

Fenotipagem de plantas: uma nova abordagem para um velho problema

Carlos Antônio Ferreira de Sousa¹

As técnicas tradicionais de fenotipagem de plantas, em geral, avaliam características integrativas, facilmente mensuráveis, relacionadas ao peso e ao tamanho dos órgãos e estruturas vegetais. Entre as vantagens destas técnicas, está a possibilidade das medições serem realizadas em qualquer horário, sem a necessidade de protocolo, preparação prévia da amostra, equipamentos sofisticados ou conhecimentos profundos para a obtenção e interpretação dos dados. Contudo, exigem a experimentação a campo, usam métodos destrutivos e demandam tempo, recursos e mão-de-obra. Apesar desses inconvenientes, tais técnicas continuam a ser amplamente empregadas em programas de pesquisa com plantas especialmente por dois motivos: 1. São altamente eficientes para discriminar genótipos quanto ao crescimento e produção, as características mais avaliadas nos programas de melhoramento genético vegetal clássico; 2. A experimentação a campo – e a consequente mensuração de variáveis relacionadas ao crescimento e produção – constitui a etapa final de validação de qualquer tecnologia que envolva plantas cultivadas.

Nos últimos anos, em razão dos desafios relacionados à competitividade e sustentabilidade do agronegócio, ao aumento e/ou manutenção da produtividade, além das mudanças climáticas globais, os pesquisadores têm buscado ou inserido em plantas, via engenharia genética, características fisiológicas, as quais precisam ser avaliadas de forma precoce, dinâmica e rápida, preferencialmente em larga-escala. Tais características incluem, por exemplo, tolerância a estresses ambientais, resistência a patógenos e pesticidas, superexpressão de determinado gene para produção de um metabólito específico e expressão de genes-repórteres. Estes emitem fluorescência em regiões específicas do espectro, demandando técnicas especiais de detecção. Para avaliar esses aspectos, a fenotipagem tem avançado em escala, precisão, reprodutibilidade e complexidade em relação às técnicas tradicionais, principalmente pelo uso de imagens geradas em diferentes regiões do espectro eletromagnético, a partir de diferentes técnicas espectroscópicas. Na Embrapa, a demanda por novos processos de fenotipagem de plantas surgiram fortemente a

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, e-mail: carlos.antonio@embrapa.br

partir dos programas de melhoramento genético de espécies consideradas *commodities* agrícolas. Diante desse cenário, a Embrapa Agroenergia, com apoio financeiro da Agência Brasileira de Inovação (FINEP), está adquirindo a infraestrutura necessária para a implantação de um laboratório de fenotipagem de plantas, com base em técnicas espectroscópicas, partir do projeto “Genética reversa e fenotipagem de alta precisão aplicadas à descoberta de genes/características de importância para Agroenergia”. A estrutura terá cinco módulos de geração de imagens 1. Imagens no padrão RGB (Red: Green: Blue); 2. Imagens de fluorescência da clorofila; 3. Imagens UV/VIS (ultravioleta/visível); 4. Imagens termográficas e; 5. Imagens no NIR (Near Infrared). Quando concluída, possibilitará a avaliação do crescimento das plantas, do aparato fotoquímico, dos teores de pigmentos, da temperatura e dos teores de água nas folhas. Devido à flexibilidade, poderá ser adaptada às espécies e às condições nas quais os programas de melhoramento genético vegetal da Embrapa são conduzidos. Consequentemente, ampliará qualitativa e quantitativamente a capacidade da Empresa em avaliar diferentes genótipos, em todas as fases dos seus programas de melhoramento, sejam convencionais ou biotecnológicos. A futura melhoria, ampliação e automação dos módulos de geração de imagens, a depender da planta, das condições de cultivo e das variáveis de interesse, poderão fazer com que a Embrapa alcance um novo patamar tecnológico na área de caracterização de plantas.

Por que avaliar plantas usando imagens espectroscópicas da parte aérea?

A imagem, de modo geral, gera impacto visual de tal magnitude no observador que, independente de estar associada a um dado científico, aplica-se muito bem ao ditado “a imagem fala por si só”. O uso de imagens na medicina é uma prática consolidada e, por isso mesmo, rotineiramente utilizada em hospitais e clínicas para auxiliar os médicos no diagnóstico precoce de doenças, nos procedimentos cirúrgicos, na descoberta do sexo dos bebês, entre outras aplicações. Em plantas, o uso de imagens para avaliação de determinada característica, similar ao que se faz na medicina, é relativamente recente. Contudo, mais recente é a tentativa de aplicação de imagens para avaliação de plantas em programas de pesquisa da forma que é feita atualmente, utilizando-se o conceito de plataformas de fenotipagem.

No caso das plantas, as técnicas normalmente utilizadas para a captura das imagens são rápidas, não invasivas, precisas, de baixo custo, livres de resíduos, com boa resolução espacial e temporal, permitem explorar áreas relativamente grandes, proporcionam grande número de repetições e praticamente não oferecem perigo ao operador. A automação do processo de obtenção das imagens, dependendo da planta, das condições de cultivo e das variáveis, viabiliza estudos comparativos e seleção fenotípica em larga-escala. Por fim, com a utilização dessas técnicas, será possível avaliar o impacto dos diferentes tipos de estresses sobre as plantas, sem a necessidade de destruí-las.

As plataformas de fenotipagem de plantas desenvolvidas atualmente dispõem basicamente de cinco tipos diferentes de sensores para a captura de imagens em diferentes regiões do espectro eletromagnético. São eles: sensores digitais para captura de imagens RGB, sensores no visível para a captura de imagens de pigmentos, sensores no infravermelho próximo para a captura de imagens relacionadas aos índices de água, sensores no infravermelho longo para a captura de imagens térmicas e sensores para a captura de fluorescência, especialmente de clorofilas. A seguir, alguns exemplos de aplicação dessas técnicas.

