



UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER NA DETECÇÃO DE STRESS BIÓTICO E ABIÓTICO EM FOLHAS DE SOJA

R.M.B. Seiler¹, A.B. Magalhães², P.R. Villas-Boas², L. Campos³, M.C. Meyer⁴, E. Hirose², D.M.B.P. Milori²

- (1) Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz, 235, 13565-905, São Carlos, SP, re_mbs@hotmail.com
(2) Embrapa Instrumentação, XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, habibe.aida@gmail.com, paulino.villas-boas@embrapa.br, edson.hirose@embrapa.br, debora.milori@embrapa.br
(3) Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Londrina, PR, 86001-970, leonardo.campos@embrapa.br, mauricio.meyer@embrapa.br

Resumo: O presente trabalho tem como objetivo demonstrar o uso e aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) na detecção de stress biótico e abiótico em folhas de soja. A técnica foi utilizada em folhas de soja sadias e infectadas pela soja louca II. Quando doentes, as plantas sofrem uma mudança em seu metabolismo, bem como na produção de metabolitos primários e secundários, dentre eles a clorofila a. Com o uso da técnica LIFS, é possível perceber uma alteração nos picos de emissão de fluorescência da clorofila a, no vermelho, 685 nm, e no infra-vermelho, 735 nm, indicando que existe diferença entre as classes analisadas. Além dessas, foram observadas emissões nas regiões azul e verde. Foi utilizado o método estatístico PLSR para tratar os dados, criando um classificador capaz de diferenciar os espectros de folhas.

Palavras-chave: espectroscopia, fluorescência, soja louca II.

USE OF THE LASER-INDUCED FLUORESCENCE TECHNIQUE ON DETECTION OF BIOTIC AND ABIOTIC STRESS IN SOYBEAN LEAVES

Abstract: The present work aims to demonstrate the use and applicability of laser-induced fluorescence technique (LIFS) in the detection of biotic and abiotic stress in soybean leaves. The technique was used in healthy soy leaves and in some infected by mad soy II. Once infected, the plants suffer a change in their metabolism, as well as in the production of primary and secondary metabolites, including the Chlorophyll A. With the use of the LIFS technique, it is possible to perceive a change in the fluorescence emission peaks of the Chlorophyll A, in the wavelengths of the red (685 nm) and in the infrared (735 nm), indicating when there is a difference between the examined classes. Were also observed emissions on the blue and green regions. It was used the statistical method PLS, to analyse the data, through the Weka software, creating a classifier able to differentiate the specters.

Keywords: spectroscopy, fluorescence, mad soy II.

1. Introdução

A agroindústria é um dos principais segmentos da economia brasileira, sendo responsável por 20% do PIB nacional e 32 % das exportações do país (MAPA 2012/2013). A produção de grãos é uma das mais importantes faces de tal segmento e, segundo o ministério da agricultura, vem crescendo muito e já chegou a 72,2 milhões de toneladas no ano de 2013, podendo chegar a 157,4 milhões de toneladas em 2014 (MAPA 2011). A soja é uma das culturas mais importantes e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. Este crescimento deve-se a vários fatores, dentre eles, o intenso uso de tecnologias disponibilizadas aos produtores através do intenso trabalho da pesquisa brasileira. A soja tem uma enorme importância para a economia do país, tanto para alimentação humana, visto que é extremamente nutritiva, estando presente em cestas básicas na forma de óleo, farelo, entre outros, quanto para ração animal, principalmente aquelas destinadas aos frangos. Vários fatores podem diminuir diretamente a produção de grãos, dentre eles doenças e pragas que destroem grande parte das lavouras, podendo ter impacto grande na economia. Apenas para a soja, existem mais de 40 doenças causadas por fungos, bactérias e vírus identificados no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2004). Existem doenças que podem acabar com 100% da lavoura, e o diagnóstico rápido para um posterior tratamento e melhoramento do manejo se torna cada vez mais importante. Levando em consideração tais informações, pesquisadores da Embrapa Instrumentação vêm procurando métodos eficientes e economicamente viáveis para a detecção de tais doenças.

A técnica usada neste trabalho tem como base a espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) e algumas ferramentas estatísticas, como o PLSR (regressão por mínimos quadrados parciais). O presente trabalho tem como objetivo demonstrar a eficácia da técnica de espectroscopia induzida por laser na detecção de doenças,

pragas ou qualquer adversidade que acomete a planta, que passa por alterações em seu metabolismo e isso produz alterações químicas e físicas, facilmente detectadas por tal técnica (PEREIRA, F. M. V. & MILORI, D. M. B. P., *et al.*, 2011). Ao serem excitadas com laser em 405 nm, foi observada uma banda larga de emissão na região espectral do vermelho, em torno de 675 nm, e no infra-vermelho, em torno de 735 nm, que corresponde a emissão característica da Clorofila -a, um importantíssimo pigmento fotossintetizante. Emissões no azul e no verde, também foram observadas. Tais emissões correspondem a ácidos ferúlicos, em sua maior parte, e flavonóides, cumarinas e quercetinas, dentre outros. Foram analisadas folhas saudáveis e infectadas com soja louca II, e dentre as infectadas utilizou-se folhas do ápice e do terço médio. Foi possível perceber uma grande diferença espectral nos picos de Clorofila -a e na emissão na região azul e verde, comparando as três classes (saudável, doente do terço médio e doente do ápice), demonstrando a eficácia da técnica proposta.

