

TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA PARA DIAGNÓSTICO DO ATAQUE DE PATÓGENO

BIANCA, B. BARRETO¹, MARCO TULIO DE FREITAS REIS², MELISSA CASSOU TRINDADE³, LETÍCIA PIAZENTIN DANTAS⁴, HELGA, M. DAREZZO⁵, DÉBORA, M. B. P. MILORI⁶

¹ Pós-Doutoranda, Embrapa Instrumentação, babarreto89@gmail.com.

² Graduando em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, marcotuliodtna@gmail.com

³ Graduanda em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, mell.trindade13@gmail.com

⁴ Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, leticiadantas@estudante.ufscar.br

⁵ Pós-Doutoranda, Embrapa Instrumentação, darezzohelga@gmail.com

⁶ Pesquisadora, Embrapa Instrumentação, debora.milori@embrapa.br

Apresentado no
LII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2023
18 a 21 de outubro de 2023 – Ribeirão Preto - SP, Brasil

RESUMO: Com o crescimento da produção da cultura do algodão no Brasil, houve também um aumento expressivo de doenças nas últimas décadas. Tanto os patógenos habitantes do solo, como os que causam manchas foliares, tem causado grande prejuízo à cultura do algodão, afetando drasticamente seu rendimento. Dentre os principais patógenos do algodão, o nematoide *Aphelenchoides besseyi* têm ganhado destaque por também causar doença na cultura da soja, conhecida como Soja Louca II, este também pode causar danos irreversíveis à produção. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o sistema de imagem de fluorescência para detectar o ataque de nematoide à cultura do algodão, com os ensaios conduzidos em casa de vegetação. Esta é uma técnica que permite caracterizar características fisiológicas da planta, incluindo a eficiência fotossintética, e tem potencial para detectar precocemente o ataque do patógeno. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em ambiente controlado com plantas com plantas saudáveis e plantas e com a inoculação do nematoide. Os resultados mostram que a técnica de imagem de fluorescência foi capaz de identificar as plantas saudáveis e as plantas inoculadas com o patógeno.

PALAVRAS-CHAVE: Imagem de fluorescência, algodão, patógeno

FLUORESCENCE TECHNIQUE FOR DIAGNOSIS OF PATHOGEN ATTACK

ABSTRACT: With the growth of cotton production in Brazil, there has also been a significant increase in diseases in recent decades. Both soil-dwelling pathogens and those that cause leaf spots have caused great damage to cotton, drastically affecting its yield. Among the main pathogens of cotton, the nematode *Aphelenchoides besseyi* has gained prominence for also causing disease in soybean, known as Soja Mad II, which can also cause irreversible damage to production. Thus, the objective of this work was to use the fluorescence imaging system to detect the nematode attack on cotton, with the tests carried out in a greenhouse. This is a technique that allows characterizing the physiological characteristics of the plant, including photosynthetic efficiency, and has the potential to early detect the attack of the pathogen. The experiment was carried out in a greenhouse, in a controlled environment with plants with healthy plants and plants and with the inoculation of the nematode. The results show that the fluorescence imaging technique was able to identify healthy plants and plants inoculated with the pathogen.