Imagens RGB

As imagens digitais coloridas no padrão RGB têm sido usadas para avaliar de forma dinâmica o crescimento de raízes e, principalmente, da parte aérea das plantas. As reproduções visuais geradas, depois de processadas, permitem a estimativa da altura, da largura, do número de folhas, do ângulo de inserção das folhas, da área foliar individual e da área projetada da parte aérea das plantas. Adicionalmente, com base nas variáveis anteriores, é possível, também, a estimativa da massa da parte aérea das plantas e a determinação do acúmulo de biomassa para cada estágio de crescimento em centenas de plantas simultaneamente, algo que não seria possível usando o tradicional método destrutivo. Uma vez que essas imagens são obtidas nas mesmas plantas a intervalos de tempo regulares no decorrer do período de cultivo, elas podem ser usadas para avaliar a taxa de crescimento expressa em área, massa ou altura, o que permite a obtenção de vários parâmetros fenotípicos relacionados ao crescimento, à produção (partição de assimilados) e à tolerância aos estresses (relação parte aérea/raiz, por exemplo). Na Figura 1, é possível observar

a alta correlação existente entre a massa seca da parte aérea de plantas de trigo estimada por meio das imagens RGB e aquelas obtidas pela coleta e pesagem das folhas.

Há várias plataformas de fenotipagem de plantas espalhadas pelo mundo que utilizam com sucesso a análise de crescimento com base em métodos não convencionais. É o caso, por exemplo, da plataforma para a fenotipagem de milho para

tolerância à seca, com capacidade para 480 plantas (Figura 2), descrita por Tardieu e Tuberosa (2010). Essa combina as medidas gravimétricas com o sistema de análise de crescimento de folhas pelo uso de transdutores de deslocamento, o qual permitiu a avaliação da taxa de crescimento de cada folha ao longo do período experimental, possibilitando o cálculo do tamanho médio da folha em cada fase do desenvolvimento da planta.

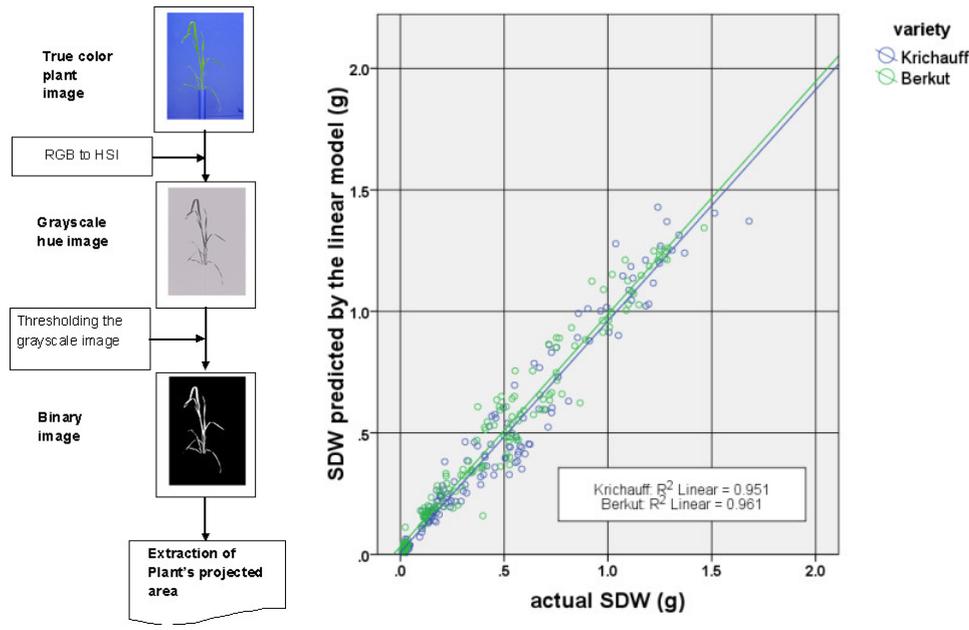


Figura 1. Passos para a captura e processamento de imagens RGB de plantas de trigo (esquerda) e correlação entre as medidas de massa seca da parte aérea estimadas pela imagem e aquelas obtidas pela pesagem (direita) (GOLZARIAN et al., 2011).

