



POTENCIAL DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER PARA SEPARAR VARIEDADES DE LARANJA GENETICAMENTE PARECIDAS

T.M.K. Kubota¹, A.B. Magalhães², M. Cristofani-Yaly³, P.R. Vilas-Boas², D.M.B.P. Milori²

- (1) Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São Carlense, 400, 13560-970, São Carlos, SP, thiagomassaiti.k.k@gmail.com
(2) Embrapa Instrumentação, XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, habibe.aida@gmail.com, paulino.villas-boas@embrapa.br, debora.milori@embrapa.br
(3) Centro APTA Citros Sylvio Moreira, IAC, Rodovia Anhanguera Km 158, 13490-970, Cordeirópolis, SP, mariangela@centrodecitricultura.br

Resumo: As laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) concentram as espécies mais importante do grupo dos citros, onde a produção mundial em 2012 atingiu 70 mil toneladas. Elas são classificadas como: laranjas pigmentadas, comum, de baixa acidez e de umbigo. Entre esses grupos existem grandes diferenças fenotípicas, como a forma do paio, cor, tamanho do fruto e época de maturação do fruto. Apesar de todas estas diferenças fenotípicas, existe uma grande semelhança entre os genótipos destas espécies. Nota-se uma pequena variabilidade molecular do DNA, o que dificulta a sua classificação. Vários marcadores de DNA tem sido utilizado para tentar diferenciar estas variedades, porém com pouco sucesso. Pensando nisso a Embrapa Instrumentação junto com o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), vem desenvolvendo uma nova técnica para realizar a identificação entre as variedades de laranjas geneticamente parecidas. Esta técnica tem como base a espectroscopia de fluorescência induzida por laser e algumas ferramentas estatísticas. Os resultados são obtidos de forma rápida, sem preparo de amostras e com baixo custo. Neste trabalho foi utilizado um conjunto de folhas de tres variedades de laranjas geneticamente parecidas: Laranja Pera Abril, Laranja Pera Bianchi e Laranja Pera Roberto Gullo. Estas folhas foram limpas, medidas com o equipamento de fluorescência induzida por laser (Photon-Citrus) e com o auxílio do software Weka foram feitos os tratamentos estatístico com os espectros de fluorescência das folhas. Com isso, a partir de uma validação cruzada, foi possível separar corretamente as três classes de Laranja Pera com um acerto de 88 %.

Palavras-chave: espectroscopia, fluorescência, Photon-Citrus, laranjas doce.

POTENTIAL OF THE LASER INDUCED FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN SEPARATING CITRUS VARIETIES VERY CLOSE GENETICALLY

Abstract: The sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) concentrate the most important species of the citrus group. In 2012 the sweet orangeworld production has reached 70 thousand tons. They are classified as: Pigmented, common, low acidity and navel oranges. Major differences between these groups are the phenotypic size, shape of the paio, its color, size of the fruit and the fruit maturation season. Despite all these phenotypic differences, there is a large similarity between the genotypes of these species. It is possible to observe a small molecular variability of the DNA, which difficult their classification. Several DNA markers have been used to differentiate these varieties, but they were not successful. Thinking about this, the Embrapa Agro cultural, together with the Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), has developed a new technique to perform the differentiation between genetically similar orange varieties. This technique is based on laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) and some statistics tools. The LIFS technique can provide a fast and low cost analysis, without sampling preparation, can be applied to a large number os samples and provide a quality database. In this work, it was used a set of leaves of three different orange varieties genetically similar: "Laranja Pera Abril", "Laranja Pera Bianchi" and "Laranja Pera Roberto Gullo". These leaves were cleaned and then measured with the LIFS equipment (also named Photon-Citrus). With the aid of the Weka software, statistical treatments were made from the fluorescence spectra of the leaves and it was possible to separate the three classes correctly, with a success rate of 88%.

Keywords: spectroscopy, fluorescence, Photon-Citrus, sweet oranges.

1. Introdução

No setor agropecuário a produção de citros tem grande destaque econômico. São produzidos aproximadamente 122 milhões de toneladas de frutas, que correspondem a 17 bilhões de dólares em vendas da fruta fresca

e sucos concentrados no mundo (FAO,2014). O Brasil é o maior produtor e exportador de laranja do planeta, responsável por 18 milhões de toneladas anuais. O país também é o maior exportador de suco concentrado. O setor é responsável por gerar mais de 230 mil empregos, divididos em mais de 300 municípios (NEVES,2010).

As laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) concentram as espécies mais importante do grupo dos citros, cuja produção mundial em 2012 chegou a 70 mil toneladas (FAO,2014). Elas são classificadas como: laranjas pigmentadas, comum, de baixa acidez e de umbigo. Entre esses grupos existem uma grande diferença fenotípicas, como o tamanho, a forma do paio, cor, tamanho do fruto e época de maturação do fruto.

