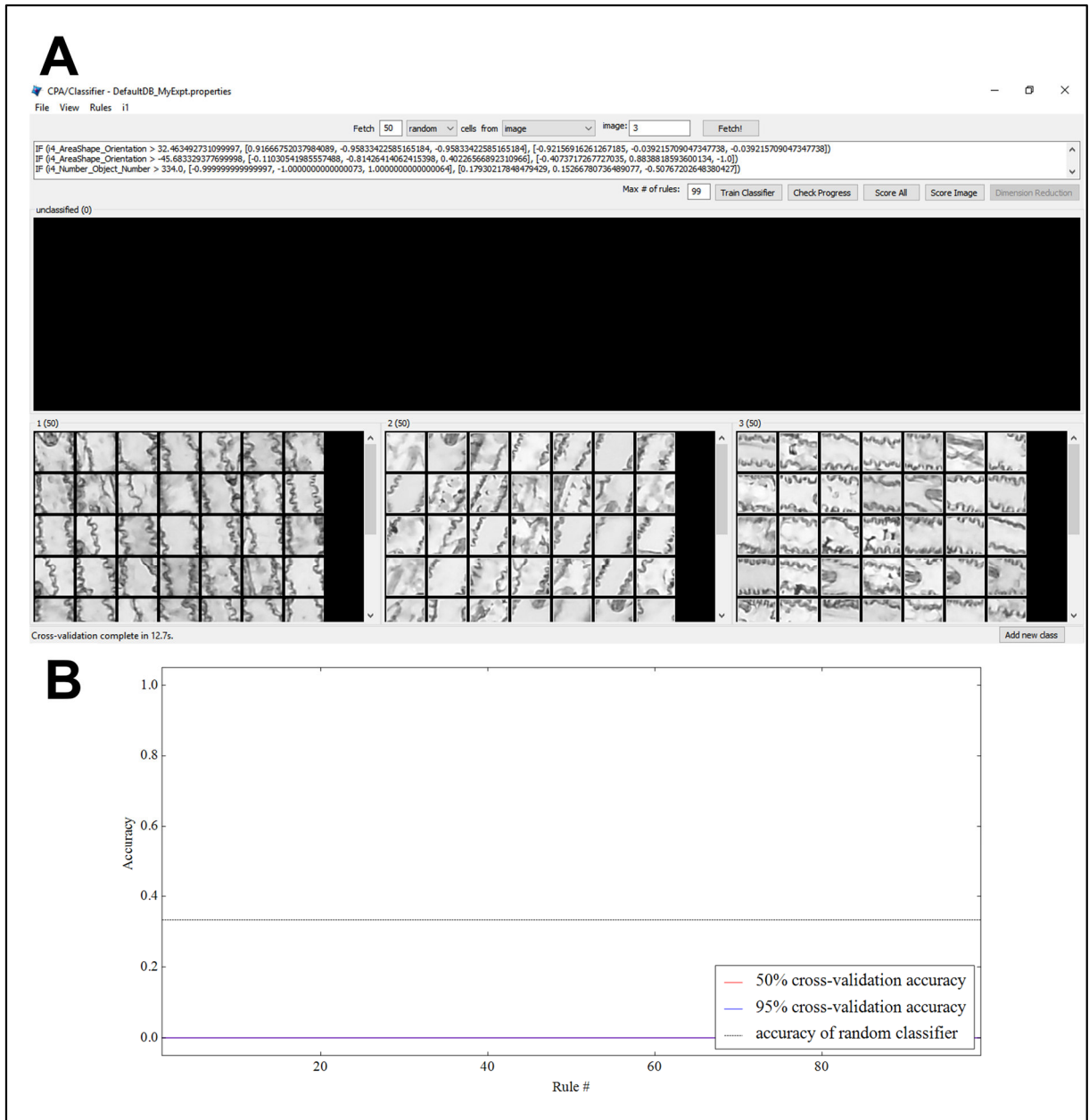


Figure 4. Results of analysis in CellProfiler Analyst (CPA): (A) Graphical visualization of the CPA for classification of the objects identified in the CellProfiler; and (B) Graphic result generated by the CellProfiler Analyst (CPA) after identifying, analyzing and classifying the objects.