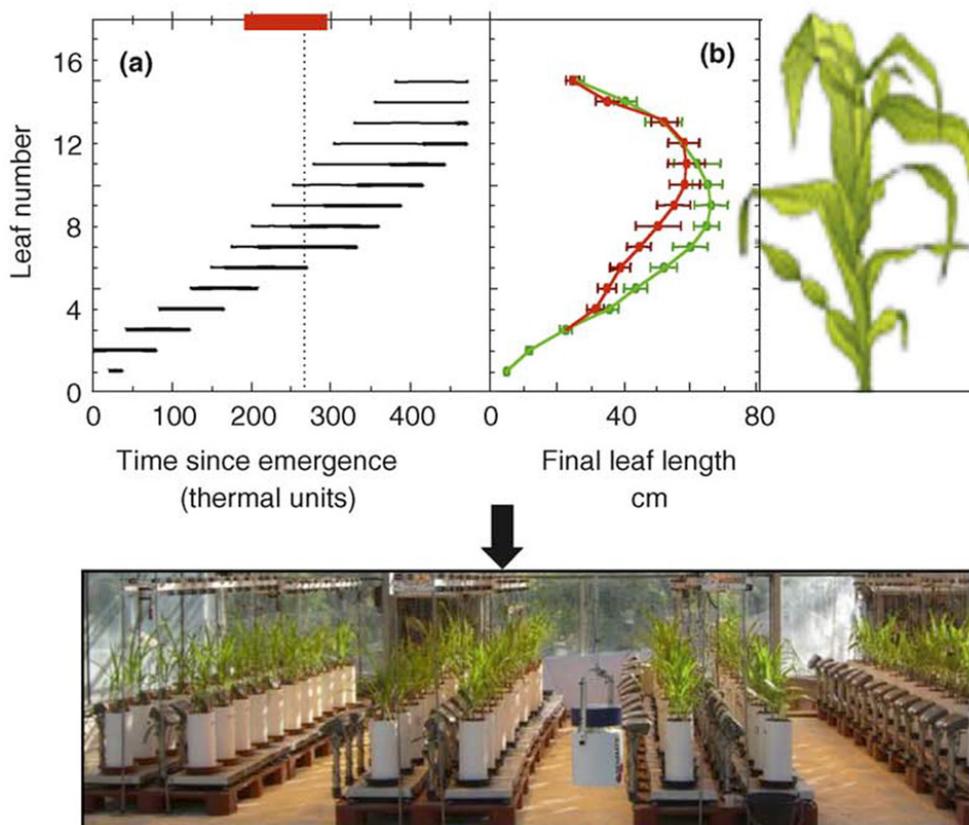


Figura 2. Duração do desenvolvimento com base em unidades térmicas (a) e comprimento (b) foliar de plantas de milho cultivadas em condições normais, comparadas às plantas submetidas ao déficit hídrico, em plataforma de fenotipagem para tolerância à seca (TARDIEU; TUBEROSA, 2010).

Imagens de fluorescência da clorofila

A premissa básica de se medir a fluorescência da clorofila, ao invés de outros pigmentos como forma de avaliar as plantas, é que todos os tipos de estresse, em última análise, interferem no processo fotossintético, no qual as clorofilas desempenham papel fundamental. E, se houver qualquer interferência na fotossíntese, todo o metabolismo da planta provavelmente será afetado. Usando imagens de fluorescência da clorofila, é possível avaliar precocemente o impacto de estresses ambientais sobre as plantas, antes do aparecimento de sintomas visuais. Na imagem abaixo, por exemplo, grupos de plantas de *Arabidopsis* foram submetidos às principais condições estressantes em ambiente tropical: alta intensidade de luz, alta temperatura e déficit hídrico. A imagem digital colorida das plantas praticamente não difere entre os tratamentos (Figura 3). Entretanto, o máximo rendimento quântico do fotossistema II (Fv/Fm) (imagem à direita) diminuiu drasticamente nas plantas sob alta intensidade de luz ou alta temperatura. Conforme esperado, nas plantas submetidas ao déficit hídrico, esse parâmetro praticamente não se alterou. No entanto, é possível avaliar o efeito do déficit hídrico nas plantas comparando o tamanho da área foliar, uma variável que pode ser obtida pela técnica de fluorescência da clorofila por imagem.

O teste de milhares de moléculas de herbicidas a cada ano pela indústria de pesticidas poderia ser inviabilizado, se todas as avaliações tivessem que ser realizadas em campo. Segundo Barbagallo et al. (2003), estes testes atualmente são viabilizados pela técnica de fluorescência da clorofila por imagem. No exemplo da Figura 4, aqueles pesquisadores aplicaram um herbicida que atua impedindo a síntese de aminoácidos ramificados, em uma via metabólica que, teoricamente, não está relacionada à fotossíntese. Imediatamente antes da aplicação do produto, as plantas apresentavam bom aspecto visual (3-A) e nenhuma alteração na fluorescência da clorofila (3-D). No entanto, a partir de 24 horas (3-E) e, principalmente, 48 horas (3-F) após a aplicação do herbicida, as plantas tratadas reduziram drasticamente a capacidade fotossintética, antes do aparecimento de sintomas visuais (3-B e 3-C, respectivamente). A ampliação da imagem digital (3-G) e da imagem de fluorescência da clorofila (3-H) permite uma melhor visualização dos resultados. Esta é uma comprovação prática de que um tipo de estresse que não está diretamente relacionado à fotossíntese, inevitavelmente a impactará devido às inter-relações metabólicas das plantas.