Apesar de todas estas diferenças fenotípicas, existe uma grande semelhança entre os genótipos destas espécies. Nota-se uma pequena variabilidade molecular do DNA, o que dificulta a sua diferenciação e classificação. Esta pequena diferença na variabilidade molecular do DNA é causada por uma estreita base genética comum deste grupo, e as características morfológicas diferentes é devida a mutações e mantida por propagação vegetativa (HERRERO,1996).

Varios marcadores de DNA tem sido utilizado para tentar diferenciar estas variedades, porém com pouco sucesso. Pensando em desenvolver um método rápido, de baixo custo, que não produza resíduos que possam agredir o meio ambiente, a Embrapa Instrumentação junto com o Instituto Agronômico de Campinas (IAC), vem desenvolvendo uma nova tecnica para realizar a identificação entre as variedades de laranjas geneticamente parecidas. Esta tecnica tem como base a espectroscopia de fluorescencia induzida por laser (LIFS) e algumas ferramentas estatísticas (MILORI, 2013).

2. Materiais e Métodos

Neste estudo foram utilizadas folhas de três variedades de laranjas geneticamente parecidas: Laranja Pera Abril, Laranja Pera Bianchi e Laranja Pera Roberto Gullo. As árvores se encontravam no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), onde estavam sujeitas nas mesmas condições de irrigação, temperatura, adubo e luminosidade.

Foram utilizadas 90 folhas, sendo 30 de cada variedade. Elas foram limpas com algodão umedecido com água destilada e seca com outro algodão. Quando não estavam sendo utilizadas eram mantidas na geladeira em aproximadamente 4° C, para evitar a degradação.

Com as folhas devidamente limpas, foram feitas as medidas com o equipamento de fluorescência induzido por lazer (Photon-Citrus), o equipamento pode ser visto na Figura (1).

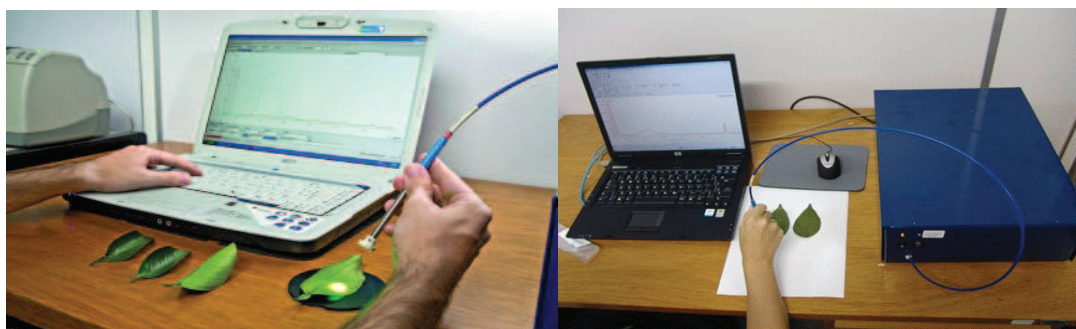


Figura 1. Equipamento de fluorescência induzido por laser (Photon-Citrus).

O Photon-Citrus consiste em um laser de diodo Coherent, modelo CUBE, com excitação em 405 nm e potencia máxima de saída de 50 mW, um mini-espectrômetro da Ocean Optics (USB 4000) e um cabo óptico. O laser então é acoplado ao cabo óptico composto por seis fibras ópticas que excitam a amostra e uma fibra óptica central que coleta o sinal de fluorescência da folha. A fluorescência e a reflectância da amostra são conduzidas até um mini-espectrômetro de alta sensibilidade.

A emissão da fluorescência e da reflectância da amostra é então decomposta através de uma grade de difração fixa e detectada por um conjunto de fotodiodos previamente calibrados. Desta forma, obtém-se o espectro de emissão que será enviado para um computador. Este fará o controle, a aquisição e o tratamento dos dados por meio de um *software* de aquisição de dados desenvolvido pelo próprio Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação. Também foi utilizado o software livre Weka para criar um modelo de regressão, com o auxílio da ferramenta estática de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), e fazer uma validação cruzada para separar as variedades. A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) foi proposto inicialmente por H. Wold, é uma técnica de análise de dados multivariados utilizada para relacionar uma ou mais variáveis resposta (Y) com diversas variáveis independentes (X). Assim este método busca maximizar a variância entre as componentes encontradas, por meio de uma mudança do sistema de coordenadas.

A outra ferramenta estatística utilizada foi o de Análise de Componentes Principais (PCA) que é um método utilizado para encontrar padrões em dados e apresenta-los de uma maneira a demonstrar suas similaridades e diferenças. A diferença entre os métodos é que o PCA não leva em consideração as variedades (Laranja Para Abril, Bianchi e Roberto Gullo) para a análise, já o PLS utiliza esta informação.