Análises comparativas por aprendizagem da máquina em software livre em tecidos vegetais afetados pelo glifosato

RESUMO

A citometria de imagem é uma técnica microscópica que permitem a identificação e caracterização e análises biológicas quantitativas das células. Com o aperfeiçoamento de softwares e hardwares surgem novas técnicas para análise celular com abordagem automatizada para quantificação de células conforme análise padronizadas de imagens. A aprendizagem da máquina na quantificação de elementos celulares permite repetir as avaliações na região de interesse observando resultados confiáveis e reprodutíveis. Com base nisto, adotou-se o uso do glifosato, um agrotóxico de ação herbicida de maior aplicação em todo mundo, para análises comparativas. O presente estudo analisou dados de imagens através de aprendizagem da máquina, em software livre, originados de tecidos foliares de milho (*Zea mays*) com tratamentos diferenciados na exposição ao glifosato. Foram utilizados três grupos tratamento com glifosato e doses diferenciadas (0,31, 0,62 e 0,93 ml de glifosato) aplicadas no em cinco recipientes de 10 cm³. Um grupo controle foi adotado. As imagens foram geradas através de cortes manuais e microscopia óptica e analisadas nos programas CellProfiler (CP) e CellProfiler Analyst (CPA). Observou-se a fitotoxicidade do glifosato, o grupo de tratamento que recebeu a maior dosagem do produto tornou-se inviável para análise. Análise pelos softwares CP e CPA demonstrou atender satisfatoriamente requisitos técnicos de leitura com base em baixo investimento econômico e preparação de amostras com métodos simples e tradicionais, embora não tenha havido identificação de variações na estrutura celular entre grupos de tratamento através da análise automatizada de imagem no CP e no CPA. Os softwares foram capazes de realizar a análise das imagens automaticamente a partir dos algoritmos definidos no estudo, entretanto não houve diferenciação nas análises entre os grupos.

Palavras-chave: CellProfiler; Aprendizagem da máquina; Milho; Glifosato.

ABSTRACT

Image cytometry is a microscopic technique that allows the identification and characterization and quantitative biological analyzes of the cells. With the improvement of softwares and hardware new techniques for cellular analysis with automated approach for quantification of cells appear according to standardized analysis of images. The learning of the machine in the quantification of cellular elements allows to repeat the evaluations in the region of interest observing reliable and reproducible results. Based on this, the use of glyphosate, a pesticide of herbicide action of greater application worldwide, was adopted for comparative analyzes. The present study analyzed image data through machine learning, in free software, originated from corn leaf tissues (*Zea mays*) with differentiated treatments in glyphosate exposure. Three glyphosate treatment groups and different doses (0.31, 0.62 and 0.93 ml glyphosate) were used in five 10 cm³ containers. A control group was adopted. The images were generated through manual cuts and optical microscopy and analyzed in the programs CellProfiler (CP) and CellProfiler Analyst (CPA). The phytotoxicity of glyphosate was observed, the treatment group receiving the highest dosage of the product became unviable for analysis. Analysis by CP and CPA software demonstrated satisfactory technical reading requirements based on low economic investment and preparation of samples with simple and traditional methods, although there was no identification of variations in the cellular structure between treatment groups through automated image analysis in the CP and in the CPA. The software was able to perform the analysis of the images automatically from the algorithms defined in the study, however there was no differentiation in the analyzes between the groups.

Key-words: CellProfiler; Learning machine; Maize; Glyphosate.

1 INTRODUÇÃO

A citometria de imagem é uma técnica microscópica que permitem a identificação e caracterização e análises biológicas quantitativas das células. Esta técnica tem evoluído a medida que recursos tecnológicos e estudos aprofundam seu método de análise (TÁRNOK, 2012).

O aperfeiçoamento de softwares e hardwares ainda surgem e conduzem a novas técnicas para análise celular (TÁRNOK, 2012). Macedo et al. (2017) apresenta abordagem automatizada para quantificação de células conforme análise padronizadas de imagens. A aprendizagem da máquina na quantificação de elementos celulares permite repetir as avaliações na região de interesse observando resultados confiáveis e reprodutíveis (REXHEPAJ et al., 2013).

Este estudo propôs realizar análises com base no programa CellProfiler (CP) e CellProfiler Analyst (CPA), através de aprendizagem da máquina, para identificação de dados em morfoanatomia celular vegetal do milho, como metodologia de contribuição para avanços em biotecnologia vegetal.

Avanços biotecnológicos na produção vegetal têm promovido impactos econômicos, estendendo-se em diversos campos, sendo um elo de ligação entre a matéria prima e economia (CLARKE; ZHANG, 2013). Na agricultura, a crescente demanda global por alimentos tem justificado o uso de estratégias biotecnológica para produção alimentícia (VENKATESH et al., 2014) de forma segura e com qualidade nutricional (CLARKE; ZHANG, 2013).

Um exemplo presenciado nas últimas décadas, é o desenvolvimento de produções mais eficientes e com maior tolerância ao glifosato (VENKATESH et al., 2014), o agrotóxico de ação herbicida de maior aplicação em todo mundo (D'AVIGNON; GE, 2018). Relativamente, apresenta baixo custo comercial e alta eficácia no controle de ervas daninhas mais comuns (D'AVIGNON; GE, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS), através do IARC (International Agency for Research on Cancer) reclassificou a substância como de provável efeito cancerígeno para seres humanos, em 2015 (IARC, 2015).