KEYWORDS: Fluorescence image, cotton, pathogen

INTRODUÇÃO: Atualmente o Brasil é o quarto maior produtor e o segundo maior exportador da fibra do algodão e o maior produtor de soja no mundo. Na safra de 2021/2022 o país produziu cerca de 140 milhões de toneladas de grãos de soja. Na mesma safra, observou-se uma produção de pluma do algodão de 2,82 milhões de toneladas, (CONAB, 2022). Como consequência do crescimento da cultura no Brasil, houve um aumento expressivo de doenças nas últimas décadas. Tanto os patógenos habitantes do solo, como os que causam manchas foliares, tem causado grande prejuízo à cultura do algodão, afetando drasticamente seu rendimento (FAVORETO et al., 2018). Na ausência de medidas de controle em tempo adequado ou controle químico efetivo, as perdas são expressivas, tanto em termos de rendimento da cultura, quanto em relação à qualidade da fibra, proporcionando grandes prejuízos econômicos. Dentre os principais patógenos do algodão, o nematoide *Aphelenchoides besseyi* têm ganhado destaque por também causar doença na cultura da soja, conhecida como Soja Louca II. Nas plantas do algodão, os primeiros sintomas do ataque deste patógeno foram identificados em 2017 e incluem clorose, enrugamento de folhas, perda de botões florais e engrossamento de nós, similares aos observados na soja. Em experimento em casa de vegetação, os sintomas da doença apareceram 12 dias após a inoculação com o patógeno (GALBIERI, 2021). Como a doença é recente na cultura do algodão e da soja, ainda não há meios efetivos de controle nem técnicas ou métodos para detecção precoce do ataque do *A. besseyi*. Uma possibilidade é o uso de técnicas fotônicas para detectar precocemente nas plantas os estresses causados patógenos (Pérez Bueno et al., 2016). A fotônica é um ramo da física que estuda aplicações da luz, como a sua geração, manipulação e detecção. As técnicas fotônicas, que usam inclusive lasers de baixa e alta potência, são largamente aplicadas em várias áreas por sua sensibilidade, precisão e alto potencial de portabilidade (Cardinali, et al., 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o sistema de imagem de fluorescência para detectar o ataque de nematoide à cultura do algodão, com os ensaios conduzidos em casa de vegetação. Esta é uma técnica que permite caracterizar características fisiológicas da planta (CHAERLE, et al., 2007; HAN et al., 2019), incluindo a eficiência fotossintética, e tem potencial para detectar precocemente o ataque do patógeno. Quanto maior a atividade fotossintética, menor será a fluorescência da clorofila, sendo grandezas inversamente proporcionais. Frequentes modificações na atividade fotossintética causam mudanças na cinética de emissão da fluorescência da clorofila e podem indicar estresses bióticos e abióticos (ROSSEAU et al., 2013; YUSUF et al., 2010).

MATERIAL E MÉTODOS: Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com ambiente controlado: temperatura do ar em 30°C e umidade relativa do ar em 80%. Fornecidas pelo IMA Instituto Mato-Grossense do Algodão, as sementes de algodão da cultivar IMA 5801B2RF, Campo 2OP Safra 2019/20, foram cultivadas em vasos de 650 ml e substrato, na densidade de duas por vaso. A inoculação do nematoide foi feita 8 dias após a semeadura com o auxílio de um borrifador a uma concentração de 6.000 nematoides/planta em solução aquosa. Foram utilizados seis vasos com plantas inoculadas e seis vasos com plantas livres do patógeno (Figura 1a). As medições foram realizadas durante 15 dias após a inoculação, duas vezes ao dia, uma às 08h30 e outra às 14h30, após um período de 30 min no escuro para inativar a atividade fotossintética. A medição da cinética de fluorescência da clorofila possibilita observar a dinâmica fotossintética das plantas de uma maneira não invasiva. Uma planta saudável e adaptada ao escuro possui uma ótima capacidade de converter a energia fotossintética, implicando em um rendimento da fluorescência da clorofila mínimo (F_0), uma vez que são propriedades inversamente proporcionais. O rendimento fotossintético pode ser mínimo quando um pulso de luz forte congestiona a via de transporte de elétrons da fotossíntese e, dessa forma, o rendimento da fluorescência da clorofila se torna máximo (F_m). O instrumento usado nas medições (Figura 1b) possui uma câmera CCD, quatro painéis de LED fixos que fornecem irradiância uniforme em uma área de 90 x 90 mm adequada para imagens de pequenas plantas, e uma roda de filtro equipada com 5 filtros de emissões diferentes. As imagens geradas do sinal de fluorescência são apresentadas em escala

de cores, e são induzidas por luz actinic (vermelho-laranja 617 nm) ou flashes de saturação (cool white 6500K).