2. Materiais e Métodos

Foram analisadas folhas de soja saudáveis e doentes, infectadas com soja louca II. Dentre as infectadas foram analisadas folhas tanto do ápice, quanto do terço médio. Todas as amostras vieram de Pedro Afonso, TO. Tais folhas foram transportadas até a unidade da Embrapa Instrumentação dentro de uma caixa de isopor, a fim de mantê-las em bom estado para as posteriores análises. As folhas foram limpas com algodão e água destilada e posteriormente foram armazenadas em geladeira a 4°C (ESPECIFICAR TEMPOS DE ARMAZENAMENTO, EMBALAGEM E UMIDADE RELATIVA). Foram utilizadas 25 folhas de cada variedade analisada e as medidas foram feitas nas folhas *in natura*, na região ventral próxima ao pedúnculo, à esquerda e à direita da nervura central da folha.

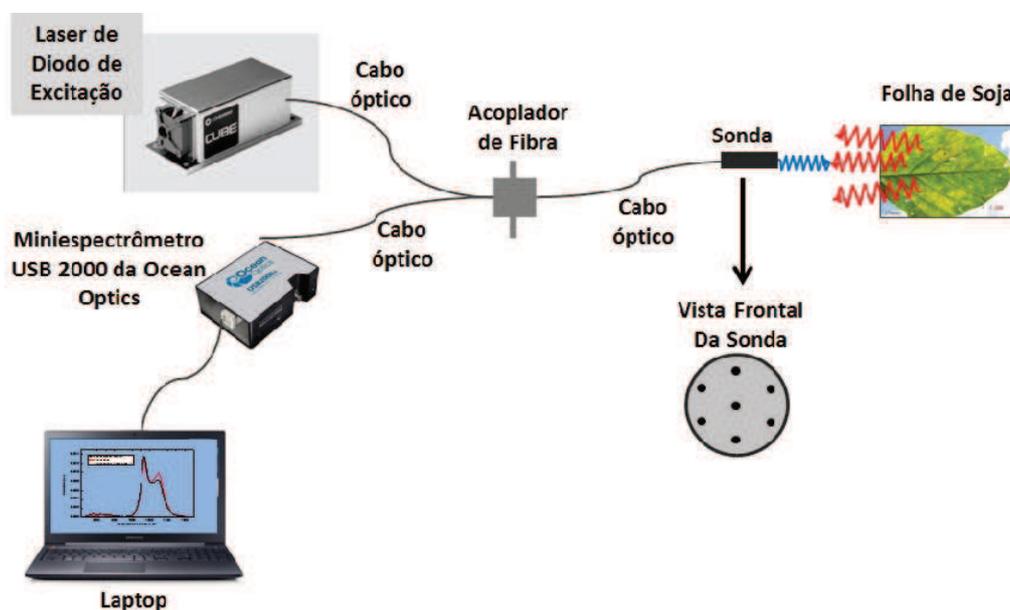


Figura 1. Esquema de funcionamento do sistema LIFS-405.

As medidas de fluorescência foram feitas utilizando o sistema LIFS-405, ilustrado na Figura 1, desenvolvido pelo laboratório de Ótica e Fotônica da Embrapa Instrumentação. O sistema consiste em um conjunto de fibras fixas em uma ponteira de aço-inoxidável, um filtro ótico e um notebook que possui um software desenvolvido pelo próprio Laboratório de Ótica e Fotônica da Embrapa Instrumentação, capaz de coletar e tratar os dados. A fluorescência e a reflectância da amostra são conduzidas até um miniespectrômetro de alta sensibilidade e antes de atingir o miniespectrômetro, o sinal é filtrado para atenuar o sinal da reflectância. A emissão da amostra é decomposta através de uma grade de difração fixa e detectada por um conjunto de fotodiodos previamente calibrados. O espectro de emissão é enviado para o notebook e os dados são tratados. O sistema utiliza um laser com excitação em 405nm, ou seja, utiliza luz na região do violeta. Foi utilizado, também, o software livre Weka, para construir e testar o classificador induzido via PLSR.