3. Resultados e Discussão

Os espectros característicos de cada variedades, obtidos pelo Photon-Citrus está mostrado na Figura (2-a). Fazendo uma análise apenas visual podemos ver que na faixa entre 675nm a 700nm, os espectros da variedade Pera Abril são mais intensos que os da Pera Roberto Gullo. Já na faixa entre 725nm a 775nm a situação se inverte. E para o caso da variedade Pera Bianchi os espectros possuem uma intensidade intermediária, e com isso se confundem com as outras duas classes. Esta diferença nos espectros pode ser explicada pela diferente concentração da clorofila e outros fluoróforos, característico para cada variedade.

Agora analisando o PCA, mostrado na Figura (2-b), pode se notar que os pontos relacionado às amostras da variedade Pera Roberto Gullo, tendem a se acumular ao lado esquerdo do zero da PC1, e os pontos relacionados à Pera Abril, estão se agrupando no lado direito do zero. E no caso da Pera Bianchi, elas estão se agrupando no centro próximo ao zero.

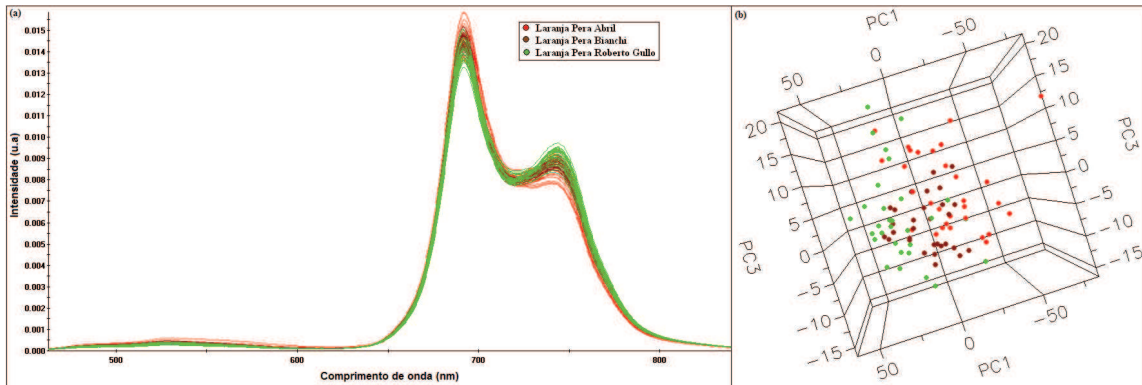


Figura 2. (a) Espectros obtidos com o Photon - Citrus, (b) Análise de PCA das três variedades de laranja Pera.

Este tipo de análise de reconhecimento de padrões entre as variedades é extremamente importante, pois mostra o potencial de se criar um classificador. E criado este classificador pode se identificar e classificar plantas desconhecidas, destas três variedades de laranja Pera.

Para montar um classificador foi utilizado o software Weka, onde foi usada a ferramenta estática PLSR para fazer uma validação cruzada com os dados obtidos do Photon-Citrus. O resultado desta validação está mostrada na matriz confusão da Figura (3).

		Classificado como:		
		Abril	Bianchi	Gullo
Variedade Real:	Abril	97%	0%	3%
	Bianchi	3%	91%	6%
	Gullo	12%	12%	76%

Figura 3. Matriz confusão dos resultados da validação cruzada.

Na matriz confusão as linhas mostram as três variedades que estão sendo classificada, que foram chamadas de Variedade Real. Já as colunas representam como estas variedades foram classificadas pelo classificador. Com isso a diagonal principal representa o acerto do classificador na validação cruzada. Analisando esta diagonal pode se observar que o classificador acertou 88% das classificações.

4. Conclusões

Podemos concluir analisando os espectros característicos de cada variedade, que eles possuem uma diferença nas suas intensidades. E analisando o teste de PCA podemos ver que as variedades tendem a se agrupar em uma dada região das PCs, mas podendo ocorrer uma pequena confusão entre Bianchi e Abril e Bianchi e Roberto Gullo. Mas mesmo assim podemos ver que os espectros tem o potencial para serem diferenciados.

O resultado da validação cruzada obteve um acerto bastante alto, uma vez que estas variedades são geneticamente parecidas, mas mesmo assim nossa técnica foi capaz de diferenciar e classificar as variedades, o que mostra o grande potencial da nossa técnica.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer todos os autores pela colaboração no bom resultado do trabalho, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro e a Embrapa Instrumentação.

Referências

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Produção total de citros em 2012*. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05 set 2011.
- NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. 2010. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao Marcos Fava evento valor.pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao%20Marcos%20Fava%20evento%20valor.pdf)>. Acesso em: 04 set 2011.
- HERRERO R, ASÍNS M.J, CARBONELL E.A, NAVARRO L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. Intraspecies end intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics* v.92, p. 599-609,1996.
- MILORI, Débora Marcondes Bastos Pereira; RAYNAUD, Michel; BOAS, Paulino Ribeiro Villas; VENÂNCIO, André Leonardo; MOUNIER, Stéphane; BASSANEZI, Renato Beozzo e REDON Roland, Identification of citrus varieties using laser-induced Fluorescence Spectroscopy (LIFS). *Computer and Electronics in Agriculture*, v. 95, p. 11-18, 2013.