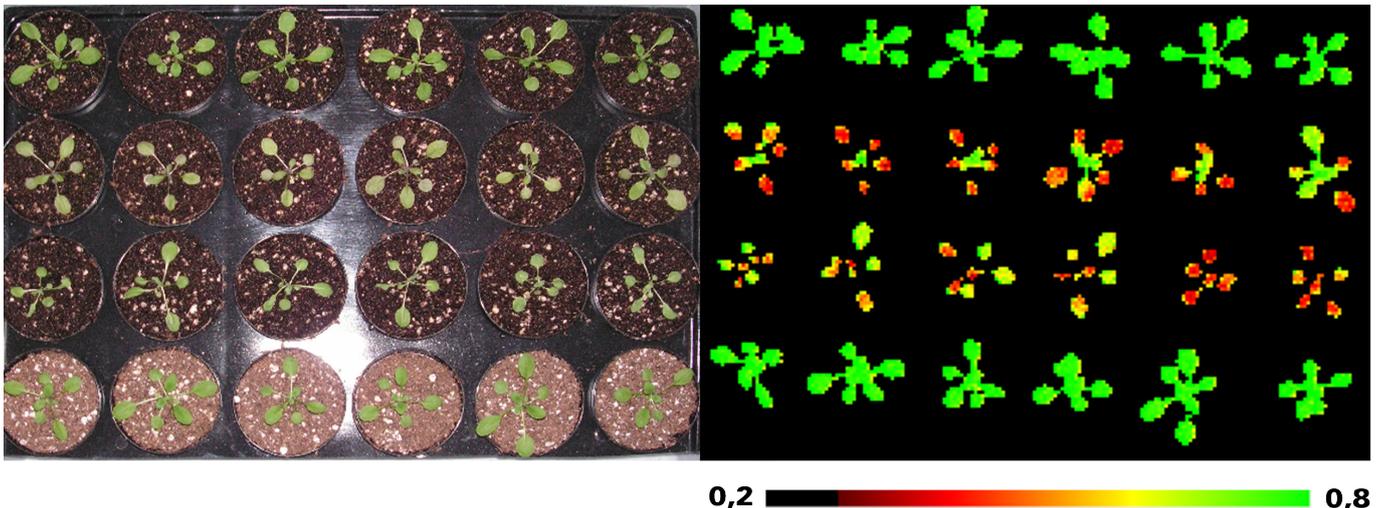


Figura 3. Imagem digital colorida (esquerda) e imagem do parâmetro de fluorescência da clorofila Fv/Fm (direita) de plantas de *Arabidopsis* (ecótipo An-1) sob condições normais (Linha A), alta intensidade de luz (Linha B), alta temperatura (Linha C) e déficit hídrico (Linha D). (SOUSA et al., 2010).

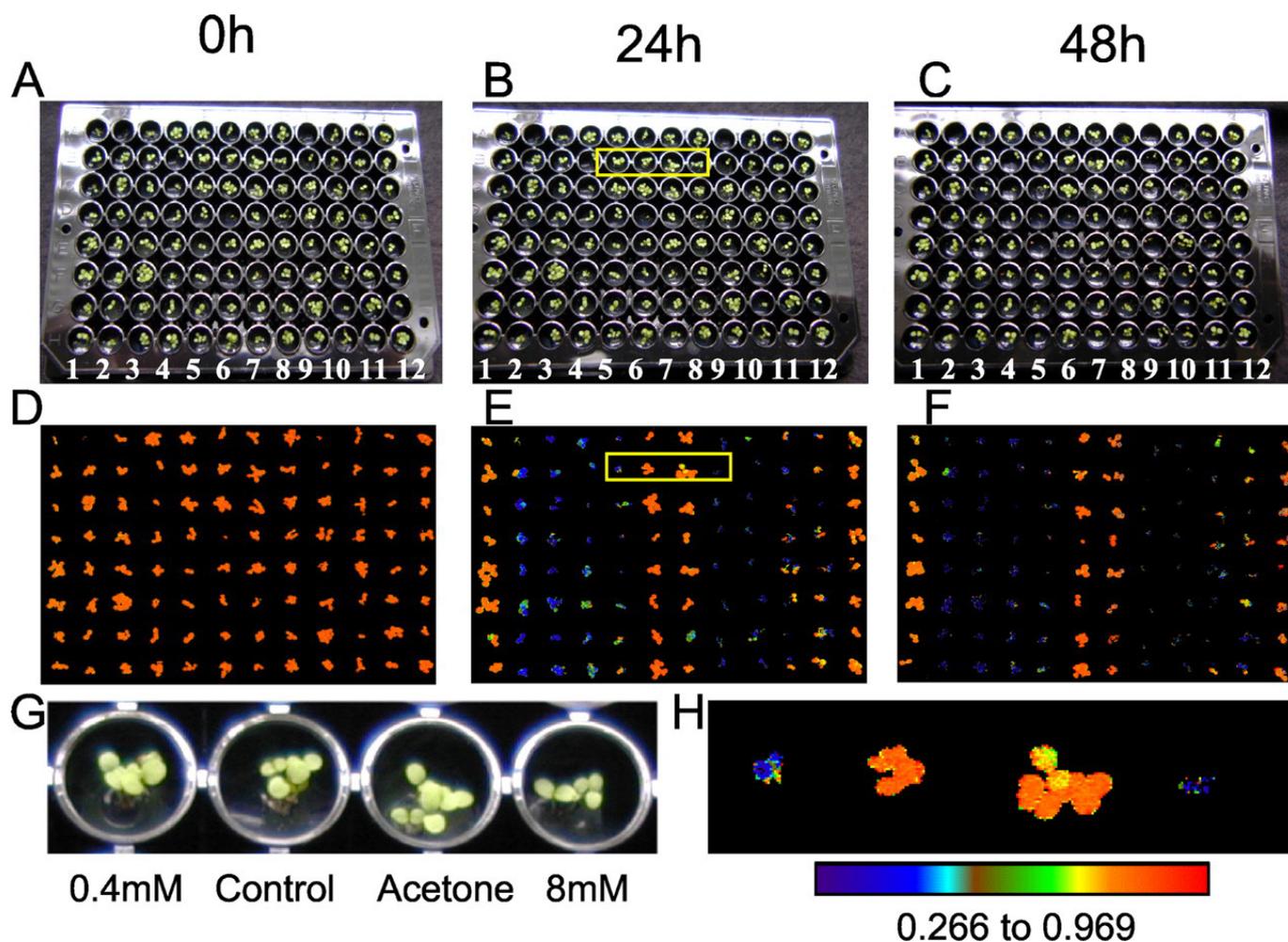


Figura 4. Uso da fluorescência da clorofila para a detecção dos efeitos do herbicida Imazapyr sobre o metabolismo das plantas de *Arabidopsis*, antes do aparecimento de sintomas visuais (Barbagallo et al., 2003).