3. Resultados e Discussão

Na Figura 2 são mostrados os espectros típicos obtidos utilizando o sistema LIFS-405, normalizados e com o offset corrigido. Pode-se observar os picos de fluorescência no azul e verde e os dois picos de fluorescência da clorofila-a no vermelho, 685 nm, e no infra-vermelho, 735 nm. Nas folhas saudáveis a intensidade do pico no vermelho é maior do que o pico do infra-vermelho. Quando comparamos os picos de emissão em 685 nm e em 735 nm de uma folha sadia e os de uma doente observamos que o primeiro aumenta e o segundo diminui na folha

doente, pois a quantidade de pigmentos de clorofila diminui nessas folhas e, portanto, há menos reabsorção da luz emitida pelas moléculas de clorofila.

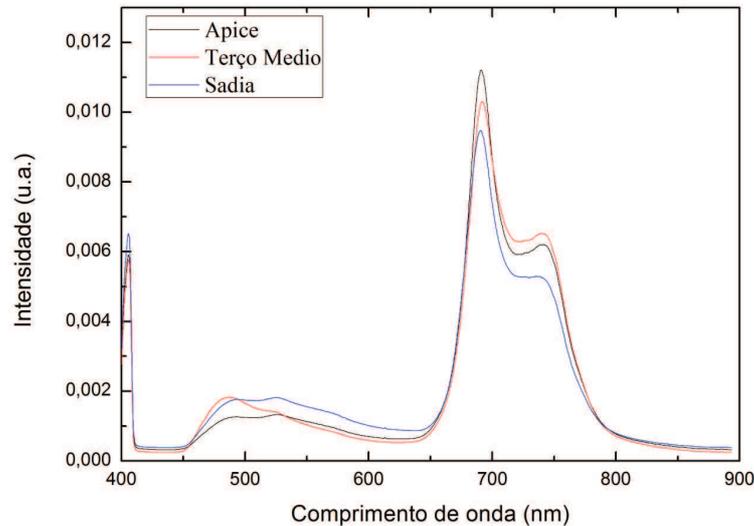


Figura 2. Espectro de Fluorescência induzida por laser da clorofila.

Utilizando o software Weka e ferramenta estática PLSR fez-se uma validação cruzada com os dados obtidos. Os resultados obtidos estão expostos na matriz confusão da (Tabela 3).

Tabela 3. Matriz confusão obtida com o programa WEKA. Demonstra que o LIFS consegue diferenciar corretamente as três classes analisadas: folhas saudias, folhas doentes com soja louca II (terço médio) e folhas doentes com soja louca II (ápice). A diagonal principal representa o acerto do classificador na validação cruzada.

Classificação		
Doente (terço médio)	Sadia	Doente (Ápice)
80%	0	20%
0	100%	0
12%	8%	80%

Acerto: 87%; 6 componentes

A partir dos dados fornecidos na Tabela 3 e analisando a diagonal da matriz confusão, percebe-se que a fluorescência induzida por laser é capaz de diferenciar 87% de acerto com três classes diferentes de folhas: folhas saudias, folhas doentes com soja louca II (terço médio) e folhas doentes com soja louca II (ápice), provando a eficácia da técnica. É importante ressaltar que não houve confusão entre as folhas doentes terço médio e doentes ápice, pois correspondem à mesma classe. A acurácia do classificador leva tal informação em consideração.

4. Conclusões

Analisando os resultados, percebe-se que houve 87% de acertos, demonstrando que a técnica de fluorescência induzida por laser é extremamente promissora para detectar doenças em campo. A técnica oferece ao produtor a possibilidade de analisar uma grande quantidade de amostras e fornece diagnóstico rápido e de baixo custo. A pesquisa ainda tem como objetivo analisar amostras infectadas com outros tipos de doenças que acometem a soja, bem como outros tipos de estresses que possam danificar a lavoura.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro e a Embrapa Instrumentação pelo apoio financeiro e infraestrutura para realização do projeto e a Embrapa Soja pelo fornecimento das amostras.

Referências

- DEBORA M.B.P. MILORI, PAULINO RIBEIRO VILLAS BOAS, ANDRÉ LEONARDO. VENÂNCIO, MARCELO CAMPONEZ DO BRASIL CARDINALI, EDNALDO JOSÉ FERREIRA, POLYANA KELLY MARTINS, JULIANA FREITAS-ASTÚA, J. BRESOLIN. Diagnóstico de Citrus Greening (HLB) utilizando espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS). In: INAMASU, R. Y., NAIME, J. de M., RESENDE, A. V. de, BASSOI, L. H.; BERNARDI, A. de C.. (Org.). Agricultura de precisão: um novo olhar. São Carlos: Editora Cubo, 2011
- EMBRAPA SOJA, 2004. Doenças e Medidas de controle. Tecnologias de produção de Soja Região Central do Brasil. www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca.htm.
- MAPA 2012/2013. Plano Agrícola e Pecuário 2012/2013 da Secretaria de Política Agrícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.