Entre as pesquisas desenvolvidas para estudos do glifosato, destacam-se: estudos de engenharia genética com sementes tolerantes ao produto (D'AVIGNON; GE, 2018); efeitos secundários na fisiologia da planta (GOMES et al., 2014); alterações no desenvolvimento vegetal (DAMGAARD et al., 2014; FENG et al., 2018; VILA-AIUB; CASAS; GUNDEL, 2018); e fitotoxicidade do glifosato com danos à estrutura celular e alterações morfológicas (FENG et al., 2018).

A proposta de se analisar os efeitos do glifosato no cultivo do milho conduz o estudo por vantagens da técnica citadas por outros pesquisadores, como: possibilidade de realizar uma variedade de análises de dados celulares (HEDVAT, 2010); potencial de reprodutibilidade das análises (REXHEPAJ et al., 2013) e, ainda, preservação do material de estudo em imagem, o que possibilita refazer as análises (MITTAG et al., 2005).

O presente estudo analisou dados de imagens através de aprendizagem da máquina, em software livre, originados da folha de milho (*Zea mays*) com tratamentos diferenciados na exposição ao glifosato. Justifica-se pela necessidade de avançar com novas metodologias no campo da biotecnologia vegetal propondo métodos de baixo custo e reprodutíveis de forma automatizada com impacto econômico, social e científico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e laboratórios localizada no Campus Biopráticas da UVV, localizado no município de Vila Velha, no Estado do Espírito Santo (Brasil), nas coordenadas: 20°21'02.7"S 40°18'01.5"W.

2.1 *Cultivo do milho e tratamentos com glifosato*

Foram adotadas sementes orgânicas doadas pelo INCAPER com certificação EMCAPA-201 (SOUZA, 2015). As sementes passaram por processo de desinfestação superficial, adaptado de SANTOS et al (2011), sendo tratadas com: imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por 30 segundos, seguido de três lavagens exaustivas com água deionizada; e imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) obtida de uma solução a 10%, acrescida de uma gota de detergente comercial, por 20 minutos, seguida de três lavagens exaustivas com água deionizada.

O substrato foi composto por terra vegetal e grãos de quartzo na proporção (3:1). Previamente, foi reservado o material em recipiente apropriado, com todo o volume a ser utilizado nos experimentos. O substrato passou por tratamento em autoclave (1 atm; 121°C; 60 minutos). Após resfriar até temperatura ambiente, o substrato foi fracionado em quatro porções, destinando-as aos tratamentos específicos a serem adotados para cada grupo experimental.

O glifosato foi adquirido em comércio local, preparado e aplicado diretamente sobre o substrato. Foi utilizado o Glifosato Dipil de composição: sal de monoisopropilamina (glifosato) 48,0% - 480g/l – p/v; e ingredientes inerentes 52,0% - 684g/l – p/v; disponibilizado em comércio local em fracos de 20ml do produto concentrado dentro dos critérios técnicos para uso e descarte, conforme bula do produto, doravante denominado de glifosato (MANZKE, 2017). Foram preparadas três soluções com o produto em 100ml de água deionizada para cada grupo, levando-se em conta o volume de 5 litros de substrato por grupo, respectivamente: 0,31, 0,62 e 0,93 ml. A aplicação foi homogênea em todo substrato adotando-se procedimento de pulverização e mistura.

Cada porção de substrato tratado foi distribuído em 5 recipientes de 1 litro de capacidade totalizando três grupos com tratamento. Um quarto grupo foi constituído sem tratamento como controle. Os recipientes foram cobertos internamente com papel alumínio com face reflexiva para o sentido externo ao centro do recipiente.

Foram depositadas quatro sementes em cada recipiente a uma profundidade de 1,0cm garantindo que o embrião estivesse em oposição a superfície (na região mais profunda) e as sementes a uma distância de 5 cm, aproximadamente, umas das outras. Após germinação das sementes foi realizado o desbaste, mantendo-se apenas uma planta por recipiente.

2.2 Preparo das amostras

O cultivo foi mantido até se obter folhas ao 4º e 5º nível foliares, de onde serão extraídas as folhas para o estudo. Secções paradérmicas foram aplicadas nos terços médios das folhas nas superfícies adaxiais extraindo-se as amostras. Os cortes foram feitos de mãos livres usando lâminas de barbear comerciais. Após o corte, o material *in vivo* foi fixado na lâmina com água deionizada e protegido com lamínula. As lâminas foram analisadas sob o microscópio (Olympus CX23LED RFS1). Cada amostra foi identificada conforme grupo de origem no cultivo.

2.3 Registro de imagem

As imagens das lâminas com as amostras de folhas do milho foram registradas com uma câmera digital (Motorola 5S Full HD 1080p) conectada ao microscópio com uma lente objetiva de 10x selecionada. As imagens foram salvas e armazenadas individualmente no formato *.tiff, mantendo-se a identificação do grupo ao qual pertenciam.