A – plantas de *Arabidopsis* aos quatro dias após a germinação, imediatamente antes do tratamento com 0,4 (linhas 5 e 11), 0,8 (linhas 4 e 10), 4 (linhas 3 e 9) e 8 (linhas 2 e 8) mm de Imazapyr em acetona 50% (v/v) + Tween 0,1% (v/v); as plantas nas linhas 6 e 12 são os controles não tratados, e plantas nas linhas 1 e 7 foram tratadas com acetona 50% (v/v) + tween 0,1% (v/v). As plantas tratadas conforme descrito em A são mostradas 24 h e 48 h após o tratamento em B e C, respectivamente. As imagens de fluorescência da clorofila do parâmetro, Fv/Fm, para as plantas indicadas em A, B, e C são mostrados em D, E e F, respectivamente. G e H correspondem às ampliações da imagem digital e do aprômetro Fv/Fm das plantas que estão delineadas pelas caixas amarelas em B e E, respectivamente. Os dados nas imagens de Fv/Fm mostrados em D, E, F e H, respectivamente, devem ser comparados com a paleta de cores mostrada abaixo do H.

Imagens de pigmentos

Todas as moléculas de pigmentos que absorvem radiação eletromagnética na faixa do visível e, conseqüentemente, determinam as cores das folhas são passíveis de terem seus teores estimados pelo método não destrutivo de sensoriamento remoto, com o uso da técnica de espectroscopia óptica por imagem. Apesar de representar pequena fração da diversidade de metabólitos presentes em uma folha vegetal, os pigmentos têm importância fundamental na captura da luz na faixa visível do espectro. As moléculas, cujas concentrações têm sido o alvo principal em plantas, incluem os pigmentos que estão localizados nos cloroplastos e diretamente ligados à fotossíntese, como as clorofilas e os carotenoides (carotenos e xantofilas), ou à proteção do aparato fotoquímico, como as antocianinas, localizadas no vacúolo. A determinação dos teores de clorofilas é utilizada para avaliar o *status* de nutrientes nas plantas e, juntamente aos carotenoides, para monitorar a fenologia foliar e avaliar os efeitos provocados por diferentes tipos de estresses, enquanto as xantofilas se correlacionam com a eficiência fotossintética.

As produções visuais relacionadas aos pigmentos foliares de plantas podem ser geradas desde a escala individual até a escala global, dependendo da

finalidade. A obtenção de imagens em escala foliar individual, com a utilização de fonte de luz artificial, tem por finalidade a determinação dos teores de pigmentos e implica a observação de alguns princípios fotônicos para ter validade científica, entre os quais estão a posição horizontal das folhas, sem sobreposição, e a manutenção da distância entre a fonte de luz e a folha a ser avaliada. Estes princípios não se aplicam às imagens obtidas em larga-escala como, por exemplo, imagens de satélites, cuja aplicação é diversa.

Inúmeras câmeras disponíveis no mercado são capazes de capturar imagens relacionadas aos teores de pigmentos em folhas. Matsuda et al. (2012), por exemplo, com uma câmara hiperespectral de alta resolução, construída inicialmente para uso em satélite, foram capazes de capturar imagens de folhas de *Arabidopsis* que se correlacionaram com os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e a relação carotenoides/clorofila *a* (Figura 5).

O parâmetro mais utilizado para a correlação com as clorofilas é o índice de vegetação por diferença normalizada ou “normalized difference vegetation index”, NDVI $[(NIR-R)/(NIR+R)]$, no qual R e NIR são os valores de refletância nas faixas do vermelho e do infravermelho-próximo do espectro eletromagnético,