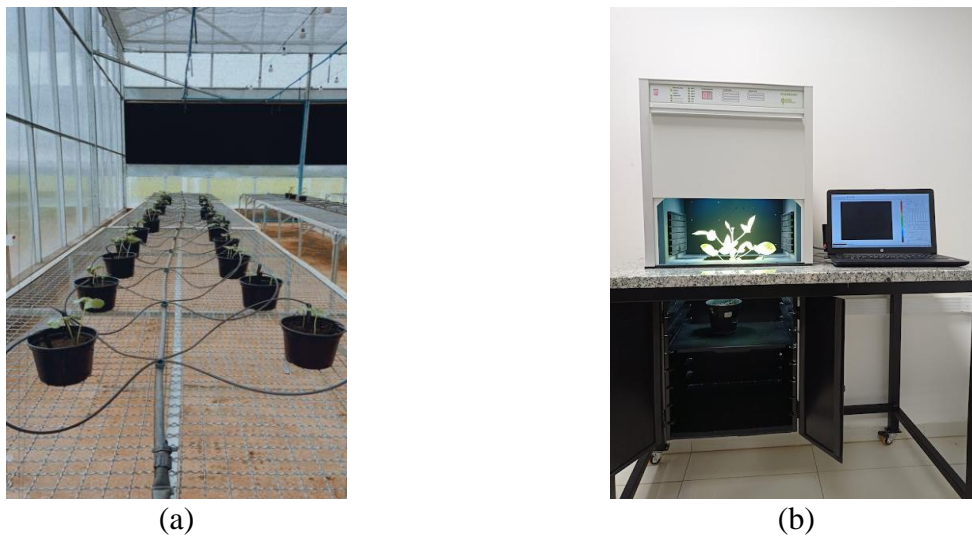


Figura 1 (a) condução do experimento em casa de vegetação e (b) equipamento para medição da fluorescência FluorCam.

Um dos protocolos utilizados para as medições foi o Actinic Light Curve II, que já possuía parâmetros pré-definidos, porém que foram ajustados no programa FluorCam 7.0 de acordo com cada amostra (Figura 2). Os parâmetros ajustáveis foram: i) Shutter, tempo de abertura da câmera, equivalente a 20us; ii) Flashes, ajuste da sensibilidade para manter a cor da escala da amostra em 500; iii) Act 2, ajuste da intensidade para manter a cor da amostra na escala entre 1.000 e 1.500; e iv) Super, pulso de saturação, para manter a imagem da amostra branca. Esse protocolo mede primeiramente a emissão de fluorescência mínima F_0 e a emissão de fluorescência máxima F_m . Em seguida, uma sequência pré-estabelecida das luzes de LED se repetiam seis vezes para a obtenção de seis picos de fluorescência, onde todos os parâmetros são medidos. Para a obtenção dos resultados e confecção de planilhas, foram selecionadas duas regiões de interesse na imagem obtida, referentes a cada uma das plantas que constituíam a amostra em análise, contendo apenas a parte aérea das mesmas, exemplificado pela Figura 2. Para a obtenção dos dados das avaliações fotônicas das plantas de milho, foram selecionadas áreas de cada amostra no programa FluorCam7 e submetidas à análise. Primeiramente selecionou-se, automaticamente, a área da planta da imagem de fluorescência, delimitando a área de interesse para o estudo. Com estes protocolos, foram obtidos 80 parâmetros por planta, extraídos pelo programa, a partir das imagens geradas pelo equipamento. Para cada um dos parâmetros, o programa forneceu a média e desvio padrão da imagem de cada planta que foram extraídos e tabelados, indicando em verde os valores da média e em vermelho os valores do desvio padrão de cada parâmetro. E, posteriormente, analisados em programas desenvolvidos no Python. Enquanto a média serve para avaliar como o parâmetro varia à medida que a doença progride, o desvio padrão indica se esse parâmetro é uniforme ou heterogêneo na imagem em cada medição. Todo o processamento dos dados e implementação do modelo foi realizado em Python, com as bibliotecas numpy e pandas, para a manipulação e visualização dos dados, e a biblioteca scikit-learn para o processamento dos dados e implementação dos modelos de classificação. O Google Colab foi adotado como editor principal para escrita dos códigos. O processamento dos dados seguiu as seguintes etapas: padronização, exploração e classificação do conjunto de dados. A

padronização dos dados visa tratar os dados para viabilizar a aplicação de algoritmos de classificação no contexto de aprendizagem de máquina ao identificar a métrica e a normalização utilizada e permitir a remoção de outliers. A exploração é realizada com intuito de explorar e visualizar os dados, podendo ser por meio de mapas, que permitem a identificação de padrões nestes dados. E, a classificação, que busca por meio de modelos identificar plantas das diferentes classes estudadas, assim, o algoritmo de treino utilizado aprende a relação entre as características do indivíduo e a variável alvo, o que permite classificar se a planta está sofrendo algum ataque ou se está saudável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Foram geradas 360 observações de plantas que sofreram ataques do nematoide e 360 observações de plantas que não sofreram o ataque, com 80 atributos de médias dos parâmetros e 80 atributos de desvios padrões dos parâmetros. A Figura 2 ilustra a correlação entre estes parâmetros, no qual o agrupamento de cores indica alta correlação entre as variáveis, no qual cores idênticas próximas indicam correlação entre os parâmetros.

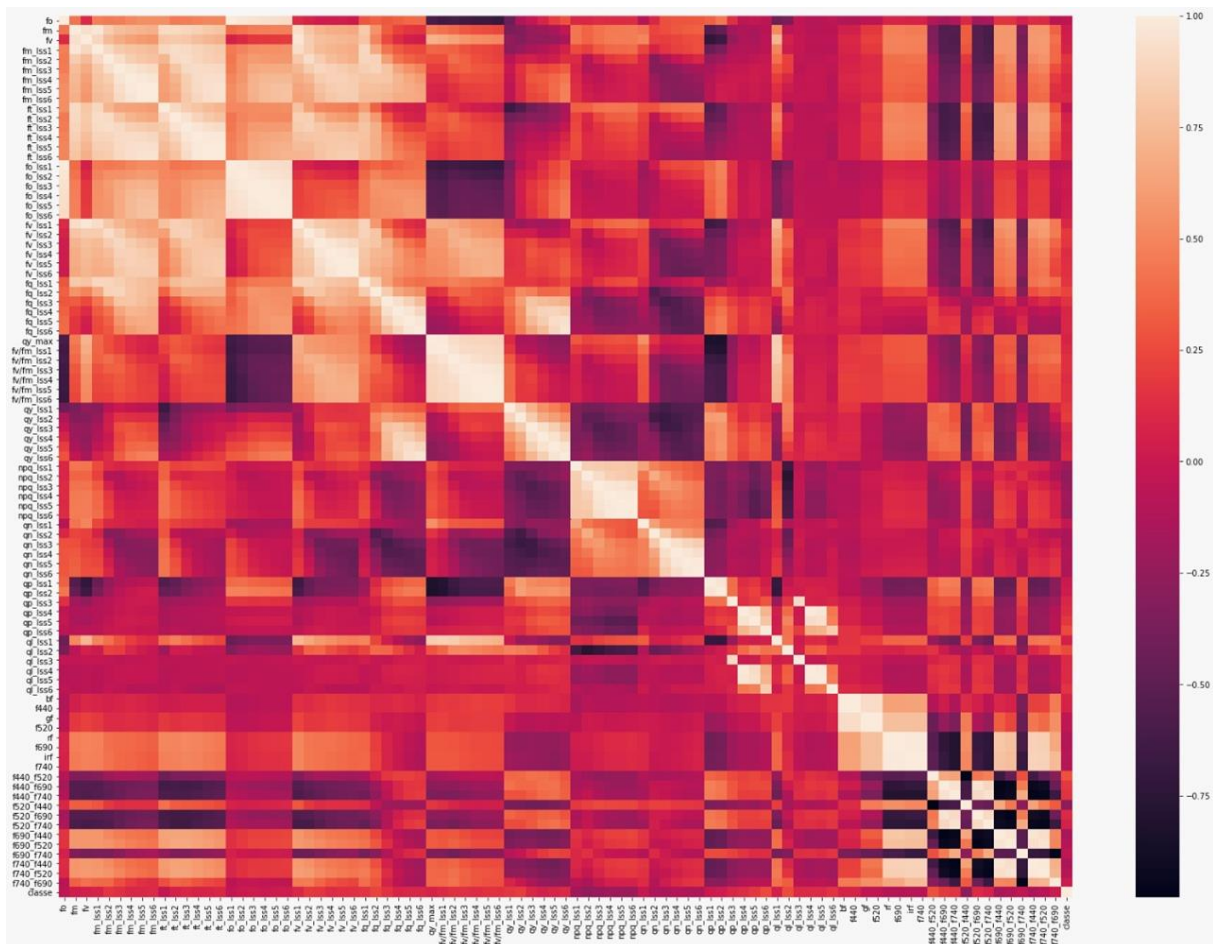


Figura 2 Correlação entre os parâmetros

Com os atributos padronizados e utilizando o modelo de aprendizado de máquina Support Vector Machine (SVM) e Recursive Feature Elimination (RFE), conseguiu-se uma taxa de acerto de 78% em todas as variáveis. A Figura 3 mostra a matriz de confusão com os resultados de 105 amostras Verdadeiro Negativo (0, 0), 39 para Falso Positivo (1, 0), 30 para Falso Negativo (0, 1) e 104 para Verdadeiro Positivo (1, 1). Nem todos os parâmetros, média ou desvio padrão, foram bons atributos para a classificação, mas o parâmetro da fluorescência em GF, em nm, permitiu a diferenciação entre as classes nove dias após a inoculação.

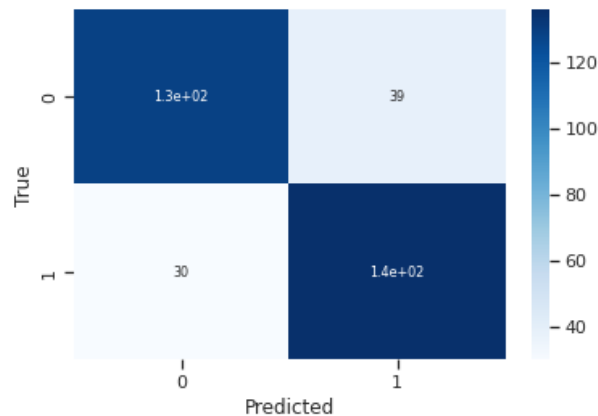


Figura 3 matriz de confusão para classificação de inoculadas e testemunhas

Na Figura 4 é possível visualizar esta diferença, em que a classe 1, representada pela cor verde, representa a classe as plantas inoculadas e a classe 0, representada pela cor roxa, as plantas sadias. Seleção de atributos pode ajudar a encontrar outros atributos que também permitam a diferenciação das classes e que possam ser usados para monitoramento da evolução da doença

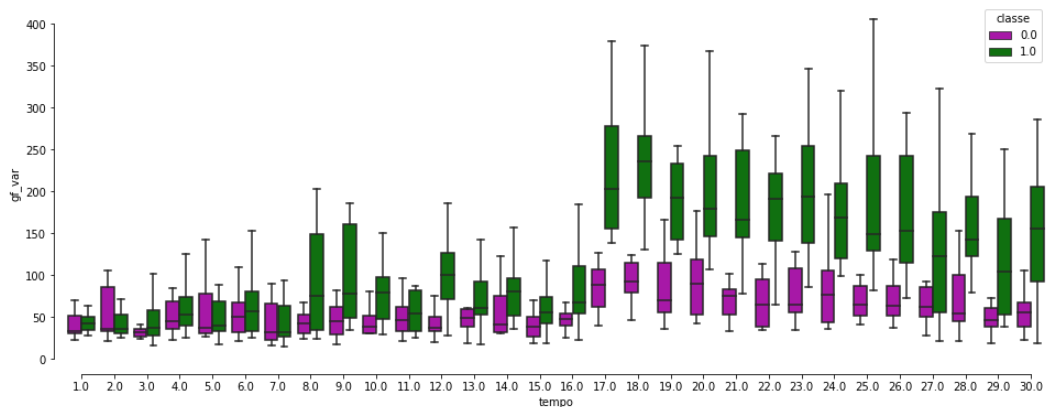


Figura 4 Evolução do parâmetro de fluorescência GF em função do tempo, a partir da inoculação.

A Figura 5 mostra as amostras analisadas em fase assintomática e sintomática em fase inicial. Os sintomas apareceram com 15 dias após a inoculação. Mostrando que a técnica utilizada é sensível para diagnosticar em fase inicial, ainda assintomática, plantas de algodão quando sofrem ataque de nematoide *A. besseyi*. A técnica de imagem de fluorescência para detectar plantas com incidência de nematoide *A. besseyi* na cultura do algodão é inédita. Entretanto, Esta já foi usada para detectar a detecção de outros patógenos e outras culturas (Ortiz-Bustos et al., 2016; Cen et al., 2017; Senesi et al., 2022).

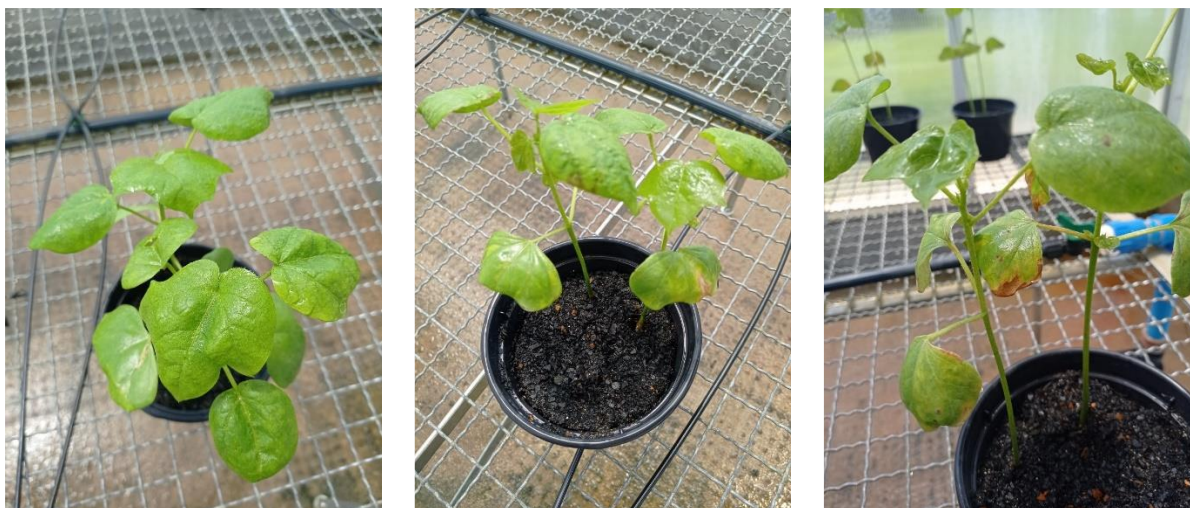


Figura 5 Amostras de algodão inoculadas com nematoide *A. besseyi*. em fase assintomática e sintomática inicial.

CONCLUSÕES: Com este trabalho concluiu-se que a imagem de fluorescência é uma técnica que pode ser usada para detectar precocemente o ataque de *A. besseyi* na cultura do algodão em ambiente controlado, com três dias antes dos sintomas visuais aparecerem. Mais experimentos e melhores formas de tratamento de dados são necessários para reduzir o tempo de detecção e para avaliar se a técnica diferencia outros tipos de estresses.

AGRADECIMENTOS: Este trabalho foi financiado por Embrapa instrumentação, CAPES, CNPq, FAPESP, COMDEAGRO e IMA.

REFERÊNCIAS:

- CARDINALI, M.C.D.B, et al. Infrared spectroscopy: a potential tool in huanglongbing and citrus variegated chlorosis diagnosis. *Talanta*, 91, 1–6, 2012.
- CEN H et al. Chlorophyll Fluorescence Imaging Uncovers Photosynthetic Fingerprint of Citrus Huanglongbing. *Front. Plant Sci.* 8:1509, (2017).
- CHERLE, L. et al. “Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging”. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 4, p. 773–784, mar. (2007).
- FAVORETO, L et al., “First Report of *Aphelenchoides besseyi* Infecting the Aerial Part of Cotton Plants in Brazil”. *Plant Disease*. V 102, n. 12 p. 2662 (2018).
- GALBIERI R., “*Aphelenchoides besseyi* no algodoeiro,” XI Encontro Técnico Algodão Fundação Mato Grosso Integração: A chave que abre nossos horizontes (2021).
- HAN, D. et al. “Development of high-speed dual-camera system for batch screening of aflatoxin contamination of corn using multispectral fluorescence imaging”. *Transactions of the ASABE*, v. 62, n. 2, p. 381–391 (2019).
- ROUSSEAU, C.; BELIN, E.; BOVE, E.; ROUSSEAU, D.; FABRE, F.; BERRUYER R.; GUILLAUMÉS, J.; MANCEAU, C.; JACQUES, M.A.; BOUREAU, T. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9:17 (2013)
- PEREZ-BUENO, F. M., and Baron, M. Multicolor fluorescence imaging as a candidate for disease detection in plant phenotyping. *Front. Plant Sci.* 7:1790, 2016.
- ORTIZ-BUSTOS CM, et al. Fluorescence Imaging in the Red and Far-Red Region during Growth of Sunflower Plantlets. Diagnosis of the Early Infection by the Parasite. *Orobanche cumana*. *Front. Plant Sci.* 7:884. (2016).

SENESI, G.S., et al. Chlorophyll Fluorescence Imaging (CFI) and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) Applied to Investigate Tomato Plants Infected by the Root Knot Nematode (RKN) *Meloidogyne incognita* and Tobacco Plants Infected by Cymbidium Ringspot Virus. *Photonics* 9, 627, 2022.

YUSUF, M.A. et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: 33 Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1797, p. 1428- 1438 (2010)