2.4 Análise de imagens

As imagens foram analisadas utilizando os softwares livres de análise automatizada de imagens CellProfiler (CP) (versão 2.1.1) e CellProfiler Analyst (CPA) (versão 2.0 r11710).

Todas as imagens do estudo foram analisadas usando o mesmo conjunto de algoritmos (Tabela 2) em CP. Para esta parte do estudo, foram definidos nove

módulos-chave. Depois de processar as imagens no CP, os dados de interesse foram exportados para o CPA usando um formato SQLite.

As informações estatísticas foram fornecidas pelo próprio CPA através da identificação, análise e classificação dos objetos estudados através das imagens.

Tabela 2. Algoritmos usados por imagem analisada com o CellProfiler.

Módulos	Operações
1 - LoadImages	Identify and load the *.tiff images Name the load objects: i1
2 - ColorToGray	Select the input image: i1 Conversion method: Combine Name the output image: i2 Image type: RGB Red channel: 1.0 Green channel: 1.0 Blue channel: 1.0
3 - ApplyThreshold	Select the input image: i2 Name the output image: i3 Select the output image type: Binary (black and White) Threshold strategy: Automatic
4 - IdentifyPrimaryObjects	Select the input image: i3 Name the primary objects to the identify: cells Typical diameter of objects, in pixel units (Min, Max): 55 to 75 Threshold strategy: Adaptive Threshold Method: MoG Method: Shape
5 - MeasureObjectSizeShape	Select objects to measure: cells
6 - FilterObjects	Name the output objects: cells2 Select object to filter: cells Filtering mode: Measurements Filterin method: Limits Category: AreaShape Measurement: FormFactor Filter using minimum value: Yes; value: 0.2 Filter using maximum value: Yes; value: 0.8
7 – MeasureImageIntensivv	Select the image: i3
8 – MeasureObjectIntensivv	Select na image to measure: i3 Select object measure: cells2
9 - MeasureObjectSizeShape	Select objects to measure: cells2

Depois de processadas as imagens, cada imagem gerou um arquivo sequencial denominado: "DEFAULT*.mat com os dados das análises. Ainda no CP,

estes arquivos foram agrupados, aos pares, e preparados para serem exportados (Tabela 3) e classificados no CPA em formato SQLite.

Tabela 3. Procedimentos para exportar dados do CP para o CPA

Procedimento	Sequências de Operações
Agrupar Arquivos	Data Tools MergedOutputFiles Destination Files Name File: "merged_**.mat" Type: Matlab CellProfiler data (*.mat) Add: Select de Files (two files) Select: OK
Exportar para CPA	Data Tools ExportToDatabase Select file to export: "merged_**.mat" Database type: SQLite Experiment Name: MyExpt** Name the SQLite: DefaultDB**.db Table Prefix: MyExp**_ Create a CellProfiler Analyst properties file: Yes Wich objects used for locations: cells2 Export to measurements for alls objects: cells2 Select: Run

No CPA foram selecionados 250 objetos (*fetchs*, nome no CPA) referente a cada imagem para análise e classificação. Os objetos foram analisados e classificados, individualmente, distribuídos em três grupos: o primeiro e segundo grupo referiram a imagem de origem, denominados "1" e "2"; o terceiro formado por objetos que não atendiam a classificação da célula, denominados "artefatos". Tal distribuição permitiu a análise comparativa após identificação, análise e classificação de ambas as imagens.

3 RESULTADOS

O grupo tratado com a maior dose de glifosato (0,93 ml) tornou-se inviável para análise devido: atraso de crescimento e desenvolvimento; folhas amareladas; e, somente, duas plantas não morreram após trinta dias de cultivo. Quanto aos demais grupos, observou-se grandes limitações no desenvolvimento das folhas e das raízes dos dois grupos tratados com glifosato em relação ao grupo controle. O grupo controle apresentou raízes e folhas longas e coradas, com preservação morfoanatômica. Os dois grupos com tratamento apresentaram características semelhantes ao grupo controle, entretanto possuíam raízes curtas e sem feixes secundários.

A figura 6 apresenta a sequência de análise no CP.

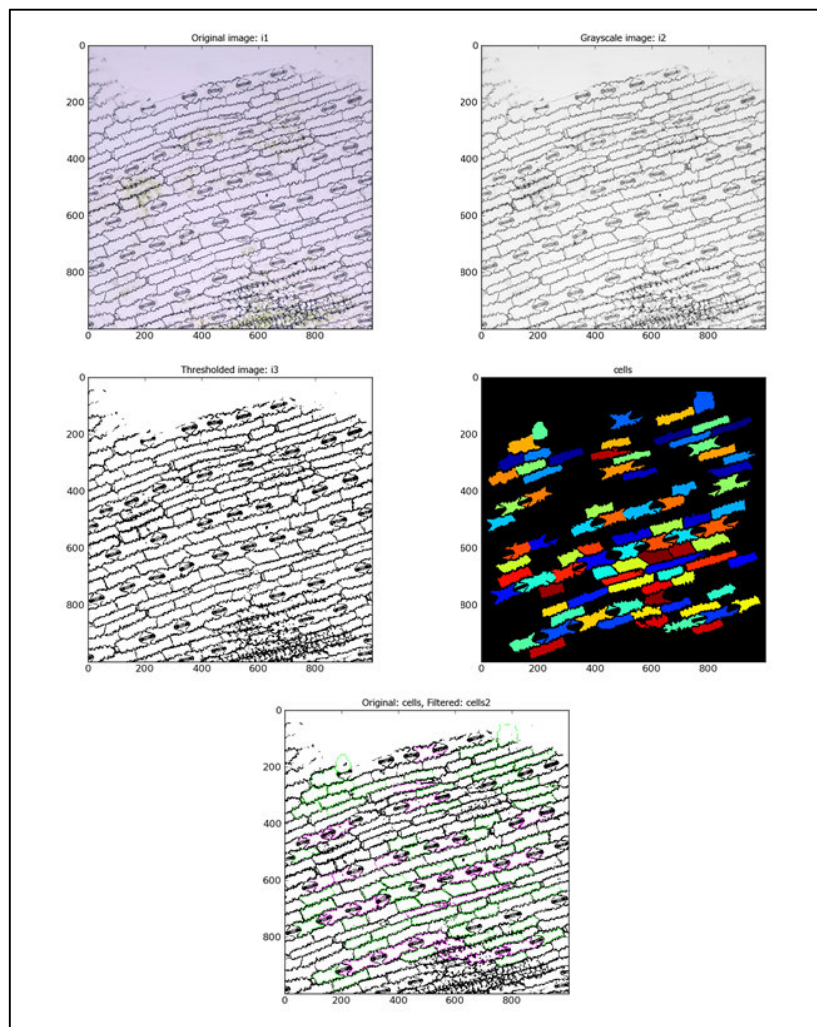


Figura 6. Análise de uma amostra no CP. A imagem descreve a sequência de análise de acordo com a Tabela

2. Etapas: 'LoadImages' para imagem original: i1; 'ColorToGray' para escala cinza: i2; 'ApplyThreshold' para limites de imagem: i3; "IdentifyPrimaryObjects" para: cells; e "FilterObjects" para: cells2 . Todas as amostras utilizadas no estudo foram analisadas seguindo este mesmo processo.

A figura 7 apresenta a estrutura de análise no CPA onde os objetos são identificados, analisados e classificados.

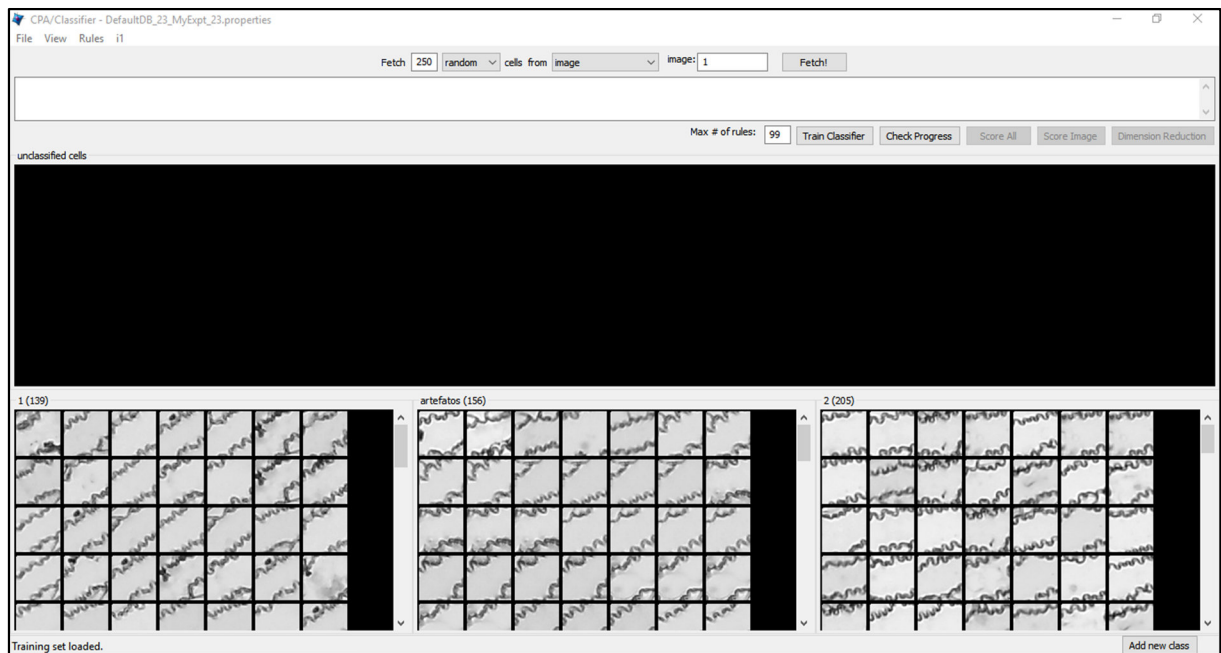


Figura 7. Estrutura de análise gráfica do CPA aplicada. Para cada imagem foram obtidos 250 *fecths* da imagem para serem analisados e classificados. Artefatos foram separados em um grupo específico. Todas as análises obedeceram a estes critérios.

A figura 8 apresenta os resultados das análises através de gráficos gerados pelo CPA.

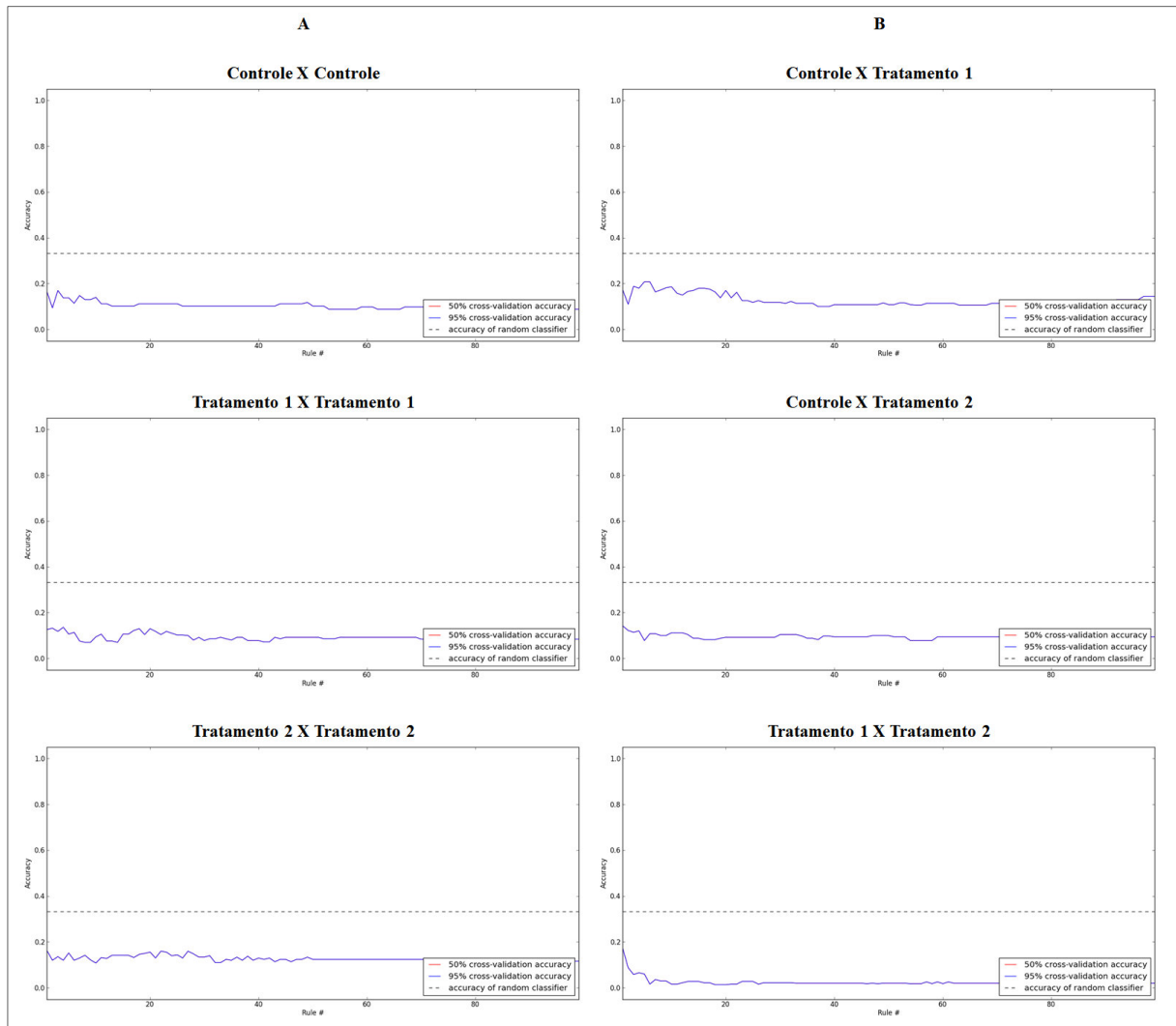


Figura 8. Resultados da análise em CPA. Resultado gráfico gerado pelo CPA após identificar, analisar e classificar os objetos: (A) gráficos gerados pelo CPA na comparação das imagens por grupo; e (B) gráficos gerados pelo CPA na comparação das imagens entre os grupos.

Através das análises não foi possível diferenciar os tratamentos aplicados. Apenas a relação entre imagens originadas do tratamento 1 em relação ao tratamento 2 apresentaram significância estatística. Entretanto, tal significância representa similaridade entre os tecidos. Todos os tecidos analisados foram identificados pelo CPA como amostras similares, não apresentando diferenciação do impacto do glifosato através da leitura de dados pelo programa. Com isto, não foi possível diferenciar as imagens analisadas entre os diferentes tratamentos e o grupo controle.

4 DISCUSSÃO

Há evidências de que o glifosato seja responsável pela fitotoxicidade vegetal (CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2018; FENG et al., 2018; FLORENCIA et al., 2017; TONG et al., 2017) e alterações no desenvolvimento vegetal (FENG et al., 2018; VILA-AIUB; CASAS; GUNDEL, 2018). Resíduos livres do composto no solo podem ser absorvidos, metabolizados e transportados por vegetais distantes da cultura principal (FLORENCIA et al., 2017; TONG et al., 2017). Ainda, Cardoso-Gustavson et al. (2018) relatam que, apesar das evidências do impacto fenotípico do glifosato, a alteração na anatomia da planta precisam ser melhor esclarecidas. Este estudo evidenciou a interferência do glifosato nos vegetais onde foi aplicado, mesmo em doses subletais, reforçando o interesse no estabelecimento de um método prático sugerindo uma análise automatizada de imagens.

Estudos recentes têm aplicado tecnologias a desenvolver métodos para a melhor identificação histológica e anatômica em vegetais (BRICHET et al., 2017; HECKWOLF et al., 2015; LEGLAND et al., 2017; MAKANZA et al., 2018; PACE et al., 2014; ZHANG et al., 2018). O uso de novas metodologias com base em análises de imagens tem favorecido: caracterizações genotípicas (BRICHET et al., 2017; HECKWOLF et al., 2015; LEGLAND et al., 2017), fenotípicas (PACE et al., 2014) e fisiológicas (HECKWOLF et al., 2015), identificação do impacto de fatores ambientais na composição química e histologia da planta (LEGLAND et al., 2017), caracterização biomecânica das estruturas (ZHANG et al., 2018) e redução de custos (MAKANZA et al., 2018). O presente estudo contribui com evidências de um modelo aplicado ao software CellProfiler e CellProfiler Analitics para análises automatizadas de características morfoanatômicas de vegetais de baixo custo e com ampla aplicabilidade.

Métodos são estudados visando a possibilidade de obter dados com qualidade e valor econômico agregado, considerando restrições nos recursos para estudos (MAKANZA et al., 2018), melhor desempenho de cultivos (HECKWOLF et al., 2015), possibilidade de aplicação de técnicas simples e disponíveis para novos estudos (LEGLAND et al., 2017). A análise pelos softwares CP e CPA demonstrou atender

satisfatoriamente requisitos técnicos de leitura com base em baixo investimento econômico e preparação de amostras com métodos simples e tradicionais.

Processos automatizados têm sido utilizados através de procedimentos técnicos de digitalização e criação de softwares em busca de maior aproveitamento das análises (CARPENTER et al., 2006; MARIÉ et al., 2014). Entretanto, a escolha precisa do processo de digitalização e construção e aplicação dos softwares têm sido fator limitante para algumas análises (MARIÉ et al., 2014). Os CP e CPA possibilitaram as análises dos tecidos vegetais estudados, sendo uma contribuição para análises científicas em estudos de plantas.

Estudos apontam para a mudança de morfologia diante de fatores ambientais (HECKWOLF et al., 2015; LEGLAND et al., 2017) com variações múltiplas para características genotípicas em feixes vasculares de milho, por exemplo (HECKWOLF et al., 2015). Aplicação de técnicas simples e com uso tecnológico de softwares tem demonstrado útil para entendimento de impacto ambiental sobre a histologia das plantas (LEGLAND et al., 2017). As análises possibilitadas pelos CP e CPA não puderam ser conclusivas quanto ao impacto do glifosato na morfoanatomia da folha do milho, mas apontam caminhos para desenvolvimento de novos métodos de cultivos em busca de novas descobertas.

5 CONCLUSÃO

O atual estudo propicia um caminho de evolução metodológica. Embora não tenha havido identificação de variações na estrutura celular entre grupos de tratamento através da análise automatizada de imagem no CP e no CPA, os resultados evidenciam um valor científico plausível para análises teciduais em plantas, ou seja, os CP e CPA foram capazes de realizar a análise das imagens automaticamente a partir dos algoritmos definidos no estudo.

Sugere-se desenvolvimento de novos estudos considerando a possibilidade de metodologias diferenciadas para cultivo, mantendo-se o preparo de lâminas conforme modelo adotado neste estudo, tendo em vista a relevância econômica e acessibilidade aos recursos. Quanto a aplicação dos programas livres, CP e CPA, as análises automatizadas apresentaram-se promissoras e sugere-se implementação do método em novos estudos.

REFERÊNCIAS

- BRICHET, N. et al. A robot-assisted imaging pipeline for tracking the growths of maize ear and silks in a high-throughput phenotyping platform. **Plant Methods**, v. 13, n. 96, p. 1–12, 2017.
- CARDOSO-GUSTAVSON, P. et al. Imaging of glyphosate uptake and identification of early microscopic markers in leaves of C3 and C4 glyphosate-resistant and -susceptible species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 502–513, 2018.
- CARPENTER, A. E. et al. CellProfiler : image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. **Genome Biology**, v. 7, n. 10, p. R100.1-11, 2006.
- CLARKE, J. L.; ZHANG, P. Plant biotechnology for food security and bioeconomy. **Plant Molecular Biology**, v. 83, p. 1–3, 2013.
- D'AVIGNON, D. A.; GE, X. In vivo NMR investigations of glyphosate influences on plant metabolism. **Journal of Magnetic Resonance**, 2018.
- DAMGAARD, C. et al. The effect of glyphosate on the growth and competitive effect of perennial grass species in semi-natural grasslands. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 49, n. 12, p. 897–908, 2014.
- FENG, X. et al. Non-destructive Determination of Shikimic Acid Concentration in Transgenic Maize Exhibiting Glyphosate Tolerance Using Chlorophyll Fluorescence and Hyperspectral Imaging. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 468, p. 1–16, 2018.
- FLORENCIA, F. M. et al. Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 360–368, 2017.
- GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 17, p. 4691–4703, 2014.
- HECKWOLF, S. et al. Image analysis of anatomical traits in stalk transections of maize and other grasses. **Plant Methods**, v. 11, n. 26, p. 1–10, 2015.

HEDVAT, C. V. Digital Microscopy: Past, Present and Future. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, p. 1666–1670, 2010.

IARC. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1–119. 2015. Disponível em: < <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>>. Acessado em: 28 set 2017.

LEGLAND, D. et al. Histological quantification of maize stem sections from FASGA - stained images. **Plant Methods**, v. 13, n. 84, p. 1–11, 2017.

MACEDO, N. D. et al. Objective detection of apoptosis in rat renal tissue sections using light microscopy and free image analysis software with subsequent machine learning Detection of apoptosis in renal tissue. **Tissue and Cell**, v. 49, n. 1, p. 22–27, 2017.

MAKANZA, R. et al. High-throughput method for ear phenotyping and kernel weight estimation in maize using ear digital imaging. **Plant Methods**, v. 14, n. 49, p. 1–13, 2018.

MANZKE, M. E. **Bula Dose Unica Glifosato Dipil 480 Herbicida** Dipil Indústria Química, , 2017.

MARIÉ, C. LE et al. Rhizoslides: paper-based growth system for non-destructive , high throughput phenotyping of root development by means of image analysis. **Plant Methods**, v. 10, n. 13, p. 1–16, 2014.

MITTAG, A. et al. Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets. **Cytometry Part A**, v. 65, n. 2, p. 103–115, 2005.

PACE, J. et al. Analysis of Maize (Zea mays L .) Seedling Roots with the High-Throughput Image Analysis Tool ARIA (Automatic Root Image Analysis). **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2014.

REXHEPAJ, E. et al. A Texture Based Pattern Recognition Approach to Distinguish Melanoma from Non-Melanoma Cells in Histopathological Tissue Microarray Sections. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–15, 2013.

SOUZA, J. L. DE. **Agricultura Orgânica: tecnologias para produção de alimentos**. 3. ed. [s.l.] Incaper, 2015.

SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J.O.M. Patologia de Sementes Florestais. Colombo, **PR: EMBRAPA**, 2011. 236 p.

TÁRNOK, A. Innovations in image cytometry. **Cytometry Part A**, v. 81A, p. 183–184, 2012.

TONG, M. et al. The Uptake, Translocation, Metabolism and Distribution of Glyphosate in Non-target Tea Plant (*Camellia sinensis* L .) The Uptake, Translocation, Metabolism and Distribution of Glyphosate in Non-target Tea Plant (*Camellia sinensis* L .). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1–35, 2017.

VENKATESH, T. V et al. Compositional analysis of grain and forage from MON 87427, an inducible male sterile and tissue selective glyphosate-tolerant maize product for hybrid seed production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 1964–1973, 2014.

VILA-AIUB, M.; CASAS, C.; GUNDEL, P. E. The role of plant size in the selection of glyphosate resistance in *Sorghum halepense*. **Pest Management Science**, v. 74, n. 11, p. 2460–2467, 2018.

ZHANG, Y. et al. High-throughput micro-phenotyping measurements applied to assess stalk lodging in maize (*Zea mays* L .). **Biological Research**, v. 51, n. 40, p. 1–14, 2018.