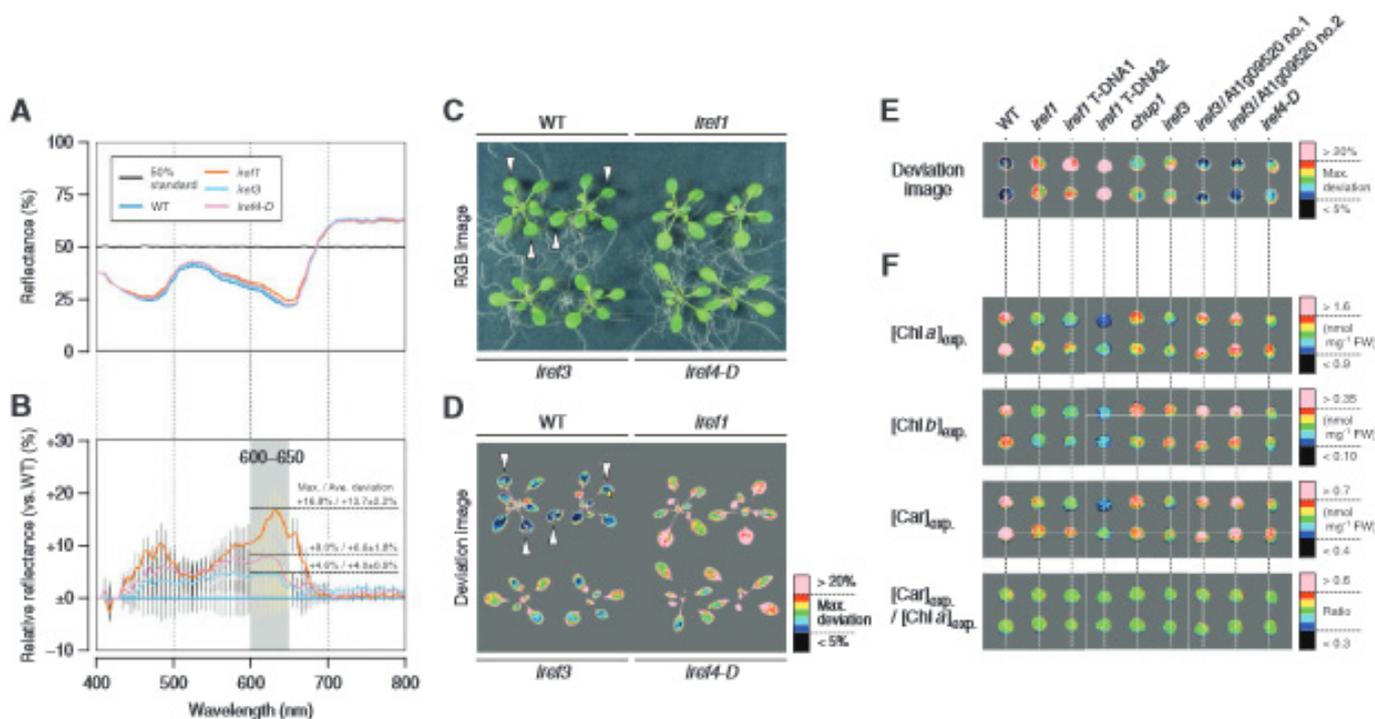


Figura 5. Medidas de refletância (a e b), imagens digitais RGB (c) e de refletância de pigmentos no visível (d) para processamento (e) e obtenção de imagens de parâmetros relacionados aos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e a relação carotenoides/clorofila *a* (f) em folhas de *Arabidopsis* (MATSUDA et al., 2012).

respectivamente. Os valores de NDVI podem variar de -1 a +1. Quanto maior essa relação, maior a concentração de clorofila. Essa diferença de refletância espectral é utilizada tanto em pequena (radiômetros de laboratório) quanto em larga escala (radiômetros acoplados a satélites). Vários satélites em órbita utilizam o NDVI para monitorar a vegetação terrestre. Com as imagens de NDVI, é possível, por exemplo, seguir as mudanças na vegetação dos hemisférios do planeta em função das estações do ano, como mostram essas imagens obtidas pela NASA (National Aeronautics and Space Administration), usando o radiômetro AVHRR (Advanced Very High Resolution Radiometer), acoplado a um satélite da série LANDSAT (Figura 6).

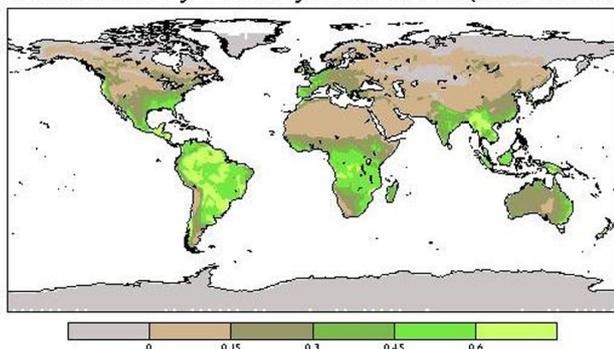
Imagens termográficas

A temperatura da copa das plantas é reconhecida como um indicador da sua condição hídrica e, portanto, como ferramenta potencial para a caracterização das plantas sob as mais diversas condições de cultivo. As imagens termográficas são utilizadas na pesquisa para a seleção de genótipos

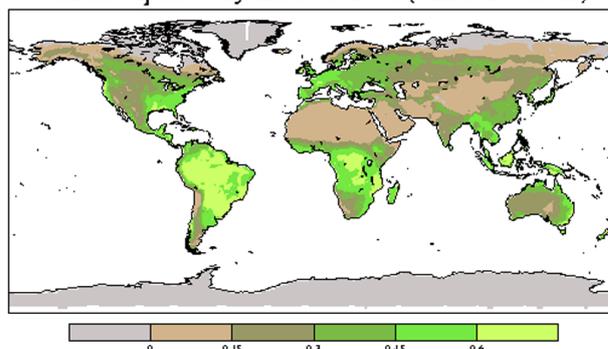
tolerantes aos estresses devido ao excesso de sais e ao déficit hídrico. Mas, pode ser usada, também, associada a outras técnicas, para auxiliar na detecção precoce de infecções patogênicas em plantas. Todas essas aplicações têm como princípio os mecanismos de abertura e fechamento estomáticos, a primeira linha de defesa das plantas contra a perda de água, que regulam a temperatura foliar. Consequentemente, as imagens termográficas das folhas se correlacionam ao estado hídrico da planta, ao grau de abertura estomática e à taxa de transpiração.

No campo ou em condições controladas, é possível observar diferenças entre a temperatura foliar das plantas, em função do regime hídrico a que elas estão submetidas. Nas imagens abaixo, as plantas de milho, cultivadas em casa-de-vegetação, foram mantidas em condições normais de irrigação (vasos brancos à direita) ou submetidas ao déficit hídrico (vasos escuros à esquerda). As plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram maior temperatura média da copa. Ao se avaliar diferentes genótipos nessas condições, observa-se que quanto maior a sensibilidade à seca, maior a temperatura da copa (Figura 7).

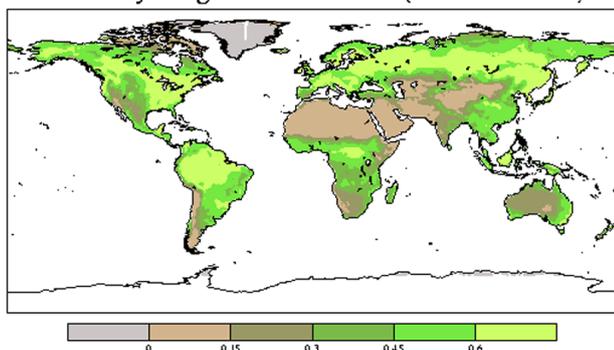
December-January-February mean NDVI (dimensionless)



March-April-May mean NDVI (dimensionless)



June-July-August mean NDVI (dimensionless)



September-October-November mean NDVI (dimensionless)

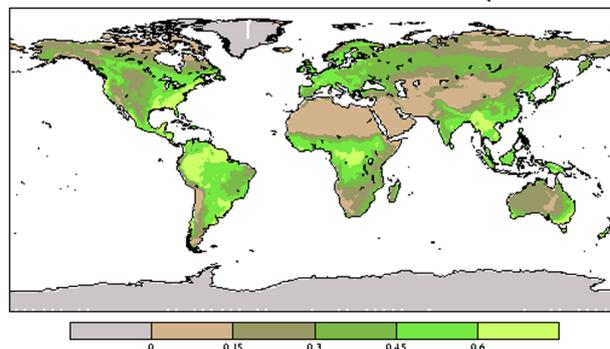


Figura 6. Imagens de NDVI obtidas por satélites da agência federal dos Estados Unidos para o monitoramento das condições dos oceanos e da atmosfera (National Oceanic Atmospheric Administration) em que é possível se observar as mudanças estacionais que ocorrem na vegetação dos hemisférios da terra (JENSEN, 2007).

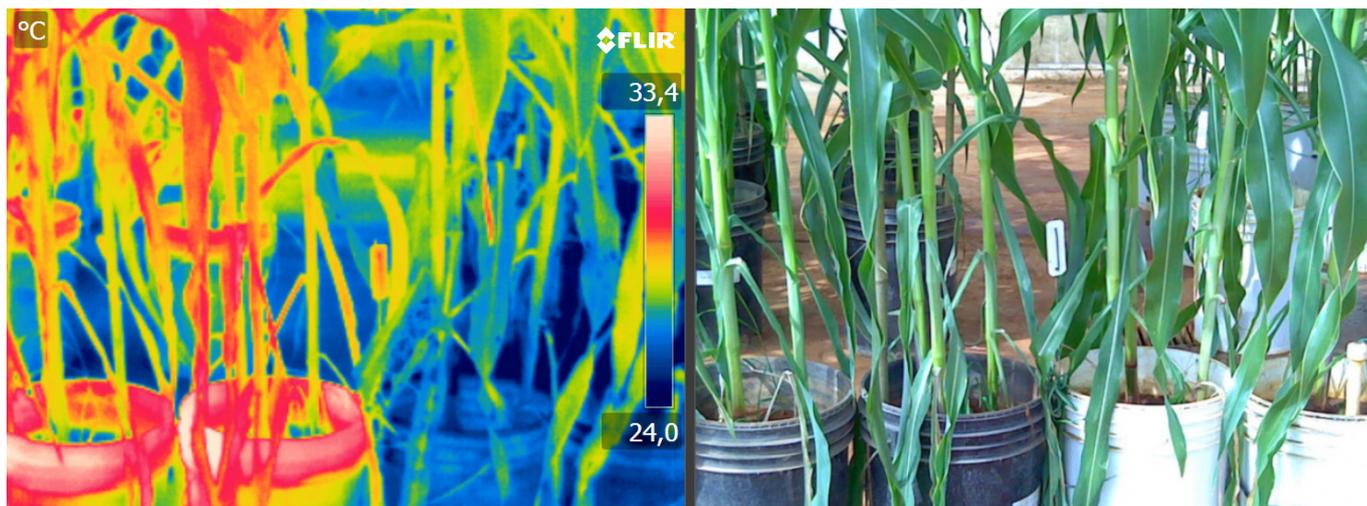


Figura 7. Imagem termográfica (esquerda) e digital (direita) de plantas de milho cultivadas em condições normais (vasos brancos à direita) e sob déficit hídrico (vasos escuros à esquerda). (Crédito: Dr. Paulo César Magalhães, Embrapa Milho e Sorgo)

Imagens na região infravermelha do espectro

A região infravermelha do espectro eletromagnético é particularmente útil para a análise não invasiva *in situ* de metabólitos primários associados diretamente ao crescimento vegetal. O desenvolvimento de tecnologias para a captura de imagens e dados em faixas específicas do espectro infravermelho tem impulsionado a sua utilização para a avaliação do estado metabólico e, conseqüentemente, do desempenho das plantas sob as mais variadas condições. Assim, é possível

a determinação do conteúdo de uma infinidade de compostos do metabolismo celular, como os açúcares solúveis e poliméricos, compostos orgânicos nitrogenados, incluindo proteínas e aminoácidos, biomassa, lipídeos, água, vitaminas e nutrientes minerais. Nesta região do espectro é possível, por exemplo, acompanhar a perda de água pelas folhas. Na Figura 8, a imagem à esquerda representa o conteúdo de água de uma folha completamente hidratada. A imagem à direita representa o conteúdo de água da mesma folha 48 h após ser destacada da planta (Figura 8).

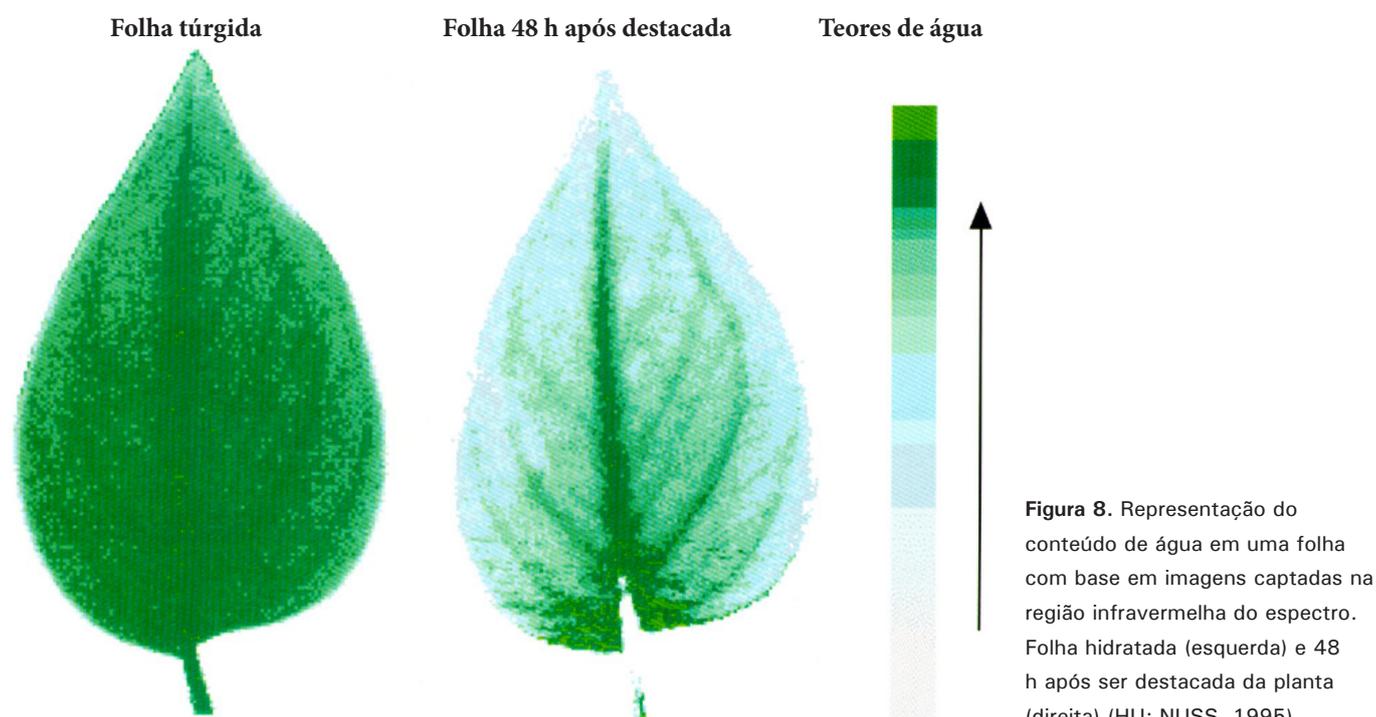


Figura 8. Representação do conteúdo de água em uma folha com base em imagens captadas na região infravermelha do espectro. Folha hidratada (esquerda) e 48 h após ser destacada da planta (direita) (HU; NUSS, 1995).

Outras técnicas disponíveis

Além da possibilidade de geração de imagens, como mostrado acima, o Laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia equipado para a medição do potencial hídrico de plantas pelos métodos da câmara de pressão e do psicrômetro. A fluorescência da clorofila pode ser avaliada isoladamente ou simultaneamente às trocas gasosas com equipamento apropriado. É possível, ainda, discriminar e quantificar a concentração de dezenas de metabólitos, utilizando as mais modernas técnicas de cromatografia e espectroscopia de massas.

Bibliografia

BARBAGALLO, R. P.; OXBOROUGH, K.; PALLETT, K. E.; BAKER, N. R. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 2, p. 485-493, 2003.

COHEN, Y.; ALCHANATIS, V.; MERON, M.; SARANGA, Y.; TSIPRIS, J. Estimation of leaf water potential by thermal imagery and spatial analysis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1843-1852, 2005.

HU, B. B.; NUSS, M. C. Imaging with Terahertz waves. **Optics Letters**, Washington, DC, v. 20, n. 16, p. 1716-1719, 1995.

GOLZARIAN, M. R.; FRICK, R. A.; RAJENDRAN, K.; BERGER, B.; ROY, S.; TESTER, M.; LUN, D. S. Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. **Plant Methods**, London, v. 7, artigo n. 2, 2011.

JENSEN, J. R. **Remote sensing of the environment: an earth resource perspective**. 2nd Ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2007. 592 p.

MATSUDA, O.; TANAKA, A.; FUJITA, T.; IBA, K. Hyperspectral imaging techniques for rapid identification of Arabidopsis mutants with altered leaf pigment status. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 1154-1170, 2012.

SOUSA, C. A. F.; MUNIZ, C. R.; SCHOOR, R. van der; JALINK, H. Large-scale plant phenotyping through chlorophyll fluorescence parameter images generated by a fast repetition rate fluorometer. (resultados não publicados).

TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 2, p. 206-212, 2010.

Comunicado Técnico, 06

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroenergia
Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB s/n,
 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4246
Fax: (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
 1ª edição 2014

**Ministério da Agricultura,
 Pecuária e Abastecimento**

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Secretária-Executiva: Lorena Costa Garcia.
Membros: Maria Iara Pereira Machado, Eduardo Fernandes Formighieri, Larissa Andreani Carvalho, Betania Ferraz Quirino, João Ricardo Moreira Machado, Felipe Brandão de Paiva Carvalho, Sílvia Belém Gonçalves e Diogo Keiji Nakai.

Expediente

Supervisão editorial: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Revisão de texto: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Editoração eletrônica: Maria Goreti Braga dos Santos.
Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado.