

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

THIAGO MASSAITI KUBOYAMA KUBOTA

Imagens e Espectroscopia de Fluorescência na Agricultura: um estudo
sobre o diagnóstico de doenças e fenotipagem

São Carlos
2017

THIAGO MASSAITI KUBOYAMA KUBOTA

Imagens e Espectroscopia de Fluorescência na Agricultura: um estudo
sobre o diagnóstico de doenças e fenotipagem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof.^a Dr.^a Débora Marcondes Bastos Pereira Milóri

Versão Original

São Carlos
2017

*Dedico este trabalho aos meus pais Massuki e Irani,
por me darem a oportunidade de estudar e buscar os meus sonhos.
Não posso deixar de citar minha irmã Thaisa,
que mesmo de longe me ajuda bastante.
Dedico também a minha namorada e futura esposa Mariane,
por todo o companheirismo, paciência e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me dar força e disposição, para desenvolver este trabalho com muita alegria. Obrigado Pai, por me abençoar todos os dias de minha vida.

Agradeço aos meus pais Massuki e Irani, por me fornecer todas as condições para realizar este sonho, por estarem presente em todos os momentos, além de me proporcionar toda segurança e apoio.

Agradeço a minha irmã Thaisa, que mesmo de longe me fortalecia, com suas atitudes e palavras.

Agradeço a minha namorada Mariane, por estar presente em todos os momentos, sendo eles difíceis ou bons, mas sempre ao meu lado me fortalecendo e fazendo com que me tornasse uma pessoa melhor.

Agradeço a minha amiga, orientadora Dra. Débora, pela confiança, paciência e por todo ensinamento transmitido. Por meio das suas atitudes e a forma como se relaciona com todos, tornou-se um profissional que levarei como referência, que vou me espelhar por toda minha vida.

Agradeço a minha amiga Dra. Aida, por me motivar nos dias conturbados, pelas grandes ideias e por todo apoio que precisei. Além da paciência e a técnica de alinhar os componentes ópticos que vou levar comigo sempre.

Agradeço a todos os meus amigos que conquistei no laboratório da Embrapa Instrumentação, por tornarem a caminhada árdua mais tranquila e fácil de seguir. Muito obrigados amigos: Marcelo, Renan, Gustavo, Ivan, Marco, Cleber, Anielle, Jessica, Kleydson, Alex, Bruno, Jader, Gutto, Aline, Renata, Gabi, Marina, Jonas ...

Agradeço a todos os meus amigos de São Carlos, pelo companheirismo e verdadeira amizade: Tattinho, Renan, Raffaello, Digon, Herik, Ellenise, Juninho, Júlio, Thomas...

Agradeço a todos que contribuíram com amostras de folhas, em especial o André e o Helton. Não poderia de deixar de agradecer ao Edinaldo, por todo suporte estatístico que contribuíram em muito para o trabalho. Agradeço aos funcionários da USP: Isabel, Ricardo e a todo o pessoal da biblioteca do IFSC. Obrigado a CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

KUBOTA T. M. K. **Imagens e Espectroscopia de Fluorescência na Agricultura: um estudo sobre o diagnóstico de doenças e fenotipagem.** 2017. 200 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) -Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Com uma grande diversidade climática, 13% de toda a água doce do mundo em seu território, abundância na energia solar e chuvas regulares, o Brasil é um país favorável para o desenvolvimento da agropecuária. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) as vendas do setor do Agronegócio brasileiro, de janeiro até julho de 2016, alcançaram US\$ 52,8 bilhões, respondendo por 49% de todas as exportações do país. Dois produtos que contribuem decisivamente para este sucesso são a soja e a laranja, onde o Brasil se enquadra como grande produtor e exportador. Um fator que pode comprometer o crescimento do setor do agronegócio são as pragas e doenças. Neste trabalho foram utilizadas técnicas de imagens e espectroscopia de fluorescência como ferramentas de diagnóstico de doenças e fenotipagem. As culturas estudadas, por sua relevância econômica, foram os citros e a soja. Foram investigadas folhas de laranja sadias e doentes com Huanglongbing (HLB), conhecida também como Greening e folhas de soja sadias e doentes com Green Stem and Foliar Retention (GSFR), popularmente conhecida como Soja Louca II. Com base em descritores retirados dos espectros e das imagens foram desenvolvidos classificadores utilizando-se a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR). O desempenho dos classificadores para diferenciar folhas de soja doentes de folhas sadias alcançou 99% para o sistema de espectroscopia de fluorescência e 100% para o sistema de Imagens de Fluorescência. Já com o sistema de imagens de Refletância com Luz Polarizada o acerto na classificação correta entre folhas de laranja sadias e com HLB foi de 84%. Também foi estudada a possibilidade de utilização de imagens termais em diferentes situações de estresse hídrico e nutricional. Através deste sistema foi possível detectar plantas em condições de estresses hídricos decorridos dois dias após o corte de água. As técnicas acima mencionadas também foram testadas para fenotipagem de plantas. Foram analisadas 20 variedades diferentes de citros e 3 de soja. A taxa de acerto na diferenciação de citros geneticamente muito próximos ficou em torno de 63% e para soja foi alcançado 95%, isso quando empregado o sistema de espectroscopia de fluorescência. Com base nesses resultados é possível afirmar que as técnicas fotônicas combinadas com os modelos classificadores, podem ser utilizadas como ferramentas para diagnosticar as doenças, como a GSFR e o HLB, e avaliar diferentes tipos de estresse abiótico. Elas também podem ser utilizadas para diferenciar variedades de plantas, mesmo no caso de variedades muito próximas geneticamente, onde as técnicas tradicionais não são capazes de fazê-lo. Os resultados apresentados foram promissores e podem, em um futuro próximo, gerar sistemas portáteis que devem auxiliar os produtores no campo.

Palavra-chave: Espectroscopia. Imagens de Fluorescência. GSFR. HLB.

ABSTRACT

KUBOTA T.M.K. **Images and Fluorescence Spectroscopy in Agriculture: a study on the diagnosis of diseases and phenotyping.** 2017. 200 p. Dissertation (Master of Science) – Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2017.

With a great climatic diversity, 13% of all the fresh water of the world in its territory, abundance in solar energy and regular rains, Brazil is a favorable country for the development of agriculture. According to the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MAPA), sales of the Brazilian Agribusiness sector, from January to July 2016, reached US\$ 52.8 billion, accounting for 49% of all Brazilian exports. Two products that contribute decisively to this success are soy and orange, where Brazil is a major producer and exporter. One factor that can jeopardize the growth of the agribusiness sector is pests and diseases. In this work, fluorescence spectroscopy and imaging techniques were used as tools for the diagnosis of diseases and phenotyping. The crops studied, because of their economic relevance, were citrus and soybean. Healthy and infected leaves with Huanglongbing (HLB), also known as Greening, and healthy and infected leaves with Green Stem and Foliar Retention (GSFR), popularly known as Mad Soybean II, were investigated. Based on descriptors taken from spectra and images, classifiers were developed using Partial Least Squares Regression (PLSR). The performance of the classifiers to differentiate diseased leaves from healthy leaves reached 99% for the fluorescence spectroscopy system and 100% for the Fluorescence Imaging system. The success rate of classification for the system using polarized reflectance images reached 84%. We also studied the possibility of using thermal images in different situations of water and nutritional stress. Through this system, it was possible to detect plants in conditions of water stress after two days of water cut. The techniques above mentioned were also tested for plant phenotyping. Twenty different citrus and three soybean varieties were analyzed. The success rate of the differentiation using fluorescence spectroscopy for very close citrus was around 63% and for soybean was reached 95%. Based on these results it is possible to conclude that the photonic techniques combined with the classifier models can be used as tools to diagnose diseases such as GSFR and HLB and to evaluate different types of abiotic stress. They can also be used to differentiate plant varieties, even in the case of very closely varieties, where traditional techniques are not able to carry out. The results presented were promising and may, in the near future, generate portable systems that should assist farmers in the field.

Keywords: Spectroscopy. Fluorescence Images. GSFR. HLB.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura 2.1 – | Psílídeo <i>Diaphorina citri</i> , vetor do Huanglongbing. O inseto possui a coloração a cinza, mede de 2 a 3 mm e se alimentam da seiva floemática das plantas. | 36 |
| Figura 2.2 – | Sintomas do HLB. Em a) folha com mosqueado amarelo assimétrico e mais espeças com relação as folhas sadias. Em b) e c) frutos de menor tamanho, assimétrico, albedo espesso e sementes abortadas. | 36 |
| Figura 2.3 – | Sintomas do GSFR: em a) folhas e nervuras grossas, enroladas e escuras; b) hastes com caneluras e engrossamento nos nós; c) vagens com manchas e menores. | 38 |
| Figura 3.1 – | Espectros de cores. Onde estão destacados os comprimentos de ondas da região visível, ultravioleta e infravermelho. | 43 |
| Figura 3.2 – | Diagrama de Jablonski. As setas pretas tracejadas na vertical representam as conversões internas. A seta preta na diagonal, que liga S_1 a T_1 , representa o Cruzamento intersistema. As setas na vertical, em roxo e azul indicam a energia absorvida pelo sistema. As setas verdes representam o decaimento relacionada a Fluorescência e as setas azuis a Fosforescência. | 45 |
| Figura 3.3 – | Moléculas das clorofilas <i>a</i> . Observa-se em sua estrutura uma porfirina, no centro um átomo de magnésio, uma estrutura macro-cíclica assimétrica e insaturada. | 47 |
| Figura 3.4 – | Espectro de refletância para diferentes comprimentos de ondas da folha verde (gráfico a), folha seca (gráfico b) e solo (gráfico c). Para a folha verde existe uma grande absorção na região do azul e vermelho. Já para a região do verde o espectro apresenta uma grande refletância, o que ocasiona à coloração verde as folhas. | 49 |
| Figura 3.5 – | Distribuição espectral de potência com relação ao comprimento de onda. A linha colorida na horizontal representa a cor branca, e linha verde é associada a uma cor monocromática real. Já o ponto vermelho representa uma cor monocromática ideal. | 50 |
| Figura 3.6 – | Diagrama de cromaticidade que ajuda a explicar os padrões de cores utilizados no CIE. No diagrama a borda exprime todas as cores espectrais e no seu interior, em W, a cor branca. | 51 |
| Figura 3.7 – | Intensidade da potência irradiada $R(\lambda)$ por comprimento de onda. O perfil espectral é característico da temperatura apresentada por um corpo. | 54 |
| Figura 5.1 – | Exemplos típicos de folhas: (a) Sadia, (b) HLB-Sintomática e (c) HLB-Assintomática. As folhas sadias e HLB-Assintomática apresenta uma grande semelhança através de análise visual. A folha HLB-Sintomática mostra o mosqueado assimétrico característico da doença. | 60 |
| Figura 5.2 – | Imagens de como estão dispostas as plantas na estufa na BAG do IAC de Citros. Todas as laranjeiras estão na mesma condição de luminosidade, irrigação, umidade relativa do ar e adubação. | 65 |
| Figura 5.3 – | Vasos utilizados no plantio da soja e preparo do solo. Os vasos são de plásticos e possuem a capacidade de 21 litros. O solo foi obtido da | |

| | | |
|----------------------|---|----|
| | própria fazenda do LANAPRE e corrigido com enxofre, fósforo, cálcio e magnésio. | 67 |
| Figura 5.4 – | Disposição das plantas dentro da casa de vegetação. Os vasos foram posicionados em três fileiras, sendo as classes alternadas a cada cinco vasos. Isso para não ocorrer beneficiamento de nenhum conjunto de plantas. | 68 |
| Figura 5.5 – | Em a) sistema do sensor TDR usado para auxiliar no controle da concentração de água nos vasos. Em b) haste do sensor TDR que possui a função de enviar e coletar o sinal elétrico e assim estimar a umidade do vaso. Em c) vaso com o sensor TDR. | 69 |
| Figura 5.6 – | Preparo das folhas de laranja antes da medida com o FIL. As folhas são limpas com algodão umedecido com água destilada, e empregando outro algodão as folhas são secas. | 71 |
| Figura 5.7 – | Todas as folhas foram armazenadas seguindo as orientações de acordo com os resultados obtidos no item anterior. Cada trifólio foi colocado separado em sacos plásticos, o ar retirado de dentro delas e fechadas com fita crepe. | 72 |
| Figura 5.8 – | Esquema do Equipamento LIFS. O sistema possui um laser como fonte de excitação, um cabo óptico, um mini-espectrômetro, um filtro, a sonda e um computador. | 73 |
| Figura 5.9 – | Medida com o sistema LIFS-405 em uma folha de laranja. O procedimento está sendo realizada na região abaxial, na parte superior e próximo a nervura central da folha. | 74 |
| Figura 5.10 – | O sistema de Imagens de Fluorescência possui um laser como fonte de excitação, um conjunto de lentes, um filtro um porta amostra e uma câmera. | 75 |
| Figura 5.11 – | O sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada possui um laser de diodo com excitação em 561 nm, um difusor, um cabo óptico, dois polarizadores, uma lente e uma câmera. | 76 |
| Figura 5.12 – | Sistema utilizado para estudar o comportamento da intensidade da luz refletida ao passar pelos polarizadores. O sistema possui praticamente a mesma configuração do sistema da figura 5.11, mas no lugar da câmera é posicionado o detector do potenciômetro. | 77 |
| Figura 5.13 – | Sistema usado para caracterizar a intensidade da luz que passa pelos polarizadores. Ao girar um dos polarizadores e mantendo o outro fixo era estudado como variava a intensidade mostrada no potenciômetro. | 78 |
| Figura 5.14 – | Em a) os polarizadores estão com os eixos de polarização cruzados, onde se nota o bloqueio da passagem de luz entre os dispositivos ópticos. Em b) os polarizadores estão com o eixo de polarização em paralelo, onde é possível observar a passagem de luz entre os dispositivos ópticos. | 78 |
| Figura 5.15 – | Sistema para caracterizar a distribuição da luz que é espalhada, neste experimento foi variado a distância do detector do potenciômetro pelos eixos X e Y. | 79 |
| Figura 5.16 – | Medidas feitas com a câmera Flir para encontrar a emissividade da folha de soja. Neste estudo foi variado o valor da emissividade na câmera e observado quando a temperatura da fita se aproximava da temperatura | |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| | da folha. | 81 |
| Figura 5.17 – | Ilustração da imagem de fluorescência obtida com o sistema de imagem descrito acima com distribuição da radiância da luz, máxima no seu centro e vai decaindo como uma função gaussiana como é no perfil do feixe que excitou os fluoróforos da folha. | 84 |
| Figura 5.18 – | Esquema de como foram criados os histogramas. Ao considerar uma imagem como sendo composta por três matrizes, de dimensão $m \times n$, onde cada elemento dessas matrizes contém valores que expressam quantidade de cores vermelho, verde e azul. Fazendo a contagem destes valores montaram-se os histogramas. | 85 |
| Figura 6.1 – | Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-405. Em a) estão os espectros coletados das regiões abaxial, próximo a nervura central e do lado direito da folha. Em b) estão os espectros coletados das regiões adaxial, próximo a nervura central e do lado direito da folha. | 88 |
| Figura 6.2 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos dois classificadores criados com as medidas nas regiões abaxiais e adaxiais. | 90 |
| Figura 6.3 – | Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar os espectros de fluorescência foliar do conjunto de calibração medidos nas regiões abaxiais. O número ótimo de componentes para o modelo gerado é 15. | 92 |
| Figura 6.4 – | Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-561. Em a) estão os espectros coletados das regiões abaxial, próximo a nervura central e do lado direito da folha. Em b) estão os espectros coletados das regiões adaxial, próximo a nervura central e do lado direito da folha. | 94 |
| Figura 6.5 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos dois classificadores criados com as medidas nas regiões abaxiais e adaxiais. | 96 |
| Figura 6.6 – | Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar os espectros de fluorescência foliar do conjunto de calibração medidos nas regiões abaxiais. O número ótimo de componentes para o modelo gerado é 12. | 98 |
| Figura 6.7 – | Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para criar o modelo de classificador, com o número de componentes que obteve o melhor desempenho. | 101 |
| Figura 6.8 – | Imagens características adquiridas com o sistema de Imagens de Fluorescências das três classes: a) HLB-Sintomática, b) HLB-Assintomática e c) Sadias. De acordo com as imagens é possível notar as diferentes colorações de vermelho e verde com relação as três classes. | 103 |
| Figura 6.9 – | Histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, coletadas das imagens obtidas com o sistema de Imagens de Fluorescência. De acordo com a distribuição do histograma é possível notar a concordância com as imagens coletadas. | 103 |
| Figura 6.10 – | Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para auxiliar na criação do modelo de | |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| | classificador. O modelo otimizado continha 15 componentes, cujo desempenho foi 89% de acerto na classificação correta. | 105 |
| Figura 6.11 | – Gráfico da intensidade da luz que passa pelos polarizadores com o respectivo ângulo formado entre os dois polarizadores. Pode-se notar a intensidade máxima quando os eixos de polarização estão em paralelo (90° e 270°) e mínimo quando estão em perpendicular (0° e 180°). | 107 |
| Figura 6.12 | – Gráficos das distribuições das intensidades da luz na direção ao eixo Y, à medida que fonte laser se afasta em relação ao eixo X (cm). A 40 cm de distância a distribuição da intensidade da luz é praticamente uniforme na região central e intensa o suficiente para não saturar os sensores da câmera. | 108 |
| Figura 6.13 | – Em a) imagem real das folhas, em b) imagem com os polarizadores com os eixos de polarização em paralelo e em (c) imagem com os polarizadores com os eixos de polarização em perpendicular. Com os polarizadores disposto de forma cruzada é possível observar diferenças nas três classes de folhas de forma nítida. | 109 |
| Figura 6.14 | – A imagem em a) mostra duas folhas Sadias, em b) HLB-Assintomática e em c) HLB-Sintomática. As definições nos contrastes das nervuras são maiores nas folhas sadias, quando comparadas com as folhas HLB-Sintomático e HLB-Assintomático. | 112 |
| Figura 6.15 | – Histograma médio da cor verde, das imagens com as três classes de folhas de laranja. As imagens sadias possuem pixels com tons de verde inferiores as imagens das classes HLB-Assintomática e HLB-Sintomática. | 112 |
| Figura 6.16 | – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para auxiliar na criação do modelo de classificador. O modelo otimizado continha 19 componentes, cujo desempenho foi 85% de acerto na classificação correta. | 113 |
| Figura 6.17 | – Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-405. As plantas foram distribuídas nas classes Deficiência Hídrica, Deficiência de Nitrogênio e Referência. Em a) temos os espectros coletados das medidas realizadas na região abaxiais e em b) nas regiões adaxiais. | 115 |
| Figura 6.18 | – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos dois classificadores criados com medidas das regiões abaxiais e adaxiais, adquiridas com o sistema LIFS-405. | 117 |
| Figura 6.19 | – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores. | 119 |
| Figura 6.20 | – Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-561. As plantas foram subdivididas nas classes: Deficiência Hídrica, Deficiência de Nitrogênio e Referência. Em a) são representados os espectros coletados das medidas realizadas na região abaxiais e em b) nas regiões adaxiais. | 122 |
| Figura 6.21 | – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos dois classificadores criados com medidas das regiões abaxiais e adaxiais, coletadas com o sistema LIFS-561. | 123 |
| Figura 6.22 | – Imagens de fluorescências de folhas típicas das classes: Em a) classe de Referência, em b) Deficiência de Nitrogênio e em c) Deficiência Hídrica. | |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| | A folha de Referência possui uma coloração vermelha superior as outras duas folhas. Já as folhas com Deficiência de Nitrogênio e Hídrica possuem em suas nervuras colorações mais azuladas quando comparadas a folha de Referência. | 125 |
| Figura 6.23 | – Histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, coletadas das imagens obtidas com o sistema de Imagens de Fluorescência. De acordo com as distribuições dos histogramas é possível notar a concordância com as imagens coletadas, onde os números de pixels com tons de vermelho são superiores para a classe de Referência. | 126 |
| Figura 6.24 | – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores. Os modelos foram criados com 19 componentes para o primeiro conjunto, 16 componentes para o segundo e 11 para o terceiro. | 128 |
| Figura 6.25 | – Em a) é apresentado a imagem da folha de soja com o ajuste da emissividade diferente da real emissividade da folha; Em b) é representado a imagem da folha de soja com o ajuste da emissividade próximo da real emissividade da folha. | 131 |
| Figura 6.26 | – Imagem das plantas da estufa com a mesma temperatura. Onde é possível observar que todas as folhas apresentam aproximadamente a mesma coloração de roxo em sua copa. | 133 |
| Figura 6.27 | – Gráficos das medidas de temperaturas das plantas, as 16h:15min do dia 10/12/2016. Onde é possível observar que as plantas em condições de Déficit Hídrico possuem as maiores temperaturas. | 133 |
| Figura 6.28 | – Imagem das plantas da estufa com temperatura distintas. Onde é possível observar que as folhas das plantas que estão sofrendo com a falta de água apresentam a coloração vermelha em sua copa, representando uma maior temperatura. | 135 |
| Figura 6.29 | – Espectros médios coletados do sistema LIFS-405, com as amostras de soja da fazenda Xingu II. Onde o espectro vermelho representa o espectro médio das folhas com GSFR e o espectro preto é referente as folhas Sadias. | 137 |
| Figura 6.30 | – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores. Os modelos foram criados com 4 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo, 14 componentes para o conjunto Xingu I e 3 para o conjunto Xingu II. | 139 |
| Figura 6.31 | – Gráfico da taxa de acertos com relação aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os três conjuntos, para o desenvolvimento do modelo de classificador mais robusto. | 141 |
| Figura 6.32 | – Espectros médios coletados do sistema LIFS-561, com as amostras de soja da fazenda Xingu II. Onde o espectro vermelho representa o espectro médio das folhas com GSFR e o espectro preto é referente as folhas Sadias. | 142 |
| Figura 6.33 | – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores. Os modelos foram criados com 16 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo, 14 componentes para o conjunto Xingu I e 18 para o conjunto Xingu II. | 144 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| Figura 6.34 – | Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os três conjuntos, para o desenvolvimento do modelo de classificador mais robusto. | 146 |
| Figura 6.35 – | Gráficos dos acertos das validações cruzadas com os respectivos números de componentes, construído com 50 folhas das três fazendas, com os espectros retirados dos sistemas LIFS-405 e LIFS-561. Os modelos foram criados com 4 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo, 19 componentes para o conjunto Xingu I e 13 para o conjunto Xingu II. | 148 |
| Figura 6.36 – | Em a) está representada a imagens típica de uma folha doente com GSFR e em b) imagem típica de uma folha Sadia, quando iluminada por uma fonte de excitação em 377 nm. | 151 |
| Figura 6.37 – | Histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, coletadas das imagens obtidas com o sistema de Imagens de Fluorescência. De acordo com a distribuição do histograma é possível notar a concordância com as imagens coletadas, onde o número de pixels com tons de azul é superior para as folhas saudas. | 152 |
| Figura 6.38 – | Gráficos dos acertos das validações cruzadas com os respectivos números de componentes, construído com os conjuntos de folhas das três fazendas. Onde os atributos foram retirados dos histogramas de cores, das imagens de fluorescência. Os modelos foram criados com 4 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo e Xingu I, e 3 componentes para o conjunto da fazenda Xingu II. | 153 |
| Figura 6.39 – | Gráfico da taxa de acertos com relação aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os três conjuntos juntos, num total de 152 imagens sendo 76 de cada classe. Para o modelo foram utilizados 18 componentes. | 156 |
| Figura 6.40 – | Gráfico da Análise de Componentes Principais do conjunto das Laranjas Peras dos espectros medidos com o sistema LIFS-405. Da análise da PCA é possível observar a formação de grupos entre as variedades de laranja Peras, representando características similares de cada cultivar. ... | 159 |
| Figura 6.41 – | Gráfico da Análise de Componentes Principais do conjunto das Laranjas Peras dos espectros medidos com o sistema LIFS-561. Da análise da PCA é possível observar a formação de grupos entre as variedades de laranja Peras, representando características similares de cada cultivar. ... | 160 |
| Figura 6.42 – | Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas, com relação aos respectivos números de componentes, do classificador criado com parte dos conjuntos dos cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. O classificador foi criado com 150 folhas, sendo 50 de cada variedade. Já a validação foi realizada em um outro conjunto de 150 folhas. | 162 |
| Figura 6.43 – | Gráfico da taxa de acertos das validações cruzadas, com relação aos respectivos números de componentes, do classificador criado com parte dos conjuntos dos cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. O classificador foi criado com 150 folhas, sendo 50 de cada variedade, onde os espectros foram retirados com o sistema LIFS-561. Já a validação foi realizada em um outro conjunto de 150 folhas. | 164 |
| Figura 6.44 – | Gráfico da taxa de acertos das validações cruzadas, com relação aos respectivos números de componentes, do classificador criado com parte dos conjuntos dos cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. O | |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| | classificador foi criado com imagens de 60 folhas, sendo 20 de cada variedade. Já a validação foi realizada em um outro conjunto de 42 imagens de folhas. | 166 |
| Figura A.1 – | Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar o potencial de separação entre as classes, dos espectros de fluorescência foliar do conjunto de calibração. | 180 |
| Figura A.2 – | Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar o potencial de separação entre as classes, das imagens coletadas com o sistema de Imagens de Fluorescência. | 181 |
| Figura A.3 – | Gráfico das taxas de acertos pelos números de componentes utilizando o conjunto todo de imagens de refletância com luz polarizada para testar o potencial de classificação da técnica. | 182 |
| Figura A.4 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, dos três conjuntos de folhas. O intuito do estudo é averiguar o potencial de separação entre as classes. | 184 |
| Figura A.5 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, dos três conjuntos de folhas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes, que nestes casos não foram atingidos. | 186 |
| Figura A.6 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões adaxiais, dos três conjuntos de folhas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes. | 187 |
| Figura A.7 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, com o sistema LIFS-405, dos três conjuntos de folhas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes, onde neste caso todos os conjuntos tiveram o acerto máximo superior a 75%. | 189 |
| Figura A.8 – | Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, para o classificador criado com os três conjuntos agrupados. O intuito era estudar o potencial de classificação, para construir um classificador universal. | 190 |
| Figura A.9 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, com o sistema LIFS-561, dos três conjuntos de folhas coletados nas diferentes fazendas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes. | 191 |
| Figura A.10 – | Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, para o classificador criado com os conjuntos das três fazendas simultaneamente. O objetivo era estudar o potencial de classificação, para obter um classificador universal. | 192 |
| Figura A.11 – | Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com as imagens medidas nas regiões adaxiais, com o sistema de Imagens de Fluorescência, dos três conjuntos de folhas coletados nas diferentes | |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| | fazendas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes. | 194 |
| Figura A.12 – | Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, para os classificadores criados com os três conjuntos juntos, num total de 152 imagens sendo 76 de cada classe. O intuito era estudar o potencial de classificação, para construir um classificador universal. | 194 |
| Figura A.13 – | Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, para os classificadores criados com os cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR produzidas nas fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, respectivamente. O intuito é estudar o potencial de reparação entre as diferentes variedades. | 196 |
| Figura A.14 – | Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR produzidas nas fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, respectivamente. Os espectros foram coletados com o sistema LIFS-561, da região abaxial das folhas. O intuito é estudar o potencial de reparação entre as diferentes variedades. | 198 |
| Figura A.15 – | Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, para o classificador criado com os cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR produzidas nas fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, respectivamente. As imagens foram tiradas das regiões adaxiais das folhas. O objetivo é estudar o potencial de reparação entre as diferentes variedades. | 199 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tabela 5.1 – | Número de folhas usadas em cada experimento e a forma como foram divididas. A primeira parte dos conjuntos foi utilizada para criar os classificadores, e as segundas partes para validar os modelos de classificadores. | 61 |
| Tabela 5.2 – | Regiões, datas das coletas e cultivares utilizados nos experimentos. As fazendas estão localizadas no Maranhão onde são cultivados três diferentes tipos de soja: TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. A doença GSFR está presente nas fazendas Laurindo, Xingu I e Xingu II. | 62 |
| Tabela 5.3 – | Número de folhas usadas nas diferentes técnicas fotônicas e a forma como foram divididas. As primeiras partes dos conjuntos foram utilizadas para criar os classificadores, e as segundas partes para validar os modelos de classificadores. | 62 |
| Tabela 5.4 – | Números de folhas usadas nas técnicas LIFS-405, LIFS-561 e Imagens de Fluorescência, e a forma como foram divididas. As primeiras partes dos conjuntos foram utilizadas para criar os classificadores, e as segundas partes para validar o modelo de classificador. Para o estudo com fenotipagem foram utilizadas folhas das Fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, cujos cultivares são todos distintos uns dos outros. | 63 |
| Tabela 5.5 – | Variedades de laranja utilizadas nos estudos com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561. As amostras vieram do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros, onde estavam todas nas mesmas condições de desenvolvimento. | 64 |
| Tabela 5.6 – | Números de folhas usadas nas diferentes técnicas fotônicas e a forma como foram divididas. As primeiras partes dos conjuntos foram utilizadas para criar os classificadores, e as segundas partes para validar os modelos de classificadores. O intuito do estudo é estudar o potencial das técnicas em separas folhas de plantas em diferentes condições de estresses. | 70 |
| Tabela 6.1 – | Em a) está expressa a matriz confusão da classificação dos espectros tirados das regiões abaxiais e em b) das regiões adaxiais. O estudo visa conhecer qual o melhor lado para se realizar as medidas com o sistema FILS-405. | 91 |
| Tabela 6.2 – | Matriz confusão das medidas da região abaxial, com a primeira parte do conjunto, utilizando o número de componentes que obteve o maior acerto. | 92 |
| Tabela 6.3 – | Matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado como modelo de classificador o número de componentes que obteve o maior acerto nas validações cruzadas. | 93 |
| Tabela 6.4 – | Em a) está expressa a matriz confusão da classificação dos espectros tirados das regiões abaxiais e em b) das regiões adaxiais. O estudo visa conhecer qual o melhor lado para se realizar as medidas com o sistema LIFS-561. | 97 |
| Tabela 6.5 – | Matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas das regiões abaxiais, com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 81%, com 12 componentes. | 98 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| Tabela 6.6 – | Matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Empregou-se 12 componentes para o modelo, onde foi alcançado 87% de acerto na sua validação. | 99 |
| Tabela 6.7 – | A parte superior da tabela expressa a matriz confusão da melhor classificação obtida com as medidas realizadas nas regiões abaxiais, com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 89%, com 20 componentes. Já a parte inferior da tabela mostra a matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado 20 componentes para o classificador, e com ele alcançando 87% de acerto na sua validação. | 101 |
| Tabela 6.8 – | A primeira parte da tabela representa a matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Fluorescência, construída com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 89%, com 15 componentes. A segunda parte da tabela mostra matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado 15 componentes para o classificador, e com ele alcançando 87% de acerto na sua validação. | 106 |
| Tabela 6.9 – | Intensidade da luz refletida das três diferentes classes de folhas. Onde é possível observar que as maiores intensidades são das folhas com HLB-Sintomáticas. Ficando as menores intensidades para as folhas Sadias e de forma intermediária a classe HLB-Assintomática. | 110 |
| Tabela 6.10 – | A parte superior da figura mostra a matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada, construída com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 84%, com 19 componentes. Já a parte inferior ilustra a matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado 19 componentes para o classificador, e com ele alcançando 80% de acerto na sua validação. | 114 |
| Tabela 6.11 – | Matriz confusão da validação cruzada que obteve o maior acerto na classificação correta, com os espectros retirados das regiões abaxiais, utilizando o sistema LIFS-405. | 117 |
| Tabela 6.12 – | Matriz confusão da validação cruzada que obteve o maior acerto na classificação correta, com os espectros retirados das regiões adaxiais, utilizando o sistema LIFS-405. | 117 |
| Tabela 6.13 – | Na parte superior das tabelas estão apresentados os melhores acertos das validações cruzadas com as primeiras partes dos conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Desta forma, os classificadores foram criados com 90 folhas, sendo 30 de cada classe. Na parte inferior das tabelas estão ilustrados os acertos das validações utilizando as segundas partes dos conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Os modelos de classificadores continham 7 componentes para o primeiro, 16 componentes para o segundo e 10 componentes para o terceiro. | 120 |
| Tabela 6.14 – | Nas primeiras partes das tabelas são ilustrados os melhores acertos das validações cruzadas com as primeiras partes dos conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Desta forma, os classificadores foram criados com 90 imagens de folhas, sendo 30 de cada classe. Já nas | |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| | segundas metades das tabelas estão apresentados os acertos das validações nos conjuntos: a) conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Os modelos de classificadores continham 19 componentes para o primeiro, 16 componentes para o segundo e 11 componentes para o terceiro. | 128 |
| Tabela 6.15 | – Variações das temperaturas das folhas de soja com relações as alterações das emissividades. Uma vez que a temperatura da folha se igualava com a da fita, era observada a emissividade que estava ajustada na câmara e assim definida como sendo a emissividade da folha de soja. | 131 |
| Tabela 6.16 | – Tabela com as diferenças de temperaturas entre as plantas de Referência e de Déficit Hídrico, em diversas condições. A maior variação é de 5,55, quando a temperatura no interior da estufa é 36°C e a umidade relativa 54%. | 136 |
| Tabela 6.17 | – Nas partes superiores das tabelas estão apresentadas as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 4 componentes, o da fazenda Xingu I 14 componentes e o da fazenda Xingu II 3 componentes. Já nas partes inferiores estão ilustradas as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. | 139 |
| Tabela 6.18 | – Nas primeiras metades das tabelas estão ilustradas as matrizes confusões das melhores classificações das validações cruzadas, utilizando as primeiras partes dos conjuntos, coletados das amostras das três fazendas. A partir das matrizes confusões é possível observar o acerto de 92%, com o classificador utilizando 14 componentes. Nas segundas metades estão ilustradas as matrizes confusões dos acertos das validações dos modelos de classificadores, nas segundas partes dos conjuntos pertencente as três fazendas. | 141 |
| Tabela 6.19 | – As partes superiores apresentam as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 16 componentes, o da fazenda Xingu I 14 componentes e o da fazenda Xingu II 18 componentes. Já nas partes inferiores estão ilustradas as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. | 144 |
| Tabela 6.20 | – A parte superior da tabela apresenta a matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando as primeiras partes dos conjuntos, coletados das amostras das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 87%, com o classificador utilizando 10 componentes. Já a parte inferior da tabela mostra a matriz confusão do acerto da validação do modelo de classificador, nas segundas partes dos conjuntos pertencente as três fazendas. | 147 |
| Tabela 6.21 | – As partes superiores das tabelas ilustram as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 4 componentes, o da fazenda Xingu I 19 componentes e o da fazenda Xingu II 13 componentes. Já as partes inferiores apresentam as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. | 149 |
| Tabela 6.22 | – As partes superiores das tabelas ilustram as matrizes confusões das | |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| | melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 4 componentes, o da fazenda Xingu I 4 componentes e o da fazenda Xingu II 3 componentes. Já as partes inferiores apresentam as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: (a) Laurindo, (b) Xingu I e (c) Xingu II. | 154 |
| Tabela 6.23 – | Na parte superior da tabela está ilustrada a matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando as primeiras partes dos conjuntos, coletados das amostras das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 79%, com o classificador utilizando 18 componentes. Já na parte inferior é mostrado a matriz confusão do acerto da validação do modelo de classificador, nas segundas partes dos conjuntos pertencente as três fazendas. | 156 |
| Tabela 6.24 – | Matriz confusão com a classificação do conjunto recebido na estação do inverno utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-405. | 157 |
| Tabela 6.25 – | Matriz confusão com a classificação do conjunto recebido na estação do verão utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-405. | 158 |
| Tabela 6.26 – | Matriz confusão referente a classificação do conjunto das laranjas Peras, onde foram utilizados os espectros coletados com o sistema LIFS-405. ... | 158 |
| Tabela 6.27 – | Matriz confusão com a classificação do conjunto recebido na estação do inverno utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-561. | 159 |
| Tabela 6.28 – | Matriz confusão referente a classificação do conjunto das laranjas Peras, onde foram utilizados os espectros coletados com o sistema LIFS-561. ... | 161 |
| Tabela 6.29 – | Na parte superior da tabela está ilustrada a matriz confusão do desempenho do classificador criado com a primeira parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Para o classificador foi utilizado 14 componentes, onde obteve o acerto máximo na validação cruzada de 95%. Já a segunda parte da tabela está ilustrada a matriz confusão do desempenho do classificador ao ser validado com a segunda parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Foi obtido um acerto de 93% na validação do modelo, destacando o acerto de 98% do cultivar produzido na fazenda Xingu II. | 162 |
| Tabela 6.30 – | Na parte superior da tabela é mostrada a matriz confusão do desempenho do classificador criado com a primeira parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Para o classificador foi utilizado 8 componentes, onde obteve o acerto máximo na validação cruzada de 83%. Já na parte inferior é apresentada a matriz confusão do desempenho do classificador ao ser validado com a segunda parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Foi obtido um acerto de 89% na validação do modelo, destacando o acerto de 96% do cultivar produzido na fazenda Xingu II. ... | 164 |
| Tabela 6.31 – | Na parte superior da tabela está sendo apresentada a matriz confusão do desempenho do classificador criado com a primeira parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Para o classificador foi utilizado 16 componentes, onde obteve o acerto máximo na validação cruzada de 92%. Já na parte inferior ilustra-se a matriz confusão do desempenho do classificador ao ser validado com a segunda parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Foi obtido um acerto de 84% na validação do modelo, destacando o acerto de 100% do cultivar produzido na fazenda Xingu II. | 166 |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Tabela – T1 | Matriz confusão da melhor classificação obtida com as medidas realizadas das regiões abaxiais, com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561. O melhor desempenho foi de 89%, com 18 componentes. Com o resultado superior a 75% o conjunto foi considerado como possuindo o potencial de classificação. | 180 |
| Tabela – T2 | Matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Fluorescência. O melhor desempenho foi de 89%, com 17 componentes. Com o resultado superior a 75% o conjunto foi considerado como possuindo o potencial de classificação. | 181 |
| Tabela – T3 | Matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada. O melhor desempenho foi de 89%, com 18 componentes. Com o resultado superior a 75% o conjunto foi considerado como possuindo o potencial de classificação. | 183 |
| Tabela – T4 | Os melhores acertos das validações cruzadas com os conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. As medidas foram realizadas com o sistema LIFS-405 nas regiões abaxiais. | 184 |
| Tabela – T5 | Os melhores acertos das validações cruzadas com os conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. As medidas foram realizadas com o sistema LIFS-561 nas regiões abaxiais. | 186 |
| Tabela – T6 | Os melhores acertos das validações cruzadas com os conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015, b) Conjunto coletado em 16/11/2015,c) Conjunto coletado em 24/11/2015. As medidas foram realizadas com o sistema de Imagem de Fluorescência das regiões adaxiais das folhas. | 188 |
| Tabela – T7 | Matrizes confusões representando os melhores desempenhos das validações cruzadas dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. Onde é possível observar que todos os conjuntos alcançaram o potencial de classificação. | 189 |
| Tabela – T8 | Matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando os espectros das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 94%, onde foi alcançado o potencial de classificação do conjunto. | 190 |
| Tabela – T9 | Matrizes confusões dos melhores desempenhos das validações cruzadas dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. Onde é possível observar que todos os conjuntos alcançaram o potencial de classificação. | 192 |
| Tabela – T10 | Matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando os espectros das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 88%, onde foi alcançado o potencial de classificações do conjunto. | 193 |
| Tabela – T11 | Matrizes confusões com as melhores classificações das validações cruzadas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes. | 195 |
| Tabela – T12 | Matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando os espectros das três fazendas. A partir da matriz confusão é | |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| | possível observar o acerto de 76%, onde foi alcançado o potencial de classificações do conjunto. | 195 |
| Figura T13 – | Matriz confusão da melhor classificação feita via validação cruzada, com os espectros coletados com o sistema LIFS-405, das amostras das fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II. Onde o objetivo é estudar o potencial de classificação do conjunto. | 197 |
| Figura T14 – | Matriz confusão da melhor classificação feita via validação cruzada, com os espectros coletados com o sistema LIFS-405, das amostras das fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II. Onde o objetivo é estudar o potencial de classificação do conjunto. | 198 |
| Figura T15 – | Matriz confusão da melhor classificação feita via validação cruzada, com as imagens coletadas com o sistema de Imagens de Fluorescência, das amostras das fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II. Onde o objetivo é estudar o potencial de classificação do conjunto. | 199 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 31 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 35 |
| 2.1 | Huanglongbing (HLB)..... | 35 |
| 2.2 | Green stem and foliar retention (GSFR) - Soja Louca II..... | 37 |
| 2.3 | Reações das plantas a estresses bióticos e abióticos | 39 |
| 3 | FUNDAMENTOS TEÓRICOS..... | 43 |
| 3.1 | Técnicas fotônicas | 43 |
| 3.1.1 | Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Lazer | 43 |
| 3.1.2 | Imagens de Fluorescência e Imagens de Refletância..... | 48 |
| 3.1.3 | Radiação térmica | 53 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 57 |
| 5 | Materiais e Métodos | 59 |
| 5.1 | Amostras | 59 |
| 5.1.1 | Conjunto de folhas de laranja para o estudo do Huanglongbing..... | 59 |
| 5.1.2 | Conjunto para os estudos do GSFR..... | 61 |
| 5.1.3 | Conjunto para os estudos de fenotipagem com cultivares de soja | 63 |
| 5.1.3 | Conjunto para os estudos de fenotipagem com variedades de laranjas | 64 |
| 5.1.4 | Amostras de soja para o estudo de deficiência de nitrogênio e deficiência hídrica com plantas de Soja | 66 |
| 5.1.5 | Preparo das amostras | 70 |
| 5.2 | Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS) | 72 |
| 5.3 | Espectroscopia de fluorescência por imagem | 75 |
| 5.4 | Sistema de Imagens de Refletância com luz polarizada | 76 |
| 5.4.1 | Caracterização da intensidade do laser que passa pelos polarizadores | 77 |
| 5.4.2 | Caracterização da distribuição da intensidade do laser em diferentes pontos .. | 78 |
| 5.5 | Imagens termográficas | 79 |
| 5.5.1 | Emissividade das folhas de soja | 80 |
| 5.6 | Tratamento dos dados | 81 |
| 5.6.1 | Tratamento dos espectros LIFS..... | 81 |
| 5.6.2 | Tratamento das imagens de fluorescência e imagens de refletância com luz polarizada | |
| | 83 | |
| 6 | RESULTADOS | 87 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 6.1 | Citros | 87 |
| 6.1.1 | Diagnóstico de HLB em citros utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405..... | 87 |
| 6.1.2 | Diagnóstico de HLB em citros utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561..... | 94 |
| 6.1.3 | Diagnóstico de HLB em citros utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 e 561 | 99 |
| 6.1.4 | Diagnóstico de HLB em citros utilizando Imagens de Fluorescência..... | 102 |
| 6.1.5 | Diagnóstico de HLB em citros utilizando Imagens de Refletância com Luz Polarizada | 106 |
| 6.1.5.1 | Caracterização do sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada | 106 |
| 6.1.5.2 | Indução de um classificador utilizando as Imagens de Refletância com Luz Polarizada no diagnóstico do HLB | 111 |
| 6.2 | Diagnóstico de estresses bióticos e abióticos na Soja..... | 114 |
| 6.2.1 | Diagnóstico de plantas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio com o equipamento LIFS-405 | 114 |
| 6.2.2 | Diagnóstico de plantas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio com o equipamento LIFS-561 | 121 |
| 6.2.3 | Diagnóstico de plantas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência | 124 |
| 6.2.4 | Estudo com Imagens Térmicas em plantas de soja..... | 130 |
| 6.3.1 | Diagnóstico do GSFR utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 | 136 |
| 6.3.2 | Diagnóstico da GSFR utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561 | 142 |
| 6.3.3 | Diagnóstico da GSFR utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 e LIFS-561..... | 147 |
| 6.3.4 | Diagnóstico da GSFR utilizando Imagens de Fluorescência..... | 150 |
| 6.4 | Fenotipagem de citros e soja..... | 157 |
| 6.4.1 | Estudos de fenotipagem com as diferentes variedades de laranjas utilizando os sistemas LIFS-405 e LIFS-561 | 157 |
| 6.4.2 | Fenotipagem de soja – Utilização do sistema LIFS-405 para diferenciar cultivares de soja | 161 |
| 6.4.3 | Fenotipagem de soja – Utilização do sistema LIFS-561 para diferenciar cultivares de soja | 163 |
| 6.4.4 | Fenotipagem de soja – Utilização do sistema de Imagens de Fluorescência para diferenciar cultivares de soja..... | 165 |
| 7 | CONCLUSÃO | 169 |

| | |
|---|-----|
| REFERÊNCIAS..... | 173 |
| APÊNDICE A – Potencial de classificação | 179 |
| A.1 Conjunto de folhas de laranja para o estudo do HLB | 179 |
| A.1.1 Verificação do potencial de classificação de folhas de laranja com HLB utilizando os sistemas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 e LIFS-561..... | 180 |
| A.1.2 Verificação do potencial de classificação de folhas de laranja com HLB utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência | 181 |
| A.1.3 Verificação do potencial de classificação de folhas de laranja com HLB utilizando o sistema Imagens de Refletância com Luz Polarizada..... | 182 |
| A.2 Conjunto de folhas de soja para o estudo de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio..... | 183 |
| A.2.1 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 | 183 |
| A.2.2 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561 | 185 |
| A.2.3 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência..... | 187 |
| A.3 Conjunto de folhas de soja para o estudo do GSFR..... | 188 |
| A.3.1 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja com GSFR utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 | 189 |
| A.3.2 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja com GSFR utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561 | 191 |
| A.3.3 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja com GSFR utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência | 193 |
| A.4 Fenotipagem | 196 |
| A.4.1 Verificação do potencial de classificação de diferentes cultivares de soja utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 | 196 |
| A.4.2 Verificação do potencial de classificação de diferentes cultivares de soja utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561 | 197 |
| A.4.3 Verificação do potencial de classificação de diferentes cultivares de soja utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência | 199 |

1 INTRODUÇÃO

Com uma grande diversidade climática, 13% de toda a água doce do mundo em seu território, abundância de energia solar e chuvas regulares, o Brasil é um país favorável para a agropecuária. Além dessas vantagens, o país apresenta aproximadamente 388 milhões de terras agricultáveis férteis, dos quais 90 milhões ainda não foram explorados, confirmando o seu grande potencial agrícola e a tudo relacionado ao setor primário. Todas essas qualidades unidas a uma grande modernização fazem com que o setor do agronegócio seja a principal base da economia brasileira. (1)

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2), as vendas do setor de agronegócio brasileiro, de janeiro até julho de 2016, alcançaram US\$ 52,8 bilhões, o que representou o crescimento de 1% com relação ao mesmo período do ano passado. Já as importações tiveram uma diminuição de 12%, com US\$ 7,24 bilhões, tornando assim o saldo comercial do setor com um superávit de US\$ 45,58 bilhões. O setor foi responsável por 49% das exportações totais do país desde o início do ano. De acordo com o jornal Estado de São Paulo, de 29 de maio de 2015, no primeiro trimestre de 2015 a agricultura teve um acréscimo de 4,7%, quando comparado com o mesmo período do ano anterior, resultando a queda no PIB de apenas 0,2%, quando a estimativa era uma diminuição ainda maior, de 0,5% para o período.

Um produto que contribuiu para o sucesso do agronegócio brasileiro no período de 2014 e 2015 foi a soja. Neste período o Brasil alcançou a colocação de segundo maior produtor do grão do planeta, com uma produção de 96,2 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. (3) Segundo MAPA (4), nas últimas três décadas foi o produto que mais cresceu no país, com maior peso na balança comercial, movimentando mais de US\$ 20 bilhões anualmente. A estimativa para a safra de 2015/2016 é um aumento de 6,1%, com uma produção de 102,1 milhões de toneladas, alavancando ainda mais o agronegócio brasileiro.

Outro produto considerado como pilar para a agricultura brasileira é a laranja. Onde o Brasil é o maior produtor e exportador do mundo, com uma produção que chegou a quase 20 mil toneladas na safra de 2014, seguida por Estados Unidos e México. (5) A estimativa para a safra de 2015/2016 é de aproximadamente 280

milhões de caixa, com 40,8 kg cada. (6) A produção do suco concentrado de laranja também impressiona, com quase 995 mil toneladas da poupa, coloca o país como o maior produtor, seguido por Estados Unidos e Espanha. (6) O estado de São Paulo apresenta lugar de destaque na produção, sendo o maior produtor e responsável por 80% de toda laranja produzida no país. (7) A cultura permite a geração de 230 mil empregos distribuídos em mais de 300 municípios. (7)

No entanto a presença de pragas e doenças nas lavouras pode limitar a produtividade e diminuir a qualidade dos produtos produzidos, acarretando sérios riscos para o bom desempenho da agricultura, prejudicando todo o potencial econômico brasileiro. (8)

Recentemente, foram encontradas nas lavouras de soja, plantas com as vagens danificadas e muito pequenas, as folhas se apresentavam com tamanho menor, retorcidas e escuras. (9) Estas plantas apresentavam uma produção muito inferior quando comparadas com as plantas normais, isso quando produziam, a elas foram associadas à doença Green Stem and Foliar Retention (GSFR), popularmente conhecida como Soja Louca II. As plantas em fase sintomáticas da doença não conseguem desenvolver as flores e vagens, provocando uma nova floração, ficando o processo natural de maturação comprometido, deixando assim a planta sempre no seu estágio adulto e não permitindo que complete o seu ciclo. (10)

As perdas por essa doença são extremamente grandes, podendo chegar a 60% na produção, as regiões com temperaturas e umidades altas são as mais afetadas. O agente causador da doença até pouco tempo era desconhecido, sendo agora associado ao nematóide *Aphlenchoides sp.* Segundo Meyer (10), ainda não existe uma forma adequada para se combater à doença, porém será preciso uma readequação na forma do manejo do solo e do plantio da cultura.

Outro fator importante que pode acarretar na diminuição da produtividade das plantas de soja é o estresse gerado pela escassez de água no início do ciclo. A limitação de água torna as plantas de soja pouco desenvolvidas, com estruturas foliares pequenas, entrenós curtos e estruturas reduzidas. Na situação de extrema de estresse hídrico, na fase vegetativa, pode acarretar além dos sintomas citados, a diminuição dos grãos e em alguns casos pode acarretar na morte das plantas. (11)

A deficiência de nitrogênio nas plantas de soja também é um fator que promove a redução na produtividade e na qualidade dos grãos. A escassez do nitrogênio provoca o retardo do crescimento das plantas, nas plantas adultas as

folhas apresentam uma coloração amarelada com tamanho reduzido e no período reprodutivo os botões florais tornam-se amarelos e caem. (12)

Já a grande preocupação nos pomares de laranja é o *Huanglongbing* (HLB), também conhecido como Greening. Oriunda da China, onde dizimou quase todas as plantas de citros do país, hoje é encontrado em diversas regiões do planeta. (11) No Brasil, segundo estudos realizados pela FUNDECITRUS (12), de 2012 até os dias atuais a doença já cresceu 152%, contaminando 17,9% das plantas de todo o parque citrícola brasileiro. A doença pode ocasionar uma perda de 50% da produção das plantas contaminadas. Mas o grande problema destas pesquisas é que se baseiam em estimativas e inspeções visuais nos pomares, em busca de plantas sintomáticas, porém é conhecido que o período de incubação da doença pode chegar a dois anos, e neste período as plantas assintomáticas são fonte de inóculo da doença. (13)

Os sintomas do *Greening* aparecem nas folhas e frutos, quando a doença está no estágio avançado pode ser percebido pelos inspetores das fazendas. No Brasil a doença é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, onde se instalam nos vasos floemas, provocando alterações no metabolismo da planta, de modo a comprometer a passagem da seiva elaborada para todo o resto da árvore. A bactéria é transmitida principalmente pelo psílideo *Diaphorina citri* ou por enxertia de borbulhas de citros contaminadas. (14) O manejo recomendado, mas não muito eficaz, consiste no controle do psílideo, erradicação das árvores contaminadas e plantio de mudas certificadas.

Diante destes fatos, fica claro a necessidade que sejam criadas técnicas ou equipamentos capazes de realizarem diagnósticos de doenças em plantas, de forma rápida e com baixo custo. Desta forma, auxiliar na escolha de um manejo eficiente, garantindo assim o bom desempenho do setor agrícola. Outra opção para minimizar as perdas por doença, pragas ou até mesmo pelas condições climáticas desfavoráveis, seria o plantio de variedades imunes a todos esses agentes.

Pensando nisso este trabalho vem para contribuir com os estudos desenvolvidos no Laboratório de Óptica e Fotônica, da Embrapa Instrumentação, em desenvolver equipamentos capazes de realizarem diagnósticos de doenças, deficiências nutricionais e diferenciar cultivares, de forma ágil, precisa, sem gerar resíduos e de baixo custo. Com base no fato das plantas alterarem seu metabolismo quando estão sujeitas as diferentes formas de estresses, seja na forma biótica ou

abiótica, alterando assim as concentrações de substâncias que são detectadas por técnicas fotônicas foram conduzidas as análises deste trabalho. Desta forma, foram realizados estudos empregando as técnicas: Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS); Imagens de Fluorescência; Imagens de Refletância com Luz Polarizada; Imagens termais. Junto com esses sistemas foram utilizados modelos de regressão estatísticas, como Regressão por Mínimos Quadrados Parciais, para criar classificadores capazes de diagnosticar folhas de plantas com GSFR e *HLB*. Foram criados também modelos de classificadores para diferenciar plantas de soja em condições de estresses hídricos, deficiência de nitrogênio, de plantas em condições ótimas para o desenvolvimento.

A caracterização de recursos genéticos com a finalidade de obter qualidades fenotípicas desejadas tem alcançado lugar de destaque em programa de melhoramento genético. A busca de novos cultivares resistentes as adversidades climáticas, doenças e pragas são cada vez maiores. Uma vez encontrada uma espécie melhor adaptada ou resistente a um ambiente desfavorável pode favorecer o aumento na qualidade e na produtividade de uma cultura. Com base neste contexto os estudos foram realizados empregando as técnicas fotônicas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser e Imagens de Fluorescência. Nos estudos foram analisados os potenciais dos classificadores em diferenciar três cultivares de soja, produzida no campo, e diversas variedades de laranja, cultivadas em estufa, mesmo estas variedades sendo geneticamente idênticas para a técnica de marcadores genéticos, método utilizado mais sensível e usado para realizar a discriminação entre diferentes variedades de laranja. Este estudo é bastante relevante, uma vez que contribuiu no desenvolvimento de um equipamento portátil capaz de auxiliar na criação e identificação de novas variedades de soja e laranja.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Huanglongbing (HLB)

O Huanglongbing (HLB) também conhecido como *Greening* é uma doença causada pelas bactérias: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* e *Candidatus Liberibacter americanus*. (15) A doença foi descoberta pela primeira vez no sul da China e logo se espalhou por todo o mundo, chegando a vários países da África, Ásia, Oceania e Américas. (11) Desde então a doença vem afligindo todos os produtores de citros.

No Brasil os primeiros casos da doença ocorreram próximos a cidade de Araraquara, estado de São Paulo, no ano de 2004. Em pouco tempo a doença espalhou por todo o território nacional, sendo encontrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. (16) Em nosso país a doença é causada na maioria das vezes pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus*, uma vez que estas são as mais resistentes a ambientes de temperaturas elevadas. (17)

A bactéria se instala nos vasos floemas das plantas infectadas, ocasionando alterações no seu metabolismo, de modo a obstruir a passagem da seiva elaborada para os órgãos do vegetal, prejudicando assim o seu desenvolvimento e em alguns casos sua morte. (11) A bactéria é transmitida principalmente pelo psíldeo *Diaphorina citri* (ver a figura 2.1), um inseto pequeno, com cerca de 2 a 3 mm, de coloração cinza, que se hospeda em todas as variedades de citros e também em uma planta ornamental conhecida como Murta. O período de incubação da doença pode chegar a dois anos e atualmente não existe cura ou variedade resistente ao HLB. (13)

A contaminação pode ocorrer quando o psíldeo doente se alimentar da seiva floemática, encontrada nas folhas e brotos das plantas. (18) No momento da sua alimentação o inseto permanece em uma posição inclinada, de maneira a formar um ângulo de 45° com a superfície de contato, facilitando assim sua identificação. Outra forma de contaminação pode acontecer através da enxertia de borbulhas de citros contaminadas com *HLB*. As borbulhas são materiais básicos, de plantas matrizes, responsáveis pela perpetuação da espécie. Assim o método da enxertia proporciona a clonagem de uma determinada variedade de copa, porém pode ocasionar o acúmulo de patógenos, como vírus e bactérias (2.7).



Figura 2.1 – Psílideo *Diaphorina citri*, vetor do Huanglongbing. O inseto possui a coloração a cinza, mede de 2 a 3 mm e se alimentam da seiva floemática das plantas.
Fonte: COMITÉ ... (19)

Os sintomas do *HLB* mais frequentemente apresentados pelas plantas de citros, aparecem nas folhas e frutos (ver a figura 2.2). As plantas sintomáticas apresentam nas folhas um mosqueado amarelo assimétrico e são mais esfeças. (11) Os frutos são de tamanhos inferiores quando comparados aos frutos sadios, com pouca simetria, albedo mais espesso, azedos e com as sementes abortadas. (14)

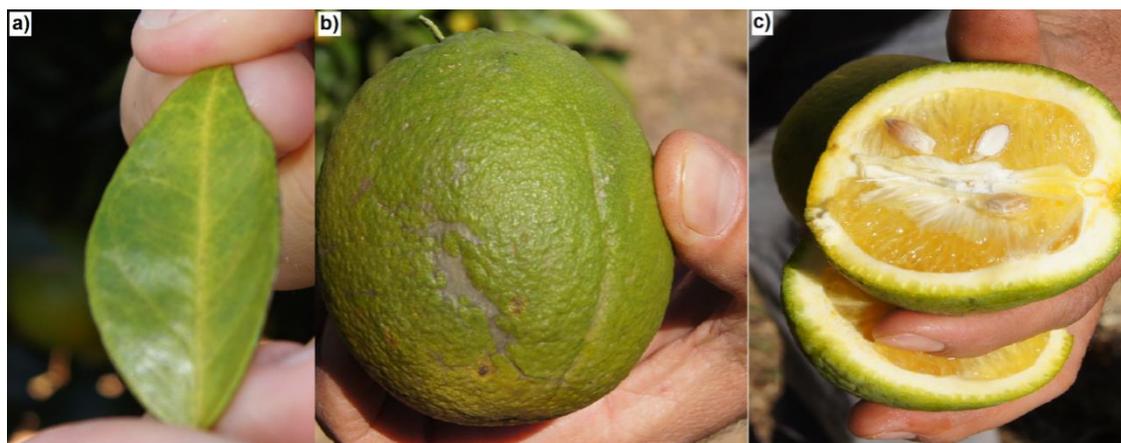


Figura 2.2 – Sintomas do HLB. Em a) folha com mosqueado amarelo assimétrico e mais esfeças com relação as folhas saudas. Em b) e c) frutos de menor tamanho, assimétrico, albedo espesso e sementes abortadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As principais formas de manejo do HLB são pulverizações periódicas dos pomares, para tentar erradicar o inseto vetor, além de inspeções constantes realizadas por equipes treinadas em encontrar folhas sintomáticas da doença. Uma vez encontradas plantas que apresentem folhas com sintomas de HLB, elas são arrancadas e realizadas novas pulverizações. (16) Existem hoje também armadilhas

adesivas que são posicionadas no interior dos pomares, com a função de capturar o inseto, mas possuem uma eficiência baixa. (16) Outra forma de evitar a doença é a aquisição de mudas certificadas, produzidas em viveiros confiáveis. (16)

A baixa eficiência nas inspeções visuais, com precisão de 27% em plantas sintomáticas, a não eficácia nas pulverizações, os descasos de alguns produtores com a doença, só contribuem com o aumentam da disseminação do HLB pelo país. (16) O grande desafio para um manejo correto está na obtenção de uma técnica capaz de diagnosticar plantas doentes, mas em sua fase assintomática, uma vez que a doença apresenta um período de latência muito grande, podendo chegar a dois anos, e nesse período elas são fontes de inóculo no campo.

A técnica padrão utilizada hoje para diagnosticar a doença em laboratório é a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR), que consiste na amplificação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) da bactéria. (20) Porém, a aplicação desta técnica para mapeamento da doença no campo é inviável. Primeiro, porque a distribuição da bactéria na planta não é uniforme e seria muito difícil um diagnóstico confiável em fase assintomática. Segundo, há limitações técnicas e financeiras para sua aplicação em larga escala.

2.2 Green stem and foliar retention (GSFR) – Soja Louca II

Na década de 1980 pesquisadores se depararam com uma doença nas lavouras de soja, capaz de provocar deformações nas folhas e aumentar a retenção foliar nas plantas. As produções das vagens diminuía consideravelmente, acarretando assim uma diminuição na produção dos grãos. A esta doença foi dada o nome de Soja Louca, causada por ataques de percevejos, capazes de transmitir toxinas para as plantas de soja. Recentemente foram observadas plantas com sintomas parecidos com os da Soja Louca, porém se diferenciando no agente transmissor (9), por esse motivo foi atribuído o nome a esta nova doença de Soja Louca II.

Recentemente a doença Soja Louca II passou a ser chamada de Green Stem and Foliar Retention (GSFR), por fazer analogia aos sintomas da doença. O GSFR geralmente se manifesta no estágio vegetativo, a partir de V5 e V6 (quarta e quinta folha trifoliolada completamente desenvolvida), provocando o engrossamento das

nervuras foliares, enrugamento do limbo, afinamento das folhas superiores, folhas com coloração mais escura e uma menor quantidade de pilosidade (ver a figura 2.3a). As hastes apresentam anomalias tipo caneluras e engrossamento dos nós (ver a figura 2.3b). Já as vagens apresentam rachaduras, lesões de coloração marrom, apodrecimento e menor quantidade de grãos (ver a figura 2.3c). (10)



Figura 2.3 – Sintomas do GSFR: em (a) folhas e nervuras grossas, enroladas e escuras; (b) hastes com caneluras e engrossamento nos nós; (c) vagens com manchas e menores.
Fonte: EPAMIG-UBERABA. (21)

As plantas sintomáticas não conseguem desenvolver flores e vagens, provocando uma nova floração e superbrotamento. Geralmente, o abortamento das flores e vagens ocorre na parte superior das plantas, impedindo o processo natural de maturação, permanecendo verde e não permitindo que completem seu ciclo natural de vida.

Pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) descartaram a possibilidade da Soja Louca II ser causado por ácaros ou vírus. Eles associaram a doença com o nematóide *Aphlenchoides sp*, pois eram encontrados com muita frequência em plantas sintomáticas. Esta descoberta foi aceita e reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recentemente. (9)

A nova doença vem causando grande prejuízo para a cultura de soja, onde na safra de 2005/2006 foi responsável por uma queda de 60% na produção do grão. O aparecimento do GSFR acontece nas regiões de temperaturas altas e úmidas, como nos estados do Maranhão, Tocantins, Pará e Mato Grosso. (9) Ainda não existe um manejo adequado para combater a proliferação da doença, segundo Meyer (9) é preciso uma readequação no manejo do solo e da cultura.

2.3 Reações das plantas a estresses bióticos e abióticos

As plantas estão sujeitas a diferentes tipos de estresses, podendo ser na forma biótico ou abiótico. Os estresses têm a possibilidade de causar as mais diferentes alterações no organismo das plantas, desde a variação da taxa de crescimento até modificações nas expressões gênicas. (22) Mas mesmo em condições desfavoráveis as plantas conseguem contornar a situação, implementando variações em seu metabolismo com o intuito de retornar as suas condições normais. As readequações podem acontecer no metabolismo primário, responsável por todos os processos fundamentais para sobrevivência da planta, destacando os processos da fotossíntese, a respiração, os transportes de solutos entre outros. Nesta etapa são produzidos os chamados metabólitos primários: celulose, proteínas, lipídios, ligninas, carboidratos e os pigmentos. (23)

Existe também o metabolismo secundário, que não está ligado diretamente com o crescimento da planta, mas favorece a sua evolução. Em muitos casos associam a este metabolismo como responsável pelo mecanismo de defesa das plantas, quando submetidas às condições de estresses bióticas e abióticas. (23) Nos processos secundários são produzidos os metabólitos secundários, como exemplo: flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, terpenóides, aldeídos, alcoóis, cetonas e fitoalexinas.

Dentre os metabólitos primários devemos destacar as clorofilas *a* e *b*, além dos carotenoides, pois estão ligados diretamente ao processo de fotossíntese. As clorofilas são pigmentos que proporcionam a coloração verde as folhas e alguns tipos de galhos. Já os carotenoides apresentam uma coloração alaranjada ou amarelada, presentes também nas folhas, porém em menor quantidade que as clorofilas.

Estudos realizados anteriormente comprovou a alteração da concentração de clorofila em folhas de plantas infectadas com HLB, onde foi notado que quanto maior o estágio de contaminação da doença menor era a concentração da clorofila presente nas folhas. (24,25) Além dos estresses causados pelo HLB, os estresses abióticos também podem acarretar variações na concentração das clorofilas. (24) No estudo de Buschmann (24) foi mostrada a existência de duas bandas de fluorescência características da clorofila, quando excitada com luz visível. Estas bandas de emissão ocorrem no vermelho e infravermelho próximo, e suas intensidades são relacionados à quantidade de clorofila presente nas folhas. Assim o perfil espectral de emissão, mais precisamente a razão entre os picos, podem ser utilizados para detectar diferentes tipos de estresses.

Já o amido, composto produzido no metabolismo primário, utilizado como reserva energética pelas plantas, também teve sua concentração relacionada a presença do HLB. No estudo de Achoret al. (25) com Microscopia Eletrônica de Transmissão ficou constatado que a presença da bactéria causava um acúmulo de amido nas folhas contaminadas e obstruíam os vasos floemáticos. Segundo Pourreza (26) as folhas com uma maior concentração de amido, ou seja, contaminadas com HLB, quando iluminadas com a luz polarizada de um led, de comprimento de onda 491 nm, gira o eixo de polarização da luz em 90° com maior eficiência quando comparadas com as folhas saudáveis. Assim a intensidade da luz que chega no detector é proporcional a concentração de amido, podendo ser um parâmetro para medir o grau de estresses das plantas de laranja.

Ribeiro et al. (27) e Hammerschmidt (28) evidenciaram a variação na concentração dos metabólitos secundários com a presença de agentes patógenos, relacionando a quantidade dessas substâncias ao mecanismo de defesa das plantas. Afecet al. (29) inoculando em galhos de citros a bactéria *Phytophthora citrophthora*, causadora do mal fitofitosa, notou um aumento de escorparona que é

uma substancia produzida pelos metabólitos secundários, também responsáveis pela defesa da planta.

Partindo da hipótese que as transformações nos metabolismos das plantas levam alterações significativas nas composições química das folhas, serão investigadas as alterações nos padrões espectrais e imagens das folhas de árvores sob condições de estresses bióticos e abióticos. Além disso, será realizado um estudo sobre o comportamento dos padrões espectrais e das imagens, de diferentes variedades de citros e soja saudáveis, com o intuito de diferencia-las.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Técnicas fotônicas

A palavra fotônica é um termo que abrange uma área muito grande envolvendo um conjunto de tecnologias relacionadas a luz. Estudos relacionados a criação, transmissão, amplificação, processamento e manipulações da luz podem ser associadas ao termo fotônica. Grandes partes das aplicações estão na faixa espectral que se estende do ultravioleta até o infravermelho distante (ver a figura 3.1). Em nosso cotidiano existe um grande número de exemplo do uso da luz, que proporcionam uma vida mais cômoda e prática, alguns exemplos do uso da fotônica: comunicações via internet, leitores ópticos, controles remotos de aparelhos eletrônicos, aparelhos médicos para o tratamento de catarata e câncer, etc.

Nesta seção será apresentada uma breve introdução aos princípios teóricos das técnicas fotônicas que irão compor este trabalho. São elas: Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser, Imagens de Fluorescência, Imagens de Refletância com Luz Polarizada e Imagens Térmicas.

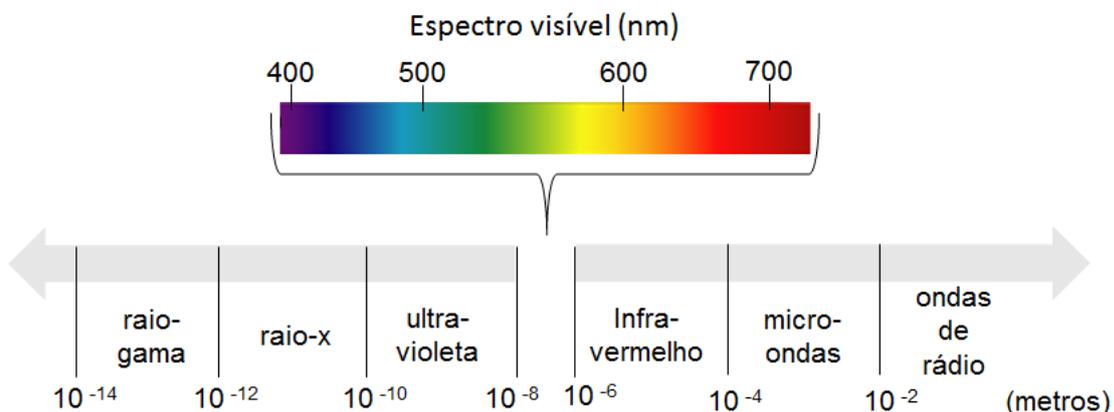


Figura 3.1 – Espectros de cores. Onde estão destacados os comprimentos de ondas da região visível.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.1.1 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Lazer

Quando uma radiação eletromagnética incide sobre um material, ela pode sofrer os seguintes efeitos: ser total ou parcialmente transmitida; refletida ou

absorvida, dependendo das propriedades físicas e químicas do material. Esses efeitos são os resultados de processos que ocorrem a nível atômico e molecular da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Este processo de absorção de energia conduzem as moléculas a um estado quântico excitado e com uma menor estabilidade. A busca das moléculas por estabilidade pode acontecer por meio do processo de decaimento, podendo ser de forma radioativa ou não radioativa. No decaimento sem a emissão de radiação a estabilidade é alcançada por meio de relaxações vibracionais moleculares. Já a estabilidade por meio de emissão de luz é chamado de Luminescência. O fenômeno de Luminescência pode ser dividido em dois processos: Fluorescência e Fosforescência. (31)

Em moléculas orgânicas a ocorrência dos fenômenos de Fluorescência ou Fosforescência vai depender dos processos envolvidos no decaimento do estado excitado. Se o retorno ao estado fundamental singleto (onde os spins se encontram disposto de forma anti-paralelos (spin *up* e spin *down*)) ocorrer de um estado excitado singleto, o fenômeno é chamado de Fluorescência. Quando o retorno para o estado fundamental singleto ocorre a partir de um estado tripleto (onde os spins estão de forma paralelos (spin *up* e spin *up* ou spin *down* e spin *down*)), o processo é chamado de Fosforescência. (31)

Para a mecânica quântica o processo de transição eletrônica é probabilístico e cada fóton, com frequência ν , da radiação incidente provê um quantum de energia, sendo regido pela equação de Planck (equação 3.1):

$$E = h \cdot \nu \quad (3.1)$$

onde h é a constante de Planck.

Desta forma, para ocorrer a transição de um elétron do estado de menor energia (E_m) para um estado excitado de maior energia (E_n), pela absorção do fóton, será preciso que o fóton tenha a frequência ν correspondente a diferença das energias entre os estados, como mostra a equação 3.2.

$$\Delta E = E_n - E_m = h \cdot \nu \quad (3.2)$$

O processo de transição do elétron de uma camada de menor energia para outra de maior energia ocorre na ordem de 10^{-15} segundos, um tempo curto para ocorrência de movimentos moleculares, baseado no princípio de Franck-Condon. (31)

Para simplificar o entendimento dos processos que podem ocorrer com a absorção da radiação eletromagnética pela matéria, utiliza-se o diagrama de Jablonski, ilustrada na figura 3.2. O uso do diagrama se faz considerando uma molécula isolada e ideal, ou seja, sem levar em conta fenômenos como a redução da intensidade de fluorescência envolvido nos processos e as interações entre solventes.

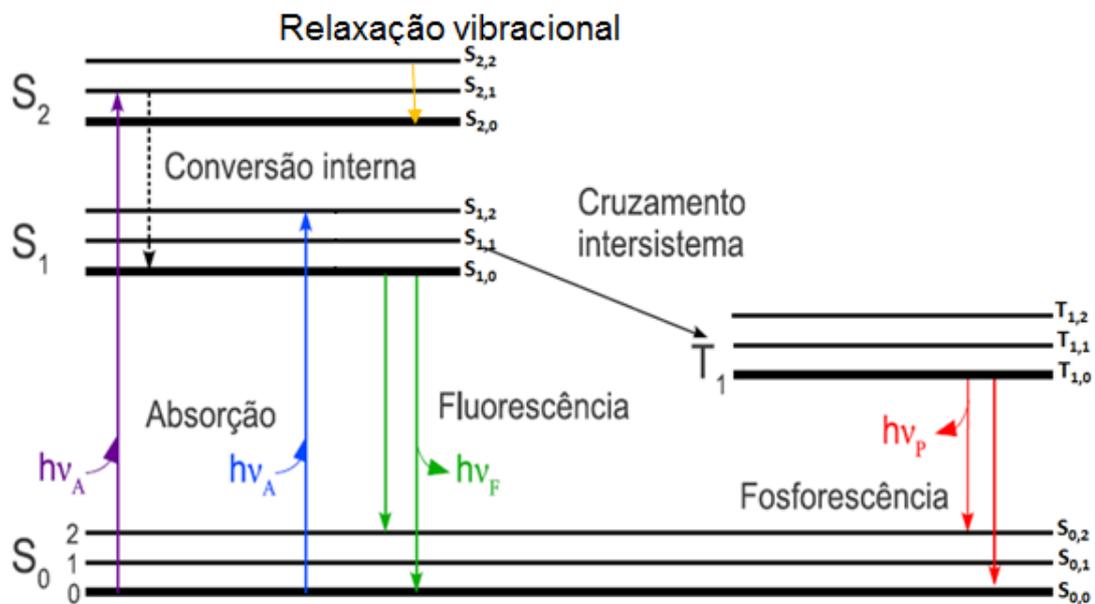


Figura 3.2 – Diagrama de Jablonski. As setas pretas tracejadas na vertical representam as conversões internas. A seta preta na diagonal, que liga S₁ a T₁, representa o Cruzamento intersistema. As setas na vertical, em roxo e azul indicam a energia absorvida pelo sistema. As setas verdes representam o decaimento relacionado a fluorescência e as setas azuis a fosforescência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No diagrama de Jablonski a letra S representa o estado singlete e T o estado tripleto. Os estados (S e T) possuem a possibilidade de ter sub-índices, relacionados ao estado fundamental (0) ou estados excitados (1,2,3...). Na representação as linhas pretas contínuas representam os estados eletrônicos, correspondente aos níveis de energia vibracionais, que estão sendo representados pelos números 0,1 e 2. A dissipação da energia por meio de colisões moleculares das espécies excitadas com o solvente acarreta um aumento da temperatura do solvente, processo conhecido como relaxação vibracional. Este processo é bastante rápido, tipicamente da ordem de 10^{-12} segundos, e está sendo representado no diagrama pela seta amarela que liga os estados excitados S_{2,2} ao S_{2,0}. Se após o processo de relaxação vibracional a molécula ainda tiver energia para migrar para outro estado de menor

energia, sem ocorrer mudança no estado de spin, o processo pode ocorrer e é chamado de conversão interna, representado na figura pela seta tracejada que liga o estado $S_{2,1}$ para $S_{1,0}$. No caso envolvendo transição de um estado excitado Singlete para um Triplete com inversões de spin é chamado de Cruzamento Intersistema, na figura esta transição é representada pela seta preta ligando o estado singlete $S_{1,1}$ ao estado triplete $T_{1,1}$.

As transições de estados singletos (S) para os estados fundamentais, no caso da figura representados pelas transições $S_{1,0}$ para $S_{0,0}$ e $S_{1,0}$ para $S_{0,2}$, com as mesmas multiplicidades de spin, envolvendo emissão de radiação recebe o nome de Fluorescência. O tempo gasto neste tipo de transição é da ordem de 10^{-8} segundos. Desta forma, temos que a energia emitida pela fluorescência ocorre em quantidades menores a que levou sua excitação, conseqüentemente em comprimentos de ondas maiores. (31)

A emissão através da transição do estado triplete T para o estado fundamental S_0 é proibida por dipolo elétrico, de acordo com a regra de seleção quântica, mas pode ocorrer via interação do tipo quadrupolo elétrico, porém com uma probabilidade muito inferior quando comparado a transição que acarreta a fluorescência. No diagrama, este tipo de transição está sendo representado pelas setas vermelhas, indicando o decaimento do estado $T_{1,0}$ para $S_{0,2}$ e $T_{1,0}$ para $S_{0,0}$. Este processo que envolve a emissão de luz é conhecido como Fosforescência, onde possui um tempo de vida muito superior ao fenômeno de Fluorescência, chegando à ordem de segundos a milissegundos.

A Fluorescência em compostos orgânicos ocorre tipicamente em estruturas de cadeias fechadas e com duplas ligações, estas estruturas diminuem o número de modos normais de vibração e rotação. A falta de rigidez nas estruturas pode ocasionar a perda de energia por relaxações via processos vibracionais moleculares, conseqüentemente diminuir a probabilidade de emissão radioativa. (31) No caso da clorofila *a* ilustrada na figura 3.3, derivada da porfirina, possui em seu centro um átomo de magnésio, com uma estrutura macro-cíclica assimétrica totalmente insaturada com quatro anéis de pirrol. Com esta estrutura a clorofila *a* é capaz de absorver na região do azul e vermelho, fluorescendo na região do vermelho e infravermelho.

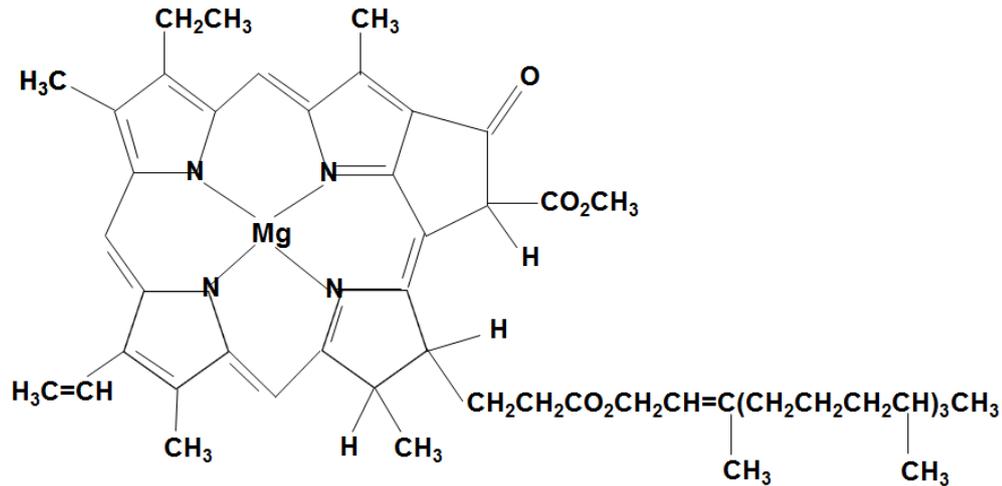


Figura 3.3 – Moléculas das clorofilas *a*. Observa-se em sua estrutura uma porfirina, no centro um átomo de magnésio, uma estrutura macro-cíclica assimétrica e insaturada.
Fonte: Elaborada pelo autor.

De forma geral, um sistema de espectroscopia de fluorescência convencional consiste de uma lâmpada, dois monocromadores, filtros e detectores de luz. Um dos monocromadores seleciona um comprimento de onda específico da lâmpada para excitar a amostra. O segundo monocromador vai difratar a luz emitida da amostra para obter o espectro de emissão característico. Os filtros, em geral, servem para eliminar ou reduzir a luz da lâmpada que é refletida pela amostra. Finalmente, o sinal de um detector posicionado na saída do segundo monocromador de emissão é enviado para o sistema de aquisição de sinal e analisado por um software dedicado ao espectrômetro. O sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS) empregado neste estudo possui uma fonte de excitação, constituída por um laser, acarretando assim a necessidade de apenas um monocromador para a obtenção do espectro de emissão, uma vez que o comprimento de onda do laser é bem definido, quando comparado com as lâmpadas. Para este sistema é utilizado como detector um mini-espectrometro, composto por um detector do tipo Dispositivo de Carga Acoplada, do inglês Charge-Coupled Divece (CCD). Tudo integrado ao computador, que controla todos os parâmetros de aquisição dos espectros de emissão, além de realizar o pré-tratamento dos dados.

3.1.2 Imagens de Fluorescência e Imagens de Refletância

Os sistemas de imagens de fluorescência estão se apresentando bastante promissores como ferramenta de detecção de estresses bióticos e abióticos em plantas. A técnica está embasada no reconhecimento de padrões das imagens de fluorescência, que são coletadas por uma câmera composta com sensores CCD, onde cada pixel carrega informações de uma área da folha. (33)

Outro fenômeno que pode ocorrer quando a luz interage com a matéria é conhecido como Refletância. De acordo com Ponzoni e Shimabukuro (34) a Refletância é a razão entre a radiação refletida e radiação incidente. Podem ocorrer outros dois processos com a interação da radiação eletromagnética com a matéria: transmitância e a absorbância. A transmitância está associada à quantidade de luz transmitida e a absorbância a capacidade de absorção do material. Os valores de refletância, absorbância e transmitância são representados por porcentagens ou números que variam entre 0 a 1. (35)

Sabendo que a onda eletromagnética possui uma energia característica é possível afirmar que as imagens dos objetos são as respostas das interações da luz incidente, tornando uma função do comprimento da onda e da intensidade da energia. (35) De acordo com Meneses (31) é conveniente considerar que para comprimentos de ondas menores, a imagem dos objetos é o retrato da resposta da interação ao nível microscópico com as suas composições. Já para comprimentos de ondas maiores a imagem dos objetos é referente a resposta da interação ao nível macroscópico com a rugosidade e suas superfícies. (35) Assim a refletância de um objeto é uma função do comprimento de onda da radiação eletromagnética que o atinge, da sua superfície e sua composição. (35)

O exemplo da resposta da interação da radiação eletromagnética, de diferentes comprimentos de onda em uma folha de planta, pode ser visto na figura 3.4.

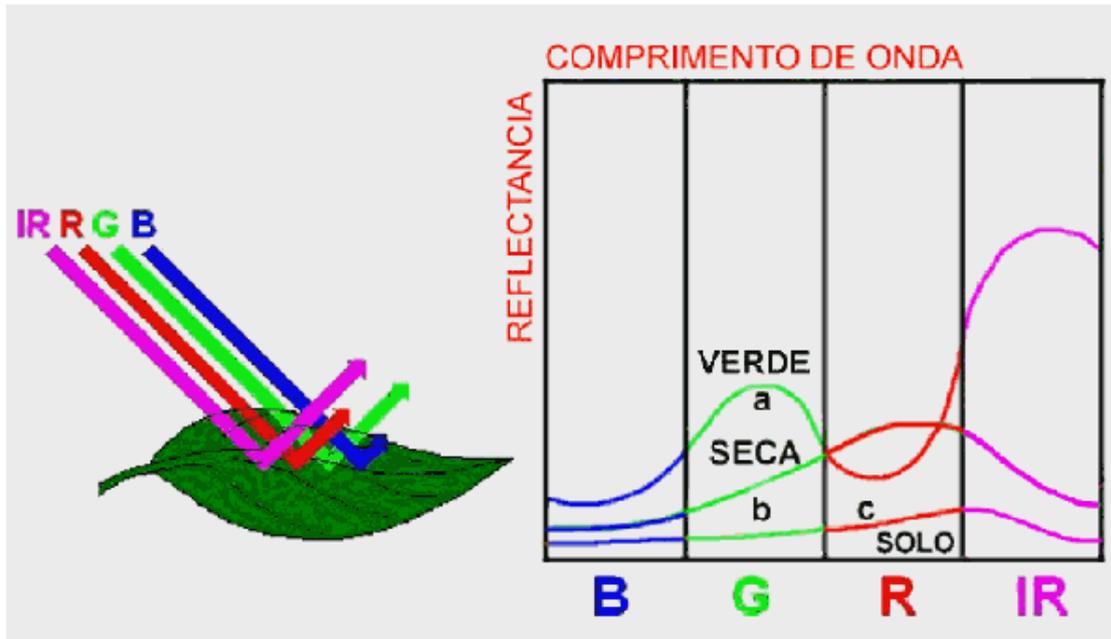


Figura 3.4 – Espectro de refletância para diferentes comprimentos de ondas da folha verde (gráfico a), folha seca (gráfico b) e solo (gráfico c). Para a folha verde existe uma grande absorção na região do azul e vermelho. Já para a região do verde o espectro apresenta uma grande refletância, o que ocasiona à coloração verde as folhas.

Fonte: MENESES. (31)

O comportamento da assinatura espectral da folha para a banda do visível (Vermelho, Verde e Azul) está relacionada a presença da clorofila, xantofila e carotenoides. A concentração desses pigmentos são a causa da pequena refletância, ou seja, essas substâncias absorvem na banda do visível, tendo o comprimento de onda verde maior refletância, como mostra a figura 3.4. Já para a banda do infravermelho (IR), a maior refletância é decorrente diretamente da interação da radiação com a estrutura celular da superfície da folha, relacionando assim os aspectos fisiológicos e a variação da concentração de água, podendo dar indicio do estágio de desenvolvimento e sanidade da planta. (35)

Para trabalhar com as imagens coletadas de um objeto ou fenômenos da natureza, utilizando um software de computador é necessário associa-la a um modelo matemático, uma vez que as imagens devem ser tratadas de maneira discreta, não continua. Uma imagem pode ser representada matematicamente pela função da equação 3.3:

$$I(x,y) = \text{Cor no ponto } (x,y), \text{ para } x \in [0,X] \text{ e } y \in [0,Y] \quad (3.3)$$

Adotando x e y como sendo números reais, delimitados entre 0 a X e 0 a Y , respectivamente, podemos modelar a imagem na linguagem de máquina. Logo a imagem digital é obtida decorrente de uma amostragem e uma quantização dessa função. Uma vez amostrado o plano temos uma matriz de valores que correspondem a cor. E cada elemento desta matriz é associado ao nome de Picture Element ou Pixel. As imagens digitalizadas apresentam um tamanho adimensional, em pixels, porém a qualidade da imagem é definida por uma grandeza conhecida como Resolução, razão do número de pixels e o tamanho da imagem. Em geral esta grandeza é representada por pontos por polegada (no inglês dots per inch ou DPI). Desta forma, a imagem é representada por uma grade regular, onde cada elemento desta grade refere-se a um pixel. (37)

Para definir o número que representam cada pixel é necessário definir a grandeza cor. Dado que a luz é uma radiação eletromagnética que transporta certa quantidade de energia, respectiva a cada comprimento de onda λ . De acordo com Meneses (31), temos que a função da distribuição da energia pelo comprimento de onda é conhecida como Distribuição Espectral de Potência, representado na figura 3.5.

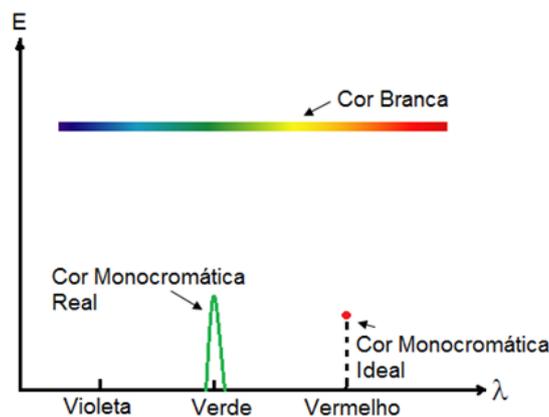


Figura 3.5 – Distribuição espectral de Potência com relação ao comprimento de onda. A linha colorida na horizontal representa a cor branca, e linha verde é associada a uma cor monocromática real. Já o ponto vermelho representa uma cor monocromática ideal.

Fonte: Adaptada de MENESES. (31)

Analisando a figura temos que a cor branca é composta por uma linha reta contendo todos os comprimentos de ondas. Já uma cor monocromática ideal é representada por apenas um ponto e uma cor monocromática real por uma banda estreita. Com isso, a luz pode ser representada por uma distribuição espectral, respeitando uma função que depende do comprimento de onda. Porém, cor é uma característica da percepção humana para diferentes espectros de luz. O olho é

composto por dois sensores: Bastonetes e Cones. Os Bastonetes não são capazes de distinguir as cores, já os Cones conseguem diferencia-las em específico as com comprimento de onda em 450 nm, a 550 nm e a 600 nm. Este processo de distinção é conhecido como tricromaticidade. (37)

Para representarmos as cores na linguagem de máquina é preciso saber como amostrar e como reconstruir. Sabendo que a amostragem de cor está associada aos receptores e a reconstrução aos emissores, podemos modelar matematicamente os receptores a partir da curva de resposta espectral de cada sensor, e os emissores modelar de acordo com as cores vermelho, verde e azul. Quando uma cor é codificada pelo computador utiliza-se um byte para cada componente, cada byte permite 2^8 possibilidades, distribuídos em valores entre 0 e 255.

Um dos padrões de cores empregados neste trabalho foi estabelecido em 1931 pelo comitê *Comission Internationale de l'Éclairage* (CIE), chamado de CIE-RGB. O padrão recebe este nome por se basear nas três cores espectrais do emissor: Vermelho, Verde, Azul e um padrão de branco. Para explicar melhor o conceito apresenta-se a figura 3.6, com o Diagrama de Cromaticidade que se baseou o sistema.

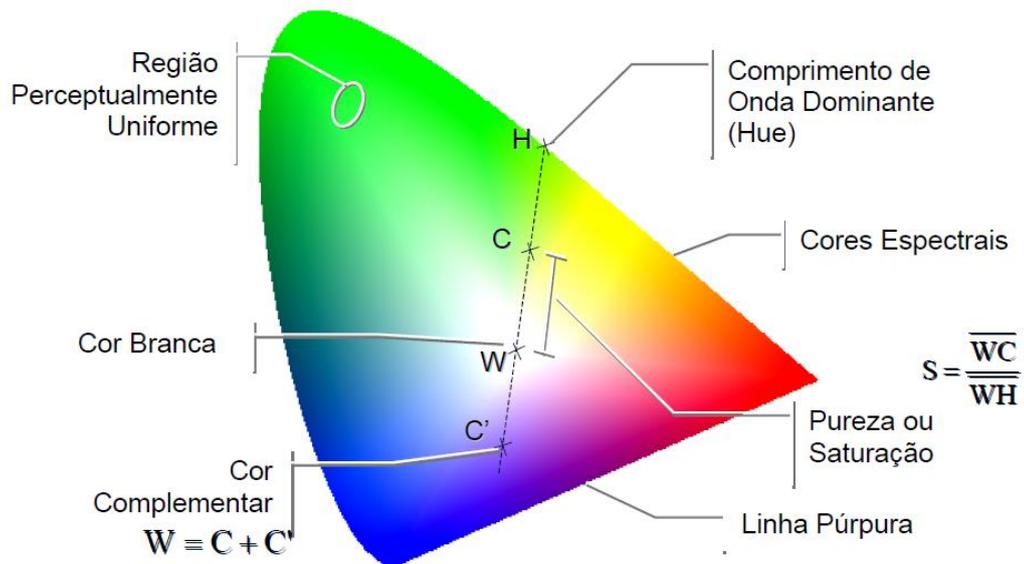


Figura 3.6 – Diagrama de cromaticidade que ajuda a explicar os padrões de cores utilizados no CIE. No diagrama a borda exprime todas as cores espectrais e no seu interior, em W, a cor branca.

Fonte: MENESES. (31)

No diagrama as cores das extremidades representam todas as cores espectrais possíveis, cujas componentes descrevem as funções de reconstruções. No interior do diagrama temos representado por W a cor branca, e a letra C refere-se a uma cor pura. A reta que liga W até a borda, passando por C define a variável Matiz H. Já a razão da reta que liga W a C por W a H defini a variável Saturação S, que expressa o quanto que a cor se assemelha a uma cor pura. A propriedade de somar uma cor com outra resultando na cor branca é chamada de complementar, no caso do diagrama está sendo exemplificada pela soma de C a C'. Porém, temos outras duas variáveis que não são representadas pelo diagrama, o Brilho e a Luminância. O brilho está relacionado diretamente com a intensidade de um espectro monocromático. Já a Luminância relaciona intensidade física da luz no espectro visível (380 a 750 nm) ponderada por uma função de sensibilidade espectral, ligada a sensação de brilho sentida pelo olho humano. Assim baseando se nas propriedades de Matiz (H), Saturação (S), e Brilho (V) foi definido outro padrão de cores o HSV. Apoiando nos padrões de cores RGB e HSV foram tratadas as imagens retiradas dos sistemas de Imagens de Fluorescência e Refletância apresentadas neste trabalho.

O sistema de imagens de fluorescência basicamente é composto por uma fonte de excitação, um filtro para bloquear a luz refletida da fonte, uma câmera para fazer a aquisição das amostras e um conjunto de lentes. E o sistema de imagens de refletância com luz polarizada contém uma fonte de luz, dois polarizadores disposto de forma que seus eixos de polarização fiquem posicionados 90° um em relação ao outro, uma câmera e o difusor. As imagens coletadas com estes sistemas são tratadas em computadores com programas ou software específicos, para retirar as informações que servirão de descritores para os nossos classificadores.

Ambos os sistemas já se mostraram muito eficiente para detecção de doenças em plantas, como apresentaram LICHTENTHALER (38), PEREIRA (39) e POURREZA. (26) A técnica de Imagem de Fluorescência baseou-se na alteração da concentração de clorofila das plantas quando sujeitas a algum tipo de estresses. Segundo BUSCHMANN (24) a clorofila possui duas bandas de emissão características, no vermelho e infravermelho, e a intensidade de emissão está associada à sua concentração, podendo dar indicio das sanidades das plantas em estudo. Já o sistema de Imagens com Luz Polarizada embasou-se no sintoma característico das plantas contaminadas com HLB, de acumular mais amido em suas

folhas, quando comparado com as folhas das plantas saudáveis. Este fato pode auxiliar no reconhecimento de padrões existente nas imagens das folhas saudáveis e doentes, uma vez que o amido tem a propriedade de girar o eixo óptico da luz polarizada incidente, sendo assim a intensidade da luz que chega no detector da câmera das folhas doentes será superior a intensidade pertencente as folhas saudáveis. (26)

3.1.3 Radiação térmica

Radiação térmica é a energia emitida por um corpo devido a sua temperatura, sendo o corpo também capaz de absorvê-la. (40) Quando a radiação atinge um corpo opaco, parte dessa radiação é refletida e parte é absorvida. A radiação absorvida possui a capacidade de aumentar a energia cinética média dos átomos que constituem o corpo, fazendo com que oscilem com mais força entorno de suas posições de origens. Definindo a temperatura como sendo a energia cinética média dos átomos, a absorção da radiação acarreta um aumento na temperatura do corpo. Esta oscilação faz com que as partículas carregadas eletricamente emitam radiação, e tendem a retornar ao estado de equilíbrio. Em temperaturas abaixo de 600°C, esta radiação térmica não é visível para o olho humano. (41)

O corpo que é capaz de absorver toda a energia fornecida, recebe o nome de Corpo Negro ideal. Josef Stefan através de seus experimentos descobriu que a potência irradiada (R) por um corpo negro se relaciona com a quarta potência da temperatura (T), como ilustra a equação (3.4). Onde $\sigma = 5,6705 \times 10^{-8} \text{W/m}^2\text{K}^4$.

$$R = \sigma.T^4 \quad (3.4)$$

Utilizando as leis da termodinâmica Ludwig Boltzmann chegou ao mesmo resultado, cinco anos após Stefan, logo a equação passou a ser conhecida como *Lei de Stefan-Boltzmann*. Um corpo negro ideal pode ser representado com uma boa aproximação, por uma cavidade com um pequeno orifício a uma temperatura T. A curva de emissão espectral $R(\lambda)$ deste corpo negro ideal, em função do comprimento de onda λ , a temperatura de 700 K pode ser vista na figura 3.7.

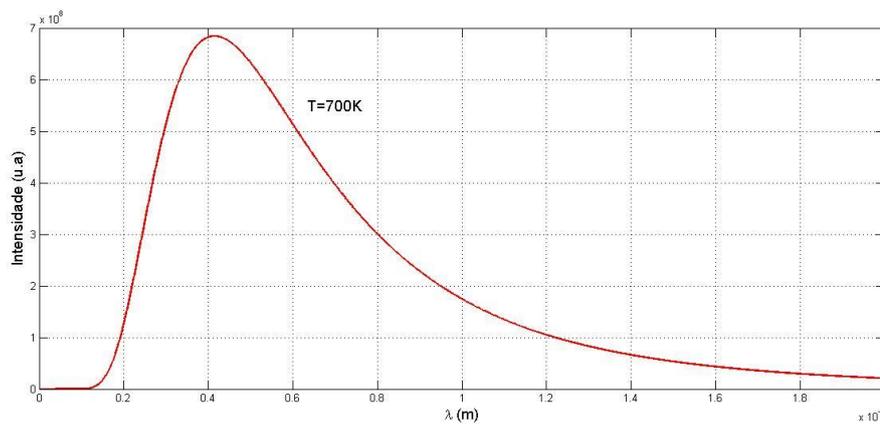


Figura 3.7 – Intensidade da potência irradiada $R(\lambda)$ por comprimento de onda. O perfil espectral é característico da temperatura apresentada por um corpo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma propriedade apresentada pelas curvas é que a radiação máxima (λ_m) varia inversamente com a temperatura, permitindo escrever a equação (3.5).

$$\lambda_m \cdot T = 2,898 \times 10^{-3} \text{ mK} \quad (3.5)$$

Este resultado foi obtido pela primeira vez por Wilhelm Wien e ficou conhecida como Lei de Deslocamento de Wien. Em 1900, Max Planck, conseguiu descrever a curva e o fenômeno da radiação desses corpos. Onde propôs que os átomos das paredes da cavidade oscilavam como osciladores harmônicos simples. Propondo ainda, que a energia irradiada por esses osciladores seria de forma discreta de acordo com a equação (3.6), onde h é a constante de Planck.

$$E_n = n \cdot h \cdot \nu \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (3.6)$$

Somando a energia média por unidade de volume, de todos os osciladores no intervalo ν e $\nu + d\nu$, Planck chegou na equação (3.7) da densidade de energia $u(\nu, T)$ no interior da cavidade.

$$u(\nu, T) = \frac{2h\nu^3}{c^2} \frac{1}{e^{\frac{h\nu}{kT}} - 1} \quad (3.7)$$

Se integrar esta fórmula da densidade de energia $u(\nu, T)$, em todas as frequências ν , encontra-se a densidade total de energia U emitida pelo corpo negro ideal, como mostra a equação (3.8).

$$U = \sigma T^4 \quad (3.8)$$

$$\sigma = \frac{2\pi^5 K^4}{15c^2 h^3}$$

Porém, em nosso cotidiano não temos corpos negros ideais e objetos comuns irradiam energia por unidade de área, com uma rapidez menor que um corpo negro a uma mesma temperatura. O valor exato não depende somente da temperatura do objeto, mas também da cor, da superfície e condições ambientais onde está o objeto. Para ajustar a equação da potência por unidade de área irradiada por um corpo, multiplicasse a fórmula por um fator ϵ , conhecido como emissividade.

As câmeras termográficas baseiam-se nesta propriedade de emissão de radiação dos corpos, com sensores capazes de registrar radiação infravermelha. O registo destas radiações permite inferir a energia emitida pelo objeto, possibilitando conhecer sua temperatura. Esses sensores convertem a energia em sinais elétricos, se necessários são amplificados proporcionalmente, e são enviados para um processador de vídeo onde são reproduzidos em uma tela de cristal líquido. Desta forma, as imagens podem ser manipuladas de maneira a aumentar o contraste, colocando-se cores falsas que representam as diferentes temperaturas dos objetos, a fim de ter uma melhor visualização para a análise.

4 OBJETIVOS

Neste trabalho pretende-se avaliar duas hipóteses:

1. Diferentes tipos de estresses acarretam alterações físicas e químicas nas plantas, e estas podem ser avaliadas através de técnicas fotônicas.
2. Diferentes variedades de uma planta possuem perfis químicos sutilmente diferentes, os quais podem ser avaliados por técnicas fotônicas.

Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial de classificação e diferenciação de plantas, empregando técnicas fotônicas. Serão avaliadas diversas condições de estresse e capacidade para fenotipagem. Os testes serão realizados utilizando-se técnicas de espectroscopia de fluorescência, imagens de fluorescência, de refletância e térmicas.

O trabalho está dividido nos seguintes objetivos específicos:

- Citrus

Avaliar o potencial das técnicas LIFS, Imagens de Fluorescência e Imagens de Refletância com Luz Polarizada em discriminar folhas de laranjeiras saudáveis de folhas doentes com HLB.

- Soja

Avaliar a capacidade das técnicas LIFS e Imagens de Fluorescência na discriminação de folhas de soja saudáveis de folhas com GSFR.

Avaliar o potencial das técnicas LIFS e Imagens de Fluorescência na discriminação de plantas de soja em condições de deficiência hídrica, deficiência de nitrogênio e referência.

Estudar o potencial das imagens termográficas na discriminação de plantas de soja em condição de deficiência hídrica de plantas de referência.

- Fenotipagem

Estudar o potencial das técnicas LIFS e Imagens de Fluorescência na diferenciação e classificação de três diferentes cultivares de soja.

Avaliar a capacidade da técnica LIFS na diferenciação de diversas variedades de laranjas, mesmo elas sendo idênticas pela técnica de marcadores genéticos.

5 Materiais e Métodos

Na sessão 5.1 deste capítulo serão apresentadas as amostras utilizadas no trabalho, suas origens, os preparos antes dos experimentos e a forma como foram acondicionadas durante as medidas. Na sessão 5.2, serão descritos os equipamentos utilizados com a técnica de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS). Já na sessão 5.3, 5.4 e 5.5 vão ser descritos os Sistemas de Imagens e como foram realizadas a suas caracterizações. Por fim, na última sessão serão apresentadas as formas como foram tratados os dados das diferentes técnicas.

5.1 Amostras

5.1.1 Conjunto de folhas de laranja para o estudo do Huanglongbing

Para o estudo de diagnóstico do Huanglongbing (HLB) em citros foram coletadas amostras de folhas de laranja de árvores em campo. Elas foram fornecidas pelo grupo Terral, e vieram da fazenda Entre Rios, localizada no município de Boa Esperança do Sul – SP. Todas as plantas são da variedade copa Valência, enxertada em citrumelo Swingle. As folhas utilizadas pertenciam a árvores adultas, com aproximadamente dez anos de idade, e foram coletadas três classes de folhas nomeadas como: HLB-Sintomática, HLB-Assintomática e Sadias.

O conjunto de folhas classificadas como HLB-Sintomática eram folhas que possuíam sintomas aparente de HLB. As folhas do conjunto HLB-Assintomática pertenciam às mesmas árvores do grupo com sintoma de HLB, mas foram coletados de galhos cujas folhas não apresentaram sintomas da doença. Por fim, o conjunto das folhas classificadas como Sadias eram folhas coletadas de árvores situadas em talhões com baixa infestação da doença e sem nenhuma deficiência nutricional. Todas as folhas foram coletadas pelo grupo de inspeção da fazenda, em um único dia, para evitar degradação das amostras ou um possível favorecimento na diferenciação entre as classes. A figura 5.1 ilustra as folhas características de cada uma das três classes definidas acima.

Ao todo, para o estudo do HLB foram utilizadas 150 folhas, 50 folhas da classe HLB-Sintomática, 50 da classe HLB-Assintomática e 50 da classe Sadia. Essas 50 folhas de cada classe pertenciam a 10 árvores diferentes, ou seja, foram coletadas em média 5 folhas por árvores. Esta distribuição nos números de folhas é importante, para não ocorrer o favorecimento na classificação de alguma classe em específico, como descrito por Ranulfi. (43)

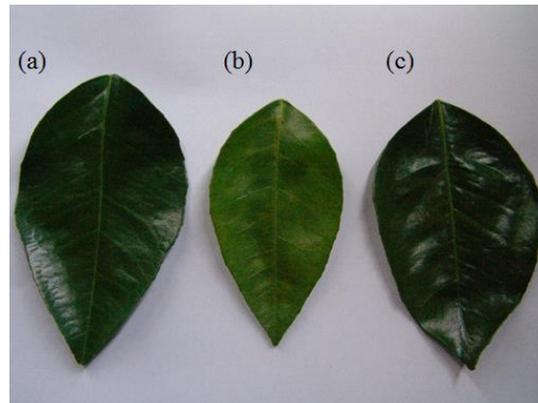


Figura 5.1 – Exemplos típicos de folhas: a) Sadia, b) HLB-Sintomática e c) HLB-Assintomática. As folhas sadias e HLB-Assintomática apresentam grandes semelhanças através de análise visual. A folha HLB-Sintomática mostra o mosqueado assimétrico característico da doença.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o diagnóstico de HLB, o conjunto de amostras de folhas de citros foi avaliado por diferentes técnicas fotônicas: LIFS-405, LIFS-561, Imagens de Fluorescência e Imagens de Refletância. Para cada uma das técnicas fotônicas foi criado um modelo de classificação via regressão *Partial Least Square* (PLSR) com o número total de espectros e/ou imagens coletadas. Quando o acerto na classificação correta das classes com o modelo gerado foi superior a 75%, após uma validação cruzada, à medida que fosse variado o número de componentes, o conjunto foi considerado como tendo potencial de classificação. Dessa forma, para validar a técnica e o modelo de classificação, e torna-lo mais universal, os conjuntos foram separados em duas partes: a primeira parte do conjunto compõe as folhas utilizadas para a construção do modelo de calibração, e a segunda parte compõe o conjunto de folhas utilizado para a validação do modelo de calibração. A tabela 4.1 especifica o número total de folhas medido por cada técnica fotônica e o número de folhas utilizado para o conjunto de calibração e validação, sempre respeitando o balanço no número de folhas nas 3 classes. Por exemplo: Para o sistema LIFS-405, das 150

folhas analisadas, 75 folhas (25 folhas de cada classe: Sadia, HLB-Sintomática e HLB-Assintomática) foram utilizadas para o modelo de calibração e 75 folhas para o modelo de validação (25 folhas de cada classe: Sadia, HLB-Sintomática e HLB-Assintomática). O mesmo critério de separação do conjunto das folhas foi respeitado para outras técnicas utilizadas.

O sistema chamado de LIFS 405-561 mostrado na tabela 5.1, refere-se aos espectros coletados separadamente nos dois Sistemas LIFS, mas os dados espectrais de cada um deles foram unidos e analisados como se fossem espectros coletados por um único Sistema LIFS com duas fontes de excitação diferentes, 405 e 561 nm.

Tabela 5.1 – Número de folhas usadas em cada experimento e a forma como foram divididas. A primeira parte dos conjuntos foi utilizada para criar os classificadores, e as segundas partes para validar os modelos de classificadores.

| | LIFS-405 | LIFS-561 | LIFS 405 -561 | Imagens de Fluorescência | Imagens de Refletância |
|---|----------|----------|---------------|--------------------------|------------------------|
| Número de folhas total | 150 | 150 | 150 | 75 | 150 |
| Primeira parte do conjunto (Classificador) | 75 | 75 | 75 | 45 | 90 |
| Segunda parte do conjunto | 75 | 75 | 75 | 30 | 60 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.2 Conjunto para os estudos do GSFR

O primeiro objetivo do estudo da aplicação das técnicas fotônicas na cultura de soja é estudar a viabilidade de se efetuar diagnóstico de doenças importantes para essa cultura utilizando instrumentação óptica, tanto em laboratório como em campo, em folhas de soja quando essas não são submetidas a nenhum preparo de amostra, ou com um mínimo de preparo de amostras. Para tal contamos com o apoio da instituição parceira do Laboratório de Óptica e Laser da Embrapa Instrumentação, a Embrapa Soja através de seu pesquisador Dr. Maurício Conrado Meyer, o qual nos enviou duas classes de folhas de soja: Classe 1: Folhas sem sintomas ou saudáveis; Classe 2: Folhas com GSFR. Essas folhas foram classificadas como sendo da Classe Doente ou Classe Sadia. As folhas

pertencentes à Classe Doente foram retiradas de regiões com a presença da doença GSFR. E as folhas classificadas como Classe Sadia, eram de regiões que não havia a presença da doença. Essas folhas foram coletadas de fazenda comerciais de soja, de diferentes cultivares e provenientes de quatro regiões diferentes como mostrado na tabela 5.2. Destas amostras apenas o conjunto das folhas coletadas da Fazenda Parnaíba não continha a doença GSFR.

Tabela 5.2 – Regiões, datas das coletas e cultivares utilizados nos experimentos. As fazendas estão localizadas no Maranhão onde são cultivados três diferentes tipos de soja: TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. A doença GSFR está presente nas fazendas Laurindo, Xingu I e Xingu II.

| Local | Estado | Latitude (S) | Longitude (W) | Data da coleta | Cultivar |
|---------------|--------|--------------|---------------|----------------|-----------|
| Faz. Parnaíba | MA | 8°27'26" | 46°06'50" | 27/2/2015 | TMG1188RR |
| Faz. Xingu I | MA | 7°44'24" | 46°27'13" | 28/2/2015 | TMG4182 |
| Faz. Xingu II | MA | 7°44'24" | 46°27'13" | 28/2/2015 | M9144RR |
| Faz. Laurindo | MA | 7°40'37" | 46°29'14" | 28/2/2015 | M9144RR |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o estudo foram utilizadas 216 folhas da fazenda Laurindo, 210 folhas da fazenda Xingu I e 210 folhas da fazenda Xingu II, sendo que destas quantidades metade pertenciam a Classe Doente e a outra metade a Classe Sadia. Sendo assim os conjuntos foram divididos, de acordo com a tabela 5.3 para as realizações dos estudos.

Tabela 5.3 – Número de folhas usadas nas diferentes técnicas fotônicas e a forma como foram divididas. As primeiras partes dos conjuntos foram utilizadas para criar os classificadores, e as segundas partes para validar os modelos de classificadores.

| | LIFS-405 | LIFS-561 | LIFS 405 -561 | Imagens de Fluorescência |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Número de folhas total | 216 (Laurindo) 210 (Xingu I e II) | 216 (Laurindo) 210 (Xingu I e II) | 216 (Laurindo) 210 (Xingu I e II) | 72 (Laurindo) 70 (Xingu I) 54 (Xingu II) |
| Primeira parte do conjunto (Classificador) | 100 (Laurindo) 100 (Xingu I e II) | 100 (Laurindo) 100 (Xingu I e II) | 100 (Laurindo) 100 (Xingu I e II) | 50 (Laurindo) 48 (Xingu I) 32 (Xingu II) |
| Segunda parte do conjunto | 116 (Laurindo) 90 (Xingu I e II) | 116 (Laurindo) 90 (Xingu I e II) | 116 (Laurindo) 90 (Xingu I e II) | 22 (Laurindo) 22 (Xingu I) 22 (Xingu II) |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os procedimentos analíticos feitos com as amostras de laranja também foram realizados para as amostras de soja. Inicialmente era observado se o acerto na classificação correta do conjunto era superior que 75%, em uma validação cruzada.

Sendo assim o conjunto era separado em duas partes, com uma das partes era criado o modelo de classificador, e com a segunda parte era feita a sua validação.

5.1.3 Conjunto para os estudos de fenotipagem com cultivares de soja

A soja foi a cultura que apresentou o maior crescimento em área no cenário agroindustrial do Brasil. A extensão e o estabelecimento de fronteiras agrícolas só foram possíveis devido a criação de novos cultivares, que possuíam uma maior produtividade, grande adaptação às diversas condições climáticas, resistentes a praga e doenças. (43) Atualmente a diferenciação destes cultivares é feita por uma margem mínima de descritores específicos a cada espécie, onde são utilizados cerca de 38 descritores, no entanto, estes não são suficientes para diferenciar todos os cultivares. (44)

Para verificar a viabilidade de se utilizar técnicas fotônicas para diferenciar ou separar os diferentes cultivares, utilizamos as amostras enviadas pelo Dr. Mauricio, e foram distribuídas de acordo com a tabela 5.4. Nesse estudo, consideramos apenas as folhas da classe saudável de cada um dos cultivares de sojas descritas na seção anterior: Fazendas Parnaíba (TMG1188RR), Xingu I (TMG4182) e Xingu II (M9144RR). Novamente, utilizamos os mesmos processos de análises estatísticas, descrito anteriormente, verificamos o potencial de classificação do conjunto, através de uma regressão PLSR. Sendo observado um acerto superior a 75%, em uma validação cruzada, o conjunto era separado em duas partes, onde uma das partes foi utilizada para criar os classificadores, e a outra usada para validar o modelo.

Tabela 5.4 – Números de folhas usadas nas técnicas LIFS-405, LIFS-561 e Imagens de Fluorescência, e a forma como foram divididas. As primeiras partes dos conjuntos foram utilizadas para criar os classificadores, e as segundas partes para validar os modelos de classificadores. Para o estudo com fenotipagem foram utilizadas folhas das Fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, cujo cultivares são todos distintas uma das outras.

| | LIFS-405 | LIFS-561 | Imagens de Fluorescência |
|---|----------|----------|--------------------------|
| Número de folhas total | 315 | 315 | 81 |
| Primeira parte do conjunto (Classificador) | 150 | 150 | 60 |
| Segunda parte do conjunto | 165 | 165 | 42 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3 Conjunto para os estudos de fenotipagem com variedades de laranjas

O uso de grandes áreas para o cultivo de uma só cultura aumenta a probabilidade do surgimento de pragas e doenças. Dessa forma, fica evidente a necessidade de possuir novas variedades resistentes e com maiores produtividades, de modo a diminuir os custos da produção. A utilização de bancos de germoplasma para conservar as variedades genéticas é uma estratégia crucial para manter a sobrevivência e assegurar a economia do setor agrícola. Assim, o aproveitamento de forma correta das bases genéticas existente nos bancos de germoplasma pode possibilitar o desenvolvimento de novas cultivares resistentes a todos os tipos de estresses biótico e abióticos. (45)

Para o desenvolvimento deste trabalho foram enviados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) alguns exemplares do seu Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros. O BAG de Citros do IAC fica localizado na cidade de Cordeirópolis, estado de São Paulo, onde foi criado a partir do acervo particular de Navarro de Andrade em 1928. Hoje o a coleção contém mais de 1700 exemplares de citros e relacionados. (45) No estudo foram utilizadas as variedades apresentadas na tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Variedades de laranja utilizadas nos estudos com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561. As amostras vieram do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros, onde estavam todas nas mesmas condições de desenvolvimento.

| Identificação | Nome Comum | Identificação | Nome Comum |
|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------|
| BAG Citros 0006 | Baia Vale del Cauca | BAG Citros 1667 | Pera Roberto Gullo |
| BAG Citros 0008 | Baianinha Piracicaba | BAG Citros 1703 | Pera Bianchi |
| BAG Citros 0119 | Pera Ipiqua | BAG Citros 0277 | Red Pulp |
| BAG Citros 0227 | Ovale | BAG Citros 0278 | Red Pulp de Mombuca |
| BAG Citros 0273 | Pera Mahle | BAG Citros 0279 | Sanguinelli- Faz. Reserva |
| BAG Citros 0295 | Pera Olímpia | BAG Citros 0280 | Doppio Red Pulp |
| BAG Citros 1546 | Pera de Abril IAC 148 | BAG Citros 1708 | Valencia Puka |
| BAG Citros 1557 | Valencia B | BAG Citros 1526 | Piralima IAC 2 |
| BAG Citros 1589 | Westin IAC 115 | BAG Citros 1538 | Lima IAC 9 |
| BAG Citros 1640 | Seleta do Rio IAC 420 | BAG Citros 1701 | Piralima IAC 11 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

As plantas do BAG Citros do IAC são as origens de novas seleções e cultivares para a agricultura do país. A coleção tem o lugar de destaque no processo de melhoramento genético de citros no Brasil e no mundo, onde as variedades são cultivadas em estufas sob condições idênticas de iluminação, adubação, temperatura e irrigação (ver figura 5.2). As plantas foram plantadas e se desenvolvem em vasos de plástico com capacidade volumétrica de 60 litros, contendo substrato de solo comercial. Alguns cultivares empregados no trabalho possuem a característica de ser irreconhecíveis pelo processo de marcadores genético, principal técnica empregada para identificação de variedades, que são os casos das laranjas Peras, e como possuem em torno de três anos de idade ainda não manifestaram características que possam ser diferenciadas por uma inspeção visual.



Figura 5.2 – Imagens de como estão dispostas as plantas na estufa na BAG do IAC de Citros. Todas as laranjeiras estão nas mesmas condições de luminosidade, irrigação, umidade relativa do ar e adubação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O conjunto com as 20 variedades foram separados em dois subconjuntos: subconjunto das variedades coletadas na estação do inverno; subconjunto das variedades coletadas na estação do verão (ver tabela (5.5)). Todas as folhas de cada subconjunto foram coletadas em um único dia, para evitar favorecimento na

classificação de uma variedade em específico, elas também foram limpas com água destilada e algodão.

No estudo foi utilizada a técnica de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser, com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561, junto com os modelos de regressão PLSR, na tentativa de diferenciar as 20 variedades de citros, como será descrito posteriormente. As medidas foram realizadas a uma temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, na região abaxial, próximo a nervura central e do lado direito.

5.1.4 Amostras de soja para o estudo de deficiência de nitrogênio e deficiência hídrica com plantas de Soja

Para avaliar o potencial das técnicas fotônicas em diagnosticar e diferenciar estresses em cultivares de soja, foi realizado um estudo controlado com plantas mantidas em uma casa de vegetação, pertencente a Dr^a Débora Milori, situada no Laboratório Nacional de Agricultura de Precisão - LANAPRE, localizado em São Carlos-SP. Os cultivares de soja foram plantados em 45 vasos de plásticos, redondos, com diâmetro superior de 34 cm, altura 30 cm, diâmetro inferior 21 cm e capacidade de 21 l. Em cada vaso foram plantadas três plantas, onde a semeadura aconteceu em 01/10/2015 e a emergência em 06/10/2015. Para este estudo, utilizou-se o cultivar ST820RR fornecidas pela Embrapa Agropastoril.

O solo utilizado para o plantio das plantas foi retirado da própria fazenda LANAPRE, e foi feito a adubação com enxofre, fósforo, cálcio e magnésio. Foram utilizados em média 25 kg de terra fina, seca ao ar, em cada vaso. Os vasos foram furados na região de baixo e colocado uma pequena camada de pedra para evitar o acúmulo excessivo de água. Os vasos e o preparo do solo para o plantio podem ser vistos na figura 5.3.



Figura 5.3 – Vasos utilizados no plantio da soja e preparo do solo. Os vasos são de plásticos e possuem a capacidade de 21 litros. O solo foi obtido da própria fazenda do LANAPRE e corrigido com enxofre, fósforo, cálcio e magnésio.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o estudo controlado de diferenciação de estresses em plantas de soja os 45 vasos foram subdivididos em 3 subconjuntos de 15 vasos, com tratamento diferenciado, e as plantas contidas em cada subconjunto foram denominadas de classes:

- Classe de Referência: Plantas pertencentes aos vasos que durante o experimento foram mantidas em condições ótimas para o seu desenvolvimento, foram consideradas amostra de controle para estudo.
- Classe de Deficiência Hídrica: Plantas que estavam nos vasos que em algum momento durante o experimento, sofreriam com a redução da concentração de água, mas sempre respeitando o limite suportável pela planta.
- Classe de Deficiência de Nitrogênio: Plantas pertencentes aos vasos que no início do experimento, não receberam adubação extra de nitrogênio.

Na casa de vegetação os vasos foram dispostos em três fileiras, com 15 vasos cada, e alternando as classes a cada cinco vasos. As disposições dos vasos podem ser vistas na figura 5.4. A fila central corresponde aos vasos com as plantas controle. As duas outras classes de folhas foram intercaladas a cada 5 vasos, isso para que tanto plantas com estresse hídrico como estresse de nitrogênio ficassem

sujeitos as variações das condições ambientais, iluminação, vento, chuva, dentro da estufa.



Figura 5.4 – Disposição das plantas dentro da casa de vegetação. Os vasos foram posicionados em três fileiras, sendo as classes alternadas a cada cinco vasos. Isso para não ocorrer beneficiamento de nenhum conjunto de plantas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante a condução dos ensaios foram realizados todos os tratamentos culturais e fitossanitários que se fizeram necessários para manter as plantas nos vasos livres de pragas, doenças e ervas daninha. As plantas de referência sempre foram mantidas nas condições ótimas de irrigação e fertilização para o seu desenvolvimento. Os vasos com as plantas de referência e déficit hídrico receberam uma adubação extra de nitrogênio, cuja fonte foi o inoculante *Bradyrhizobium*, no período de semeadura e 20 dias após o plantio. A proporção utilizada do inoculante foi de 250 mL por Hectare. Segundo Hungria (47), as principais fontes de nitrogênio para as plantas de soja são os fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio, sendo esta última a utilizada em nosso estudo com o inoculante *Bradyrhizobium*, estas bactérias infectam as raízes, ocasionando as formações de nódulos capazes de capturar o nitrogênio do ar, e assim auxiliar no crescimento da planta.

Os controles do teor de água nos vasos foram feitos através dos sensores de Time-Domain Reflectometer (TDR) da Campbell Scientific, modelo TDR-100, como feito por Almeida (49) e mostrado na figura 5.5. Eles foram instalados no centro dos vasos a uma profundidade de 20 cm. A concentração de água nos vasos, onde estavam às plantas das classes de Referência e Déficit de Nitrogênio, foram mantidas a 25% com relação ao seu volume e monitorada diariamente. A

concentração de água nas plantas da classe de Deficiência Hídrica foi reduzida em média três dias antes das coletas, ficando próximo dos 10% com relação ao volume do vaso. As coletas aconteceram em: 12/11/2015, 16/11/2015 e 24/11/2015. A escolha destas datas aconteceu, pois neste período as plantas atingiram o estágio de florescimento pleno (55 a 60 Dias Após o Plantio - DAP) e início de frutificação aos 70 DAP, período onde as plantas de soja necessitam de grande concentração de água, e um déficit neste período poderia acarretar uma menor produtividade. Após os períodos de estresses hídricos as plantas tinham sua reposição hídrica, retomada normalmente através da irrigação, onde eram monitorados pelos sensores TDR, até o momento que a concentração de água atingisse a capacidade de campo (25% do volume do vaso).

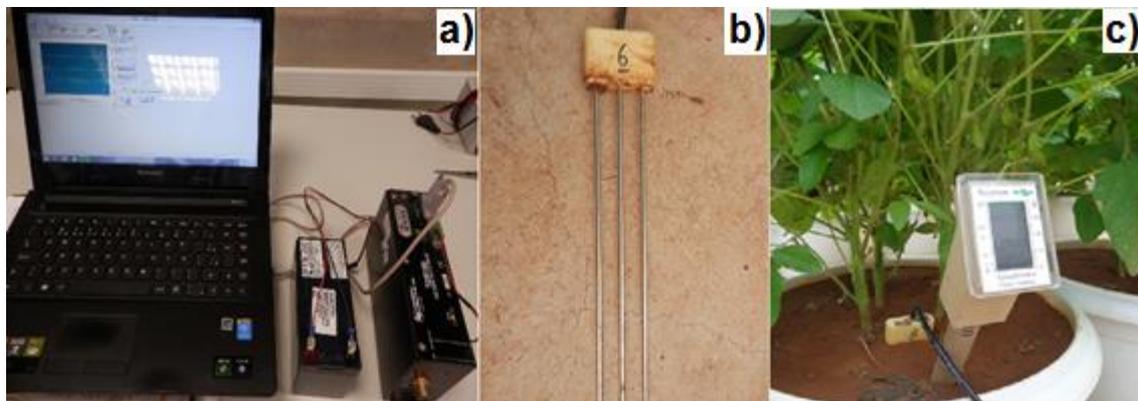


Figura 5.5 – Em a) sistema do sensor TDR usado para auxiliar no controle da concentração de água nos vasos. Em b) haste do sensor TDR que possui a função de enviar e coletar o sinal elétrico e assim estimar a umidade do vaso. Em c) vaso com o sensor TDR.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para esse experimento foram utilizadas 3 técnicas fotônicas diferentes: LIFS-405, LIFS-561 e as imagens de fluorescência. E para efetuar as medidas coletou-se sempre o quinto trifólio das plantas, em torno de 135 folhas sendo 45 de cada classe por coleta. Foram definidas estas folhas, por se tratarem de folhas adultas e mais resistentes a todos os estresses.

O número de folhas utilizadas nas diferentes técnicas pode ser visto na tabela 5.6. Os mesmos procedimentos analíticos aplicados às plantas do item 4.1.1 foram repetidos: primeiramente avaliou-se o potencial de classificação, em seguida um modelo de calibração/classificação foi criado e pôr fim o modelo foi validado.

Tabela 5.6 – Números de folhas usadas nas diferentes técnicas fotônicas e a forma como foram divididas. As primeiras partes dos conjuntos foram utilizadas para criar os classificadores, e as segundas partes para validar os modelos de classificadores. O intuito do estudo é estudar o potencial das técnicas em separas folhas de plantas em diferentes condições de estresses.

| | LIFS-405 | LIFS-561 | Imagens de Fluorescência |
|---|----------|----------|--------------------------|
| Número de folhas total | 135 | 135 | 135 |
| Primeira parte do conjunto (Classificador) | 90 | 90 | 90 |
| Segunda parte do conjunto | 45 | 45 | 45 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.5 Preparo das amostras

Para as medidas com as técnicas óticas feitas em laboratório, tanto as folhas de citro como as folhas de soja não foram submetidas a nenhum preparo de amostra. As folhas eram coletadas e colocadas em saquinhos plásticos e etiquetadas com as identificações das respectivas árvores. Em seguida foram colocadas em uma caixa de isopor e imediatamente enviadas para a Embrapa Instrumentação.

No Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação, as folhas foram limpas com algodão umedecido em água destilada e secas com outro algodão, como detalha a figura 5.6. Sempre que as folhas não estavam sendo utilizadas, para evitar a sua degradação, elas eram armazenadas na geladeira e mantidas refrigeradas à aproximadamente 4°C. Todas as medidas nos sistemas espectroscópicos e de imagem foram feitas com as folhas *in natura* e em até 8 dias pós-colheita.



Figura 5.6 – Preparo das folhas de laranja antes da medida com o FIL. As folhas são limpas com algodão umedecido com água destilada, e empregando outro algodão as folhas são secas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As folhas enviadas pelas instituições parceiras, com a Embrapa Soja são coletadas de plantações de soja que ficam a uma distância considerável da Embrapa Instrumentação e as folhas são enviadas pelo correio. Como elas degradam rapidamente após serem retiradas das plantas tornou-se necessário efetuar um estudo sobre quais as melhores condições de armazenamento dessas folhas. Esse foi um passo importante, porque a soja é uma planta anual, e o momento mais propício para o seu plantio é em meados do 2^o semestre do ano, em que se iniciam o período de chuva para uma colheita em até março do ano seguinte (dependendo do cultivar adotado para o plantio). Se essas folhas chegarem inutilizadas será necessário aguardar a próxima safra, o que acarretaria um atraso de um ano no projeto. Para estabelecer uma metodologia de coleta das folhas de soja, um estudo de armazenamento das folhas de soja foi feito e contamos com a colaboração da Fazenda Canadá, pertencente ao grupo Di Solo, localizado no município de São Carlos. Após uma coleta de folhas em diferentes pontos da plantação: folhas coletadas da borda da plantação; folhas coletadas do meio da plantação; folhas em que mantivemos o trifólio íntegro; folhas em que acondicionamos o trifólio solto; folhas soltas, e folhas armazenadas dentro de saquinhos de diferentes formas: Sem ar; Com ar; Sem ar e com água; Com ar e com água. Elas foram guardadas em uma caixa de isopor fechada e sem gelo durante 7 dias. Em seguida, a caixa foi aberta e observaram-se quais são as melhores condições para o armazenamento das amostras folhas de soja:

- 1) Saquinhos sem ar;
- 2) Trifólio solto para melhor acomodação das folhas;
- 3) Não faz diferenças entre coletar as folhas da borda ou do meio da plantação.

Esse passo foi importante para estabelecer os materiais e métodos com as amostras de folhas de soja coletadas e enviadas pela Embrapa Soja. Isso permitiu que as folhas chegassem frescas e em condições de serem medidas no Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação. As folhas do conjunto enviado pela Embrapa Soja foram armazenadas seguindo as orientações de acordo com os resultados obtidos no item anterior. Cada trifólio foi colocado separado em sacos plásticos, o ar retirado de dentro delas e fechadas com fita crepe, como ilustra a Figura 5.7. Da colheita até o momento em que elas foram medidas, as folhas foram mantidas dentro dos sacos e refrigeradas em geladeira.



Figura 5.7 – Todas as folhas foram armazenadas seguindo as orientações de acordo com os resultados obtidos no item anterior. Cada trifólio foi colocado separado em sacos plásticos, o ar retirado de dentro delas e fechadas com fita crepe.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS)

Para as medidas com o sistema LIFS foram utilizados os dois sistemas portáteis desenvolvidos no próprio Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação (WO2010069017A1 patente internacional (48)). Ambos os equipamentos possuem o mesmo sistema óptico e eletrônico, a principal diferença entre eles é a frequência dos lasers de excitação e os espectrômetros. O esquema dos sistemas se encontram na figura 5.8. Os lasers de diodo que operam nesses equipamentos

são da Coherent, um modelo CUBE e o outro COMPASS. O sistema LIFS que possui o laser com o modelo CUBE trabalha com excitação em 405 nm, com 20 mW de potência, e possui um mini-espectrômetro USB 2000-Ocean Optics com um intervalo espectral de 194 a 890 nm e resolução óptica de 1,5 nm. O sistema LIFS com o laser modelo COMPASS trabalha com a excitação em 561 nm, e potência de 8 mW, e o respectivo espectrômetro, também um mini-espectrômetro USB 2000-Ocean Optics, possui um intervalo espectral de 500 a 1200 nm. Ambos os equipamentos possuem um cabo óptico contendo seis fibras para conduzir a luz de excitação, e uma fibra central para coletar a luz refletida e a fluorescência emitida pela amostra. Além disso, os sistemas LIFS também são compostos por um filtro óptico para bloquear a luz refletida do laser, um sistema de refrigeração com entradas de ar e coolers para manter a estabilidade dos lasers e a integridade dos componentes eletrônicos. Os espectros são coletados por um computador equipado com o software Diagnóstico, que foi desenvolvido no próprio laboratório, capaz de realizar um pré-tratamento nos dados. Esse software controla tanto o processo de aquisição bem como todo processo de medição, pré-tratamento de sinal e análise dos espectros.

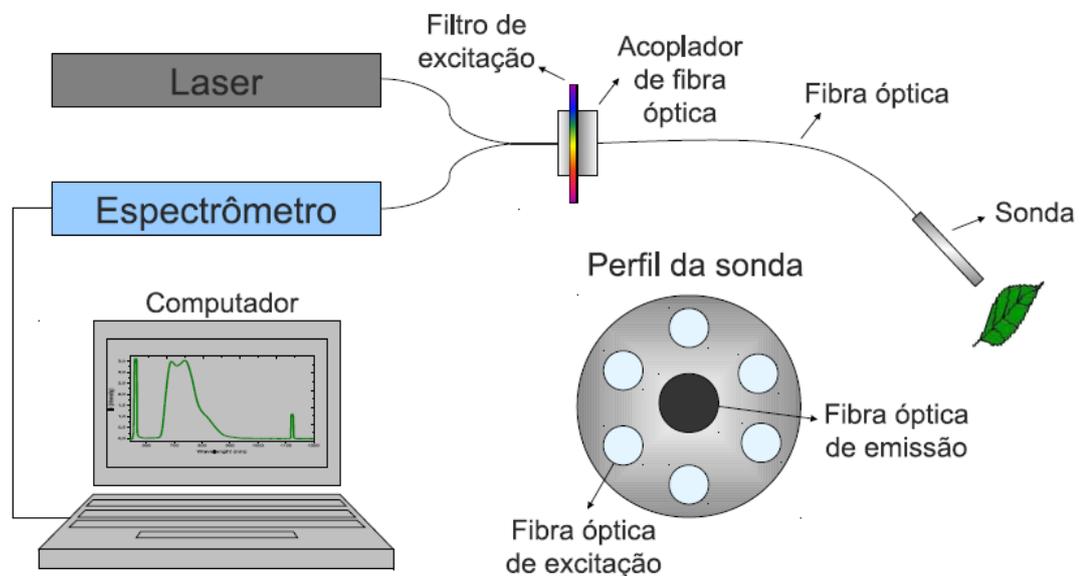


Figura 5.8 – Esquema do Equipamento LIFS. O sistema possui um laser como fonte de excitação, um cabo óptico, um mini-espectrômetro, um filtro, a sonda e um computador.

Fonte: CARDINALI. (50)

O software Diagnóstico permite o ajuste de três parâmetros de aquisição referente aos espectrômetros: *tempo de integração*, *número de médias* e *boxcar*. A grandeza *tempo de integração* está ligada ao tempo de exposição dos sensores do espectrômetro até a próxima medida. O *número de médias* relaciona o número de espectros coletados para o qual se obterá a média entre eles, isso para diminuir ao máximo os ruídos e melhorar a relação sinal/ruído. Já o *boxcar* é uma grandeza ligada à suavização do espectro, onde é feito uma média entre os pontos nas vizinhanças de cada ponto.

Para facilitar a nomenclatura denominaremos o sistema LIFS que opera com o laser de excitação em 405 nm como LIFS-405, e o que trabalha com excitação em 561 nm, será designado de LIFS-561.

No sistema LIFS-405 foi utilizado o valor de 60 ms para o *tempo de integração*, 20 o *número de médias* e 2 para *boxcar*. O LIFS-561 foi operado com 2 ms no *tempo de integração*, 20 no *número de médias* e 2 para *boxcar*.

Todas as medidas realizadas no LIFS-405 e no LIFS-561 foram feitas nas folhas *in natura*, na região inferior da face abaxial e adaxial, como mostra a figura 5.9.



Figura 5.9 – Medida com o sistema LIFS-405 em uma folha de laranja. O procedimento está sendo realizada na região abaxial, na parte superior e próximo a nervura central da folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Espectroscopia de fluorescência por imagem

O sistema experimental das imagens de fluorescência foi montado sobre uma mesa óptica e é composto por uma câmera Sony, modelo Alfa-55, um laser de diodo da marca Coherent, modelo CUBE com emissão em 377 nm, duas lentes divergente e uma convergente, todas de BK7, um filtro para bloquear a luz refletida pertencente ao laser e um porta-amostra, como ilustrado na figura 5.10.

As imagens foram coletadas pela câmera Sony, a qual estava ajustada no modo manual, para que não ocorressem correções e ajustes automáticos, feito pelo software da própria câmera. O laser incide e excita as amostras de folhas *in natura*. Antes de atingir as folhas, o feixe foi expandido com o auxílio das duas lentes divergentes para que a área iluminada na amostra fosse a maior e mais homogênea possível. Em frente da câmera foi posicionado um filtro da Barloword Scientific, modelo LAMBDA 900 UV/VIS/NIR, para bloquear luz com comprimento de onda inferior a 400 nm e uma lente convergente para aumentar a área de aquisição da imagem. O porta-amostra tinha a função de fixar as folhas de soja e laranja de modo a facilitar o posicionamento e a troca das folhas na hora da medida.

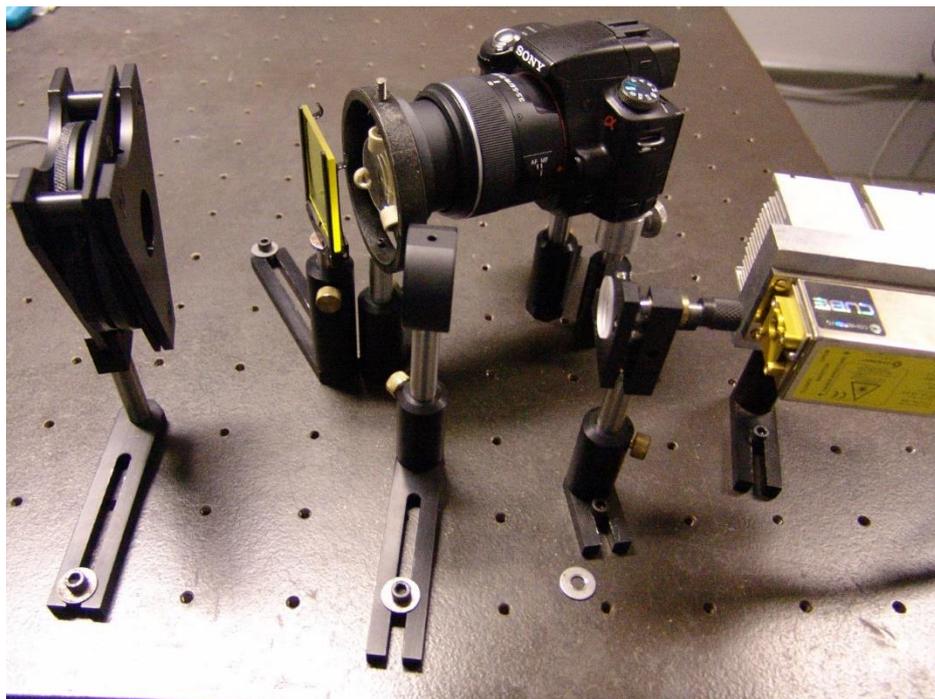


Figura 5.10 – O sistema de Imagens de Fluorescência possui um laser como fonte de excitação, um conjunto de lentes, um filtro um porta amostra e uma câmera.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Sistema de Imagens de Refletância com luz polarizada

O sistema de imagens com luz polarizada foi montado sobre a mesma mesa óptica e dispunha de uma câmera Sony, modelo Alfa – 55, para aquisição das imagens, uma lente divergente, dois polarizadores posicionados de forma que suas polarizações ficassem cruzadas, ou seja, uma com a polarização na vertical e o outro com polarização na horizontal. O sistema também era composto de um laser de diodo Coherent, modelo COMPASS, com excitação em 561 nm e 8 mW de potência, um difusor com granulometria 600, para homogeneizar e diminuir a intensidade da luz do laser, e um cabo óptica contendo seis fibras, com a função de conduzir e espalhar a luz, de modo que o feixe chegue na amostra bastante disperso, e um porta amostra para acomodar as diferentes folhas. O efeito da luz polarizada sobre as folhas com HLB, de girar a polarização da luz em 90° devido ao acúmulo de amido, foi estudado por Pourreza (26), mas com um led com o comprimento de onda de excitação em 591 nm.

O sistema de imagem de refletância com luz polarizada empregado neste trabalho de mestrado pode ser visto na figura 5.11.

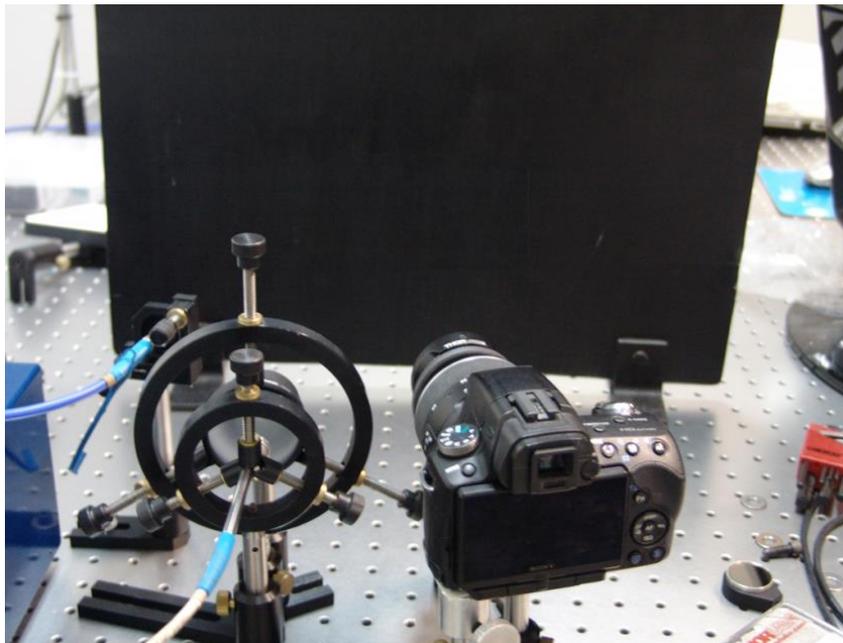


Figura 5.11 – O sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada possui um laser de diodo com excitação em 561 nm, um difusor, um cabo óptico, dois polarizadores, uma lente e uma câmera.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para caracterizar o sistema de imagem de refletância de luz polarizada, outro sistema foi utilizado para ver o comportamento da intensidade da luz refletida pelas diferentes classes de folhas de laranja. Ao invés de utilizar os sensores de aquisição da câmera Sony, utilizou-se um medidor de baixa potência luminosa. A arquitetura do sistema foi a mesma que a descrita para o sistema de imagens de refletância, mas no lugar da câmera foi posicionado o detector do medidor de potência. A figura 5.12 mostra a disposição do sistema.

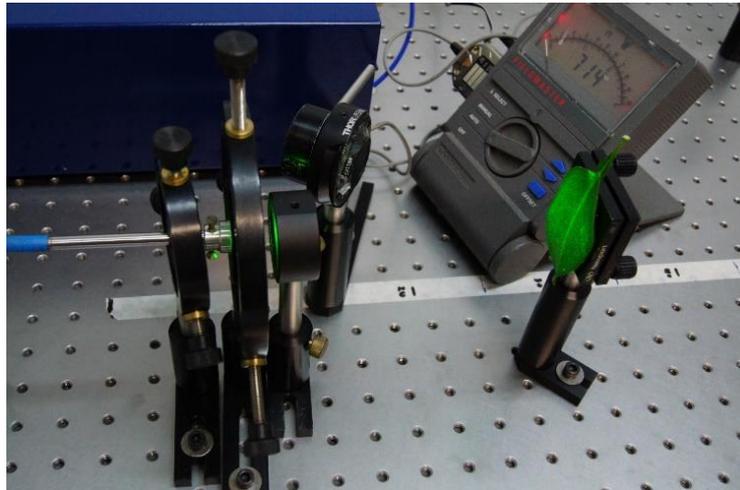


Figura 5.12 – Sistema utilizado para estudar o comportamento da intensidade da luz refletida ao passar pelos polarizadores. O sistema possui praticamente a mesma configuração do sistema da figura 5.11, mas no lugar da câmera é posicionado o detector do potenciômetro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.1 Caracterização da intensidade do laser que passa pelos polarizadores

O sistema exposto na figura 5.13, foi usado para ver o comportamento da intensidade da luz que passa pelos polarizadores, à medida que se varia o ângulo de polarização. Para esta caracterização foi utilizado o medidor de potência luminosa, os mesmos polarizadores e o laser descrito anteriormente. Já a Figura 5.14-a) mostra como fica uma imagem (intensidade) com os polarizadores com a polarização cruzada (fechado) e em paralelo (aberta), figura 5.14-b). As imagens 5.14 estão de acordo com o funcionamento dos filtros polarizadores, pois quando estão posicionados de forma cruzados, não permitem a passagem da luz, o que não ocorre quando os polarizadores estão dispostos paralelamente.

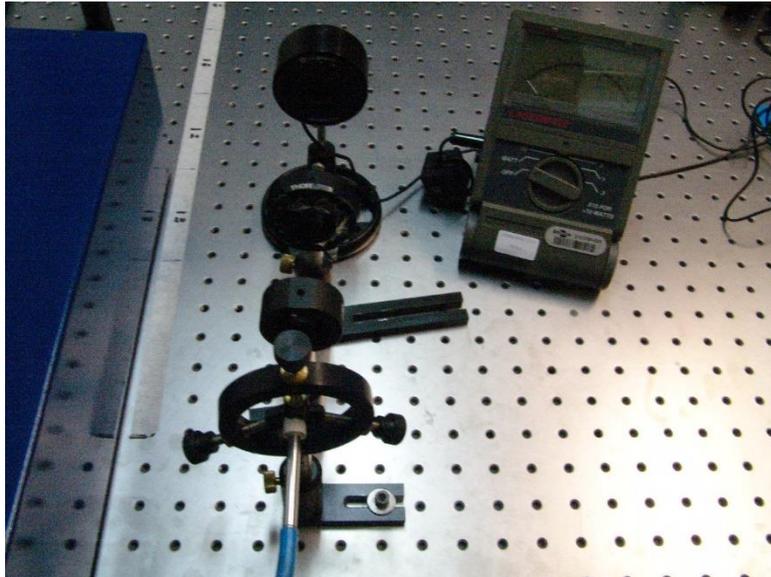


Figura 5.13 – Sistema usado para caracterizar a intensidade da luz que passa pelos polarizadores. Ao girar um dos polarizadores e mantendo o outro fixo foi estudado como variava a intensidade mostrada no potenciômetro.

Fonte: Elaborada pelo autor.



Figura 5.14 – Em a) os polarizadores estão com o eixo de polarização cruzados, onde se nota o bloqueio da passagem de luz entre os dispositivos ópticos. Em b) os polarizadores estão com o eixo de polarização em paralelo, onde é possível observar a passagem de luz entre os dispositivos ópticos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.2 Caracterização da distribuição da intensidade do laser em diferentes pontos

Uma segunda caracterização foi realizada para ver como se comporta a distribuição do feixe do laser, ou seja, como varia a intensidade em diferentes posições. Na caracterização foi utilizado a Câmera Sony, o laser, o difusor, o medidor de potência luminosa e o cabo óptico dos experimentos anteriores. A imagem desta caracterização pode ser vista na figura 5.15.

Para a determinação da distribuição da intensidade de luz laser variou-se a distância entre o laser e o detector de 20 a 100 cm, em intervalos de 10 cm. A reta que liga o laser ao detector foi denominada de eixo Y. Assim em cada uma destas posições do eixo Y foram variadas as posições do detector, de um a um centímetro, sobre uma reta perpendicular à que liga o laser ao detector, que foi chamada de eixo X, de modo que assim fosse possível ver a distribuição da intensidade da luz sobre o plano da mesa.

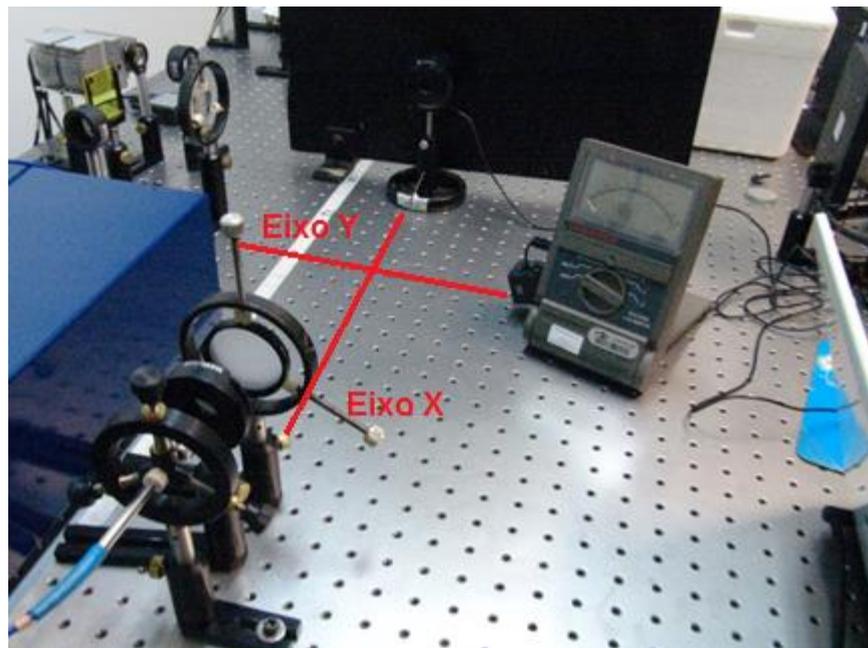


Figura 5.15 – Sistema para caracterizar a distribuição da luz que é espalhada, neste experimento foi variado a distância do detector do potenciômetro pelos eixos X e Y.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Imagens termográficas

Para as medidas das imagens térmicas com as plantas de soja na estufa foi utilizada uma câmera termográfica da FLIR, modelo T-420. As medidas foram feitas na estufa do LANAPRE, onde as plantas de soja foram cultivadas conforme descrito anteriormente na seção 4.1.3. Para tirar as imagens foi utilizado um tripé, ajustado a uma altura de 1,65 m, em relação ao chão. Para cada vaso havia uma marcação específica no chão, de modo que todas as medidas para o vaso em estudo fossem feitas na mesma posição. Foi tomado todo este cuidado para termos uma padronização no posicionamento das medidas.

Foi utilizado também um equipamento capaz de fornecer a temperatura e a umidade do ambiente, o Termo-Higrômetro, fabricado pela J.Prolab. Para aquisição do sinal de umidade tirada com o sensor TDR, foi utilizado um notebook, cujos dados foram retirados concomitantemente com as imagens termais. Em outro computador equipado com o software livre da FLIR, o FLIR-Tools, foi feito os tratamentos das imagens térmicas.

As medidas foram feitas nas mais diversas condições de temperatura, umidade e horário. Isso para estudarmos os comportamentos e variações das três diferentes classes, e tentar encontrar qual seria melhor situação para utilizar o equipamento em uma condição de campo.

5.5.1 Emissividade das folhas de soja

A determinação da emissividade das folhas de soja foi realizada no Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação, sob condições controladas de umidade e temperatura. Para efetuar a sua determinação várias medidas foram feitas com a câmera termográfica. A figura 5.16 ilustra a montagem experimental utilizada para essas medidas. A câmera da FLIR foi acoplada a um tripé e mantida a uma altura fixa de 25 cm, em relação à mesa. A temperatura da sala foi mantida em aproximadamente 24°C por um ar condicionado instalado na sala e a umidade era ajustada na câmera toda vez que ela variava. Tanto a temperatura quanto a umidade foram controladas utilizando-se o mesmo aparelho da J. Prolab. Para referência de emissividade foi utilizado um material conhecido, uma fita isolante da 3M, cuja emissividade é de 95. Foi posicionada uma placa metálica para bloquear as correntes de ar que vinham do sistema de refrigeração da sala, e uma placa de isopor para manter as folhas isoladas termicamente, sem contato direto com a mesa óptica.

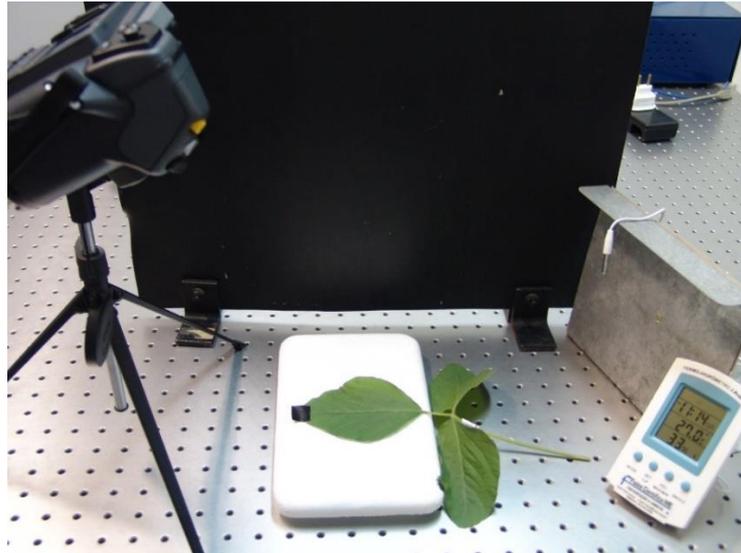


Figura 5.16 – Medidas feitas com a câmera Flir para encontrar a emissividade da folha de soja. Neste estudo foi variado o valor da emissividade na câmera e observado quando a temperatura da fita se aproximava da temperatura da folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Tratamento dos dados

5.6.1 Tratamento dos espectros LIFS

Inicialmente, todos os espectros de fluorescência de folha adquiridos com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561 tiveram as linhas de base corrigidas com o auxílio do software Diagnóstico. No caso do sistema LIFS-405 esta correção foi feita subtraindo a média de intensidade do intervalo 425 a 430 nm de todos os pontos dos espectros dos conjuntos medidos, e para o LIFS-561 a média foi feita entre o intervalo de 1050 a 1070 nm. Dessa forma, foi possível padronizar os espectros com relação ao “offset” ópticos e eletrônicos, informação que não faz parte do sinal de fluorescência emitido pela folha.

Com o mesmo software reduzimos o intervalo espectral de análise, para facilitar o trabalho e também diminuir os erros de classificação gerados por ruídos de informação. Para o sistema LIFS-405 restringiu-se a faixa do espectro entre 425 e 900 nm, constituindo 1418 atributos de entrada para o classificador. Esses atributos correspondem às intensidades do espectro. Para o sistema LIFS-561, a faixa espectral utilizada está compreendida entre 600 a 1140 nm, que corresponde a 1037 atributos de entrada. Para enfatizar as diferenças entre os picos e diminuir a

influência da intensidade foi feito uma normalização pela área. Após o pré-processamento desses espectros, as informações foram exportados para o software livre WEKA 3.6 no formato *.arff* que é compatível com ele e também no formato *.mat* para ser trabalhado no software MatLab, versão R2014a.

Para induzir os classificadores foi utilizada Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), ferramenta disponível no software WEKA. Onde foi seguida a metodologia empregada por Frank (51) e testada com sucesso por Ranulf (43), em problemas de classificação, no qual foi atribuído um valor numérico para representar cada classe nominal dos conjuntos.

O PLSR como explicado muito bem por Cardinali (50) é um método de análise multivariada, onde realiza uma transformação linear de um conjunto de dados. O método encontra uma transformação linear entre as variáveis de dados de entrada, e com eles determina a melhor correlação com os dados das variáveis de respostas.

Para nossos estudos foram induzidos classificadores via regressão, onde foi feito uma associação das classes nominais a números, em um processo de binarização, e por fim moldam-se funções para definir cada uma das classes. No caso dos citros as classes foram Sadias, HLB-Assintomática e HLB-Sintomática. Já para a soja as classes foram Sadias e GSFR, no estudo com doença, 3 diferentes cultivares para o estudo com fenotipagem e para as plantas da estufa as classes são Referência, Deficiência Hídrica e Deficiência de Nitrogênio. O processo da criação de um classificador consiste em definir um conjunto de treino, para calibrar o modelo de regressão e um outro conjunto para testa-lo. Utilizando uma validação cruzada verificamos o potencial, e a capacidade de separação entre as classes do modelo de predição.

O processo de validação cruzada consiste em dividir um conjunto de dados em n grupos, e escolher um desses grupos para ser testado nos $n-1$ grupos restantes, que foram usados para criar o modelo. Em seguida o grupo que ficou de fora é reintegrado ao conjunto total e se retira outro subconjunto para o teste, e o processo se repete até que todos os n grupos sejam testados. No final temos um valor em porcentagem do acerto do nosso modelo.

No nosso caso, todas as validações cruzadas foram feitas separando-se em 10 grupos cada conjunto de dados, e aleatorizados 10 vezes os elementos dos grupos. Por fim, a escolha do número de componentes foi realizada como Ranulfi

(52), ou seja, a componente com o maior acerto na validação cruzada e com o menor erro quadrático médio era escolhido como modelo.

Uma vez realizada a validação cruzada, com todo o conjunto e tendo resultado positivo para o potencial de classificação, o conjunto testado foi separado em duas partes:

- 1) A primeira parte do conjunto foi utilizada para criar o modelo de classificação. Para tal realizou-se uma nova validação cruzada onde se variou o número de componentes. Ao ser encontrado o número ótimo de componentes, ou seja, a quantidade de componente com maior taxa de acerto, este número foi utilizado para o modelo do classificador.
- 2) Para validar o modelo de classificação gerado pelo primeiro conjunto de amostras, utilizou-se a segunda parte do conjunto de amostras que foi denominado como conjunto de validação. Este procedimento foi repetido para todos os conjuntos em estudos que atingiram acerto superior a 75%, inclusive nos estudos com Imagens de Fluorescência e Imagens de Refletância com luz polarizada.

5.6.2 Tratamento das imagens de fluorescência e imagens de refletância com luz polarizada

Para a criação dos classificadores, tanto com a técnica de Imagens de Fluorescência quanto com a de Imagens de Refletância com Luz Polarizada, foram utilizadas imagens tiradas pela câmera Sony. As imagens foram cortadas com o auxílio do Software livre Image J, de modo que todas elas tivessem a mesma área. A escolha desta área baseou-se no conhecimento do perfil Gaussiano do feixe do laser, uma vez que estávamos interessados apenas nas respostas características de cada classe de folha quando iluminadas. O perfil Gaussiano pode ser observado na figura 5.17, retirada de uma imagem do sistema de fluorescência. E o perfil do feixe laser do sistema de imagens de refletância com luz polarizada, também foi estudado e é mostrado nos resultados da caracterização 4.4.2.

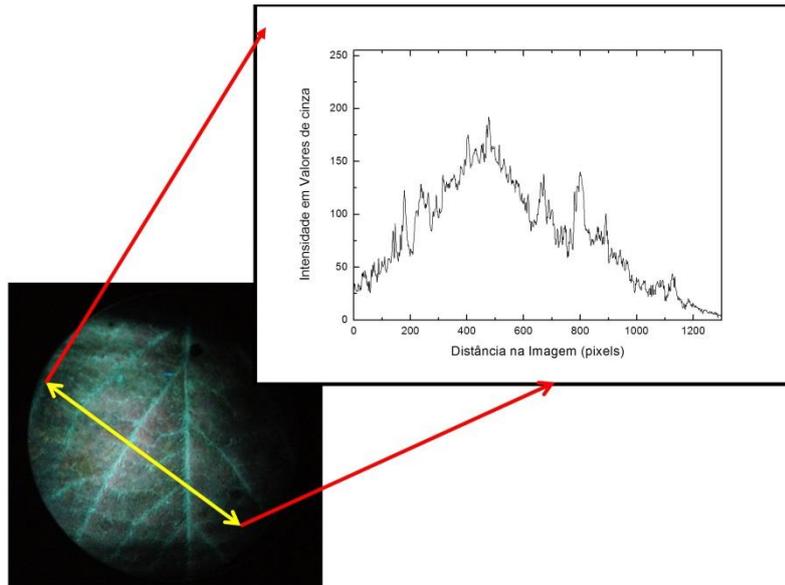


Figura 5.17 – Ilustração da imagem de fluorescência obtida com o sistema de imagem descrito acima com distribuição da radiação da luz, máxima no seu centro e vai decaindo como uma função gaussiana como é no perfil do feixe que excitou os fluoróforos da folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Utilizando o software MatLab (R2014a), foi montado um programa para realizar as escolhas dos atributos, que foram usados nas criações dos classificadores utilizando a ferramenta PLSR do software WEKA, como feito com os espectros dos sistemas LIFS. Os atributos aqui foram definidos de acordo com os histogramas de cores de cada imagem.

A figura 5.18 mostra o esquema do processamento realizado com as imagens para obtenção dos histogramas. A imagem pode ser decomposta em um cubo, onde os eixos x e y , com n e m elementos respectivamente, são as coordenadas da localização dos pixels. Quando a grandeza n é multiplicada por m obtém-se o número total de pixels. O eixo z possui três coordenadas referentes aos elementos de cores vermelho, verde e azul, respectivamente. Cada elemento deste cubo contém três valores associados a quantidade de vermelho, verde e azul, definida pelo sistema de cores RGB.

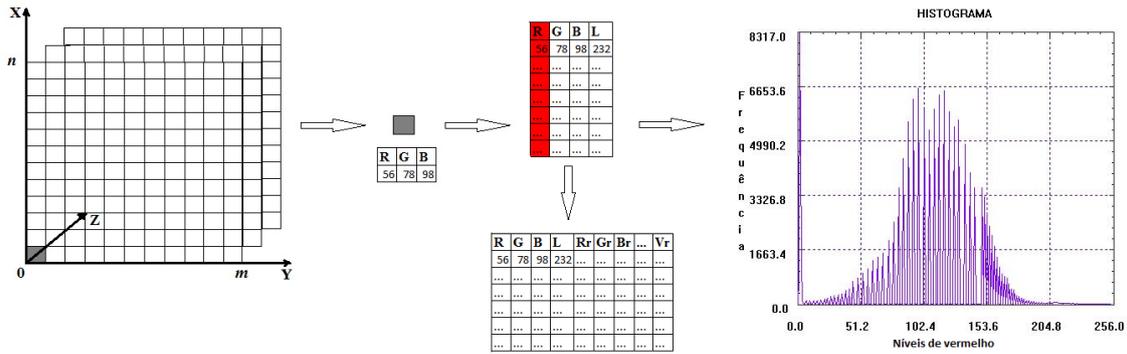


Figura 5.18 – Esquema de como foram criados os histogramas. Ao considerar uma imagem como sendo composta por três matrizes, de dimensão $m \times n$, onde cada elemento dessas matrizes contém valores que expressam quantidades de cores vermelho, verde e azul. Fazendo a contagem destes valores montaram-se os histogramas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez feita a decomposição das imagens consegue-se os histogramas de cores referente ao RGB, onde R é o *Red*, G é o *Green* e B é o *Blue*. O esquema da figura 5.18 mostra apenas o histograma da cor vermelha. Define-se uma variável L que representa a soma das quantidades das três cores de cada elemento do cubo de modo que tem-se $n \times m$ números de L . O RGB possui 3 cores de modo que o L é dividido por três para se obter um valor médio. Ao multiplicar a quantidade de vermelho por 255 e dividir pelo valor de cada L correspondente, obtém-se o valor do vermelho relativo. Repetindo o mesmo procedimento para os outros dois elementos de cores são possíveis encontrar o verde relativo e o azul relativo. Assim conseguem-se três histogramas referentes nas três cores, o histograma de L e os três histogramas das três cores relativas.

Utilizando uma função da biblioteca do MatLab é possível converter as imagens do sistema de cores RGB para o sistema Hue, Saturation e Value (Brightness), conhecido também como sistemas de cores HSV. Fazendo o mesmo procedimento feito no sistema de cores RGB com o HSV, obtém-se mais 6 histogramas. O aumento no número de histograma eleva consequentemente o número de descritores, que serão utilizados como atributos de entrada para nossos classificadores, com isso aumentará a chance de obter informações relevantes para a diferenciação das classes.

Assim foram utilizados como atributos os valores dos máximos dos histogramas, o nível da cor que este máximo aconteceu, o valor do centroide e os valores dos L . Totalizando assim 40 atributos, para serem usados na criação dos nossos modelos com o software WEKA. Com os atributos escolhidos, foram

induzidos os classificadores via regressão PLS, e estudado o potencial de separação através de validação cruzada. Sendo alcançado o potencial satisfatório, o conjunto era separado em duas partes, sendo a primeira utilizada para montar o classificador e a segunda para validá-lo.

6 RESULTADOS

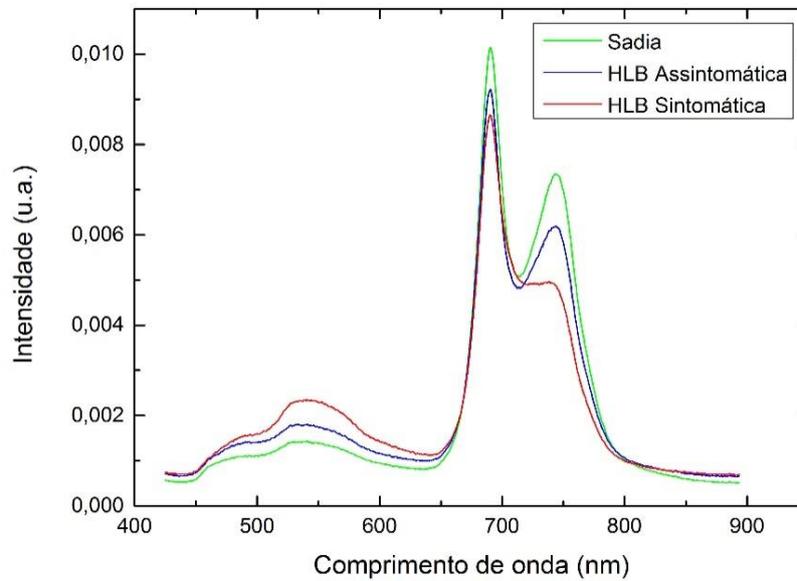
Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos com os espectros retirados dos sistemas LIFS-405 e LIFS-561. Serão expostos também os resultados das classificações das imagens adquiridas com os sistemas de Imagens de Fluorescência, Imagens de Refletância com Luz Polarizadas e Imagens Termográficas. O capítulo será dividido em três sub-sessões: Citros; Soja; Fenotipagens.

6.1 Citros

6.1.1 Diagnóstico de HLB em citros utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405

Nesta seção, descrevemos os resultados obtidos com o sistema de espectroscopia de fluorescência LIFS-405, cujo comprimento de onda de excitação é 405 nm. O intuito inicial do estudo era definir um protocolo para o sistema, quanto à escolha do melhor lado da folha para se realizar as medidas, em seguida realizar os diagnósticos e as classificações das folhas. Desta forma, mediram-se os espectros nas regiões abaxiais e adaxiais das folhas de citros das 3 classes: Sadia, HLB Sintomática, e HLB Assintomática. As figuras 6.1-a) e 6.1-b) ilustram os espectros médios típicos obtidos com o conjunto de 150 folhas de laranja das três classes nas regiões abaxiais e adaxiais, respectivamente.

a)



b)

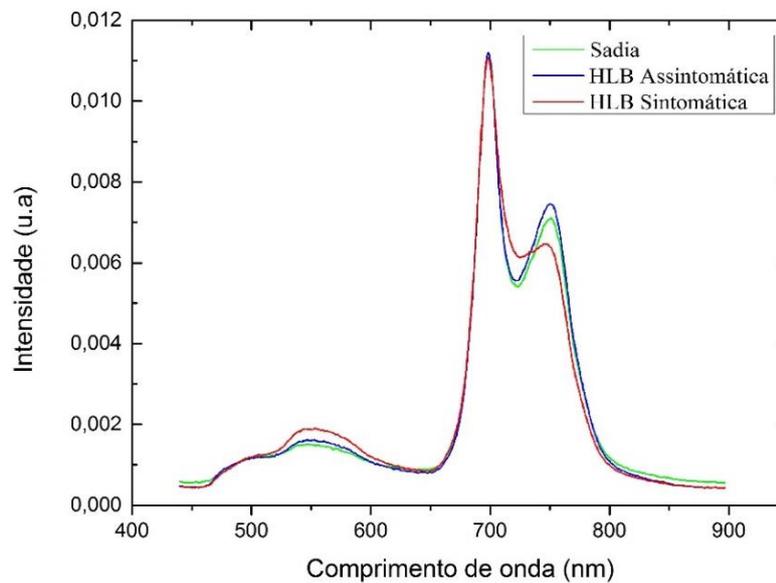


Figura 6.1 - Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-405. Em a) estão os espectros coletados das regiões abaxiais, próximo a nervura central e do lado direito da folha. Em b) estão os espectros coletados das regiões adaxiais, próximo a nervura central e do lado direito da folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como é possível observar nas figuras 6.1-a) e 6.1-b), o espectro de emissão da folha verde possui duas bandas de fluorescência, como observado por Pedrós (54) e Cardinali. (50) A primeira banda de fluorescência dos espectros LIFS-405,

compreendida no intervalo 450 a 650 nm, está relacionada aos metabolitos secundários, como os ácidos ferrúlicos e ácidos p-cumáricos. (53) Segundo Buschmann (24) e Lichtenthaler (38), estes compostos que são responsáveis pelo florescimento nesta região estão ligados diretamente ao mecanismo de defesa das plantas, onde atuam contra os agentes causadores de doenças. As variações nas concentrações dessas substâncias nas plantas (caso da cumarina, umbeliferona, dos flavonoides, hesperidina e naringina) devido à doença é a base para se desenvolver os métodos de diagnóstico por espectroscopia, uma vez que é possível reconhecer padrões nos espectros de folhas de plantas saudáveis e contaminadas com HLB.

A segunda banda de fluorescência é típica da clorofila, onde o intervalo espectral de emissão está entre 650 e 800 nm, e possui dois picos bem evidenciados. Estes picos estão ligados principalmente com a fluorescência da clorofila *a*, e possuem seus máximos em 690 e 740 nm respectivamente. (54) O segundo pico, desta segunda banda é menor que o primeiro, devido à rápida reabsorção dos carotenoides e das clorofilas. (55)

Através de uma análise qualitativa de comparação entre espectros médios adquiridos das três classes, tanto para as medidas abaxiais como adaxiais é possível notar que ambas as regiões mantêm a intensidade na primeira banda (450 a 650 nm) com relação às classes, ou seja, HLB-Sintomática possui o pico mais intenso, HLB-Assintomática possui intensidade intermediária e Saudável apresenta a menor intensidade. As diferenças de intensidades nessa banda estão ligadas com a presença da bactéria na planta, como explicado anteriormente na seção 2.3. Ao analisar a segunda banda de emissão nas figuras 6.1-a) e 6.1-b) observa-se que para os espectros medidos nas regiões abaxiais a diferença entre as intensidades nas três classes é realçada quando comparada com as medidas feitas nas regiões adaxiais. Para exemplificar esta análise, basta observar o primeiro pico (690 nm) da segunda banda dos espectros medidos nas regiões adaxiais, onde é notado que as intensidades dos espectros das três classes é praticamente a mesma. A análise das diferenças entre os espectros é extremamente importante. Uma vez que para o bom desempenho dos classificadores é preciso ter uma diferença significativa entre os espectros, de modo que os padrões característicos a cada classe sejam mantidos entre os conjuntos, pois essas assinaturas espectrais estão ligadas diretamente aos estados fisiológicos que as folhas se encontram.

Para o conjunto de 150 folhas, composto por 50 folhas de cada classe criou-se dois classificadores: um para as medidas das regiões abaxiais e o segundo para as medidas das regiões adaxiais. Inicialmente, todos os espectros passaram por um pré-tratamento, onde foi corrigida a linha de base e feito a normalização pela área como descrito na seção 5.6.1. Para a verificação do potencial de classificação foi gerado um modelo de classificação via regressão por PLSR através de uma validação cruzada com 10 *folders*. Para se determinar o número de componentes ótimo para implementar o classificador, variou-se o número de componentes, e os acertos com relações aos números de componentes podem ser visto na figura 6.2.

O número de componentes utilizados no modelo de classificação foi aquele que apresentou a maior taxa de acerto e o menor erro RMS. Como resultado, nas condições ótimas de operação do classificador, obtivemos as matrizes confusão da tabela 6.1. A matriz confusão expressa o resultado de classificação com o modelo gerado, onde as linhas representam as classes reais das folhas e as colunas como estas folhas foram classificadas pelo classificador. Com isso a diagonal principal representa o acerto do nosso classificador. Esta técnica, de criação e validação dos classificadores, foi descrita muito bem por Cardinali (50) e testada com sucesso por Ranulfi. (52)

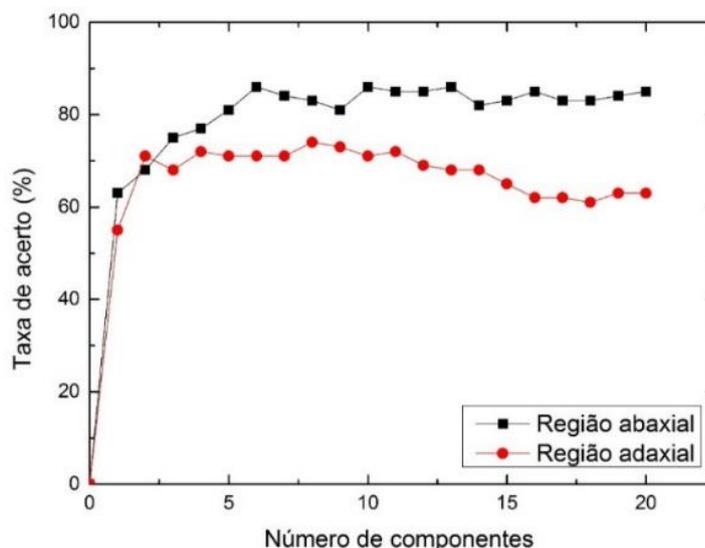


Figura 6.2 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais e adaxiais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.1 – Em a) está expressa a matriz confusão da classificação dos espectros tirados das regiões abaxiais e em b) das regiões adaxiais. O estudo visa conhecer qual o melhor lado para se realizar as medidas com o sistema FILS-405.

| a) | | | |
|--|--------------|--------------------------|------------------------|
| <u>Medidas das regiões abaxiais</u> | | | |
| Classificado | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Classe real | | | |
| Sadia | 78% | 20% | 2% |
| HLB Assintomática | 16% | 82% | 2% |
| HLB Sintomática | 2% | 0% | 98% |

| b) | | | |
|--|--------------|--------------------------|------------------------|
| <u>Medidas das regiões adaxiais</u> | | | |
| Classificado | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Classe real | | | |
| Sadia | 66% | 28% | 6% |
| HLB Assintomática | 34% | 66% | 0% |
| HLB Sintomática | 4% | 6% | 90% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através dos resultados obtidos com as duas matrizes confusão da Tabela 6.1 nota-se que as medidas realizadas nas folhas nas regiões abaxiais apresentaram maior acerto na classificação, chegando a 86% em uma validação cruzada, enquanto que o acerto obtido com as medidas realizadas com as folhas nas regiões adaxiais foi de apenas 74%. A análise das tabelas 6.1 e dos gráficos 6.2, confirmam que a técnica é mais sensível às diferenças espectrais existentes nas folhas das três classes, quando a fluorescência foliar é medida na região abaxial. Dessa forma, estabeleceu-se o seguinte protocolo para o diagnóstico de doenças em citros com a técnica LIFS-405: o modelo de classificação via regressão deve ser gerado com os espectros de fluorescência obtidos na região abaxial.

Após determinar o potencial de classificação dos espectros medidos nas regiões abaxiais, isto é, quando por validação cruzada o classificador obter um acerto superior a 75%, o conjunto de amostras foliares foi separado em duas partes: um conjunto de calibração e um conjunto de validação, procedimento análogo ao realizado por Ranulfi. (38) Esse procedimento é muito importante para o estudo de classificação das amostras de citros, uma vez que o modelo é validado com um conjunto de amostras diferente das utilizadas para criá-lo, permitindo a criação de

um classificador mais robusto e geral. As amostras de folhas foram divididas em duas partes iguais, isto é, dois conjuntos com 75 folhas, sendo 25 de cada classe. As primeiras 75 folhas foram usadas para se desenvolver o modelo, a partir de uma classificação via regressão PLSR. Inicialmente, verificou-se o desempenho da validação cruzada variando-se o número de componentes, o resultado está ilustrado no gráfico da figura 6.3. Analisando a figura 6.3 observa-se que o número ótimo de componentes para o modelo gerado é 15. Uma vez determinado o melhor número de componentes para a melhor taxa de acerto de classificação, passou-se a utilizar este valor para o modelo gerado e os resultados obtidos são representados na matriz confusão da tabela 6.2.

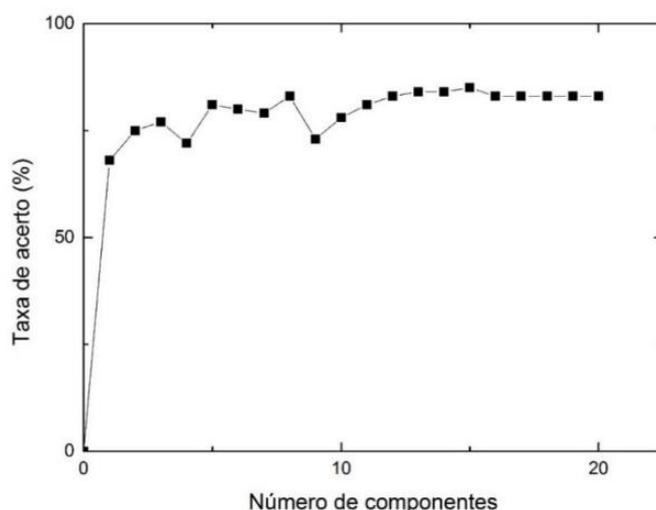


Figura 6.3 – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar os espectros de fluorescência foliar do conjunto de calibração medidos nas regiões abaxiais. O número ótimo de componentes para o modelo gerado é 15.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.2 – Matriz confusão das medidas da região abaxial, com a primeira parte do conjunto, utilizando o número de componentes que obteve o maior acerto.

| | | <u>Classificador</u> | | |
|-----------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| | | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Classificado Classe real | Sadia | 84% | 12% | 4% |
| | HLB Assintomática | 16% | 76% | 8% |
| | HLB Sintomática | 4% | 0% | 96% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

A matriz confusão mostrada na tabela 6.2 traduz o acerto máximo na classificação correta das três classes de folhas de 85%, lembrando que esse é o acerto global, ou seja, é o acerto real do classificador referente à classe de cada folha. Ao considerar as folhas das classes HLB-Assintomática e HLB-Sintomática como pertencendo apenas a uma classe, ou seja, classe de folhas Doentes, de modo que a confusão entre elas não é um erro, o acerto do classificador sobe para 88%.

O modelo de classificação gerado foi testado com o conjunto de validação, que corresponde à segunda coleção de espectros foliares medidos seguindo o protocolo descrito anteriormente. O desempenho da validação pode ser visto na matriz confusão da tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado como modelo de classificador o número de componentes que obteve o maior acerto nas validações cruzadas.

| | | <u>Validação</u> | | |
|--------------------------|--------------|------------------|-------------------|-----------------|
| | | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Classificado | Classe real | | | |
| | Sadia | | 64% | 32% |
| HLB Assintomática | | 16% | 76% | 8% |
| HLB Sintomática | | 0% | 4% | 96% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

A matriz confusão da tabela 6.3 mostra que o acerto global do classificador é de 79%. Ao fazer as mesmas considerações entre as classes doentes, o acerto aumenta para 83% na validação.

Ao analisar as matrizes confusão para a classificação correta das 3 classes de folhas de citros, nota-se a grande confusão entre os espectros das folhas Sadias e HLB-Assintomática. Essa confusão está relacionada com a grande semelhança entre seus espectros característicos, como visto na figura 6.1, e a não uniformidade da distribuição da doença na planta. (56) Apesar desta confusão alcançou-se um acerto 76% para as plantas assintomáticas na validação. Esse resultado é muito importante e mostra a relevância da técnica para o diagnóstico do HLB em citros, uma vez que por análise visual seria impossível identificar corretamente as folhas assintomáticas. Além disso, é importante notar que para as folhas sintomáticas com

HLB, obteve-se 96% no acerto de classificação, enquanto que inspeção visual esse acerto é de no máximo 27%. (16)

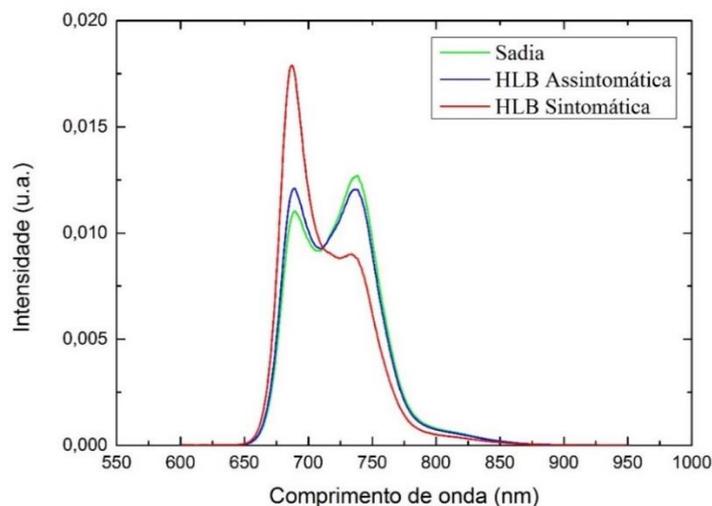
Com isso o sistema LIFS-405, junto com o modelo gerado, mostrou-se robusto e capaz de classificar corretamente um conjunto de folhas desconhecidas, que não faziam parte do classificador montado, podendo ser utilizado como ferramenta de diagnóstico de plantas com suspeita de HLB, de forma rápida e com alta acurácia.

6.1.2 Diagnóstico de HLB em citros utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561

Da mesma forma que foi feito com o LIFS-405 conduziu-se um estudo para o diagnóstico de HLB em citros com o sistema LIFS-561. Para tal, definiu-se um protocolo de medida na região abaxial ou adaxial e estabeleceu-se a análise estatística dos dados.

As figuras 6.4-a) e 6.4-b) ilustram os espectros médios típicos obtidos com o conjunto de 150 folhas de laranja nas três classes, sendo 50 folhas por classe, nas regiões abaxiais e adaxiais, respectivamente. Os espectros médios foram coletados das medidas nas duas regiões foliares, abaxiais e adaxiais, do mesmo conjunto utilizado no experimento anterior. Inclusive a ordem das medidas em cada folha foi mantida para estudos futuros.

a)



(continua)

(continuação)

b)

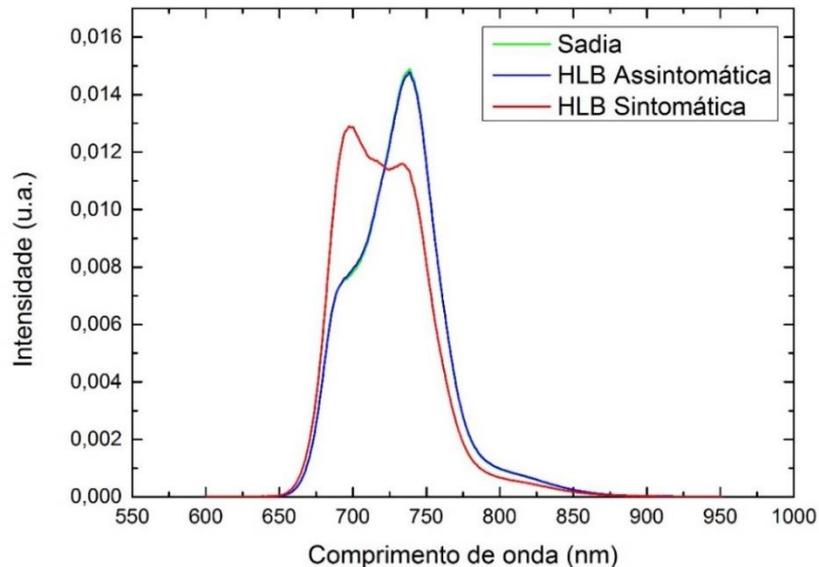


Figura 6.4 – Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-561. Em a) estão os espectros coletados das regiões abaxiais, próximo a nervura central e do lado direito da folha. Em b) estão os espectros coletados das regiões adaxiais, próximo a nervura central e do lado direito da folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros característicos das folhas de citros, mostrado nas figuras 6.4, apresentam duas bandas de emissão características da clorofila, cujos máximos estão em 685 e 735 nm. Segundo Buschmann (24) e Agati (57), o perfil do espectro de fluorescência das folhas de citros, quando excitada com o laser de comprimento de onda de 561 nm, está ligado à concentração da clorofila *a*, da eficiência de transferência de energia, da reabsorção da luz e da estrutura da folha. Pedrós (54) diz ainda que a primeira banda do espectro, com o máximo em 685 nm, está relacionada com a fluorescência das moléculas de clorofila *a* e emissões do fotossistema II. Já a segunda banda do espectro, com o máximo em 735 nm, decorre principalmente da fluorescência do fotossistema II e da emissão da clorofila *a* devido a reabsorção.

Como ilustram os gráficos da figura 6.4 do espectro médio das folhas sintomáticas existe uma inversão na intensidade dos picos (685 e 735 nm), quando comparados com as mesmas intensidades dos espectros médios das classes HLB-Assintomática e Sadia. Como a quantidade de clorofila na folha sintomática é menor

do que nas folhas saudável e HLB assintomática, característica esta que dá o mosqueado amarelado na folha HLB sintomática, menor é o efeito de reabsorção da luz emitida em 685 nm pela clorofila e conseqüentemente, maior a intensidade do pico em 735 nm (53,24). Nos espectros de fluorescência obtidos na região adaxial, o gráfico mostra a semelhança entre os espectros médios das folhas Sadias e HLB-Assintomáticas. Essa resposta espectral dificulta a identificação de padrões entre os espectros característicos de cada classe, prejudicando a geração e o desempenho dos classificadores.

Para estudar qual a melhor face da folha para adquirir os espectros de fluorescência, novamente utilizaram-se classificadores via PLSR, e investigou-se o acerto da classificação como função do número de componentes como mostra a figura 6.5. O número de componentes adotado como ótimo foi estabelecido de modo que se utilize o menor número de componente no modelo, para a maior taxa de acerto do classificador. Em todas as análises utilizou-se a validação cruzada para generalizar o modelo criado para diferentes amostras. As tabelas 6.4 apresentam as matrizes confusões com os melhores desempenhos dos classificadores, utilizando as medidas das duas regiões, gerado com os modelos com 5 componentes para as medidas abaxiais e 8 componentes para as medidas adaxiais.

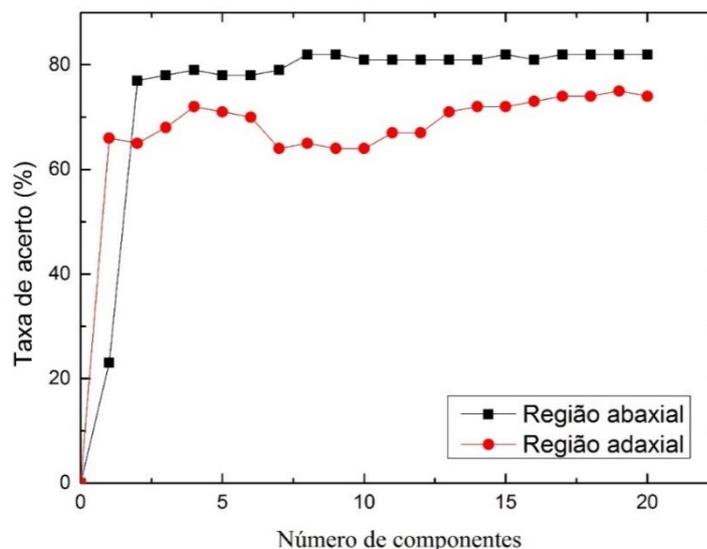


Figura 6.5 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos dois classificadores criados com as medidas nas regiões abaxiais e adaxiais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.4 – Em a) está expressa a matriz confusão da classificação dos espectros tirados das regiões abaxiais e em b) das regiões adaxiais. O estudo visa conhecer qual o melhor lado para se realizar as medidas com o sistema LIFS-561.

| a) | | | |
|--|--------------|--------------------------|------------------------|
| <u>Medidas das regiões abaxiais</u> | | | |
| Classificado \ Classe real | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 86% | 12% | 2% |
| HLB Assintomática | 34% | 66% | 0% |
| HLB Sintomática | 4% | 2% | 94% |

| b) | | | |
|--|--------------|--------------------------|------------------------|
| <u>Medidas das regiões adaxiais</u> | | | |
| Classificado \ Classe real | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 84% | 16% | 0% |
| HLB Assintomática | 42% | 46% | 12% |
| HLB Sintomática | 4% | 2% | 94% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas tabelas 6.4 nota-se que o desempenho do classificador construído com os espectros medidos nas regiões abaxiais foi superior ao classificador montado com os espectros retirados das regiões adaxiais. O melhor acerto na classificação correta das classes foi de 82%, para as medidas nas regiões abaxiais, enquanto que o melhor acerto para o classificador para os espectros medidos nas regiões adaxiais chegou no máximo a 75%. Para os espectros medidos nas regiões abaxiais, a diferença entre os espectros das três classes, principalmente entre Sadias e HLB-Assintomáticas, é mais característico e proeminente, como ilustra a da figura 6.4. Analisando as matrizes confusões das tabelas 6.4, o maior erro está entre a classificação das folhas HLB assintomática e saudável. O classificador associa os espectros das folhas HLB assintomática como sendo de espectros de folhas sadias e essa confusão aumenta quando as medidas são feitas na região adaxial, resultado semelhante ao encontrado para o sistema LIFS-405. Dessa forma, definiu-se também para o sistema LIFS-561 que o protocolo de medida seria utilizar os espectros medidos nas regiões abaxiais. A partir de agora, todas as medidas e resultados descritos para as folhas de citros nessa dissertação referem-se aos espectros adquiridos nas regiões abaxiais.

Após a determinação do potencial de classificação do conjunto de folhas a partir das validações cruzadas, realizou-se o mesmo procedimento do estudo com o sistema LIFS-405: o conjunto foi dividido em duas partes, o conjunto do classificador e o conjunto de validação. Novamente avaliou-se o desempenho do modelo gerado para a classificação das classes como função do número de componentes do modelo. O número de componentes ideal para se empregar no modelo estatístico descrito é 12, como ilustrado na figura 6.6. O acerto global com este classificador chegou a 80%.

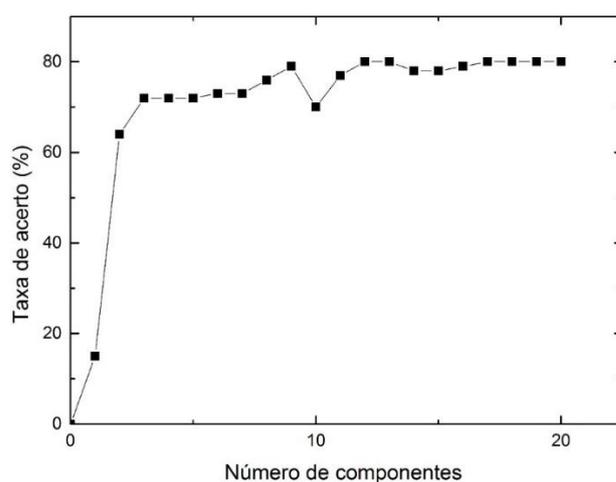


Figura 6.6 – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar os espectros de fluorescência foliar do conjunto de calibração medidos nas regiões abaxiais. O número ótimo de componentes para o modelo gerado é 12.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.5 – Matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas das regiões abaxiais, com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 81%, com 12 componentes.

| | | Classificador | | |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| | | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Classificado Classe real | Sadia | 76% | 20% | 4% |
| | HLB Assintomática | 32% | 68% | 0% |
| | HLB Sintomática | 0% | 4% | 96% |
| | | | | |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao considerar o acerto entre a classe doente (HLB sintomático e HLB assintomático como uma única classe) e sadia, o acerto chega a 81%. O modelo com 12 componentes foi testado na classificação do conjunto de validação e o resultado da classificação para o conjunto foi de 84% como pode ser visto na matriz confusão da tabela 6.6. Considerando-se somente as classes sadias e doentes, o acerto sobe para 87%. O resultado chama atenção pelo acerto alto na validação das folhas assintomáticas, que tiveram todas as folhas classificadas corretamente. Desta forma, a associação do sistema LIFS-561 junto com o modelo de classificação, pode ser utilizado como ferramenta de diagnóstico eficiente do HLB.

Tabela 6.6– Matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Empregou-se 12 componentes para o modelo, onde foi alcançado 87% de acerto na sua validação.

| Validação | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------------------|------------------------|
| Classificado Classe real | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 80% | 12% | 8% |
| HLB Assintomática | 0% | 100% | 0% |
| HLB Sintomática | 20% | 8% | 72% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.3 Diagnóstico de HLB em citros utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 e 561

Como cada equipamento de espectroscopia de fluorescência induzida por laser apresenta um perfil de emissão como função da frequência de excitação agrupou-se as características espectrais específicas de uma mesma folha obtidas por ambos os equipamentos. O processo de unir os espectros aumenta o número de informações espectrais associadas a cada amostra que permitam distinguir e caracterizar cada classe em estudo, conseqüentemente criar classificadores mais robustos, pois se trabalha com cinco bandas de fluorescência por amostra: as duas bandas de fluorescência da clorofila referente à excitação com o laser de 561 nm (ver a figura 6.4) e três bandas de excitação com o laser de 405 nm (ver a figura 6.1).

Nesse caso efetuou-se o mesmo procedimento analítico que descrito anteriormente para os sistemas LIFS-405 e LIFS-561. Primeiro avaliou-se o potencial de separação entre as três classes de todo conjunto através da validação cruzada. Quando o acerto na classificação entre as classes foi igual ou superior a 75% dividiu-se o conjunto de espectros em dois conjuntos: o conjunto de calibração para gerar o modelo e o conjunto de validação, para validar o modelo gerado.

Como apresentado no gráfico da figura A1 do Apêndice A.1.1, com os acertos das validações cruzadas e os respectivos números de componentes, o classificador criado com o conjunto de espectros coletados dos dois equipamentos das folhas de laranja, alcançou o acerto máximo de 89% com 18 componentes, sendo considerado como tendo o potencial de classificação.

Esse resultado é superior ao que foi obtido anteriormente, quando comprado com os melhores resultados dos modelos criados com os espectros separadamente. O melhor desempenho pode ser explicado pelo aumento no número de atributos de entrada para o classificador, com informações que favoreceram a classificação.

Uma vez que se observou o potencial de classificação do conjunto de espectros unidos, criou-se um modelo de classificador com 75 espectros de folhas, sendo 25 de cada classe. O modelo foi desenvolvido com o número de componentes que obteve o maior acerto em uma validação cruzada, gerado por uma regressão PLSR. Para validar o modelo de classificador utilizaram-se outros 75 espectros, também contendo 25 espectros de cada classe. O gráfico da Figura 6.7 mostra o acerto de classificação como função do número de componentes onde o melhor acerto é de 20 componentes. A melhor classificação pode ser vista na tabela 6.7 cujo melhor acerto do classificador foi de 88% e na validação do modelo 87%. Ao considerar apenas as classes doentes e sadias, o acerto na validação do modelo chega a 89%.

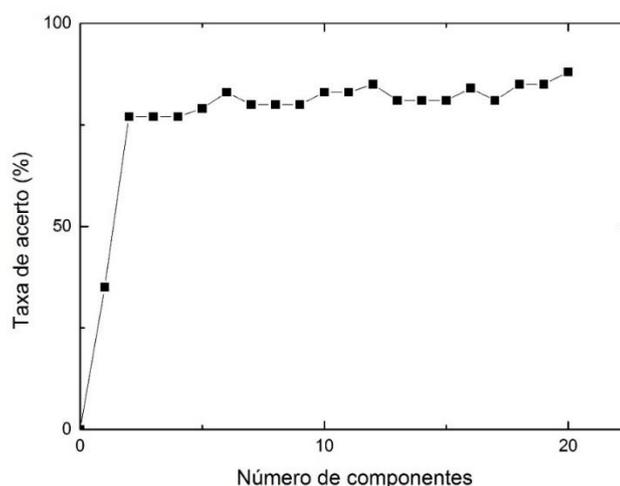


Figura 6.7 – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para criar o modelo de classificador, com o número de componentes que obteve o melhor desempenho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.7 – A parte superior da tabela expressa a matriz confusão da melhor classificação obtida com as medidas realizadas nas regiões abaxiais, com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 89%, com 20 componentes. Já a parte inferior da tabela mostra a matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado 20 componentes para o classificador, e com ele alcançando 87% de acerto na sua validação.

| Classificador | | | |
|----------------------------|------------|-------------------|-----------------|
| Classificado \ Classe real | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 84% | 16% | 0% |
| HLB Assintomática | 16% | 80% | 4% |
| HLB Sintomática | 0% | 0% | 100% |
| Validação | | | |
| Sadia | 68% | 28% | 4% |
| HLB Assintomática | 8% | 92% | 0% |
| HLB Sintomática | 0% | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

O resultado da validação cruzada com os dois espectros juntos foi superior aos dos sistemas LIFS-405 e LIFS-561. De acordo com a diagonal principal da matriz confusão, os maiores erros de classificação continuam sendo entre os espectros de folhas Sadias e HLB Assintomática. É importante notar que a classe das folhas HLB-Sintomática continua aparentando ser uma classe bem característica, uma vez que

não houve confusão de classificação das suas folhas com as outras classes analisada. Observando o resultado da validação do classificador com a segunda metade do conjunto, pode-se notar um acerto de 87%, resultado análogo ao do sistema LIFS-561 e próximo do sistema LIFS-405. Dessa forma, um equipamento que acople conjuntamente os sistemas LIFS-405 e LIFS-561, mesmo com um classificador adequado, não obterá o desempenho muito superior aos sistemas separadamente. Ao considerar o custo de um equipamento composto por dois sistemas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser não seria tão vantajoso. Porém este equipamento composto com os dois sistemas LIFS é capaz de classificar folhas doentes com HLB, mesmo que estejam no estágio sem sintomas.

6.1.4 Diagnóstico de HLB em citros utilizando Imagens de Fluorescência

Os sistemas de Imagens de Fluorescência e Imagens de Refletância com Luz Polarizada não houve a necessidade da caracterização para definir o lado de medida das folhas. Uma vez que para estes sistemas, casos se tornem portabilizados em equipamentos de campo, as medidas em largas escalas seriam mais eficazes se ocorressem na região adaxial. Assim não haveria a necessidade de um manuseio nas folhas e as medidas aconteceriam de forma rápida e ágil.

O sistema de Imagens de Fluorescência utilizado nesse projeto de mestrado é mostrado na figura 5.9, e descrito na sessão de Materiais e Métodos. A figura 6.8 mostra as imagens de fluorescência de folhas de laranja Sadia, HLB Assintomática e HLB sintomática, quando são submetidas a radiação de 377 nm. Para seleção de atributos/parâmetro para criar o modelo de classificação, analisou-se os histogramas de cores. A figura 6.9 mostra os histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, das imagens de fluorescência características a cada uma das três classes de folhas de laranja.

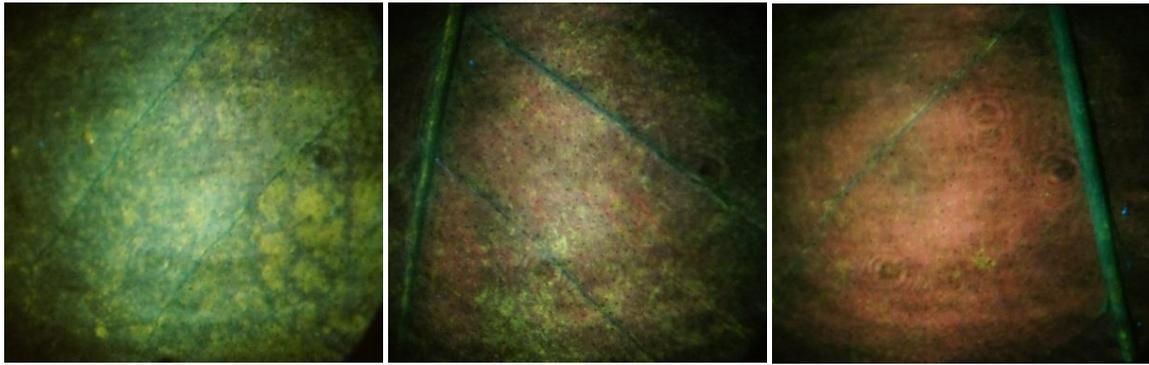
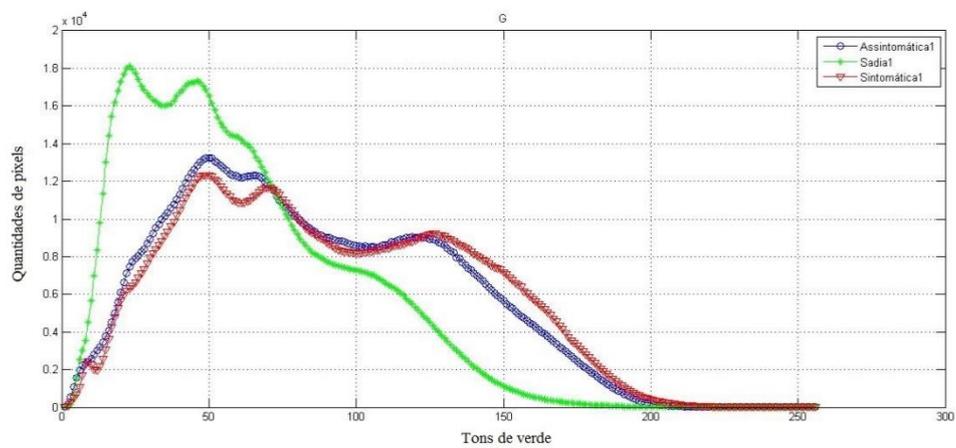
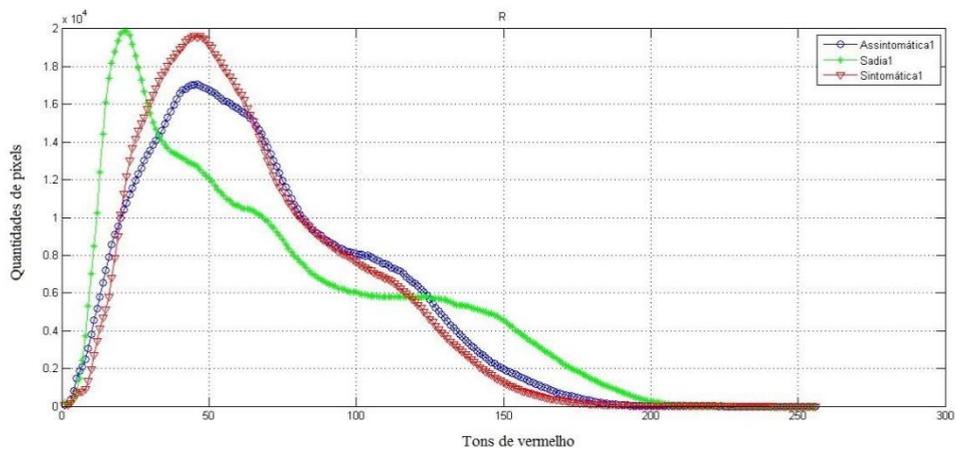


Figura 6.8 – Imagens características adquiridas com o sistema de Imagens de Fluorescências das três classes: a) HLB-Sintomática, b) HLB-Assintomática e c) Sadias. De acordo com as imagens é possível notar as diferentes colorações de vermelho e verde com relação as três classes.

Fonte: Elaborada pelo autor.



(continua)

(continuação)

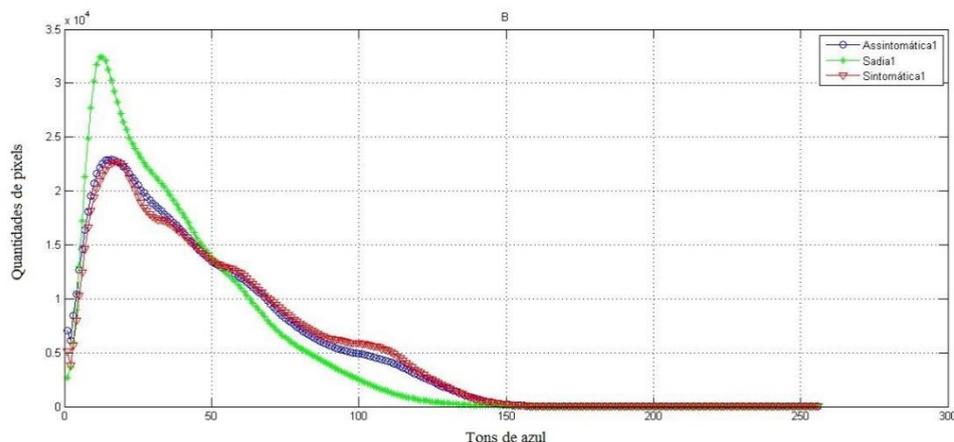


Figura 6.9 – Histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, coletadas das imagens obtidas com o sistema de Imagens de Fluorescência. De acordo com as distribuições dos histogramas é possível notar a concordância com as imagens coletadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A imagem da figura 6.9 obtida para a folha com HLB sintomática apresenta uma coloração mais verde, quando comparada com as outras duas imagens das folhas sadia e HLB-assintomática. A folha sadia apresenta uma quantidade de vermelho superior às outras duas classes, e a imagem da folha com HLB assintomática possui intensidades intermediárias da quantidade de cores vermelha, verde e azul. Esta diferença é a resposta característica do sistema de imagem de fluorescência devido à diferença da concentração de clorofila existente entre as três classes de folhas, diferença está que também foi estudada e descrita por Lichtenthaler (53) quando utilizou um sistema de imagem de fluorescência composto por um laser de Nd-YAG com excitação de 355 nm. Esta análise qualitativa das imagens é comprovada analisando-se os histogramas médios nas três cores: no histograma médio da cor vermelha, a classe sadia apresenta maior quantidade de pixels com frequências mais altas de vermelho, e os histogramas médios das cores verde e azul se mostram com maior quantidade de pixels nos tons destas duas cores para a classe de folhas doentes quando comparada a classe sadia. Dessa forma, os histogramas de cores das imagens, tanto no diagrama RGB (58) quanto HSV (35) são escolhas relevantes de atributos para a indução do classificador (59), como confirma o gráfico da figura A2 da sessão Apêndice A.1.2, onde mostra o acerto máximo na classificação correta das imagens de 89%, via validação cruzada, de um classificador construído por meio de regressão PLSR com 17 componentes.

Com este resultado, o conjunto de imagens coletado do sistema de Imagem de Fluorescência tem um alto potencial de discriminação entre as classes, resultado também encontrado por Pereira (60) ao utilizar imagens de fluorescência adquiridas com o microscópio da Zeiss, porem com atributos e modelos diferentes dos definidos neste trabalho. Determinando-se o potencial de classificação das folhas de citros entre as três classes, Sadia, HLB-assintomática e HLB-sintomática, o conjunto dos histogramas de imagens foliares foi separado em duas partes: a primeira com 45 folhas sendo 15 de cada classe, e a segunda com 30 folhas sendo 10 de cada classe. Aplicando-se os mesmos procedimentos analíticos já descritos anteriormente, a primeira parte do conjunto de espectros foliares foi utilizada para criar um modelo de classificação e validado pela segunda parte do conjunto. O gráfico da figura 6.10 mostra os acertos das validações cruzadas variando-se os números de componentes e a tabela 6.8 mostra a matriz confusão da melhor classificação. Assim, conhecendo o número de componentes ótimo do modelo foi realizado a sua validação, empregando a segunda parte do conjunto. O resultado é mostrado na segunda matriz confusão da tabela 6.8.

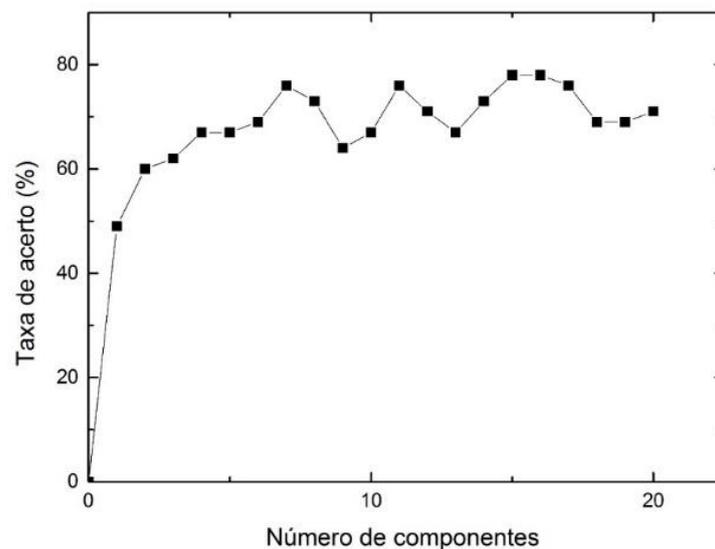


Figura 6.10 – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para auxiliar na criação do modelo de classificador. O modelo otimizado continha 15 componentes, cujo desempenho foi 89% de acerto na classificação correta.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.8 – A primeira parte da tabela representa a matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Fluorescência, construída com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 89%, com 15 componentes. A segunda parte da tabela mostra matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado 15 componentes para o classificador, e com ele alcançando 87% de acerto na sua validação.

| | | <u>Classificador</u> | | |
|-----------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------|
| | | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Classificado Classe real | Sadia | 73% | 20% | 7% |
| | HLB Assintomática | 7% | 87% | 6% |
| | HLB Sintomática | 0% | 27% | 73% |
| | <u>Validação</u> | | | |
| Sadia | 80% | 20% | 0% | |
| HLB Assintomática | 20% | 50% | 30% | |
| HLB Sintomática | 0% | 20% | 80% | |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando o gráfico da figura 6.10 observa-se que a melhor classificação do modelo foi com 15 componentes onde foi alcançando um acerto global de 78%. Ao considerar a existência de duas classes, sadia e doentes, o acerto sobe para 89%. Aplicando-se o classificador com 15 componentes ao conjunto de validação atinge-se um acerto global de 70%. Novamente, ao considerar apenas duas classes de folhas, sadia e doente, o acerto sobe para 87%, como ilustra a tabela 6.8. Com este resultado podemos considerar que o sistema de Imagens de Fluorescência, junto com o modelo de classificação criado via regressão PLSR pode diagnosticar com êxito o HLB.

6.1.5 Diagnóstico de HLB em citros utilizando Imagens de Refletância com Luz Polarizada

6.1.5.1 Caracterização do sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada

Com intuito de conhecer o comportamento do feixe do laser ao passar pelos polarizadores, a distribuição da luz sobre a mesa e como variava a intensidade da luz ao ser refletida pelas diferentes classes de folhas de laranja, foram feitas as

caracterizações do sistema. O conhecimento destes parâmetros é importante para o bom funcionamento do sistema, uma vez que estamos interessados em saber realmente se as três classes de folhas estão respondendo de forma diferente e se a disposição do sistema é a melhor possível, ou seja, as imagens coletadas não estão sendo influenciadas pela distribuição da intensidade do feixe do laser. O esquema experimental para o sistema de Imagens de Refletância foi descrito na seção 5.4 e pode ser visto na figura 5.11. O sistema é composto basicamente por um laser de diodo, dois polarizadores, um difusor e a câmera Sony.

A primeira caracterização do sistema de imagem com luz polarizada foi feita para observar se realmente o eixo de polarização dos polarizadores estavam cruzados, isto é, a 90° , bloqueando (ou extinguindo totalmente) a luz do laser incidente.

Para a caracterização da disposição do eixo de polarização alinhou-se ambos os polarizadores com o laser e o detector de potência luminosa, como descrito na sessão 4.4.1. Inicialmente, girou-se um dos polarizadores, de dez em dez graus e mediu-se a intensidade correspondente para a posição entre os eixos de polarização com o medidor de potência luminosa. O resultado da intensidade como função do ângulo entre os polarizadores é visto no gráfico da figura 6.11.

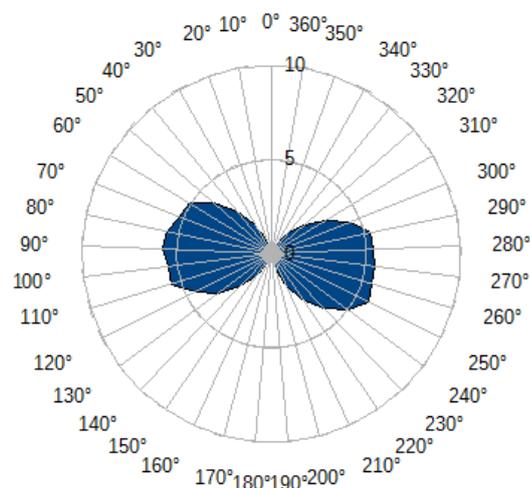


Figura 6.11 – Gráfico da intensidade da luz que passa pelos polarizadores com o respectivo ângulo formado entre os dois polarizadores. Pode-se notar a intensidade máxima quando os eixos de polarização estão em paralelo (90° e 270°) e mínimo quando estão em perpendicular (0° e 180°).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando o gráfico da figura 6.11 nota-se que quando os eixos de polarização estão paralelos um ao outro a intensidade de luz medida é máxima e quando eles estão com os eixos de polarização cruzados a intensidade da luz é nula, de modo que os polarizadores estão realmente bloqueando a luz quando estão dispostos perpendicularmente. A disposição perpendicular entre os eixos de polarização foi mantida para conduzir o experimento de imagens de refletância com as folhas de laranja.

A segunda caracterização para o sistema de imagem de refletância foi realizada para avaliar como varia a distribuição espacial da luz laser com a distância, uma vez que o objetivo é adquirir imagens características das folhas sem a influência da distribuição gaussiana da luz emitida pelo laser, isto é, a variação da intensidade no plano deve ser a mais uniforme possível. A figura 6.13 mostra a disposição do sistema de imagem montado para realizar esta caracterização e a figura 6.12 ilustra como é a variação da intensidade da luz do laser à medida que se afasta o detector da fonte.

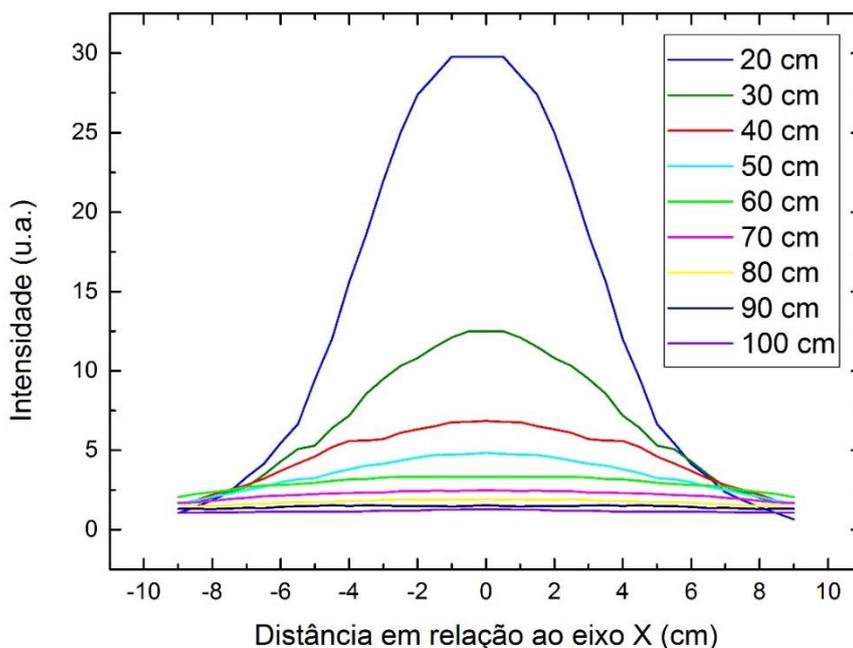


Figura 6.12 – Gráficos das distribuições das intensidades da luz na direção ao eixo Y, à medida que fonte laser se afasta em relação ao eixo X (cm). A 40 cm de distância a distribuição da intensidade da luz é praticamente uniforme na região central e intensa o suficiente para não saturar os sensores da câmera.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através do gráfico da figura 6.12 notar-se que a distribuição gaussiana característica, com centro mais intenso e à medida que se afasta da origem a intensidade decai. Após a caracterização optou-se em conduzir os experimentos com as folhas de citros a uma distância superior a 40 cm, uma vez que para distâncias iguais ou superiores a 40 cm a intensidade está uniformemente distribuída na região central, além que a esta distância a intensidade da luz incidente não satura os sensores da câmera. A equação (6.1) descreve a curva da intensidade da luz laser, a 40 cm de distância da câmera, onde $f_0 = 0.09$, $K = 6.78$, $z = -3.99$ e $w = 10.65$.

$$f(x) = f_0 + Ke^{-2\left(\frac{x-z}{w}\right)^2} \quad (6.1)$$

Para mostrar o efeito da incidência da luz polarizada sobre as folhas de laranja nas três classes (Sadia, HLB-Assintomática e HLB-Sintomática), foi obtida as imagens apresentada na figura 6.13, com o sistema de imagens de refletância com luz polarizada, mostrada na figura 5.13. Com o auxílio do detector de potência luminosa foi montada a tabela 6.9, que corresponde às intensidades da luz refletida por cada conjunto de folhas.

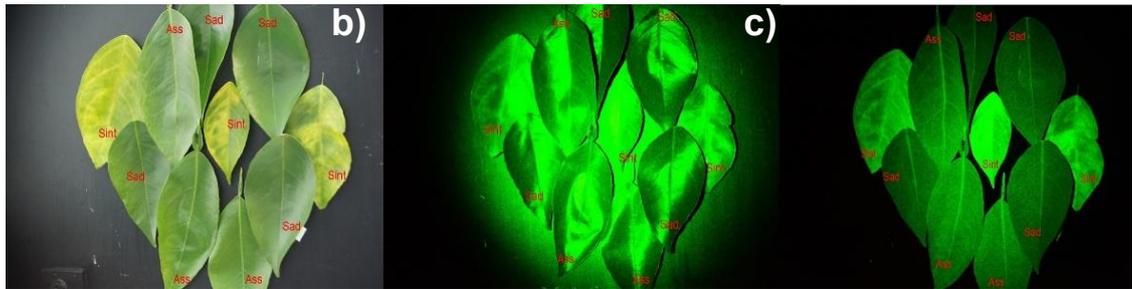


Figura 6.13 – Em a) imagem real das folhas, em b) imagem com os polarizadores em paralelo e em c) imagem com os polarizadores em perpendicular. Com os polarizadores disposto de forma cruzada é possível observar diferenças nas três classes de folhas de forma nítida.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.9 – Intensidade da luz refletida das três diferentes classes de folhas. Onde é possível observar que as maiores intensidades são das folhas com HLB-Sintomáticas. Ficando as menores intensidades para as folhas Sadias e de forma intermediária a classe HLB-Assintomática.

| Folha (n°) | Sadia (u.a.) | HLB-Assintomática (u.a.) | HLB-Sintomática (u.a.) |
|---------------|--------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 34 | 82 | 108 |
| 2 | 38 | 60 | 118 |
| 3 | 26 | 46 | 113 |
| 4 | 44 | 58 | 108 |
| 5 | 42 | 46 | 140 |
| 6 | 40 | 44 | 105 |
| 7 | 34 | 60 | 60 |
| 8 | 32 | 46 | 89 |
| 9 | 46 | 45 | 76 |
| 10 | 32 | 44 | 72 |
| Média | 37 | 53 | 99 |
| Desvio padrão | 6 | 12 | 23 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas imagens da figura 6.13 nota-se que quando os polarizadores são dispostos com os eixos em paralelos, como ilustra a figura 6.13-b), não é possível identificar as características de cada folha com clareza, uma vez que grande parte da luz refletida passa pelo segundo polarizador chegando a saturar parte dos sensores da câmera. Para as imagens obtidas quando os eixos de polarização estão posicionados perpendicularmente entre si, como observado na figura 6.13-c), é possível notar as diferenças entre as classes de folha, uma vez que a luz que chega à câmera é decorrente apenas da refletida pelas folhas e que possuem a mesma direção de polarização do segundo polarizador.

Fazendo-se uma breve análise das imagens adquiridas da figura 6.13 é visível a diferença entre a luz refletida pelas folhas das diferentes classes que passa pelo segundo polarizador. O sensor da câmera captura mais luz refletida pelas folhas com HLB sintomática, uma vez que a luz refletida por elas teve a direção de polarização girada e atravessou o segundo polarizador, quando comparadas com a luz refletida pelas folhas das classes HLB-Assintomáticas e Sadias. Além disso,

nota-se que as folhas da classe HLB-Assintomática refletem mais que as Sadias. Este fato, como mencionado anteriormente, foi explicado por Pourreza (26), onde foi relacionado a quantidade de luz refletida na direção de polarização do segundo polarizador, com a concentração de amido nas folhas. Uma vez que é conhecido que o amido é capaz de girar a polarização da luz, e que a quantidade de amido nas folhas doentes com HLB é superior ao encontrado nas folhas saudáveis, como explicado por Bové (11) e Kim. (61)

A tabela 6.9 apresenta as médias de intensidade de luz refletida que chegam no detector de potência luminosa. A intensidade média da luz refletida é maior para a classe HLB-Sintomática, e menores para a classe Sadia. A classe HLB-Assintomática apresenta uma intensidade intermediária entre essas duas classes, este resultado é análogo ao do desvio padrão, o que pode expressar a não uniformidade na distribuição da doença. Os resultados da tabela 6.9 apresentam a existência de diferenças nas refletâncias das diferentes classes de citros, de modo que é possível aplicar as ferramentas estatísticas de classificação das imagens para separar e identificar essas classes.

6.1.5.2 Indução de um classificador utilizando as Imagens de Refletância com Luz Polarizada no diagnóstico do HLB

Utilizando o sistema mostrado na figura 5.13, com o porta-amostra posicionado a 40 cm de distância entre a câmera e a saída do feixe laser, adquiriu-se as imagens de refletância para o conjunto de folhas de citros sadias, HLB-sintomática e HLB-assintomática.

A figura 6.13 apresenta diferenças e contrastes nas intensidades da luz capturada pelo sensor da câmera entre as diferentes classes de folhas de laranja. Para o tratamento estatístico recortou-se todas as imagens, coletada uma a uma nas mesmas condições, para que possuam a mesma área como ilustra a figura 6.14. As figuras 6.14-a), 6.14-b) e 6.14-c) ilustram as imagens características para as classes Sadias, HLB-Assintomática e HLB-Sintomática, respectivamente.

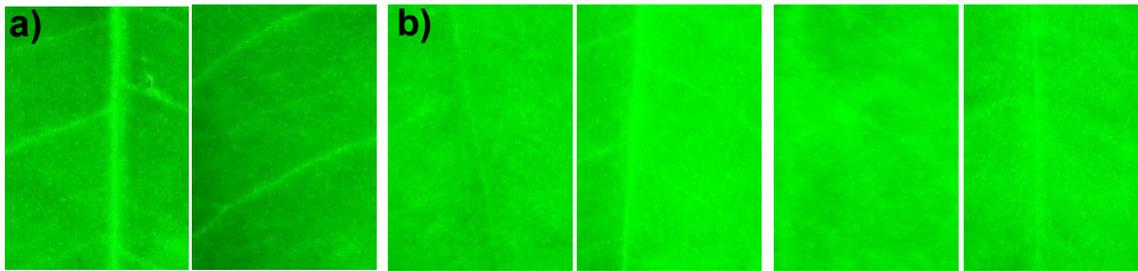


Figura 6.14 – A imagem em a) mostra duas folhas Sadias, em b) HLB-Assintomática e em c) HLB-Sintomática. As definições nos contrastes das nervuras são maiores nas folhas sadias, quando comparadas com as folhas HLB-Sintomático e HLB-Assintomático.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As imagens com as folhas sadias apresentam melhor nitidez possibilitando identificar a distribuição das nervuras com clareza. Já as imagens das folhas com HLB sintomáticas apresentam uma maior saturação por causa da quantidade excessiva de luz refletida que chega ao sensor da câmera. Por fim, as imagens das folhas com HLB assintomáticas possuem uma nitidez, mas também com certo grau de saturação revelando um perfil característico intermediário entre as duas outras classes. Os histogramas médios da cor verde para as imagens referente às três classes de laranja são ilustrados na figura 6.15 e a análise qualitativa feita coincide com a realizada anteriormente. Para as folhas HLB-Sintomática observa-se maior quantidade de pixels com maiores tons de verde. As imagens das folhas Sadias possuem uma maior contagem de pixels com frequências de verde menores e as folhas HLB-Assintomática com a quantidade intermediária.

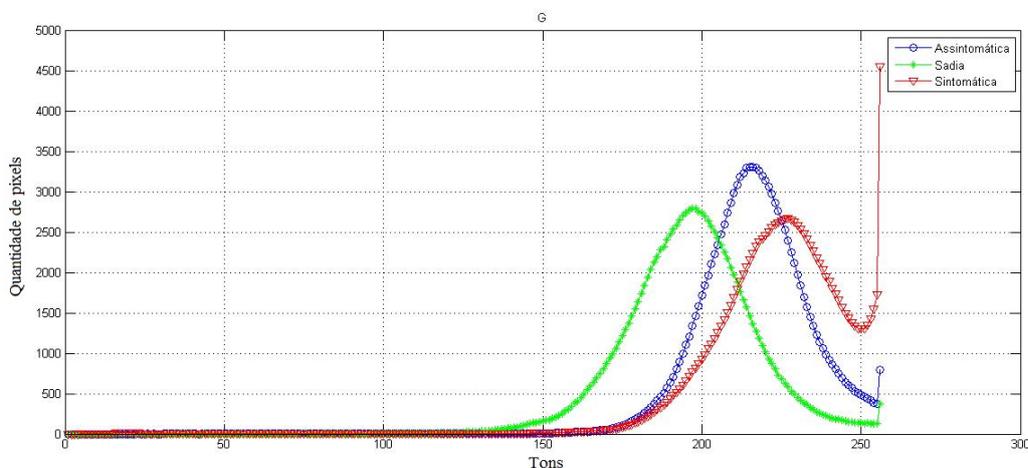


Figura 6.15 – Histogramas médios da cor verde, das imagens com as três classes de folhas de laranja. As imagens sadias possuem pixels com tons de verde inferiores as imagens das classes HLB-Assintomática e HLB-Sintomática.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As diferenças nos histogramas de cores medidas de todo o conjunto de imagens foram inicialmente computados, em seguida escolhidos os atributos empregados para induzir um classificador via regressão com PLSR. Como apresentado na sessão do Apêndice A.1.3, pode-se notar o acerto máximo das validações cruzadas de 89% utilizando 18 componentes no modelo, considerando as classes Sadias e Doentes. Desta forma, ficou constatado que o conjunto de imagens de folhas de laranja, retirado com o sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada possui o potencial de classificação. Assim conduziu-se o processo de dividir o conjunto em duas partes: a primeira parte do conjunto foi utilizada para se criar um modelo, e a segunda parte das folhas para validar o classificador. Realizando os mesmos procedimentos feitos nos estudos anteriores montou-se o gráfico da figura 6.16, dos acertos da classificação como função do número de componentes obtidos através da validação cruzada do modelo de classificador. Analisando a figura 6.16 vemos que o maior acerto foi alcançado com 19 componentes que chegou a 71%, como mostra a tabela 6.10 com a matriz confusão desta melhor classificação. Considerando apenas as classes doentes e sadias, o acerto aumenta para 84%. A tabela 6.10 também mostra a matriz confusão para a validação do modelo, usando a segunda parte do conjunto, onde o acerto foi de 57%. Se considerar apenas as duas classes, a validação deste modelo alcança o acerto de 80%.

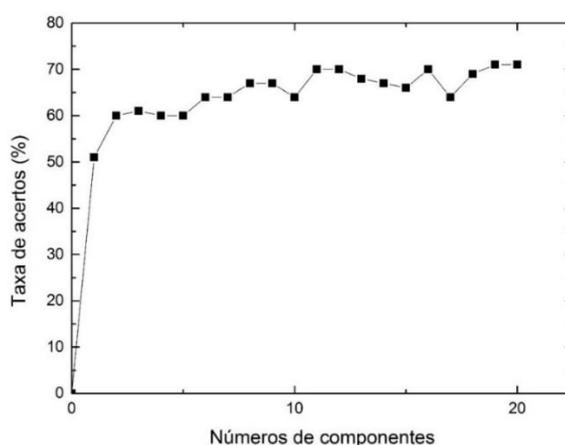


Figura 6.16 – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para auxiliar na criação do modelo de classificador. O modelo otimizado continha 19 componentes, cujo desempenho foi 84% de acerto na classificação correta.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.10 - A parte superior da figura mostra a matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada, construída com a primeira parte do conjunto. O melhor desempenho foi de 84%, com 19 componentes. Já a parte inferior ilustra a matriz confusão da validação do classificador, utilizando a segunda parte do conjunto. Onde foi empregado 19 componentes para o classificador, e com ele alcançando 80% de acerto na sua validação.

| Classificador | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------------------|------------------------|
| Classificado Classe real | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 83% | 17% | 0% |
| HLB Assintomática | 23% | 60% | 17 |
| HLB Sintomática | 7% | 23% | 70% |
| Validação | | | |
| Sadia | 75% | 20% | 5% |
| HLB Assintomática | 25% | 50% | 25% |
| HLB Sintomática | 10% | 45% | 45% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com este resultado é mostrado que a utilização do sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada, junto com o modelo de classificação criado, também pode ser utilizado como uma técnica de diagnóstico do HLB.

6.2 Diagnóstico de estresses bióticos e abióticos na Soja

Nas próximas sessões serão apresentados os resultados com os conjuntos de sojas retirados da estufa pertencente a Embrapa Instrumentação – LANAPRE e dos conjuntos de campo vindos do estado do Maranhão, como descrito em 5.1.2 e 5.1.4. Serão avaliadas as técnicas LIFS-405, LIFS-561 e Imagens de Fluorescência, na discriminação de plantas de soja em diversas condições de estresses.

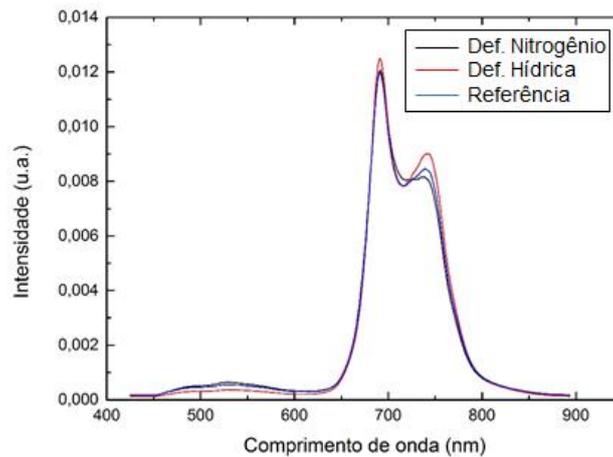
6.2.1 Diagnóstico de plantas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio com o equipamento LIFS-405

Utilizando o conjunto de folhas de soja colhidas da estufa do LANAPRE, em 12/11/2015, foram feitas medidas com o sistema LIFS-405 nas regiões abaxiais e adaxiais, para testar o desempenho dos classificadores em separar as classes de

referência, plantas que foram submetidas ao estresse hídrico e plantas que foram cultivadas sem o inoculante *Bradyrhizobium*. Para facilitar o entendimento, chamaremos essas três classes como de Referência, Deficiência Hídrica e Deficiência de Nitrogênio, respectivamente. As características e os números de folhas empregadas no estudo foram descritos na sessão 5.1.4, em Materiais e Métodos.

Os espectros médios medido com o sistema LIFS-405, das regiões abaxiais e adaxiais são ilustrados na figura 6.17-a) e 6.17-b).

a)



b)

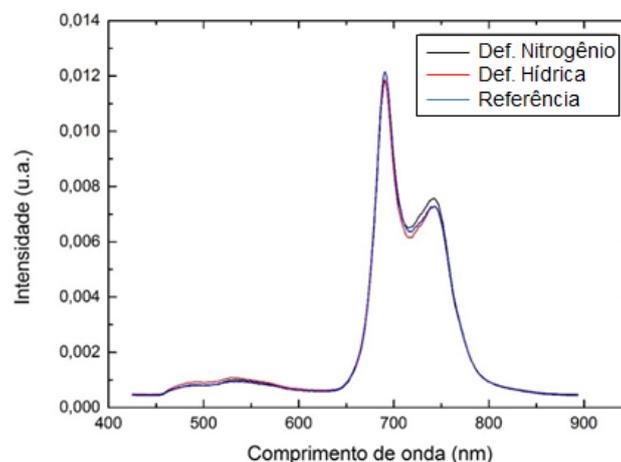


Figura 6.17 – Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-405. As plantas foram distribuídas nas classes Deficiência Hídricas, Deficiência de Nitrogênio e Referência. Em a) temos os espectros coletados das medidas realizadas na região abaxiais e em b) nas regiões adaxiais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros característicos das folhas de soja, apresentado na figura 6.17, assemelham-se muito com os espectros de laranja, contendo duas bandas de emissão característicos da clorofila. A primeira banda de excitação estende-se de 450 a 650 nm e a segunda banda de 650 a 800 nm. Dessa forma, fazendo uma analogia com os espectros de fluorescência das folhas de citros é possível associar a primeira banda de fluorescência com os metabolitos secundários (53) e a segunda banda a fluorescência da clorofila.

De acordo com os espectros da figura 6.17, a segunda banda possui dois picos característicos situados em 690 e 740 nm. É possível observar que a ordem das intensidades, das diferentes classes não se mantem, quando são comparadas as medidas abaxiais e adaxiais. Este fato pode ser visto claramente na segunda banda de excitação, mais especificamente no segundo pico, onde para as medidas da região abaxial a média da classe com deficiência Hídrica é a mais intensa, seguida por Referência e deficiência de Nitrogênio. E a ordem das intensidades para as medidas na região adaxial é Deficiência de Nitrogênio, a mais intensa, seguido de Referência e Deficiência Hídrica.

Utilizando do artifício de encontrar diferentes padrões que representam cada classe de folhas, com intuito de encontrar um protocolo de medida para o sistema LIFS-405 nas folhas de soja, como feito para os citros, foram realizadas medidas em 135 folhas, sendo 45 de cada classe, nas regiões abaxiais e adaxiais. Dessa forma foram criados dois modelos de regressão via PLSR, por meio de uma validação cruzada com 10 *folders*, foram avaliados os desempenhos com diferentes números de componentes, dos classificadores criados com as medidas das duas regiões. Os acertos das validações cruzadas podem ser vistos no gráfico da figura 6.18, as matrizes confusões com os maiores acertos são apresentadas nas tabelas 6.11 e 6.12. O número de componentes utilizados nas montagens dos melhores modelos foram 11 componentes para as medidas nas regiões abaxiais e 9 componentes para as medidas adaxiais.

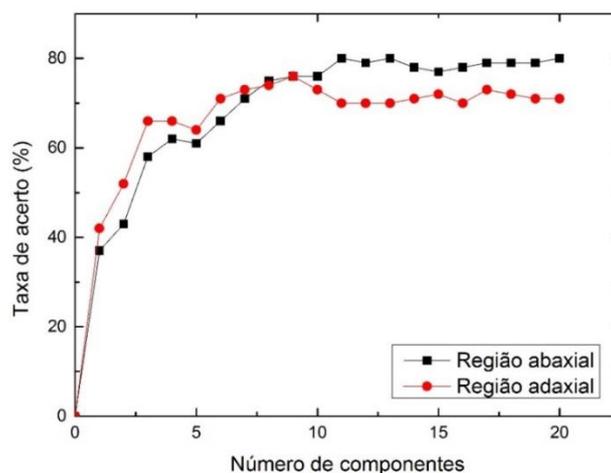


Figura 6.18 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos dois classificadores criados com medidas das regiões abaxiais e adaxiais, adquiridas com o sistema LIFS-405.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.11 – Matriz confusão da validação cruzada que obteve o maior acerto na classificação correta, com os espectros retirados das regiões abaxiais, utilizando o sistema LIFS-405.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|--------------|-----------------|---------------|
| | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Referência | 76% | 4% | 20% |
| Def. Nitrogênio | 4,44% | 82,22% | 13,34% |
| Def. Hídrica | 17,78% | 0% | 82,22% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.12 – Matriz confusão da validação cruzada que obteve o maior acerto na classificação correta, com os espectros retirados das regiões adaxiais, utilizando o sistema LIFS-405.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|---------------|-----------------|---------------|
| | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Referência | 71,11% | 0% | 28,89% |
| Def. Nitrogênio | 6,67% | 86,66% | 6,67% |
| Def. Hídrica | 24,44% | 6,67% | 68,89% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analogamente com o resultado com as folhas de laranja, o sistema FILS-405 para as folhas de soja se mostrou mais eficientes nas medidas realizadas nas regiões abaxiais. Comparando os acertos do melhor modelo feito com as medidas

das duas regiões, como apresenta as matrizes confusões das tabelas 6.11 e 6.12, notamos um acerto de 80% com as medidas das regiões abaxiais e 75% para as medidas nas regiões adaxiais. É possível observar que a grande confusão está entre as classes de Referência e Deficiência Hídrica, tanto para as medidas nas regiões abaxiais quanto nas regiões adaxiais. Dessa forma, estabeleceu-se o seguinte protocolo para diferenciar os diferentes tipos de estresses nas folhas de soja com a técnica LIFS-405: o modelo de classificação via regressão deve ser gerado com os espectros de fluorescência obtidos na região abaxial.

Assim utilizando este conjunto e outros dois, coletados respectivamente em 16/11/2015 e 24/11/2015, foi averiguado o potencial de classificação dos modelos criados via regressão PLSR, por meio de validações cruzadas. O resultado está apresentado na sessão do Apêndice A.2.1, na figura A4, onde o conjunto coletado em 12/11/2015 obteve o acerto máximo de 80% utilizando 12 componentes, o conjunto coletado em 16/11/2016 alcançou 82% de acerto com 12 componentes e o último conjunto coletado em 24/11/2016 teve o acerto máximo de 81% usando 12 componentes no modelo. Assim todos os modelos criados com os três conjuntos obtiveram o potencial de separação das classes de Referência, Deficiência Hídrica e Deficiência de Nitrogênio.

Conhecendo o potencial de classificação dos conjuntos foi realizado o processo de separar cada conjunto em duas partes, onde a primeira parte com 90 folhas, sendo 30 de cada classe foi usado para montar classificador, e com a segunda parte contendo 45 folhas, sendo 15 de cada classe foi usado para validar o modelo. Lembrando que esta validação foi realizada com o classificador e sua respectiva segunda metade do conjunto, sem haver mistura nos conjuntos de medidas. Os resultados com os desempenhos dos classificadores criados utilizando as primeiras partes dos conjuntos colhidos nas três diferentes datas, desenvolvido por meio de validações cruzadas são ilustradas na figura 6.19, onde são expressos as variações dos números de componentes e os respectivos acertos. Assim utilizando o número de componentes correspondente ao maior acerto de cada conjunto foram montadas as matrizes confusões, apresentada na tabela 6.13, onde também estão representadas as matrizes confusões das validações dos modelos nos seus respectivos subconjuntos.

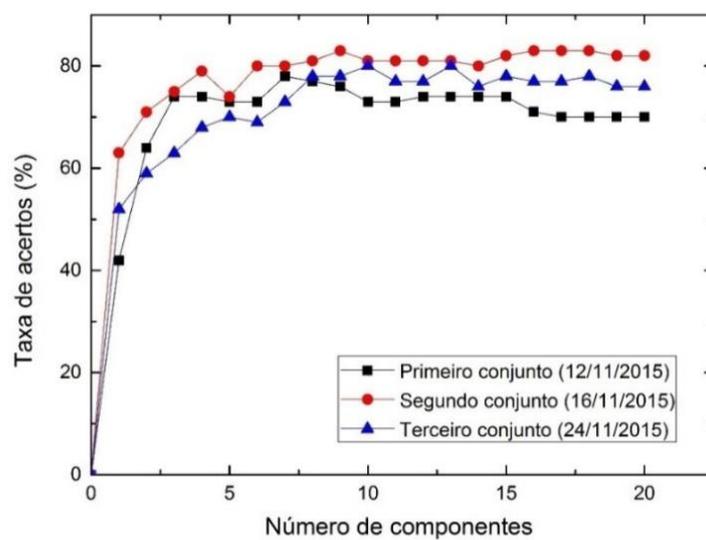


Figura 6.19 – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 6.13 – Na parte superior das tabelas estão apresentados os melhores acertos das validações cruzadas com as primeiras partes dos conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Desta forma, os classificadores foram criados com 90 folhas, sendo 30 de cada classe. Na parte inferior das tabelas estão ilustrados os acertos das validações utilizando as segundas partes dos conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Os modelos de classificadores continham 7 componentes para o primeiro, 16 componentes para o segundo e 10 componentes para o terceiro.

a)

| Classificador | | | |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Classe real | | | |
| Referência | 73% | 27% | 0% |
| Def. Nitrogênio | 30% | 70% | 0% |
| Def. Hídrica | 0% | 10% | 90% |
| Validação | | | |
| Referência | 67% | 27% | 6% |
| Def. Nitrogênio | 27% | 67% | 6% |
| Def. Hídrica | 7% | 0% | 93% |

b)

| Classificador | | | |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Classe real | | | |
| Referência | 73% | 7% | 20% |
| Def. Nitrogênio | 3% | 97% | 0% |
| Def. Hídrica | 13% | 7% | 80% |
| Validação | | | |
| Referência | 74% | 13% | 13% |
| Def. Nitrogênio | 13% | 87% | 0% |
| Def. Hídrica | 13% | 7% | 80% |

c)

| Classificador | | | |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Classe real | | | |
| Referência | 87% | 7% | 6% |
| Def. Nitrogênio | 0% | 83% | 17% |
| Def. Hídrica | 10% | 20% | 70% |
| Validação | | | |
| Referência | 73% | 27% | 0% |
| Def. Nitrogênio | 7% | 93% | 0% |
| Def. Hídrica | 20% | 7% | 73% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

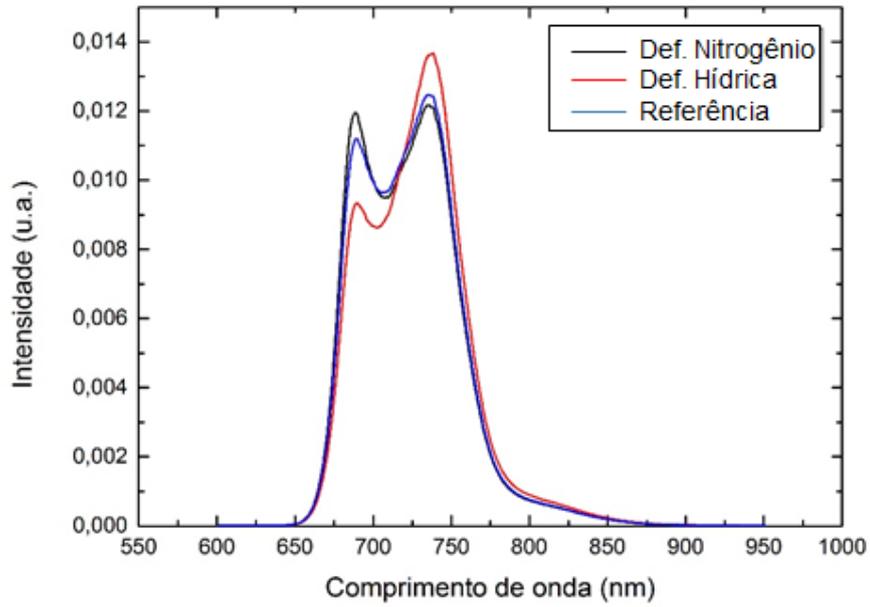
Analisando a figura 6.19 com os acertos das validações cruzadas, utilizando a primeira parte dos conjuntos, conseguimos um acerto máximo de 78% para o primeiro conjunto, 83% no segundo e 80% no terceiro. Onde o número de componentes que proporcionaram esses acertos foram 7 para o primeiro conjunto coletado, 16 componentes no segundo conjunto e 10 no terceiro. Já os acertos nas validações empregando a segunda parte de cada conjunto, com o respectivo modelo criado foram de 76% para o primeiro, 80% para o segundo e terceiro conjunto. O resultado pode ser considerado bastante elevado, uma vez que por uma análise visual seria impossível diferenciar as três classes de folhas. Sendo assim o sistema LIFS-405, junto com os modelos criados, podem ser utilizados para separar e classificar plantas que estão sob estresses hídricos, plantas com disponibilidade baixa de nitrogênio de plantas em condições ideais para o crescimento.

6.2.2 Diagnóstico de plantas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio com o equipamento LIFS-561

Utilizando o sistema LIFS-561, nas amostras de soja retiradas da casa de vegetação do LANAPRE, estudou-se o potencial da técnica em diferenciar plantas em condições de Deficiência Hídrica, de plantas com Deficiência de Nitrogênio de plantas de Referência, assim como conduzido com o sistema LIFS-405.

Foram utilizados os mesmos conjuntos descritos na sessão 5.1.4 e o procedimento análogo realizado para determinar o protocolo de medida com o sistema LIFS-405. As figuras 6.20-a) e 6.20-b) mostram os perfis médios dos espectros, das três classes (Deficiência Hídrica, Deficiência de Nitrogênio e Referência) retiradas com o sistema LIFS-561 medidas nas regiões abaxiais e adaxiais, respectivamente.

a)



b)

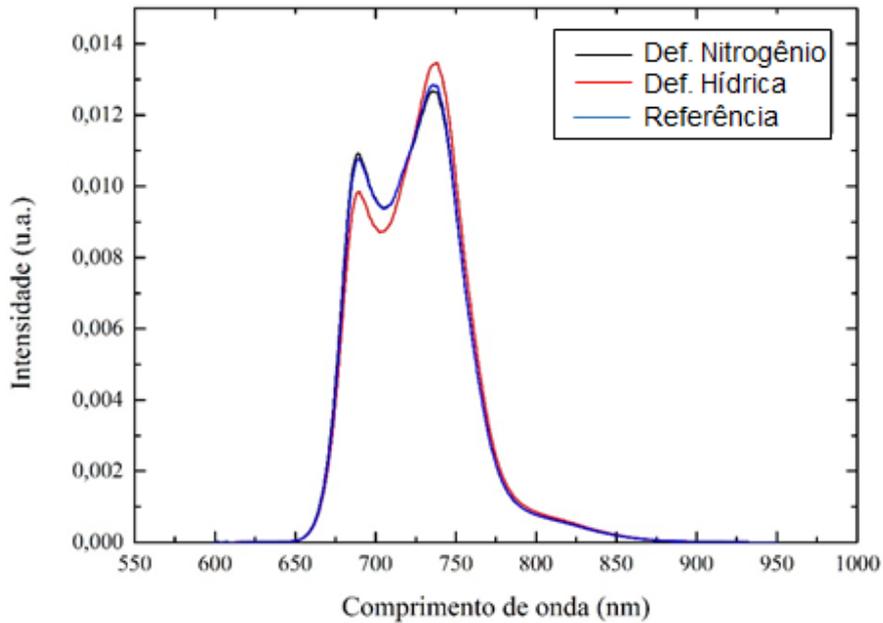


Figura 6.20 – Espectros de fluorescência médios típicos das três classes adquiridos com o sistema LIFS-561. As plantas foram subdivididas nas classes: Deficiência Hídrica, Deficiência de Nitrogênio e Referência. Em a) são representados os espectros coletados das medidas realizadas na região abaxiais e em b) nas regiões adaxiais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando os espectros é possível observar os picos característicos da clorofila, o primeiro em 685 nm e o segundo em 735 nm. Estudando as intensidades dos picos nota-se que a ordem das intensidades, referente a cada classe, mantém-se a mesma para as duas regiões. Este fato pode ser exemplificado analisando o primeiro pico dos espectros médios, onde o espectro da classe com Deficiência de Nitrogênio apresenta uma maior intensidade, seguida pela classe de Referência e Deficiência Hídrica. Já no segundo pico temos a classe com Déficit Hídrico como a mais intensa, seguida da Referência e Deficiência de Nitrogênio. Este fato como visto anteriormente está relacionado a concentração da clorofila presente na folha (53,24), e essa diferença nos espectros é um fator crucial para encontrar os padrões entre as classes e induzir os classificadores.

Com os espectros normalizados e corrigidos as linhas de bases foram induzidos os classificadores, para os dois conjuntos distintos de medidas. Utilizando uma classificação baseada em validação cruzada foi montado o gráfico da figura 6.21, com os acertos e os referentes números de componentes.

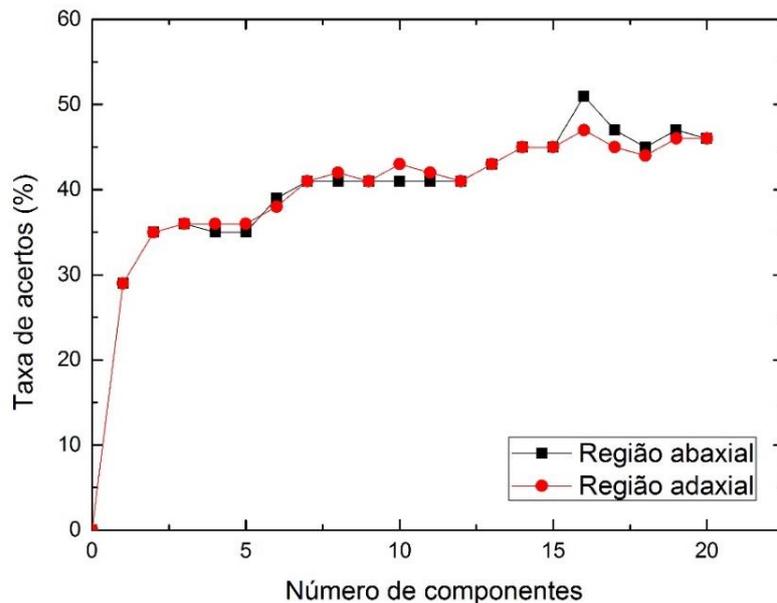


Figura 6.21 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, dos dois classificadores criados com medidas das regiões abaxiais e adaxiais, coletadas com o sistema LIFS-561.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível notar, analisando o gráfico da figura 6.21, o acerto máximo na validação cruzada com os espectros coletados das regiões abaxiais de 51%, com 16

componentes, e com o conjunto medidos nas regiões adaxiais chegou a 47%, com os mesmos 16 componentes. Assim devido o melhor desempenho, na classificação do conjunto medido na região abaxial, como aconteceu com o conjunto de folhas de laranja, todas as medias para folhas de soja com o sistema LIFS-561 foram realizadas nas regiões abaxiais.

Quando feita a comparação dos desempenhos dos sistemas LIFS-405 e LIFS-561 é nítida a superioridade do sistema LIFS-405, isso acontece pela maior quantidade de informações relevantes que possuem os espectros retirados com a excitação do laser de 405 nm, facilitando assim o reconhecimento das características espectrais referente a cada classe (Deficiência Hídrica, Deficiência de Nitrogênio e Referência), consequentemente aumentando o acerto na classificação.

Utilizando o sistema LIFS-561 foram medidos os três conjuntos, como descrito nos estudos com o LIFS-405, e utilizando as mesmas técnicas dos estudos anteriores foi estudado o potencial de classificação das classes dos conjuntos, como mostrado na sessão do Apêndice A.2.2. De acordo com o gráfico da figura A5, ilustrada no Apêndice A5, o primeiro conjunto coletado em 12/11/2015 obteve o acerto máximo de 51% com 16 componentes, já o conjunto coletado em 16/11/2015 alcançou 61% com 13 componentes, e o terceiro conjunto adquirido em 24/11/2015 teve um acerto de 72% com 20 componentes. Analisando esses resultados percebe-se que o sistema LIFS-561 não alcançou a margem dos 75%, e com isso não se enquadrou no critério de ter o potencial de discriminação das três classes. Com isso não foi realizado o processo de dividir o conjunto, para criar um classificador com a primeira parte e valida-lo com a segunda metade.

6.2.3 Diagnóstico de plantas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência

Empregando a técnica de Imagens de Fluorescência na tentativa de diferenciar as classes de Deficiência Hídrica, Deficiência de Nitrogênio e Referência foram utilizados os mesmos três conjuntos coletados nas diferentes datas, como feito para os sistemas LIFS-405, LIFS-561 e descrito em 5.1.4. Usando o sistema de Imagens de Fluorescência foram adquiridas as imagens características das três classes em estudo, onde são ilustradas pela figura 6.22.

Em uma análise visual podemos notar que as folhas com Deficiência Hídrica e com Deficiência de Nitrogênio possuem uma maior concentração da cor azul, em suas nervuras, quando comparadas com a folha de Referência. Já a folha de Referência possui uma quantidade maior de coloração vermelha, quando comparada com as outras duas classes. O resultado desta análise qualitativa pode ser confirmado estudando os histogramas médios das cores vermelha, verde e azul, retiradas das imagens das três classes e dos três conjuntos. A figura 6.23 apresenta os histogramas médios das três cores.

Os estudos dos histogramas médios permitem afirmar que as imagens das folhas de Referência possuem uma maior quantidade de pixels com tons maiores de vermelho, e uma menor quantidade de pixels com tons azul e verde, quando comparado com as classes de Deficiência de Nitrogênio e Deficiência Hídrica. De acordo com a análise dos histogramas médios da cor azul é possível constatar uma maior quantidade de pixels com tons superiores de azul para as classes de Deficiência Hídrica e Deficiência de Nitrogênio, quando comparados com a classe de Referência.

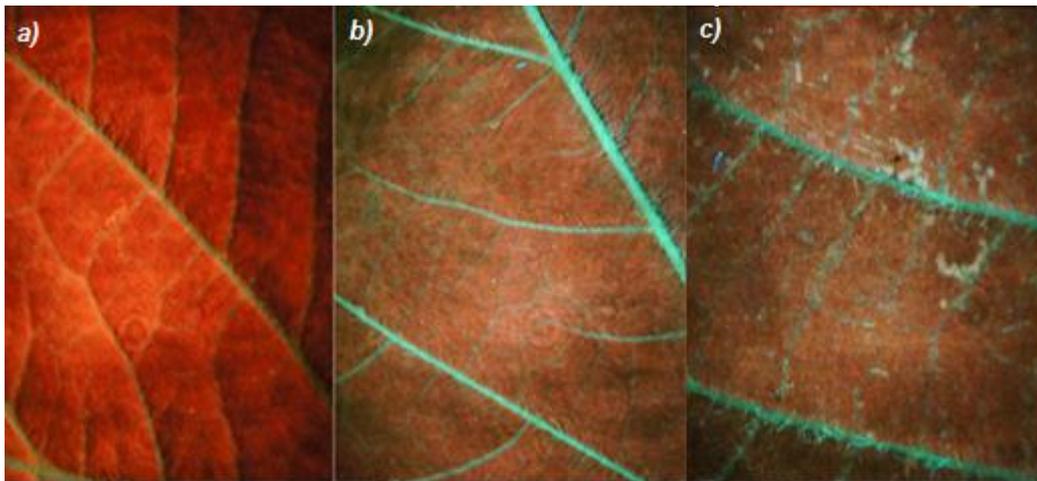


Figura 6.22 – Imagens de fluorescências de folhas típicas das classes: Em a) classe de Referência, em b) Deficiência de Nitrogênio e em c) Deficiência Hídrica. A folha de Referência possui uma coloração vermelha superior as outras duas folhas. Já as folhas com Deficiência de Nitrogênio e Hídrica possuem em suas nervuras colorações mais azuladas quando comparadas a folha de Referência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

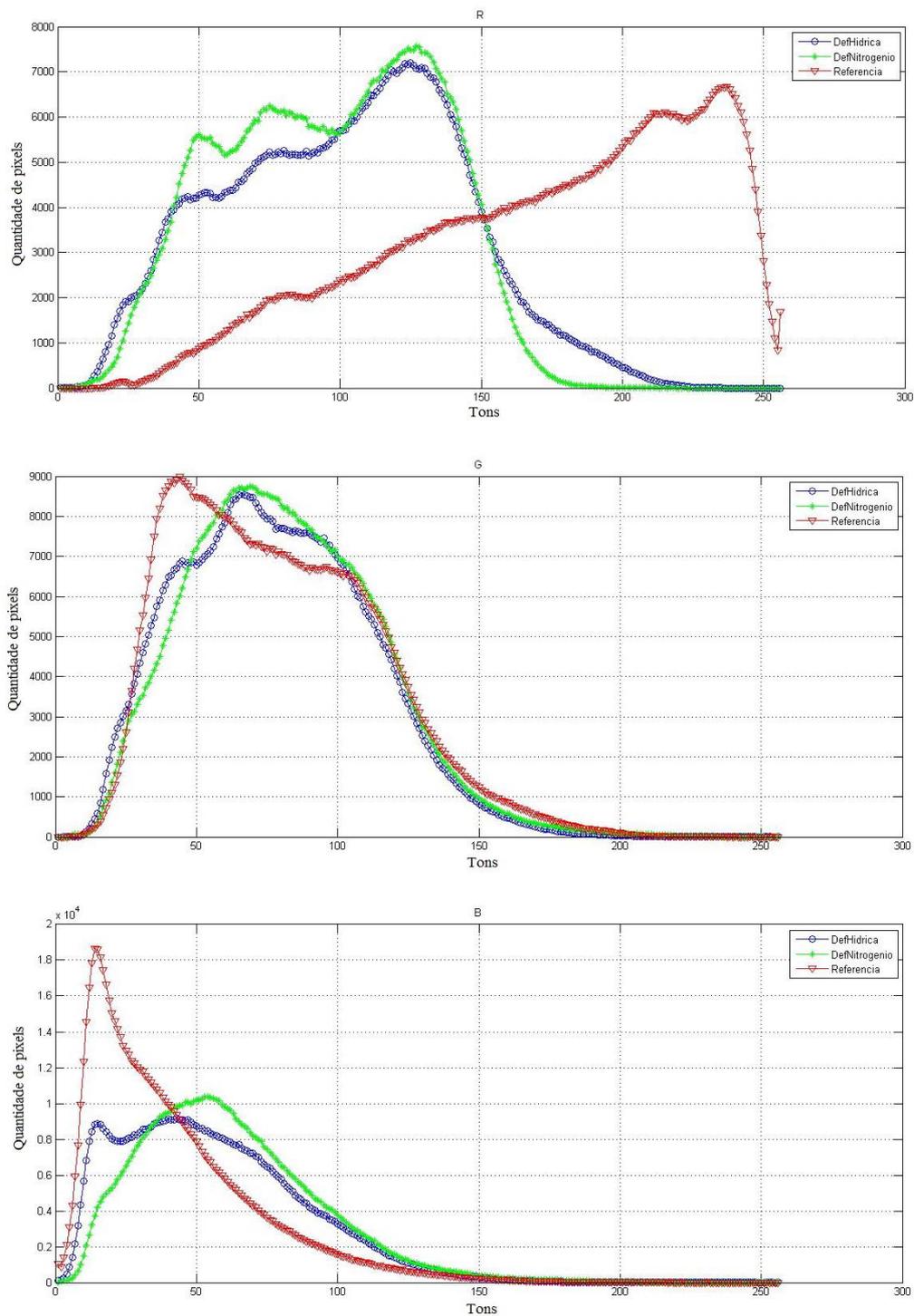


Figura 6.23 – Histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, coletadas das imagens obtidas com o sistema de Imagens de Fluorescência. De acordo com as distribuições dos histogramas é possível notar a concordância com as imagens coletadas, onde os números de pixels com tons de vermelho são superiores para a classe de Referência.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim trabalhando com os histogramas de cores, como feito no estudo com as imagens de laranja, foi induzido um classificador via regressão PLSR e por meio de validações cruzadas estudado o potencial de classificação do conjunto, como apresentado no Apêndice A.2.3, no gráfico da figura A6. A análise das matrizes confusões da tabela T6, do Apêndice A, permite observar que grande parte do erro está associada à classificação das folhas da classe de Referência, pois estão sendo classificadas como pertencente a classe de Deficiência Hídrica ou Deficiência de Nitrogênio. Por outro lado, pode-se afirmar que as folhas com Deficiência Hídrica e Deficiência de Nitrogênio possuem imagens que caracterizam bem as duas classes, uma vez que grande parte das folhas estão sendo classificadas de forma acertada pelo classificador. O acerto máximo foi de 68% para o primeiro conjunto, 79% para o segundo e 85% para o terceiro. Apesar do primeiro conjunto não ter alcançado os 75% de acerto máximo na validação cruzada, os outros dois conjuntos alcançaram acertos muito superiores, conseqüentemente foram considerados como tendo potencial de diferenciação.

Observado o potencial de discriminação entre as classes, os conjuntos foram separados em duas partes, e repetidos os procedimentos de montagem do classificador e validação. Os acertos das validações cruzadas com relação aos números de componentes estão representados no gráfico da figura 6.24. E as matrizes confusões com os melhores acertos dos classificadores e as suas validações podem ser vistos na tabela 6.14. Lembrando que a validação de cada classificador foi feita com o respectivo subconjunto, ou seja, com a segunda parte do conjunto coletado na mesma data.

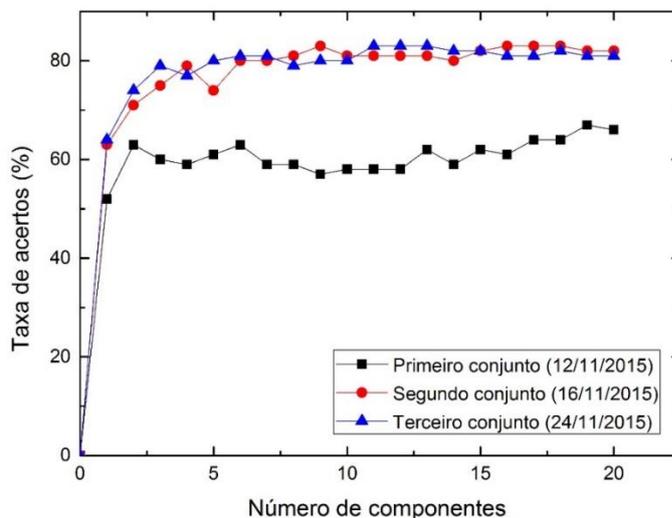


Figura 6.24 – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores. Os modelos foram criados com 19 componentes para o primeiro conjunto, 16 componentes para o segundo e 11 para o terceiro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.14 - Nas primeiras partes das tabelas são ilustrados os melhores acertos das validações cruzadas com as primeiras partes dos conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Desta forma, os classificadores foram criados com 90 imagens de folhas, sendo 30 de cada classe. Já nas segundas metades das tabelas estão apresentados os acertos das validações nos conjuntos: a) conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Os modelos de classificadores continham 19 componentes para o primeiro, 16 componentes para o segundo e 11 componentes para o terceiro.

a)

| <u>Classificador</u> | | | |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Classe real | | | |
| Referência | 50% | 23% | 27% |
| Def. Nitrogênio | 13% | 77% | 10% |
| Def. Hídrica | 13% | 13% | 74% |
| <u>Validação</u> | | | |
| Referência | 53% | 40% | 7% |
| Def. Nitrogênio | 0% | 80% | 20% |
| Def. Hídrica | 20% | 27 | 53% |

(continua)

(continuação)

Tabela 6.14 – Nas primeiras partes das tabelas são ilustrados os melhores acertos das validações cruzadas com as primeiras partes dos conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Desta forma, os classificadores foram criados com 90 imagens de folhas, sendo 30 de cada classe. Já nas segundas metades das tabelas estão apresentados os acertos das validações nos conjuntos: a) conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. Os modelos de classificadores continham 19 componentes para o primeiro, 16 componentes para o segundo e 11 componentes para o terceiro.

b)

| <u>Classificador</u> | | | |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Classe real | | | |
| Referência | 73% | 7% | 20% |
| Def. Nitrogênio | 0% | 97% | 3% |
| Def. Hídrica | 20% | 7% | 73% |
| <u>Validação</u> | | | |
| Referência | 87% | 0% | 13% |
| Def. Nitrogênio | 7% | 80% | 13% |
| Def. Hídrica | 33% | 7% | 60% |

c)

| <u>Classificador</u> | | | |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
| Classe real | | | |
| Referência | 90% | 10% | 0% |
| Def. Nitrogênio | 3% | 70% | 27 |
| Def. Hídrica | 0% | 10% | 90% |
| <u>Validação</u> | | | |
| Referência | 60% | 7% | 33% |
| Def. Nitrogênio | 13% | 80% | 7% |
| Def. Hídrica | 13% | 0% | 87% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os estudos das matrizes confusões com as validações cruzadas permitem afirmar que o primeiro classificador teve um acerto máximo de 67%, o segundo e o terceiro um acerto de 83%. Onde o primeiro modelo utilizou 19 componentes, o segundo 16 e o terceiro 11 componentes. Assim empregando esses modelos nas validações utilizando os seus respectivos subconjuntos foram alcançados um acerto

de 62% para o primeiro conjunto, 76% para o segundo e 80% para o terceiro. A progressão no acerto pode ser decorrente ao aumento das diferenças entre as imagens das três classes, com isso facilitando o reconhecimento dos padrões pelos classificadores.

Desta forma é possível afirmar que a técnica de imagens de fluorescência, junto com os modelos criados, pode ser utilizada para diferenciar plantas de soja que estão sofrendo com o estresse hídrico, de plantas que estão sendo cultivadas com uma menor quantidade de nitrogênio, de plantas que estão em condições ótimas para o crescimento.

6.2.4 Estudo com Imagens Térmicas em plantas de soja

Para que as medidas de temperatura fossem realizadas de forma correta foi necessário encontrar a emissividade da folha de soja. Para o propósito foi montado o esquema ilustrado na figura 5.16, onde a câmera foi posicionada sobre a mesa óptica e variou-se o parâmetro de emissividade. Como visto na figura 5.16 a fita isolante foi colocada em contato com a folha de soja, para que ambas apresentassem a mesma temperatura. Conhecendo a emissividade da fita, 95, o valor foi ajustado na câmera Flir de modo a obter sua temperatura. Uma vez conhecida a temperatura da fita foi variado a emissividade da câmera, até que a temperatura medida na folha de soja tivesse o mesmo valor que a temperatura encontrada anteriormente para a fita.

A tabela 6.15 expressa como variou a temperatura da folha com relação à variação da emissividade. Já a figura 6.25-a) ilustra como caracteriza a imagem quando ajustado uma emissividade diferente do que a folha possui e na figura 6.25-b) quando se aproxima da emissividade verdadeira da folha de soja.

Tabela 6.15 – Variações das temperaturas das folhas de soja com relações as alterações das emissividades. Uma vez que a temperatura da folha se igualava com a da fita, era observada a emissividade que estava ajustada na câmara e assim definida como sendo a emissividade da folha de soja.

| Temperatura da fita: 23.3°C | | Temperatura da fita: 23.1°C | | Temperatura da fita: 24.1°C | |
|-----------------------------|------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|------------------|
| Emissividade | Temperatura (°C) | Emissividade | Temperatura (°C) | Emissividade | Temperatura (°C) |
| 0.80 | 23.9 | 0.80 | 25.4 | 0.80 | 23.4 |
| 0.81 | 23.6 | 0.81 | 25.1 | 0.81 | 23.2 |
| 0.82 | 23.7 | 0.82 | 24.9 | 0.82 | 23.2 |
| 0.83 | 23.9 | 0.83 | 24.8 | 0.83 | 23.2 |
| 0.84 | 23.7 | 0.84 | 24.6 | 0.84 | 23.2 |
| 0.85 | 23.7 | 0.85 | 24.5 | 0.85 | 23.1 |
| 0.86 | 23.8 | 0.86 | 24.3 | 0.86 | 22.6 |
| 0.87 | 23.9 | 0.87 | 24.1 | 0.87 | 22.8 |
| 0.88 | 23.8 | 0.88 | 24 | 0.88 | 22.7 |
| 0.89 | 23.9 | 0.89 | 23.6 | 0.89 | 23 |
| 0.90 | 24 | 0.90 | 23.3 | 0.90 | 23.2 |
| 0.91 | 24.1 | 0.91 | 23.3 | 0.91 | 23.2 |
| 0.92 | 24 | 0.92 | 23.4 | 0.92 | 23.2 |
| 0.93 | 24 | 0.93 | 23.4 | 0.93 | 23.3 |
| 0.94 | 23.8 | 0.94 | 23.4 | 0.94 | 23.4 |
| 0.95 | 23 | 0.95 | 22.9 | 0.95 | 23.7 |
| 0.96 | 23.2 | 0.96 | 23.2 | 0.96 | 24 |
| 0.97 | 23.8 | 0.97 | 23.6 | 0.97 | 24 |
| 0.98 | 23.9 | 0.98 | 23.4 | 0.98 | 23.9 |
| 0.99 | 23.8 | 0.99 | 23.6 | 0.99 | 23.9 |
| 1 | 23.9 | 1 | 23.6 | 1 | 23.9 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

a)

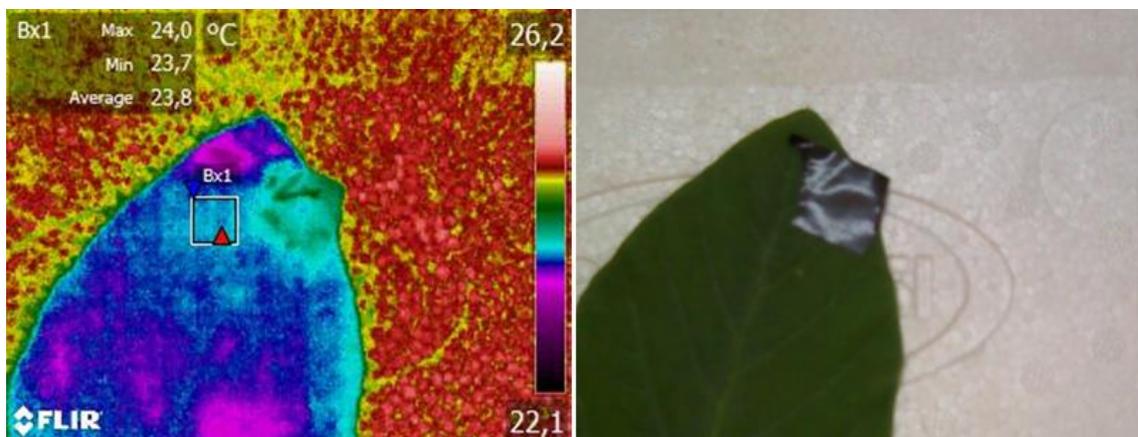


Figura 6.25 – Em a) é apresentada a imagem da folha de soja com o ajuste da emissividade diferente da real emissividade da folha; Em b) é representado a imagem da folha de soja com o ajuste da emissividade próximo da real emissividade da folha.

(continua)

(continuação)

b)

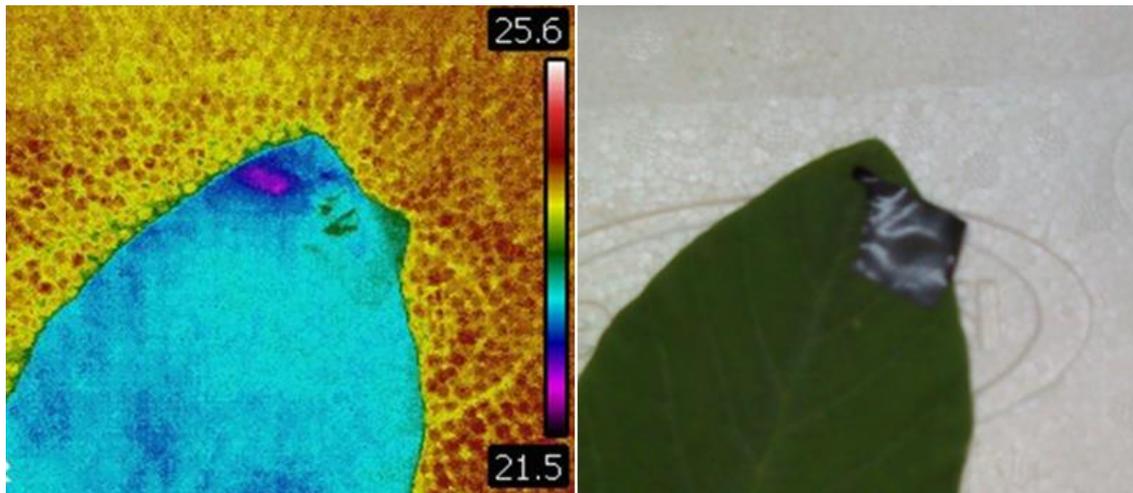


Figura 6.25 – Em a) é apresentada a imagem da folha de soja com o ajuste da emissividade diferente da real emissividade da folha; Em b) é representado a imagem da folha de soja com o ajuste da emissividade próximo da real emissividade da folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a análise da tabela 6.30 é possível afirmar que a emissividade da folha de soja coincidiu para as três folhas, mesmo para as duas diferentes temperaturas da fita. Quando variado o valor da emissividade na câmera é observado que a cor da fita, que corresponde uma temperatura, aproxima-se da cor da folha, como ilustrado na figura 6.25-b). Com isso pode-se inferir que a emissividade da folha é 0.96, cujo valor foi empregado em todas as medidas do experimento.

Ajustada a emissividade de 96 na câmera da Flir foram realizadas as medidas com as plantas da estufa do LANAPRE. Para as primeiras medidas todas as plantas estavam sendo irrigada de forma idêntica, e nesta condição não foi possível observar diferença significativa de temperatura entre os três diferentes grupos, como mostra a figura 6.26.

A partir do dia 08/11/2016, quinze plantas foram induzidas ao estresse hídrico, distribuídas de acordo com a figura 5.4. Nesta condição foram conduzidas as medidas de imagens térmicas em diferentes dias e horários, com o intuito de estudar a capacidade do equipamento detectar diferenças nas temperaturas entre as plantas.

Desta forma, no dia que se iniciou o estudo e no dia posterior (09/11/2016), não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre as temperaturas das plantas. Porém, no dia 10/12/2016 foi constatado que o conjunto das plantas que

estavam no regime de escassez de água possuía a temperatura média superior à temperatura média das plantas de referência e das plantas com menor quantidade de nitrogênio. A figura 6.27 apresenta o gráfico dos valores das temperaturas das respectivas plantas, medidas que foram realizadas no dia 10/11/2016 as 16h:15mim.

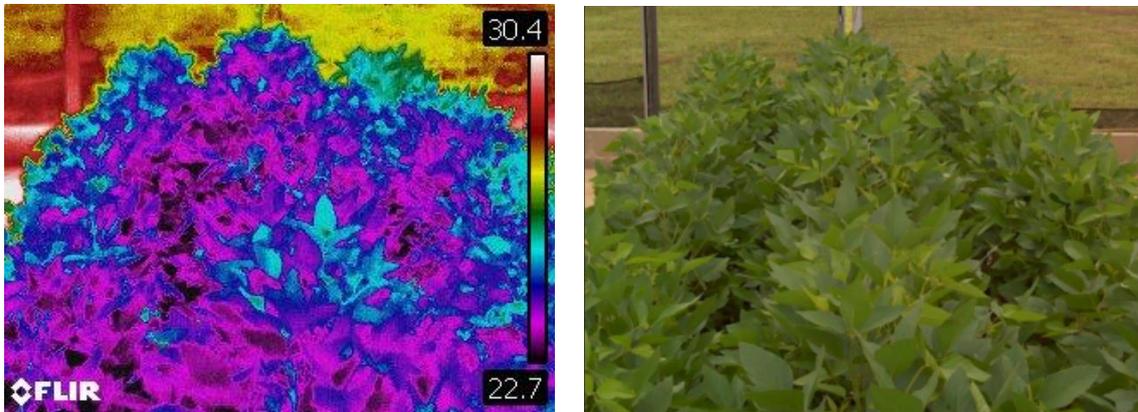


Figura 6.26 – Imagem das plantas da estufa com a mesma temperatura. Onde é possível observar que todas as folhas apresentam aproximadamente a mesma coloração de roxo em sua copa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

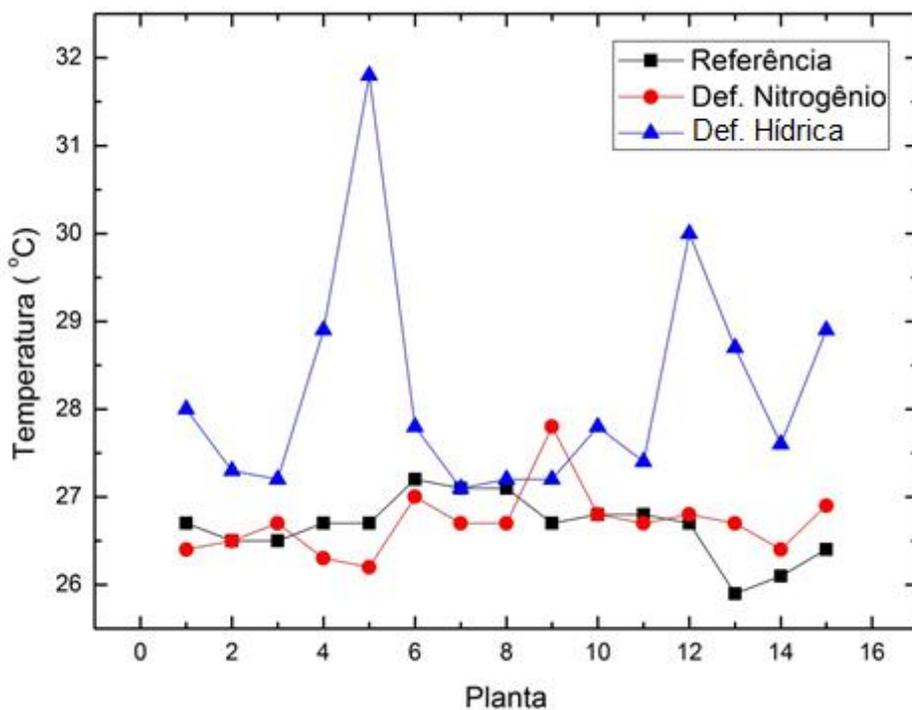


Figura 6.27 – Gráficos das medidas de temperaturas das plantas, as 16h:15mim do dia 10/12/2016. Onde é possível observar que as plantas em condições de Déficit Hídrico possuem as maiores temperaturas.

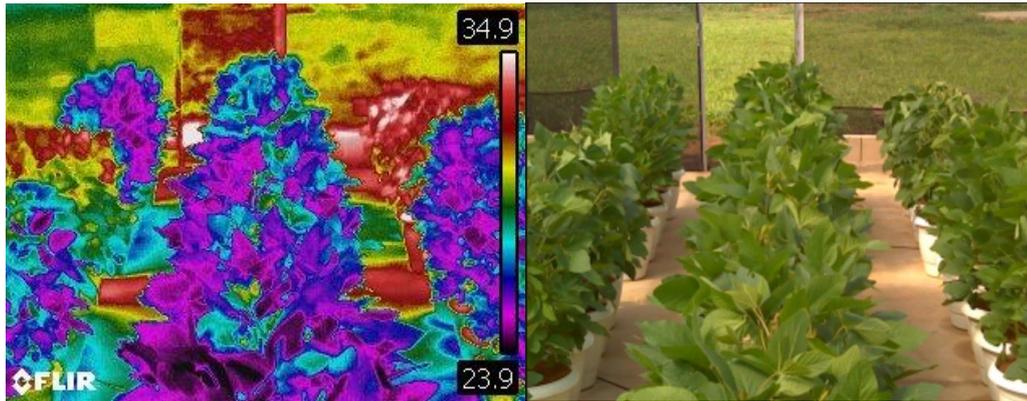
Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise dos gráficos da figura 6.27 permite afirmar que o conjunto das plantas sob estresse hídrico possui a temperatura média de 28,20°C. Já a média das plantas de Referência ficou próxima de 26,66°C e das plantas com menor quantidade de nitrogênio era de 26,71°C. Assim a diferença entre as médias de temperatura das plantas de Referência e das plantas em condições de Deficiência hídrica foi de 1,54°C, enquanto que a diferença entre as médias das temperaturas entre as plantas de Referência e Deficiência de Nitrogênio foi de 0,05°C, o que não é considerado uma diferença significativa. Desta forma, constatou-se que a câmera termográfica da Flir necessita de dois dias para detectar plantas em condição estresse hídrico.

Um estudo similar a este, porém com variedades diferentes de soja, conduzido por Saraiva (62), constatou que para observar diferenças entre as temperaturas das plantas que estão em condições ideais de plantas com déficit hídrico levaria três dias. O desacordo no número de dias pode estar relacionado com o diferente solo utilizado, na diferença entre as variedades de soja, na diferença entre as umidades relativa do ar, onde se encontravam as plantas, além das variações nas temperaturas dos ambientes e entre outros fatores.

Sendo mantidas as mesmas condições de estresses, no dia 11/12/2016, foi observada uma diferença entre as temperaturas médias, das plantas com falta de água e as plantas de Referência de 5,92°C. As plantas com menor quantidade de nitrogênio e as plantas de Referência, continuaram a não apresentar diferença significativa entre as temperaturas médias. A imagem com os três conjuntos de plantas, nas diferentes condições de estresses é ilustrado na figura 6.28-a) e 6.28-b).

a)



b)

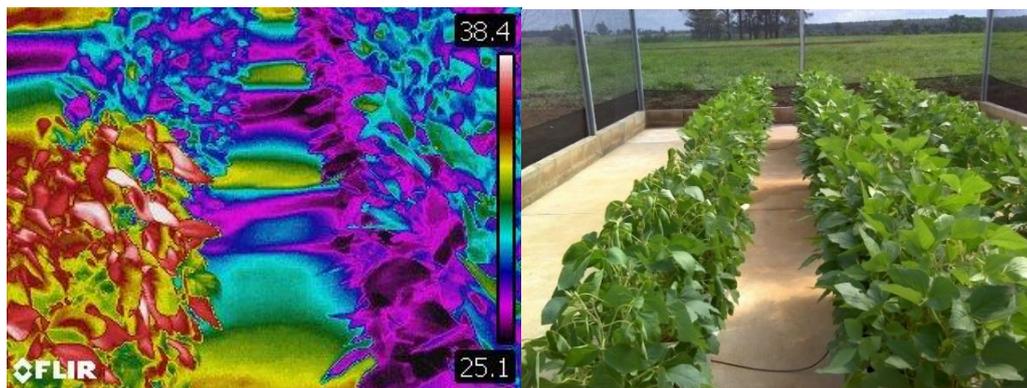


Figura 6.28 – Imagem das plantas da estufa com temperaturas distintas. Onde é possível observar que as folhas das plantas que estão sofrendo com a falta de água apresentam a coloração vermelha em sua copa, representando uma maior temperatura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a imagem da figura 6.28 é possível observar que as plantas que se encontravam em condições de estresses hídricos apresentam uma coloração avermelhada, lembrando que está é uma cor falsa definida pelo software da câmera para auxiliar na visualização, e as plantas de Referência e com Déficit de Nitrogênio apresentam a mesma coloração, roxa escura com algumas partes azul.

Por volta das 18h:00min do dia 11/12/2016, as plantas que estavam em condições baixa de água, voltaram a ser irrigadas da mesma forma que as plantas de Referência e as plantas com Deficiência de nitrogênio. No dia 12/11/2016, a máxima diferença entre as médias das temperaturas entre as plantas que estavam em estresses hídricos e as referências foi de 1.2°C, já no dia 13/12/2016 a diferença chegou a 0,72°C e no dia 14/12/2016 as temperaturas de todas as plantas praticamente se igualaram. Assim as plantas que estavam no regime de escassez

de água, precisaram de três dias para obter a mesma temperatura que as plantas de Referência.

Montado a tabela 6.16, com as diferenças de temperatura média das plantas de Referência e de Deficiência hídrica, com as medidas realizadas no dia 11/12/2016, em inúmeras horas do dia, em diferentes temperaturas e umidades relativa do ar dentro da estufa, definiram-se quais seriam as melhores condições para realizarem as medidas, quando o objetivo é investigar as condições de estresses hídricos em plantas de soja.

Tabela 6.16 – Tabela com as diferenças de temperaturas entre as plantas de Referência e de Déficit Hídrico, em diversas condições. A maior variação é de 5,55, quando a temperatura no interior da estufa é 36°C e a umidade relativa 54%.

| Horário | 09:15 | 10:30 | 11:45 | 14:00 | 15:30 | 16:30 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ΔT das médias das plantas Ref. com as Def. Hídrica (°C) | 2,7 | 5,25 | 5,55 | 3,24 | 1,6 | 0,41 |
| Temperatura da estufa (°C) | 28 | 32 | 36 | 33 | 33 | 30 |
| Umidade relativa do ar (%) | 75 | 63 | 54 | 61 | 71 | 63 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com o estudo da tabela 6.16, com as diversas medidas de temperatura em diferentes condições, nota-se que a maior diferença das temperaturas entre as plantas de referência e as plantas com Deficiência hídrica ocorreu às 11h:45min, onde a temperatura da estufa se encontrava a 36°C, ou seja, a maior temperatura medida no interior da casa de vegetação durante o dia. A tabela 6.16 também permite afirmar que quando a umidade relativa do ar é 54%, a mais baixa da tabela, ocorre a maior diferença entre as temperaturas. Assim é possível afirmar que as melhores condições para se realizar as medidas de temperatura, com a câmara FIL, com o intuito de observar se as plantas de soja estão sob estresses hídricos, são quando a temperatura do ambiente for alta e a umidade relativa do ar baixa.

6.3.1 Diagnóstico do GSFR utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405

Em busca de desenvolver um equipamento que possa auxiliar no diagnóstico da doença GSFR, doença que esta devastando a cultura da soja e pode causar a diminuição de até 60% da produção, este trabalho buscou auxílio nas técnicas

fotônicas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS-405 e LIFS-561) e Imagens de Fluorescência para alcançar o objetivo.

Para estes estudos foram utilizados os conjuntos de folhas das fazendas Laurindo, Xingu I e Xingu II, como descrito na sessão 5.1.2. A figura 6.29 mostra os espectros médios característico das classes Sadia e com GSFR, do conjunto da fazenda Xingu II retirado com o sistema LIFS-405.

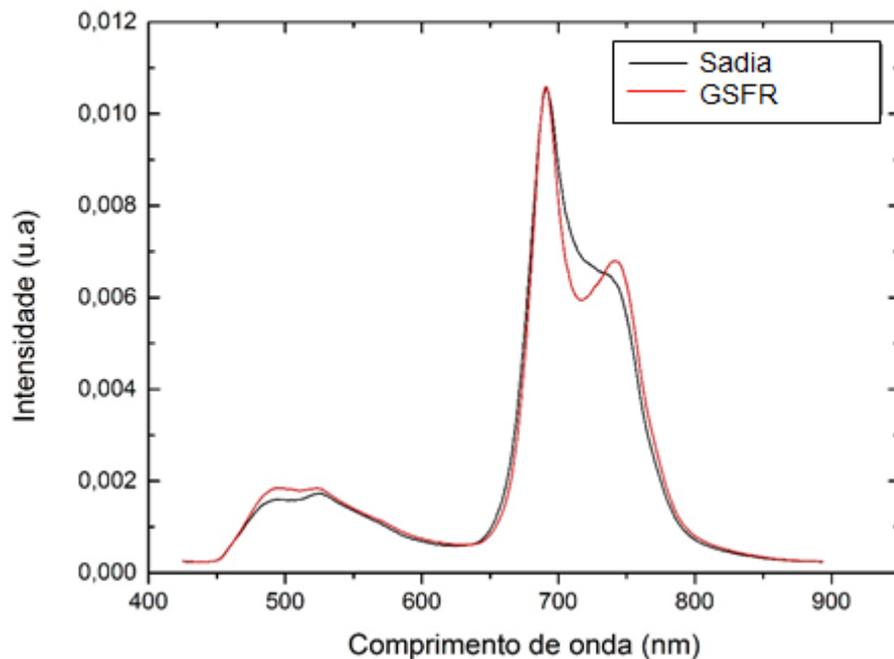


Figura 6.29 – Espectros médios coletados do sistema LIFS-405, com as amostras de soja da fazenda Xingu II. Onde o espectro vermelho representa o espectro médio das folhas com GSFR e o espectro preto é referente as folhas Sadias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a figura 6.29 é possível observar que os espectros médios das folhas Sadias e com GSFR possuem as mesmas bandas de fluorescência que os espectros das folhas de laranja, e das folhas de soja da estufa, entretanto com intensidades diferentes. É possível notar que na primeira banda, que vai de 450 a 650 nm, a média dos espectros da classe GSFR é mais intenso do que a média dos espectros da classe Sadia. A característica desta fluorescência está relacionada aos metabólitos secundários, que por sua vez estão ligados ao mecanismo de defesa da planta, podendo ser indícios da presença da doença. (27,39) A segunda banda que vai de 650 a 800 nm, possuem também os dois picos característico da clorofila, que estão em 690 e 740 nm. A grande diferença nesta banda está na intensidade do

segundo pico, onde os espectros da classe GSFR são mais intensos que os da classe Sadia, fato que está relacionado com a concentração de clorofila, ou seja, é provável que as plantas doentes apresentem uma maior concentração quando comparada com as sadias. Este fato está de acordo com o sintoma da doença, de não permitir que a planta seque, ou seja, não complete o seu ciclo natural de vida, ficando sempre na fase adulta, conseqüentemente deixando as folhas com uma maior quantidade de clorofila quando comparada com as plantas saudáveis.

Utilizando os conjuntos de sojas das fazendas Laurindo, Xingu I e Xingu II foram estudados os potenciais de classificações dos conjuntos, como mostrado no Apêndice A.3.1. Por meio de modelos desenvolvidos via regressões PLSR, foram feitas classificações através de validações cruzadas e construído o gráfico da figura A7, do Apêndice A. Com as análises da figura A7 observam-se os acertos de 92% na classificação correta do conjunto da Fazenda Laurindo, 93% no conjunto da fazenda Xingu I e 99% no conjunto da fazenda Xingu II. Onde os números de componentes para esses respectivos acertos foram 16 para o conjunto da fazenda Laurindo, 14 para Xingu I e 10 para Xingu II.

Observado o potencial de separação entre as classes doentes e sadias, cada conjunto foi separado em duas partes, e conduzido o processo de criação dos classificadores e suas validações. A figura 6.20 mostra os acertos das validações cruzadas dos classificadores, onde cada conjunto continha 50 espectros de folhas sendo metade de cada classe. As matrizes confusões que representam os maiores acertos dos modelos de classificadores podem ser vistas nas tabelas 6.17, onde também são apresentadas as validações dos modelos com os respectivos subconjuntos.

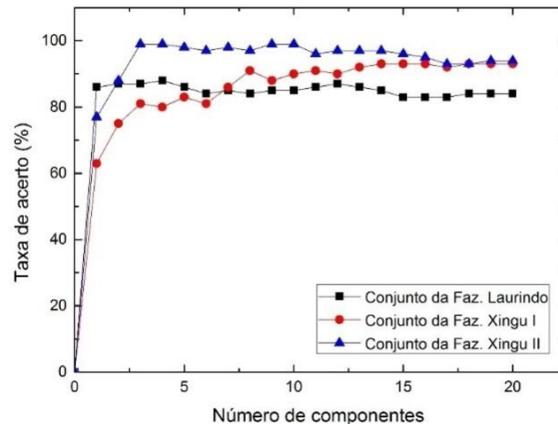


Figura 6.30 – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores. Os modelos foram criados com 4 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo, 14 componentes para o conjunto Xingu I e 3 para o conjunto Xingu II.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.17 - Nas partes superiores das tabelas estão apresentadas as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 4 componentes, o da fazenda Xingu I 14 componentes e o da fazenda Xingu II 3 componentes. Já nas partes inferiores estão ilustradas as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II.

a)

| | | <u>Classificador</u> | |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|
| | | GSFR | Sadia |
| Classificado | Classe real | | |
| | GSFR | 90% | 10% |
| | Sadia | 6,0% | 94% |
| | | <u>Validação</u> | |
| | GSFR | 97% | 3% |
| | Sadia | 19% | 81% |

b)

| | | <u>Classificador</u> | |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|
| | | GSFR | Sadia |
| Classificado | Classe real | | |
| | GSFR | 90% | 10% |
| | Sadia | 4% | 96% |
| | | <u>Validação</u> | |
| | GSFR | 89% | 11% |
| | Sadia | 2% | 98% |

(continua)

(continuação)

Tabela 6.17 - Nas partes superiores das tabelas estão apresentadas as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 4 componentes, o da fazenda Xingu I 14 componentes e o da fazenda Xingu II 3 componentes. Já nas partes inferiores estão ilustradas as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II.

c)

| Classificador | | |
|----------------------|-------------|--------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 98% | 2% |
| Sadia | 0% | 100% |
| Validação | | |
| GSFR | 91% | 9% |
| Sadia | 4% | 96% |

Fonte: Elaborada pelo autor

Com a análise das matrizes confusões das tabelas 6.17 é possível observar o acerto máximo de 92% com o classificador do conjunto da Fazenda Laurindo, 93% com o classificador da fazenda Xingu I e 99% com o modelo da fazenda Xingu II. Onde para esses acertos foram utilizados os modelos com 4 componentes no conjunto da fazenda Laurindo, 14 para o conjunto Xingu I e 3 para Xingu II. Assim com os modelos gerados foram realizadas as validações com as respectivas segundas metades de cada conjunto, onde foram alcançados os acertos de 89% para o classificador da fazenda Laurindo, 94% para o da Xingu I e 94% no classificador da Fazenda Xingu II. Com estes resultados podemos afirmar que o sistema LIFS-405, junto com os classificadores criados, possui o poder de diferenciar folhas doentes com GSFR de folhas Sadias, mesmo sendo de diferentes fazendas da região do Maranhão.

Na busca de encontrar padrões nos espectros das folhas doentes e um classificador mais robusto e geral, juntou-se os espectros das três distintas fazendas, ficando assim com duas classes de folhas: 318 folhas da classe Sadias (folhas sadias da Faz. Laurindo, Xingu I e Xingu II) e 318 folhas da classe Doentes (folhas doentes das Faz. Laurindo, Xingu I e Xingu II). Dessa forma, foi testado o potencial de classificação do conjunto global, como apresentado na sessão do Apêndice A. O resultado apresentado no gráfico da figura A8, do Apêndice A.3.1, expressa um acerto máximo na classificação correta com as três variedades de

94%, empregando 17 componentes no modelo. Assim o conjunto foi separado em duas partes: a primeira parte montou-se o classificador com 300 folhas, sendo 150 de cada classe; e a segunda parte com 336, sendo 168 também de cada classe, desta forma foi validado o modelo.

Os acertos e os correspondentes números de componentes dos modelos montado com a primeira parte do conjunto são apresentados na figura 6.31. Já a tabela 6.18 ilustra como foi distribuição dos espectros do melhor modelo e sua a validação.

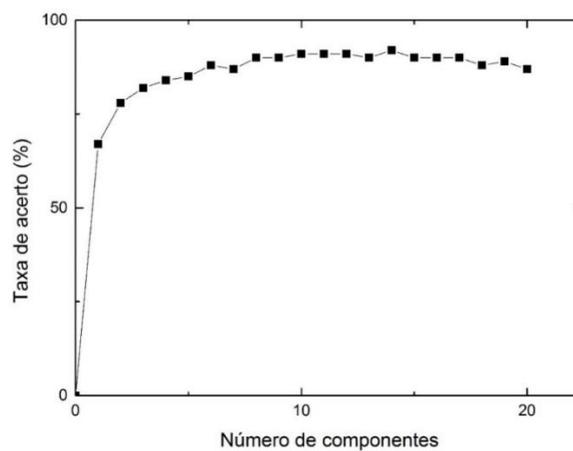


Figura 6.31 – Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os três conjuntos, para o desenvolvimento do modelo de classificador mais robusto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.18 – Nas primeiras metades das tabelas estão ilustradas as matrizes confusões das melhores classificações das validações cruzadas, utilizando as primeiras partes dos conjuntos, coletados das amostras das três fazendas. A partir das matrizes confusões é possível observar o acerto de 92%, com o classificador utilizando 14 componentes. Nas segundas metades estão ilustradas as matrizes confusões dos acertos das validações dos modelos de classificadores, nas segundas partes dos conjuntos pertencente as três fazendas.

| Classificador | | |
|----------------------------|-------------|--------------|
| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
| GSFR | 90% | 10% |
| Sadia | 6% | 94% |
| Validação | | |
| GSFR | 89% | 11% |
| Sadia | 9% | 91% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a tabela 6.18 e o gráfico da figura 6.31 é possível notar que a melhor classificação por meio de uma validação cruzada foi de 92%, com 14 componentes. Empregando este modelo para validar a segunda parte do conjunto, atingiu-se um acerto de 90%, como apresenta a matriz confusão da tabela 6.18. Baseado nestes resultados é garantido que o sistema LIFS-405, junto do modelo desenvolvido, pode ser utilizado como instrumento para diagnosticar a doença GSFR, presente nas três diferentes fazendas da região do Maranhão.

6.3.2 Diagnóstico da GSFR utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561

Com o auxílio do sistema LIFS-561 foram retirados e estudados os espectros de folhas de soja descrita na sessão 5.1.2, como realizado com o sistema LIFS-405. A figura 6.32 são apresentados os espectros médios das classes Sadias e GSFR, referente ao conjunto da fazenda Xingu II.

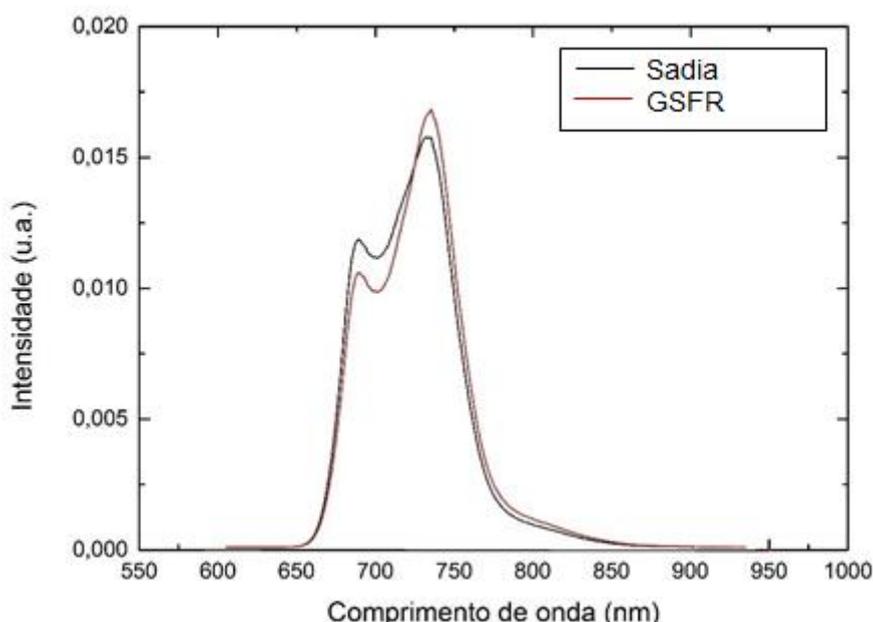


Figura 6.32 – Espectros médios coletados do sistema LIFS-561, com as amostras de soja da fazenda Xingu II. Onde o espectro vermelho representa o espectro médio das folhas com GSFR e o espectro preto é referente às folhas Sadias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudando os espectros obtidos com o sistema LIFS-561 é possível notar a presença dos dois picos característicos da clorofila, o primeiro em 685 nm e o

segundo em 735 nm, assim como discutido para as folhas de laranja. Pode-se observar que o espectro médio da classe Sadia possui o primeiro pico mais intenso que o da classe GSFR, já para o segundo pico a situação se inverte. Utilizando o reconhecimento desse tipo de padrão foi avaliado o potencial de classificação dos conjuntos coletados nas fazendas Laurindo, Xingu I e Xingu II, em classificar espectros de folhas sadias de folhas doentes, como mostrado na sessão do Apêndice A.3.2. O estudo destas classificações por meio de validações cruzadas permitiu afirmar que as amostras da fazenda Xingu II tiveram a melhor classificação, onde o acerto chegou a 99%, isso quando comparados com os acertos da fazenda Laurindo que alcançou 88% e com Xingu I que foi de 85%. Para esses acertos foram empregados 14 componentes para a melhor classificação da fazenda Laurindo, 19 para a fazenda Xingu I e 13 para a fazenda Xingu II. Desta maneira, o sistema se mostrou bastante eficiente, uma vez que foram alcançados acertos superiores a 75%, porém com os acertos inferiores ao sistema LIFS-405. Esta diferença se deve a presença de mais uma banda de fluorescência que possui os espectros do sistema LIFS-405, como mostrado na figura 6.17, que favorece na criação do modelo para realizar a classificação das folhas.

Utilizando o mesmo procedimento que foi realizado para o estudo com o sistema LIFS-405, foram separados três conjuntos com 50 folhas, sendo 25 de cada classe, para induzir três classificadores de cada região. Os resultados das validações cruzadas e os respectivos números de componentes são ilustrados na figura 6.33. Assim empregando o número de componente que obteve o maior acerto como modelos de classificador foram feitas as validações com os restantes das folhas que haviam sido separados de cada conjunto. As matrizes confusões dos melhores acertos nas validações cruzadas, dos conjuntos que serviram como classificadores podem ser vistos na tabela 6.19, onde são representados também os resultados das validações dos modelos com os respectivos subconjuntos.

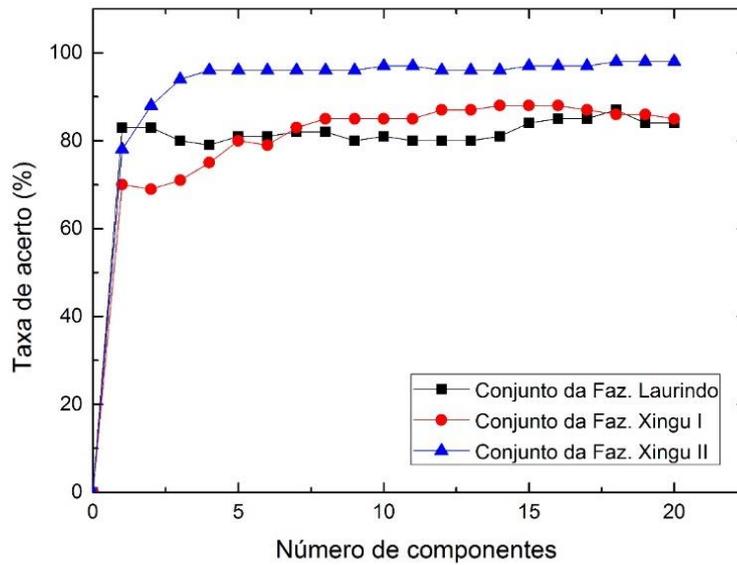


Figura 6.33 – Gráficos das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, das primeiras partes dos três conjuntos que foram utilizados para construir os classificadores. Os modelos foram criados com 16 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo, 14 componentes para o conjunto Xingu I e 18 para o conjunto Xingu II.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.19 - As partes superiores apresentam as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 16 componentes, o da fazenda Xingu I 14 componentes e o da fazenda Xingu II 18 componentes. Já nas partes inferiores estão ilustradas as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II.

a)

| Classificador | | |
|----------------------|-------------|--------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 80% | 20% |
| Sadia | 10% | 90% |
| Validação | | |
| GSFR | 91% | 9% |
| Sadia | 10% | 90% |

(continua)

(continuação)

Tabela 6.19 –As partes superiores apresentam as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 16 componentes, o da fazenda Xingu I 14 componentes e o da fazenda Xingu II 18 componentes. Já nas partes inferiores estão ilustradas as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II.

b)

| <u>Classificador</u> | | |
|-----------------------------|------------|------------|
| Classificado Classe real | GSFR | Sadia |
| GSFR | 88% | 12% |
| Sadia | 12% | 88% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 76% | 24% |
| Sadia | 7% | 93% |

c)

| <u>Classificador</u> | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| Classificado Classe real | GSFR | Sadia |
| GSFR | 98% | 2% |
| Sadia | 2% | 98% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 100% | 0% |
| Sadia | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pela análise dos gráficos da figura 6.33 é possível notar que o conjunto de folhas da fazenda Xingu II possui a melhor classificação através da validação cruzada, chegando a 98% de acerto com 18 componentes. Validando este modelo foi alcançado o acerto de 100% das folhas. Baseando neste resultado e nas classificações dos outros conjuntos é possível afirmar que o sistema LIFS-561, junto com os modelos criados, pode ser utilizado para diagnosticar as plantas de soja com suspeita de GSFR nas respectivas fazendas.

Do mesmo modo que foi realizado com o sistema LIFS-405, conduziu-se o processo de unir os três conjuntos de dados coletados com o sistema LIFS-561, com o intuito de criar um classificador mais robusto e abrangente. Desta forma foram

agrupados os espectros coletado das fazendas Laurindo, Xingu I e Xingu II, de modo que ficassem distribuídos em duas classes: Classes das Sadias (folhas sadias das três fazendas) e Classe das Doentes (folhas doentes das três fazendas), com ambas as classes contendo 318 amostras. Assim foi induzido um classificador via regressão PLSR, e avaliado o seu desempenho por meio de validação cruzada, para estudar o potencial de classificação dos conjuntos agrupados, como mostrado na figura A10 da sessão do Apêndice A.3.2.

O estudo do gráfico da figura A10 mostra o acerto superior a 75% na classificação correta, chegando a 88% empregando 18 componentes no modelo. Alcançado o potencial de classificação o conjunto global foi separado em duas partes: primeira parte construiu-se o classificador com 300 folhas, sendo 150 de cada classe; a segunda parte com 336 amostras sendo 168 de cada classe, validou-se o modelo. Os desempenhos das validações cruzadas do classificador são apresentados no gráfico da figura 6.30, onde o acerto do melhor modelo de classificação e sua validação é expresso na matriz confusão da tabela 6.18.

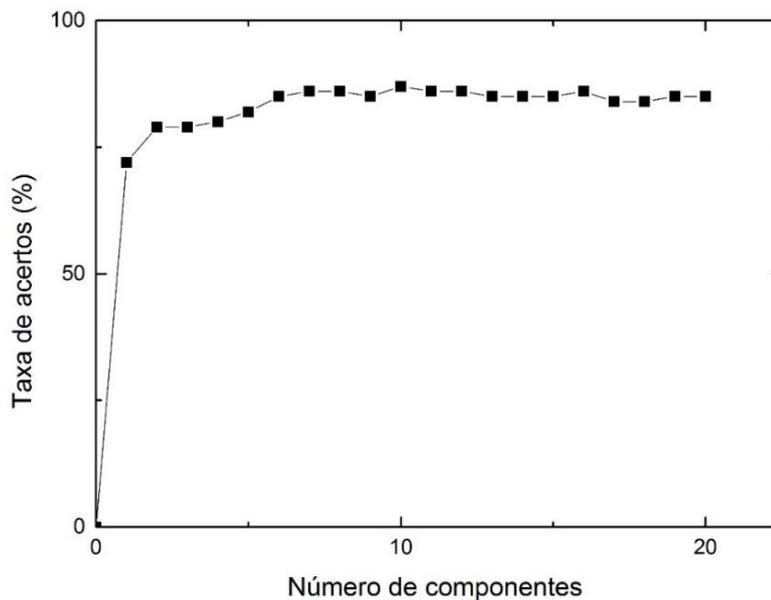


Figura 6.34 – Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os três conjuntos, para o desenvolvimento do modelo de classificador mais robusto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.20 – A parte superior da tabela apresenta a matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando as primeiras partes dos conjuntos, coletados das amostras das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 87%, com o classificador utilizando 10 componentes. Já a parte inferior da tabela mostra a matriz confusão do acerto da validação do modelo de classificador, nas segundas partes dos conjuntos pertencente as três fazendas.

| <u>Classificador</u> | | |
|-----------------------------|-------------|--------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 81% | 19% |
| Sadia | 7% | 93% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 84% | 16% |
| Sadia | 9% | 91% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando o gráfico da figura 6.34 e a matriz confusão da tabela 6.20 é possível observar que o classificador mais adequado foi quando possuía 10 componentes, uma vez que atingiu um acerto de 87% na validação cruzada. Já a validação do modelo obteve um desempenho de 88% na classificação correta. Com estes resultados é possível afirmar que o sistema LIFS-561, junto com o modelo criado com o conjunto global foi capaz de diferenciar folhas de soja sadias de doentes com GSFR, mesmo com espectros retirados das folhas de três diferentes regiões do Maranhão, tornando-se apto a ser utilizado como ferramenta de diagnóstico e auxiliar a escolha do manejo mais adequado.

6.3.3 Diagnóstico da GSFR utilizando Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 e LIFS-561

Em busca de obter o máximo de informações espectrais retirados dos sistemas de Espectroscopia de Fluorescência Induzido por Laser (LIFS-405 e LIFS-561), com a finalidade de se criar um equipamento capaz de diagnosticar a GSFR com precisão, agruparam-se os espectros obtidos de uma mesma folha que foram coletados com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561.

Como conduzido na sessão 6.1.3, no estudo do HLB, os espectros dos classificadores retirados dos dois sistemas foram unidos e construídos três classificadores, um para cada conjunto coletados das três diferentes fazendas.

Montaram-se três modelos de classificadores utilizando 50 espectros de cada conjunto, sendo 25 de cada classe (Sadia e Doente), de modo a ter informações dos dois sistemas para uma mesma folha de soja.

Os três classificadores foram criados a partir de regressão PLSR e a sua validação foi realizada por meio de uma validação cruzada. Assim os acertos das validações cruzadas com os respectivos números de componentes são apresentados na figura 6.35. Já os desempenhos das melhores validações cruzadas são mostrados nas matrizes confusões da tabela 6.19. Dessa forma, foram utilizados como classificadores os modelos com os números de componentes que obtiveram os acertos mais elevados, e com eles foram realizadas as validações com os respectivos subconjuntos de cada região, eos resultados são ilustrados nas matrizes confusões da tabela 6.19.

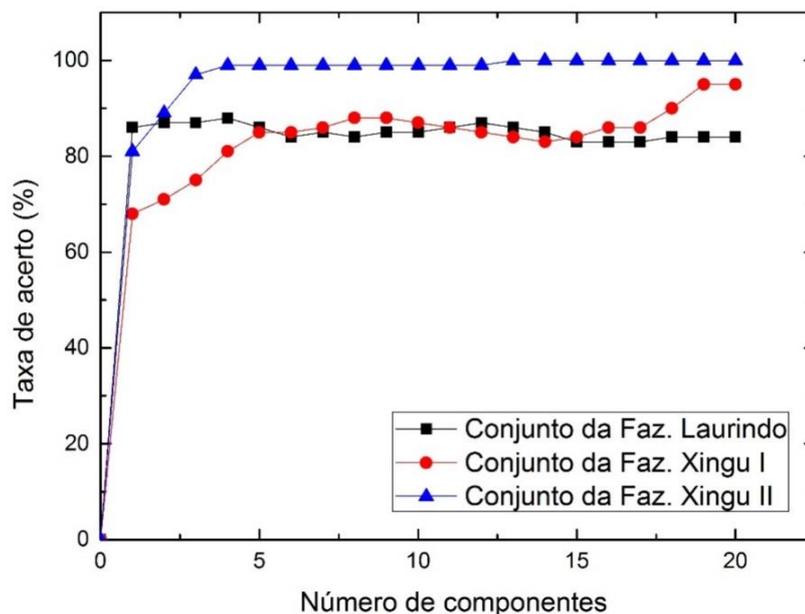


Figura 6.35 – Gráficos dos acertos das validações cruzadas com os respectivos números de componentes, construído com 50 folhas das três fazendas, com os espectros retirados dos sistemas LIFS-405 e LIFS-561. Os modelos foram criados com 4 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo, 19 componentes para o conjunto Xingu I e 13 para o conjunto Xingu II.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.21 - As partes superiores das tabelas ilustram as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 4 componentes, o da fazenda Xingu I 19 componentes e o da fazenda Xingu II 13 componentes. Já as partes inferiores apresentam as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II.

a)

| <u>Classificador</u> | | |
|----------------------|------------|------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 86% | 14% |
| Sadia | 12% | 88% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 93% | 7% |
| Sadia | 29% | 71% |

b)

| <u>Classificador</u> | | |
|----------------------|------------|------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 96% | 4% |
| Sadia | 6% | 94% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 84% | 16% |
| Sadia | 3% | 97% |

c)

| <u>Classificador</u> | | |
|----------------------|-------------|-------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 100% | 0% |
| Sadia | 0% | 100% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 98% | 2% |
| Sadia | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando os gráficos da figura 6.35, dos acertos das validações cruzadas é possível observar que o conjunto da Fazenda Xingu II continua tendo o melhor desempenho, chegando a 100%. Já para os conjuntos das fazendas Laurindo e Xingu I, o acerto chegou a 88% e 95%, respectivamente. Para estes resultados foram utilizados 4 componentes para o classificador da fazenda Laurindo, 19 para o classificador da fazenda Xingu I e 13 para Xingu II.

Comparando o desempenho dos classificadores nas validações, observa-se que o classificador da fazenda Xingu II manteve a melhor classificação, com 99% de acerto, seguido por Xingu I com 90% e por último o classificador da fazenda Laurindo com 82%. Desta maneira é possível afirmar que para as folhas de soja, o aumento de informações ao se juntar os dois espectros, não foi satisfatório a ponto de melhorar a classificação, quando comparado aos sistemas LIFS-405 e LIFS-561 separadamente. Para os espectros das folhas de soja, o aumento na informação confundiu os classificadores, uma vez que este aumento pode ter sido de informação que diminuíram os padrões referentes a cada classe, fato que não aconteceu com os espectros de folhas de laranja. Porém o acerto na classificação é bastante grande, tornando possível empregar os dois sistemas LIFS, junto com os modelos criados, para diagnosticar plantas de soja com suspeita de GSFR.

6.3.4 Diagnóstico da GSFR utilizando Imagens de Fluorescência

Empregando o sistema de Imagens de Fluorescência foram realizadas medidas nas folhas de soja provenientes das três regiões do Maranhão, como descrito na sessão 5.1.2. A figura 6.36 ilustra imagens características de uma folha sadia e a outra com GSFR.

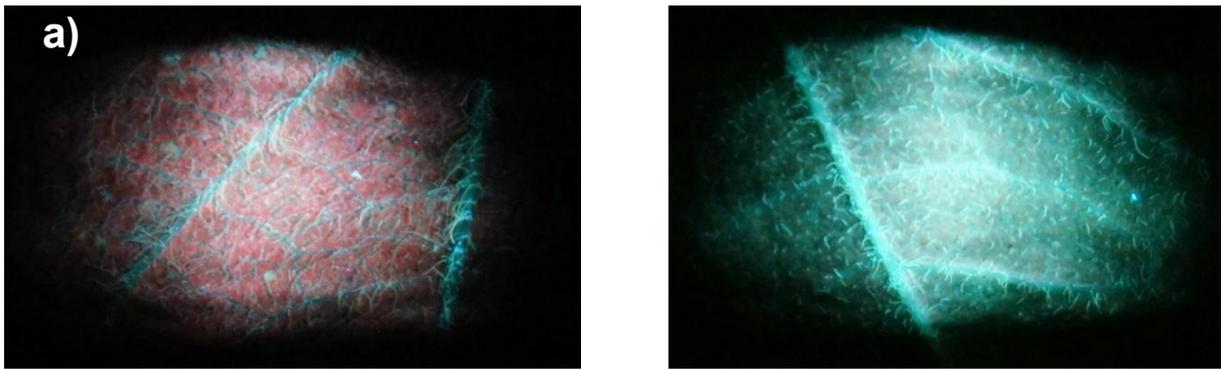


Figura 6.36 – Em a) está representada a imagens típica de uma folha doente com GSFR e em b) imagem típica de uma folha Sadia, quando iluminada por uma fonte de excitação em 377 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio de uma análise qualitativa da figura 6.36 é possível afirmar que a imagem da folha com GSFR possui uma tonalidade mais avermelhada quando comparada com à folha Sadia, este fato está ligado a fluorescência da clorofila, que é maior na folha doente, resultado que foi observado também com o sistema LIFS-405. Esta análise está de acordo com um dos sintomas da doença, que obriga a folha a permanecer na sua fase adulta impedindo que emurcheça. (10) Já a imagem da folha Sadia possui uma coloração mais azulada que a folha doente, ou seja, uma menor quantidade de clorofila, consequentemente menor fluorescência com emissão no vermelho.

A confirmação desta análise qualitativa acontece quando é estudado os histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, de todas as imagens do conjunto da fazenda Xingu II, como mostra a figura 6.37.

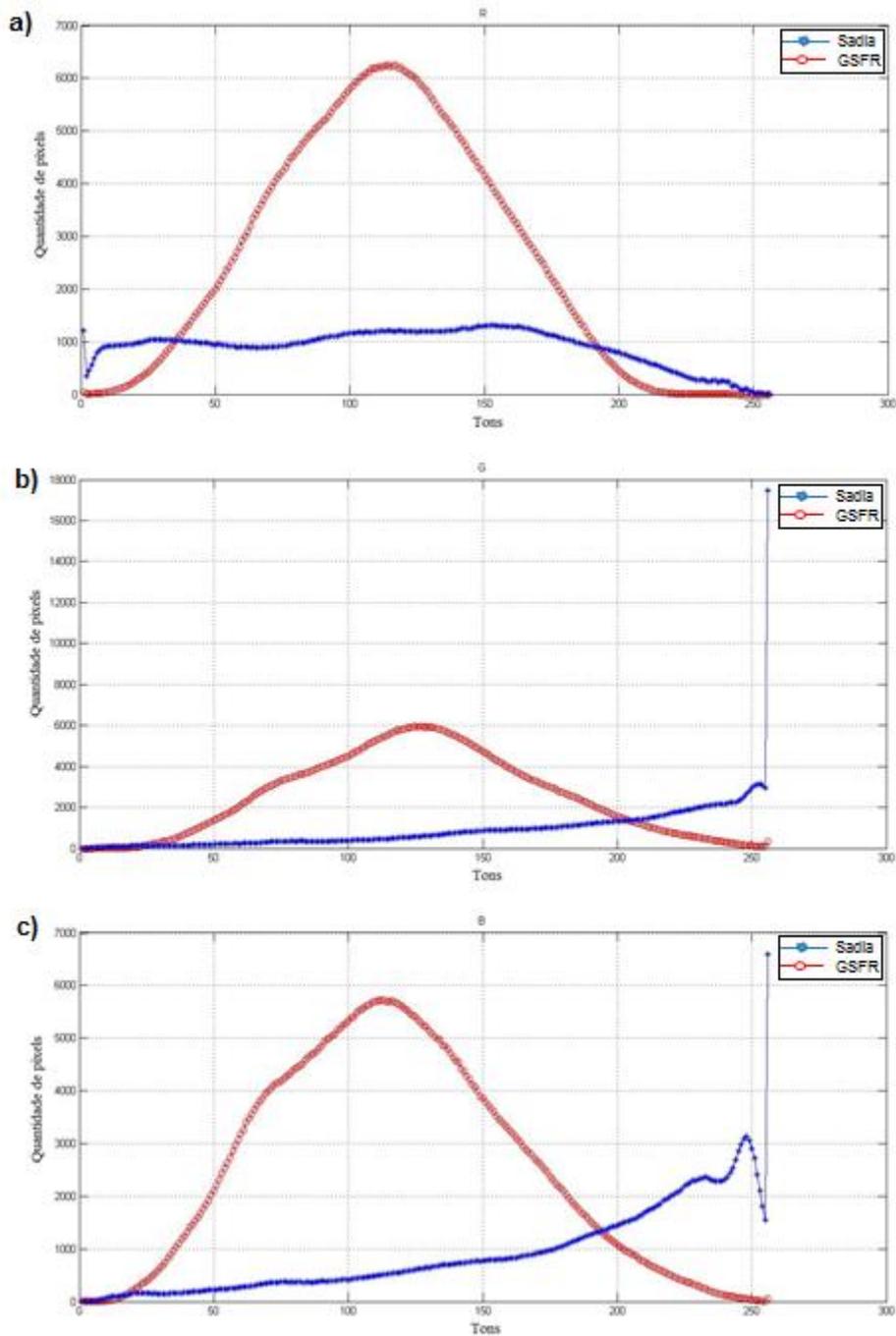


Figura 6.37 – Histogramas médios das cores vermelho, verde e azul, coletadas das imagens obtidas com o sistema de Imagens de Fluorescência. De acordo com a distribuição do histograma é possível notar a concordância com as imagens coletadas, onde o número de pixels com tons de azul é superior para as folhas sadias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando os histogramas médios das cores, pertencente as imagens das folhas de soja, confirma-se o estudo qualitativo, pois a figura 6.37-a) mostra que as folhas doentes possuem uma maior quantidade de pixels com maiores tons de

vermelho. Já a figura 6.37-b) e figura 6.37-c) mostra que as folhas saudias possuem uma maior quantidade de pixels com maiores tons de verde e azul, respectivamente.

Utilizando os histogramas de cores para retirar os atributos e criar os classificadores, como feito para as imagens de laranja foi montado o gráfico da figura A11 da sessão do Apêndice A.3.3, onde são mostrados os acertos das validações cruzadas, com os respectivos números de componentes de um modelo de regressão via PLSR. Com a análise do gráfico da figura A11 é possível notar que o conjunto da fazenda Xingu II obteve a melhor classificação, onde o acerto chega a 100%, seguido pelo conjunto Laurindo com 83% e por último o conjunto Xingu I com 76%. Para esses acertos os modelos utilizaram 5 componentes no classificador do conjunto Laurindo e Xingu I, já para o classificador do conjunto da fazenda Xingu II utilizou-se 3 componentes.

Constado o potencial de classificação, o conjunto foi separado em duas partes como feito anteriormente. Os desempenhos nas validações cruzadas com os respectivos números de componentes dos classificadores são ilustrados na figura 6.38. Já as matrizes confusões da tabela 6.22 ilustram como foram distribuídos os espectros dos modelos criados, com o número de componentes que obtiveram os maiores acertos, e as validações desses modelos com os subconjuntos correspondentes.

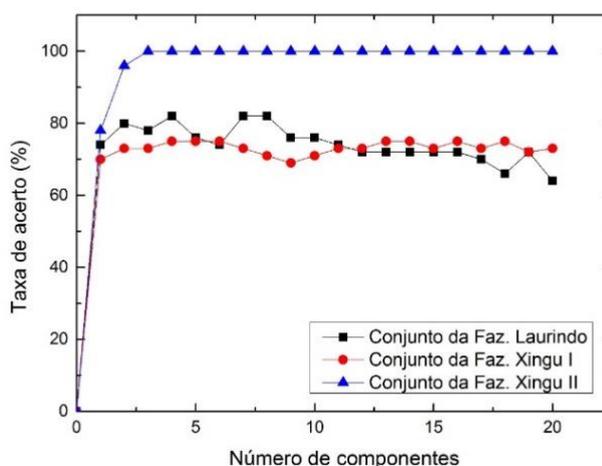


Figura 6.38 – Gráficos dos acertos das validações cruzadas com os respectivos números de componentes, construído com os conjuntos de folhas das três fazendas. Onde os atributos foram retirados dos histogramas de cores, das imagens de fluorescência. Os modelos foram criados com 4 componentes para o conjunto da fazenda Laurindo e Xingu I, e 3 componentes para o conjunto da fazenda Xingu II.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.22 - As partes superiores das tabelas ilustram as matrizes confusões das melhores validações cruzadas das primeiras partes dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. O modelo da fazenda Laurindo utilizava 4 componentes, o da fazenda Xingu I 4 componentes e o da fazenda Xingu II 3 componentes. Já as partes inferiores apresentam as matrizes confusões das validações dos classificadores das Fazendas: (a) Laurindo, (b) Xingu I e (c) Xingu II.

a)

| <u>Classificador</u> | | |
|----------------------|------------|------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 88% | 12% |
| Sadia | 24% | 76% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 82% | 18% |
| Sadia | 36% | 64% |

b)

| <u>Classificador</u> | | |
|----------------------|------------|------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 75% | 25% |
| Sadia | 25% | 75% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 73% | 27% |
| Sadia | 27% | 73% |

c)

| <u>Classificador</u> | | |
|----------------------|-------------|-------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 100% | 0% |
| Sadia | 0% | 100% |
| <u>Validação</u> | | |
| GSFR | 100% | 0% |
| Sadia | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando o gráfico da figura 6.38 e as matrizes de confusão da tabela 6.22 é possível afirmar que os acertos nas validações cruzadas dos classificadores alcançaram 100% para o subconjunto da fazenda Xingu II, 82% para subconjunto da fazenda Laurindo e 75% para subconjunto da fazenda Xingu I. Foram utilizadas 4 componentes para o modelo criado com as imagens das folhas coletadas nas fazendas Laurindo e Xingu I, e 3 para o modelo das amostras da fazenda Xingu II.

Os acertos nas validações dos modelos de classificadores utilizando as segundas partes dos conjuntos foram de 100% para Xingu II, 73% tanto para conjunto Xingu I e Laurindo. Com a análise dos resultados é possível afirmar que o sistema de imagens de fluorescência teve o desempenho na classificação da doença satisfatório, podendo ser empregado junto com os modelos criados, como classificador de folhas com GSFR e folhas sadias para cada região em específico. Porém, com o mesmo intuito dos estudos com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561, de criar um classificador mais global e que possa ser empregada nas três fazendas sem nenhuma restrição quanto a localidade de coleta, uniram-se os três conjuntos de dados. Desta forma, criou-se um conjunto global com 196 folhas, sendo 98 de cada classe, e por meio de regressão PLSR foi avaliado o desempenho através de validações cruzadas, como ilustrado na figura A12 do Apêndice A.3.3.

Com a análise do gráfico da figura A12 é possível observar que o potencial de classificação foi alcançado, chegando a um acerto de 76% na classificação correta, com 5 componentes no modelo. Por esse motivo o conjunto foi separado em duas partes: a primeira parte construiu-se o classificador com 152 imagens, sendo 76 de cada classe; e a segunda parte com 66 amostras sendo 33 de cada classe, validou-se o modelo. Os acertos das validações cruzadas do classificador construído por meio de regressão PLSR são apresentados no gráfico da figura 6.39, onde o melhor desempenho do classificador e os resultados da suas validações são mostrados na matriz confusão da tabela 6.23.

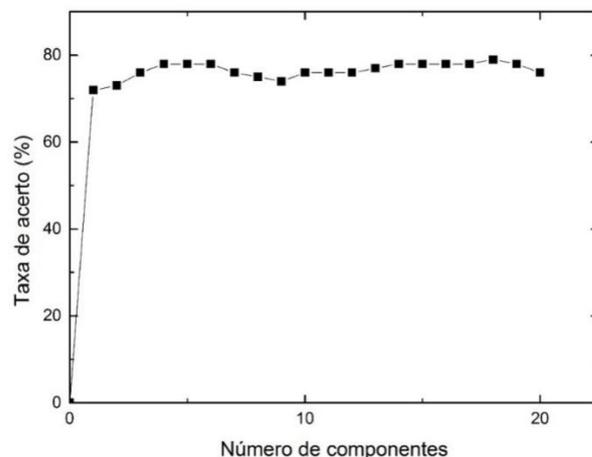


Figura 6.39 – Gráfico da taxa de acerto com relação ao respectivo número de componentes, do classificador criado com os três conjuntos juntos, num total de 152 imagens sendo 76 de cada classe. Para o modelo foram utilizados 18 componentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.23 – Na parte superior da tabela está ilustrada a matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando as primeiras partes dos conjuntos, coletados das amostras das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 79%, com o classificador utilizando 18 componentes. Já na parte inferior é mostrada a matriz confusão do acerto da validação do modelo de classificador, nas segundas partes dos conjuntos pertencente as três fazendas.

| Classificador | | |
|----------------------|-------------|--------------|
| Classificado | GSFR | Sadia |
| Classe real | | |
| GSFR | 83% | 17% |
| Sadia | 25% | 75% |
| Validação | | |
| GSFR | 88% | 12% |
| Sadia | 24% | 76% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

O estudo da figura 6.39 e a matriz confusão representada na tabela 6.23 mostra um acerto de 79% na classificação via validação cruzada, isso com o modelo de classificador utilizando 18 componentes. Empregando este modelo para classificar a segunda parte do conjunto, obteve-se o acerto de 82%, como expressa a matriz confusão da tabela 6.21. Assim é possível afirmar que foi criado um classificador, utilizando as imagens das três diferentes fazendas, mais robusto e

com a capacidade de diferenciar não apenas o conjunto de dados de uma fazenda em específico, e sim de qualquer uma das três plantações da região do Maranhão. Desta forma, com um acerto de 82%, habilita o sistema de imagens de fluorescência, junto com o classificador criado com o banco de dados das imagens das três fazendas, a serem empregados como ferramenta que auxilie o manejo da cultura de soja.

6.4 Fenotipagem de citros e soja

6.4.1 Estudos de fenotipagem com as diferentes variedades de laranjas utilizando os sistemas LIFS-405 e LIFS-561

A técnica fotônica de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS) obteve sucesso na tentativa de discriminar diferentes variedades de citros, como apresentado por Kubota. (46) Como a técnica se baseia nas diferenças espectrais da fluorescência das folhas, dos diferentes grupos de laranjas, mesmo as variedades sendo geneticamente idênticas para os marcadores genéticos, existe a possibilidade de serem diferenciadas.

Utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-405 foi criado um classificador via regressão PLSR, onde foi realizada a classificação via validação cruzada de diferentes variedades de laranja, coletada no período do inverno e verão, respectivamente. Os resultados das classificações são ilustrados nas matrizes confusões das tabelas 6.24 e tabela 6.25, onde cada conjunto apresentava 10 variedades distintas de laranja.

Tabela 6.24 – Matriz confusão com a classificação do conjunto recebido na estação do inverno utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-405.

| Classe Real \ Classificado | Classificado | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------------|--------|-------|--------|-------|---------|-----------|-------------|---------|-----------|
| | Baianinha | Doppio | Ovale | Ipigua | Mahle | Olimpia | Sanguinea | Sanguinelli | Mombuca | Del Cauca |
| Baianinha | 52.2% | 8.8% | 3.2% | 0.0% | 3.2% | 0.0% | 4.2% | 0.0% | 0.0% | 16.6% |
| Doppio | 4.3% | 26.5% | 0.0% | 3.2% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 6.6% |
| Ovale | 4.3% | 0.0% | 48.4% | 0.0% | 0.0% | 4.2% | 4.2% | 3.2% | 4.3% | 3.3% |
| Ipigua | 8.7% | 0.0% | 16.1% | 96.8% | 0.0% | 0.0% | 12.5% | 3.2% | 0.0% | 6.6% |
| Mahle | 0.0% | 17.6% | 3.2% | 0.0% | 90.3% | 0.0% | 4.2% | 16.1% | 4.3% | 0.0% |
| Olimpia | 0.0% | 17.6% | 6.5% | 0.0% | 0.0% | 65.2% | 0% | 6.4% | 4.3% | 0.0% |
| Sanguinea | 8.7% | 11.7% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 13.0% | 62.5% | 0.0% | 0.0% | 10.0% |
| Sanguinelli | 8.7% | 11.7% | 9.7% | 0.0% | 3.2% | 17.4% | 0.0% | 61.3% | 12.9% | 0.0% |
| Mombuca | 4.3% | 2.9% | 3.2% | 0.0% | 3.2% | 0.0% | 4.2% | 6.4% | 70.0% | 0.0% |
| DelCauca | 8.7% | 2.9% | 9.7% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 8.4% | 3.2% | 4.3% | 56.6% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.25 – Matriz confusão com a classificação do conjunto recebido na estação do verão utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-405.

| Classificado Classe Real | Classificado | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|----------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--|
| | Lima IAC9 | Pera Abril | Pera Bianchi | Pera Roberto Gullo | Piralima IAC11 | Piralima IAC2 | Seleta do Rio | Valencia B | Valencia Puka | Westin | |
| Lima IAC9 | 39.3% | 10.0% | 3.2% | 3.3% | 5.1% | 0.0% | 0.0% | 13.8% | 0.0% | 0.0% | |
| Pera Abril | 21.4% | 63.3% | 0.0% | 0.0% | 5.1% | 0.0% | 3.0% | 10.3% | 0.0% | 0.0% | |
| Pera Bianchi | 0.0% | 0.0% | 71.0% | 23.3% | 5.1% | 6.7% | 6.0% | 0.0% | 23.3% | 0.0% | |
| Gullo | 3.6% | 0.0% | 3.2% | 50% | 0.0% | 6.7% | 0.0% | 6.9% | 10.0% | 0.0% | |
| Piralima IAC11 | 17.8% | 6.7% | 0.0% | 0.0% | 69.2% | 23.3% | 3.0% | 13.8% | 6.7% | 0.0% | |
| Piralima IAC2 | 3.6% | 0.0% | 6.5% | 0.0% | 5.1% | 43.3% | 0% | 10.3% | 6.7% | 0.0% | |
| Seleta do Rio | 0.0% | 3.3% | 0.0% | 0.0% | 5.1% | 3.3% | 88% | 0.0% | 3.3% | 0.0% | |
| Valencia B | 14.2% | 13.3% | 3.2% | 0.0% | 2.6% | 6.7% | 0.0% | 27.6% | 6.7% | 9.7% | |
| Valencia Puka | 0.0% | 0.0% | 9.7% | 13.3% | 2.6% | 6.7% | 0.0% | 6.9% | 30.0% | 0.0% | |
| Westin | 0.0% | 3.3% | 3.2% | 10% | 0.0% | 3.3% | 0.0% | 10.3% | 13.3% | 90.3% | |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através das análises das matrizes confusões das tabelas 6.24 e tabela 6.25 é possível afirmar que as diferentes variedades de laranja possuem padrões nos espectros que os caracterizam, uma vez que as diagonais principais das matrizes apresentam os valores com as maiores porcentagens, representando assim o bom desempenho nas classificações corretas dos modelos. Os acertos nas classificações foram 63% para o conjunto coletado no inverno e 57% para o conjunto coletado no verão. Este resultado pode ser considerado bastante expressivo, uma vez foram utilizados um grande número de variedades e as folhas serem visualmente idênticas.

Utilizando a técnica para separar as três variedades de Laranjas Peras (Pera Ipigua, Pera Mahle e Pera Olímpia) consideradas idênticas pelos marcadores genéticos, foi construída a matriz confusão da tabela 6.26, com a classificação de uma validação cruzada via regressão PLSR e o gráfico da Análise de Componentes Principais (PCA) da figura 6.40.

Tabela 6.26 – Matriz confusão referente a classificação do conjunto das laranjas Peras, onde foram utilizados os espectros coletados com o sistema LIFS-405.

| Classificado Classe real | Classificado | | |
|-----------------------------|--------------|------------|--------------|
| | Pera Ipigua | Pera Mahle | Pera Olímpia |
| Pera Ipigua | 94% | 0% | 6% |
| Pera Mahle | 0% | 91% | 9% |
| Pera Olímpia | 0% | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

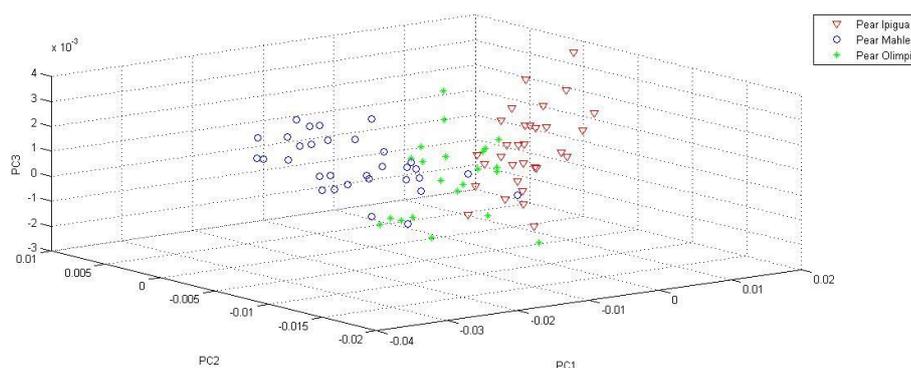


Figura 6.40 – Gráfico da Análise de Componentes Principais do conjunto das Laranjas Peras dos espectros medidos com o sistema LIFS-405. Da análise da PCA é possível observar a formação de grupos entre as variedades de laranja Peras, representando características similares de cada cultivar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através do estudo da tabela 6.26 é possível notar o acerto de 95% na classificação correta das diferentes variedades de Laranjas Peras. Já a figura 6.40 com a análise de PCA apresenta a formação de três grupos, onde cada grupo é formado pelo agrupamento de uma dada variedade, mostrando assim que existe semelhança nos espectros de cada grupo de cultivares.

Empregando o sistema LIFS-561 foram medidas as folhas coletadas no período de inverno, e induzido um classificador via regressão PLSR. A tabela 6.27 mostra o desempenho da classificação das 10 variedades de laranja. As folhas coletadas no período do verão não foram medidas com o sistema LIFS-561, pois o equipamento estava desativado.

Tabela 6.27 – Matriz confusão com a classificação do conjunto recebido na estação do inverno utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-405.

| Classificado \ Classe Real | Classificado | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------|--------|-------|--------|-------|---------|-----------|-------------|---------|-----------|
| | Baianinha | Doppio | Ovale | Ipigua | Mahle | Olimpia | Sanguinea | Sanguinelli | Mombuca | Del Cauca |
| Baianinha | 47.8% | 0.0% | 3.2% | 3.2% | 0.0% | 0.0% | 4.2% | 8.7% | 16.1% | 16.7% |
| Doppio | 13.0% | 47.0% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 26.0% | 16.7% | 0.0% | 9.7% | 0.0% |
| Ovale | 8.7% | 8.8% | 61.3% | 6.4% | 0.0% | 4.3% | 12.5% | 0.0% | 9.7% | 3.3% |
| Ipigua | 8.7% | 0.0% | 16.3% | 71.0% | 0.0% | 0.0% | 25.0% | 0.0% | 0.0% | 13.3% |
| Mahle | 0.0% | 11.7% | 3.2% | 0.0% | 94.0% | 4.3% | 0.0% | 4.3% | 29.0% | 3.3% |
| Olimpia | 0.0% | 17.7% | 0.0% | 6.4% | 3.2% | 39.2% | 0.0% | 4.3% | 0.0% | 0.0% |
| Sanguinea | 0.0% | 0.0% | 3.2% | 9.7% | 0.0% | 8.7% | 25.0% | 0.0% | 3.2% | 0.0% |
| Sanguinelli | 4.3% | 5.9% | 9.7% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 8.3% | 61.0% | 6.4% | 3.3% |
| Mombuca | 4.3% | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 3.2% | 17.4% | 4.2% | 14.4% | 25.4% | 16.6% |
| Del Cauca | 13.0% | 8.8% | 3.2% | 3.2% | 0.0% | 0.0% | 4.2% | 4.3% | 0.0% | 43.4% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a matriz confusão da tabela 6.27 é possível notar que os maiores valores de porcentagens estão na diagonal principal, como observado para o sistema LIFS-405. A classificação correta para as 10 variedades de laranja coletadas na estação do inverno foi de 52%. Como explicado anteriormente, um acerto bastante considerável uma vez que está sendo analisado um conjunto com muitas variedades, e por meio de um estudo visual seria impossível separá-las.

Separando as três variedades de Laranjas Peras, como feito com o sistema LIFS-405, montou-se a matriz confusão da tabela 6.28 com a classificação realizada por meio de uma regressão PLSR, também foi feito um estudo com Análise de Componentes Principais (PCA) ilustrado na figura 6.41.

Tabela 6.28 – Matriz confusão referente a classificação do conjunto das laranjas Peras, onde foram utilizados os espectros coletados com o sistema LIFS-561.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|--------------|------------|--------------|
| | Pera Ipigua | Pera Mahle | Pera Olímpia |
| Pera Ipigua | 94% | 0% | 6% |
| Pera Mahle | 0% | 90% | 10% |
| Pera Olímpia | 9% | 4% | 87% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

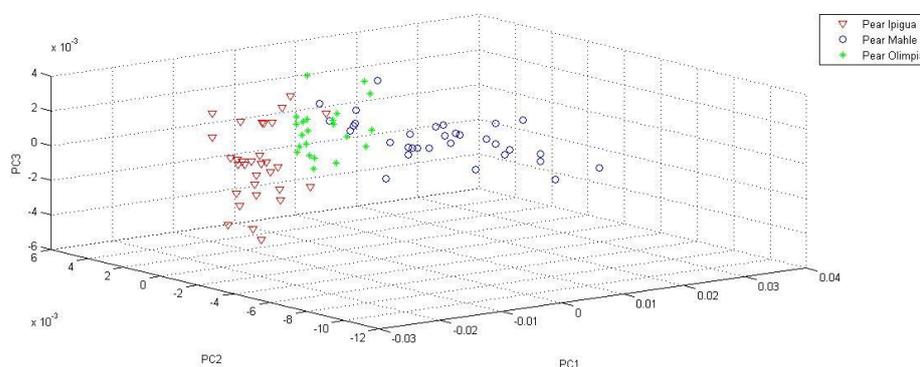


Figura 6.41 – Gráfico da Análise de Componentes Principais do conjunto das Laranjas Peras dos espectros medidos com o sistema LIFS-561. Da análise da PCA é possível observar a formação de grupos entre as variedades de laranja Peras, representando características similares de cada cultivar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelo estudo da matriz confusão da tabela 6.28 é possível afirmar que a maioria das folhas, pertencente as três variedades de Laranjas Peras foram

classificadas corretamente. Onde o acerto máximo é de 90%, de acordo com a diagonal principal da matriz confusão. Já a análise da figura 6.41 com o estudo das PCAs, nota-se a formações de grupos, como observado para os espectros colhidos do sistema LIFS-405. Desta forma, confirma que os espectros retirados do sistema LIFS-561, de cada classe de Laranja Pera possuem características que as identificam.

Os resultados com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561 mostraram que é possível utilizar Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Lazer, junto com os classificadores desenvolvidos por meio de regressão PLSR, para separar variedades de laranjas distintas, mesmo sendo geneticamente idênticas para os marcadores genéticos e cultivadas nas mesmas condições ambientais.

6.4.2 Fenotipagem de soja – Utilização do sistema LIFS-405 para diferenciar cultivares de soja

Utilizando os cultivares de soja TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR, produzidas nas fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, respectivamente, foi estudado o potencial do sistema LIFS-405, junto com os modelos de regressão PLSR, em classificar as diferentes variedades. Os acertos das validações cruzadas e os respectivos números de componentes são apresentados no gráfico da figura A13, da sessão do Apêndice A.4.1, onde é possível observar um acerto na distinção das variedades de 96%, utilizando 13 componentes no modelo. Este procedimento foi o mesmo empregado por Kubota (46), porém em um estudo com diferentes variedades de laranja.

Alcançado o acerto superior a 75%, como realizado nos estudos de doenças de soja e laranja, o conjunto foi separado em duas partes, onde cada parte continha a mesma quantidade de espectros dos três cultivares. Desta forma, com a primeira parte contendo 150 folhas, sendo 50 folhas de cada variedade, induziu-se o modelo de classificador. Já a segunda parte do conjunto contendo 165 folhas, sendo 55 de cada variedade, validou-se o modelo.

O modelo foi induzido através da regressão PLSR, e os acertos das validações cruzadas com os respectivos números de componentes são ilustrados no

gráfico da figura 6.42. Já as matrizes confusões da tabela 6.29 ilustra como foram as distribuições dos espectros para o modelo e da sua validação.

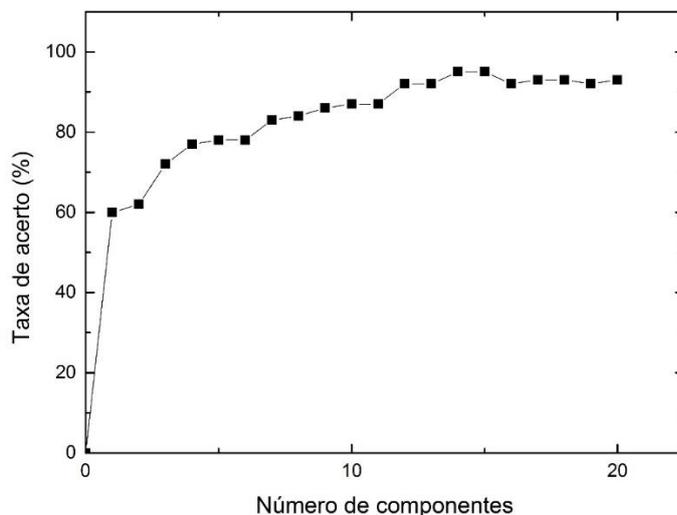


Figura 6.42 – Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com parte dos conjuntos dos cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. O classificador foi criado com 150 folhas, sendo 50 de cada variedade. Já a validação foi realizada em outro conjunto de 150 folhas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.29 – Na parte superior da tabela está ilustrada a matriz confusão com o desempenho do classificador criado com a primeira parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Para o classificador foi utilizado 14 componentes, onde obteve o acerto máximo na validação cruzada de 95%. Já a segunda parte da tabela está ilustrada a matriz confusão do desempenho do classificador ao ser validado com a segunda parte do conjunto.

| Classificador | | | |
|----------------------------|------------------|----------------|----------------|
| Classificado \ Classe real | TMG1188RR | TMG4182 | M9144RR |
| TMG1188RR | 98% | 2% | 0% |
| TMG4182 | 4% | 88% | 8% |
| M9144RR | 0% | 2% | 98% |
| Validação | | | |
| TMG1188RR | 91% | 7% | 2% |
| TMG4182 | 2% | 89% | 9% |
| M9144RR | 0% | 2% | 98% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise da figura 6.42 e da matriz confusão da tabela 6.29 revela que o melhor desempenho do classificador é com 14 componentes, onde atingi um acerto de 95% na classificação correta. Já a validação deste modelo, no subconjunto,

alcança um acerto de 93%. Este resultado mostra que o sistema LIFS-405, junto com o modelo criado, pode ser usado para classificar um conjunto desconhecido de folhas de soja, que contenha os três cultivares em estudo. Sendo assim, a técnica pode ser utilizada como ferramenta de discriminação das diferentes variedades, e auxiliar na certificação de mudas de soja.

6.4.3 Fenotipagem de soja – Utilização do sistema LIFS-561 para diferenciar cultivares de soja

Utilizando as mesmas folhas empregadas no estudo conduzido com o sistema LIFS-405, e descritas na sessão 5.1.3, foram feitas medidas com o sistema LIFS-561. O protocolo de medida foi o mesmo e o estudo do potencial de classificação foi idêntico ao sistema anterior. Utilizando os espectros de todo o conjunto, com os três cultivares, montou-se o gráfico da figura A14 da sessão do Apêndice A.4.1, com os acertos das validações cruzadas e os respectivos números de componentes dos modelos de regressão PLSR.

A análise do gráfico da figura A14 permite constatar que com 6 componentes, acontece o maior acerto que é de 85%. Constatado o potencial de separação dos espectros coletados de todo o conjunto, o mesmo foi separando em duas partes como feito anteriormente. Desta forma, foi induzido um classificador com uma das partes, via regressão PLSR, onde os resultados das classificações das validações cruzadas são ilustrados na figura 6.43. Já a distribuição da melhor classificação e a validação do modelo com a segunda parte do conjunto é apresentado na matriz confusão da tabela 6.30.

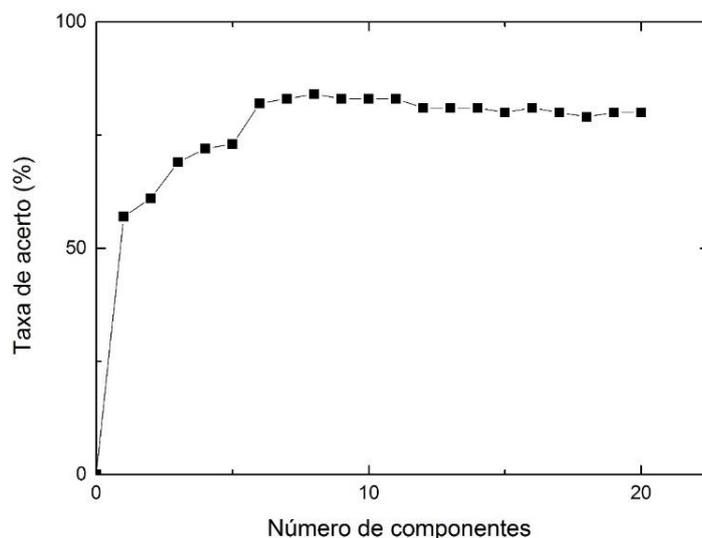


Figura 6.43 – Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com parte dos conjuntos dos cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. O classificador foi criado com 150 folhas, sendo 50 de cada variedade, onde os espectros foram retirados com o sistema LIFS-561. Já a validação foi realizada em outro conjunto de 150 folhas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.30 – Na parte superior da tabela é mostrada a matriz confusão do desempenho do classificador criado com a primeira parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Para o classificador foi utilizado 8 componentes, onde obteve o acerto máximo na validação cruzada de 83%. Já na parte inferior é apresentada a matriz confusão do desempenho do classificador ao ser validado com a segunda parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Foi obtido um acerto de 89% na validação do modelo, destacando o acerto de 96% do cultivar produzido na fazenda Xingu II.

| Classificador | | | |
|-----------------------------|-----------|---------|---------|
| Classificado Classe real | TMG1188RR | TMG4182 | M9144RR |
| | TMG1188RR | 78% | 12% |
| TMG4182 | 12% | 82% | 6% |
| M9144RR | 6% | 4% | 90% |
| Validação | | | |
| TMG1188RR | 75% | 15% | 10% |
| TMG4182 | 11% | 71% | 18% |
| M9144RR | 4% | 0% | 96% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a análise do gráfico da figura 6.43 é possível dizer que o maior acerto foi de 83%, com 8 componentes. Já pela matriz confusão da tabela 6.30 é permitido afirmar que ainda temos uma pequena confusão entre os espectros das variedades TMG1188RR e TMG4182. Assim, utilizando o modelo otimizado foi obtido um acerto 89% em sua validação na segunda metade do conjunto, porém nesta classificação a confusão ocorreu entre as folhas da variedade TMG1188RR com as folhas da variedade M9144RR, como é apresentado na parte inferior da tabela 6.28.

O resultado foi inferior ao sistema LIFS-405, porém bastante elevado, uma vez que visualmente seria impossível distinguir as três variedades de soja. Assim é possível afirmar que com o modelo criado, com os espectros retirados do sistema LIFS-561, pode ser empregado na classificação de folhas destes três cultivares de soja, tornando a técnica apta a auxiliar os estudos de fenotipagens.

6.4.4 Fenotipagem de soja – Utilização do sistema de Imagens de Fluorescência para diferenciar cultivares de soja

Na busca de estudar a capacidade de discriminação dos três cultivares de soja, descrita na sessão 5.1.3, com o sistema de Imagens de Fluorescência foram realizadas as aquisições das imagens das folhas com as diferentes variedades. Como conduzido nos estudos de imagens anteriores, com plantas de soja e laranja sob estresses biótico e abiótico, foi conduzido as análises com os três cultivares de soja. Utilizando os histogramas de cores para retirar os descritores foi construído o classificador através de regressão PLSR, onde o intuito era conhecer o potencial de classificação do conjunto. Como ilustrado na sessão do Apêndice A.4.3, pela figura A15, a melhor classificação através de validações cruzadas foi de 84%, onde ocorreu com o modelo contendo 11 componentes. Desta forma, o modelo teve um acerto superior a 75%, consequentemente sendo considerado com o potencial de classificação correta entre as variedades TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR.

Sendo constatado o potencial de classificação do conjunto, realizou-se o mesmo procedimento feito nos estudos anteriores, onde o conjunto foi separado em duas partes: a primeira parte do conjunto foi usada para construir o classificador e a segunda parte para validar o modelo. Assim foi elaborado o gráfico da figura 6.44, com os acertos das validações cruzadas por números de componentes. Já a

distribuição da melhor classificação e a validação do modelo está representada na matriz confusão da tabela 6.31.

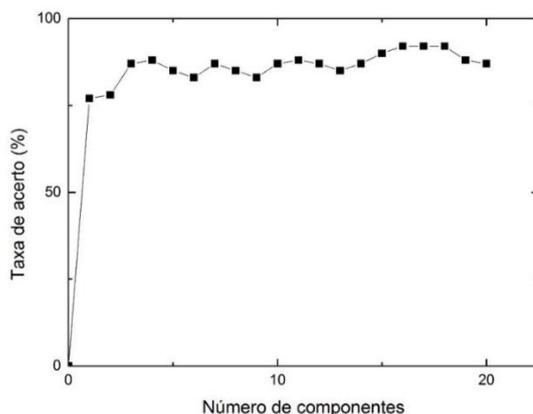


Figura 6.44 – Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com parte dos conjuntos dos cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR. O classificador foi criado com imagens de 60 folhas, sendo 20 de cada variedade. Já a validação foi realizada em outro conjunto de 42 imagens de folhas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6.31 – Na parte superior da tabela está sendo apresentada a matriz confusão do desempenho do classificador criado com a primeira parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Para o classificador foi utilizado 16 componentes, onde obteve o acerto máximo na validação cruzada de 92%. Já na parte inferior ilustra-se a matriz confusão do desempenho do classificador ao ser validado com a segunda parte do conjunto, formado pelos cultivares das três diferentes fazendas. Foi obtido um acerto de 84% na validação do modelo, destacando o acerto de 100% do cultivar produzido na fazenda Xingu II.

| Classificador | | | |
|-----------------------------|-----------|---------|---------|
| Classificado Classe real | TMG1188RR | TMG4182 | M9144RR |
| | TMG1188RR | 95% | 5% |
| TMG4182 | 20% | 80% | 0% |
| M9144RR | 0% | 0% | 100% |
| Validação | | | |
| TMG1188RR | 73% | 27% | 0% |
| TMG4182 | 20% | 80% | 0% |
| M9144RR | 0% | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelo gráfico da figura 6.44 constata-se o acerto máximo de 92%, com 16 componentes, mantendo o elevado acerto nas folhas da variedade M9144RR, como ressalta a matriz confusão da tabela 6.31. Utilizando 16 componentes no modelo de

regressão PLS, para a validação utilizando a segunda parte do conjunto foi possível obter o acerto de 84%, como mostra a tabela 6.31.

O resultado da validação do nosso modelo mostra que o sistema de Imagem de Fluorescência obteve um acerto bastante elevado para diferenciar os três cultivares de soja, sendo considerado apto para ser empregado como uma ferramenta de distinção das variedades TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR.

7 CONCLUSÃO

Os estudos com as folhas de laranja, proveniente da fazenda Entre Rios, com o intuito de avaliar o potencial das técnicas fotônicas em diagnosticar plantas com HLB obtiveram bons resultados, quando comparado com as inspeções visuais e a análise de PCR. Por meio dos resultados obtidos com a utilização dos sistemas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS), ficou evidente a capacidade de empregar a técnica como ferramenta de discriminação de folha doente com HLB de folhas saudáveis. Uma vez que os sistemas LIFS-405 e LIFS-561, junto com os classificadores desenvolvidos por meio de regressão PLSR alcançaram os acertos no diagnóstico de 83% e 87%, respectivamente. Porém, a tentativa de aumentar as informações espectrais de uma mesma folha, juntando os espectros dos dois sistemas, não obteve um aumento significativo no acerto. Desta forma, o desenvolvimento de um equipamento que empregue os dois sistemas LIFS simultaneamente, não seria tão vantajoso quando comparado com um equipamento composto por apenas um sistema LIFS, isso levando em consideração desempenho e custo.

Os sistemas de Imagens de Fluorescência e Imagens de Refletância com Luz Polarizada também obtiveram desempenho satisfatório no diagnóstico do HLB, sendo alcançados 87% e 80%, respectivamente. O desempenho desta técnica está intimamente ligado com as alterações na concentração da clorofila e amido, presente nas folhas das plantas contaminadas, o que acarreta mudanças na intensidade de fluorescência e refletância, conseqüentemente nos histogramas de cores das imagens. Desta forma, os reconhecimentos nos padrões dos histogramas de cores das imagens de folhas doentes e saudáveis são favorecidos, permitindo a indução de classificadores via Regressão PLSR, com a capacidade de diagnosticar a doença. Porém o emprego do sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada deve ser feito com cautela, uma vez que o acúmulo de amido nas folhas dos citros podem ocorrer por outros motivos, não apenas por HLB.

A segunda parte dos estudos ocorreu com as folhas de soja cultivadas na casa de vegetação do LANAPRE e folhas provenientes de fazendas do estado do Maranhão. Os resultados obtidos com as folhas da casa de vegetação revelaram que os sistemas LIFS-405 e Imagens de Fluorescência foram capazes de diferenciar plantas de soja em condições de deficiência hídrica, deficiência de nitrogênio de

plantas de referência, com o acerto máximo de 80% na classificação correta para ambos os sistemas. Os acertos do sistema LIFS-561 não foram satisfatórios, uma vez que os conjuntos não alcançaram o potencial de classificação. Este fato está ligado a grande similaridade dos espectros das três classes, quando excitados com o laser de comprimento de onda de 561 nm, acarretando confusão no processo de identificação. Enquanto que para excitações com lasers de comprimento de onda de 405 e 377 nm é conseguido um número maior de informações relevantes, pois com estas excitações é possível a emissão de uma banda larga na região do visível e início do infravermelho. Esta característica favorece formações de padrões entre as classes, sendo assim reconhecidos pelos modelos de regressão PLSR. Desta forma, dispositivos criados com o intuito de identificar plantas de soja em condições de estresse hídrico e deficiência de nitrogênio, baseados em Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser e Imagens de Fluorescência serão mais eficientes se possuírem fontes de excitações com comprimento de onda de 405 e 377 nm.

O emprego das técnicas LIFS e Imagens de Fluorescência na tentativa de diagnosticar o GSFR obtiveram os acertos superiores a 94%, em todos os conjuntos, chegando a 100% de acerto na classificação correta para os sistemas LIFS-561 e Imagens de Fluorescência com o conjunto da Fazenda Xingu II. O desempenho das técnicas LIFS e Imagens de Fluorescência foram favorecidos pela existência de padrões característicos nos espectros e imagens entre as duas classes, onde de acordo com o sintoma típico da doença de não permitir que a planta contaminada complete seu ciclo natural de vida, conseqüentemente permanecendo sempre no estágio adulto, proporciona as folhas doentes uma maior concentração de clorofila quando comparadas com as folhas saudáveis. Assim por meio das diferenças nas intensidades espectrais e contagens dos histogramas, entre as classes doente e saudável, os diagnósticos foram possíveis e satisfatórios. Outro resultado importante no diagnóstico do GSFR ocorreu com a validação do classificador criado com os espectros retirados do sistema LIFS-405, onde foram agrupados os conjuntos das três fazendas, desta forma alcançou-se o acerto na classificação correta de 90% das folhas, revelando que os padrões característicos da doença superam os padrões referentes aos diferentes cultivares de soja.

A utilização da câmera termográfica da FLIR, na tentativa de diferenciar plantas em condição de estresse hídrico de plantas de referência, por meio da diferença de temperatura obteve resultados satisfatórios. O experimento constatou que

a classe das plantas em condição de deficiência hídrica, possui a média das temperaturas superior à média das temperaturas das plantas em condições ótimas de desenvolvimento. Uma vez que foi verificada uma diferença de 5,55 °C entre as médias das temperaturas dessas duas classes. Também ficou constatado que as melhores condições para realizarem as medidas de temperatura são quando o ambiente se encontra com a temperatura mais alta e a umidade relativa do ar mais baixa. No entanto o uso da câmera FLIR não se mostrou eficiente para diferenciar as temperaturas médias das plantas com menor quantidade de nitrogênio, das plantas de referência. Uma tentativa de solucionar este problema seria a utilização de outra câmera, que possui uma faixa espectral maior e com precisão mais apurada.

Os estudos de fenotipagem com as folhas de sojas das fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, cujos conjuntos continham três diferentes cultivares (TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR), alcançaram bons resultados nos processos de separar e classificar as variedades, uma vez que eram idênticas visualmente. Os resultados nas validações dos classificadores alcançaram os acertos de 93% e 89%, para os sistemas LIFS-405 e LIFS-561, respectivamente. Já o emprego desta técnica para diferenciar 20 diferentes variedades de laranjas atingiu o acerto de 63%. Este resultado é bastante relevante por se tratar de um número grande de variedades que foram cultivadas em estufa, ou seja, todas nas mesmas condições ambientais sem haver favorecimento de uma variedade em específico.

Com base nos estudos apresentados neste trabalho ficou evidente a capacidade das técnicas fotônicas em diferenciar alterações o perfil químico de plantas sob condições de estresse, de plantas em condições ótimas de desenvolvimento. As técnicas também se mostraram capazes de diferenciar diferentes cultivares de soja e laranja, mesmo que estas variedades sejam idênticas para a técnica de marcadores genéticos, a mais sensível utilizada atualmente. É importante ressaltar que mesmo as plantas sendo cultivadas condições em diferentes, seja em campo ou estufa, as classificações tiveram desempenhos satisfatórios. Fazendo uma análise comparativa entre as técnicas podemos afirmar que os equipamentos baseados em espectroscopia de fluorescência obtiveram índices de acertos mais elevados, quando comparados com os equipamentos baseados em técnicas de imagens. Porém, as medidas com os equipamentos de imagens são mais rápidas, podendo cobrir um número maior de plantas. Sendo assim, as técnicas de espectroscopia de fluorescência e imagens poderão

futuramente ser empregadas em sistemas portáteis, de modo a auxiliar os produtores no controle de doenças e fenotipagens, acarretando o aumento na qualidade e quantidade da produção. A utilização combinada de ambos os sistemas seria a escolha mais acertada para um manejo adequado. Pois com o equipamento de imagens poderia realizar medidas em larga escala para confecção de mapas, e o sistema de espectroscopia de fluorescência fazer diagnósticos mais precisos em regiões que o mapa obtido por imagens teria considerado como áreas de risco.

REFERÊNCIAS

- 1 PORTAL DO AGRONEGÓCIO. *Estudo sistemático da importância do setor do agronegócio brasileiro*. 2004. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/pagina/o-que-e>>. Acesso em: 17 out 2014.
- 2 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio. *Balança comercial do agronegócio: agosto / 2016*. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/08/exportacoes-do-agronegocio-somam-uss-52-bilhoes-no-acumulado-do-ano>>. Acesso em 9ago 2016.
- 3 EMBRAPA. *Soja em números (safra 2015/2016)*. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 17 out. 2016.
- 4 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). *Mercado Interno*. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno>>. Acesso em: 17 out. 2016.
- 5 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Produção total de citros em 2009*. 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 15 fev. 2016.
- 6 FUNDECITRUS. *Safra de laranja de ser de 278,9 milhões de caixa*. 2015. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-da-laranja-deve-ser-de-2789-milhoes-de-caixas/316>>. Acesso em: 17 out 2016.
- 7 CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. 2005. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/43.pdf>. Acesso em: 17 out. 2016.
- 8 BUENO, C, R, N, C. *Infecção por Sporisorium scitamineum em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método diagnose precoce*. 2010. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- 9 PORTAL EMBRAPA. *Soja Louca II é reconhecida como doença da soja pelo MAPA*. 2015. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/5213621/soja-louca-ii-e-reconhecida-como-nova-doenca-da-soja-pelo-mapa>>. Acesso em: 06 ago. 2016.

10 PORTAL EMBRAPA. *Soja Louca II: um problema de causa desconhecida*. 2010. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/Folder_Soja_LoucaII.pdf>. Acesso em: 17 out. 2016.

11 BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006.

12 CANAL RURAL. *Greening na agricultura atinge 17,9% das plantas*. 2015. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/citrus/greening-citricultura-atinge-179-das-plantas-58341>>. Acesso em 17 out. 2016.

13 SPANN, T. M. et al. IFAS guidance for Huanglongbing (Greening) management. *Citrus Industry*, v. 91, n. 4, p. 6-13, 2010.

14 GOTTWALD, T. R.; GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. *Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact*. 2007. Disponível em:<<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/12085/1/IND44030779.pdf>>. Acesso em: 09 jul. 2016.

15 GARNIER, M. et al. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. proposal of “*Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 6, p. 2119–2125, 2000.

16 BELASQUE JUNIOR, J. et al. Scientific basis for the eradication of symptomatic and asymptomatic plants in Huanglongbing (HLB, Greening) aimed at effective disease control. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 3, p. 137–145, 2009.

17 LOPES, S. A. et al. Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. *Plant Disease*, v. 93, n. 3, p. 257–262, 2009.

18 HALL, D. G. et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 146, n. 2, p. 207–223, 2013.

19 COMITÊ BRASILEIRO DE AÇÕES A RESISTÊNCIA A INSETICIDAS. *Manejo da Resistência de Psilídeo dos Citros a Inseticidas*. 2013. Disponível em:<<http://www.irac-online.org/documents/resistencia-de-psilideo-dos-citros/>>. Acesso em 04 ago. 2016.

20 BRLANSKY, R. H.; ROGERS, M. E. *Citrus huanglongbing: understanding the vector-pathogen interaction for disease management*. 2007. doi: 10.1094/APSnetFeature-2007-1207.

21 EPAMIG-UBERABA. *Ocorrência de Aphelenchoides sp. em plantas de soja com sintomas se Soja Louca II*. 2015. Disponível em: <<http://nematologia.com.br/wp-content/uploads/2015/07/lucipost15.pdf>>. Acesso em 09 nov. 2016.

- 22 SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica – ciências agrárias e biológicas*, v. 1, n. 1, p. 9–19, 2007.
- 23 ROHÁČEK, K.; SOUKUPOVÁ, J.; BARTÁK, M. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In: SCHOEFS, B. (Ed.). *Plant cell compartments - selected topics*. Kerala, India: research signpost, 2008. cap. 3. p. 41–104.
- 24 BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research*, v. 92, n. 2, p. 261–271, 2007.
- 25 ACHOR, D. S. et al. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal*, v. 9, n. 2, p. 56–64, 2010.
- 26 POURREZA, A. et al. Citrus Huanglongbing detection using narrow-band imaging and polarized illumination. *Transactions of the ASABE*, v. 57, n. 1, 259–272, 2014.
- 27 RIBEIRO, A. B. et al. Chemical characterization of citrus sinensis grafted on c. limonia and the effect of some isolated compounds on the growth of xylella fastidiosa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 17, p. 7815–7822, 2008.
- 28 HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, v. 37, p. 285–306, 1999. doi: 10.1146/annurev.phyto.37.1.285.
- 29 AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Effects of Fosetyl-Al and Phosphorous acid on Scorparone, a Phytoalexin associated with resistance of Citrus to *Phytophthora Citrophthora*. *Phytopathology*, v. 79, n. 7, p. 736–739, 1989.
- 30 ELECTROMAGNETIC spectrum. 2012. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electromagnetic_spectrum-es.svg>. Acesso em 09 nov. 2016.
- 31 LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- 32 FOOD-INFO. *Chlorophyll*. 1999. Disponível em: <<http://www.food-info.net/uk/colour/chlorophyll.htm>>. Acesso em 09 nov. 2016.
- 33 SANKARAN, S. et al. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computer and Electronics in Agriculture*, v. 72, n. 1, p. 1–13, 2010.
- 34 PONZONI, F. J.; SHIMABUKURO, Y. E. *Sensoriamento remoto no estudo da vegetação*. São José dos Campos: Parêntese, 2007.

35 MENESES, P. R.; ALMEIDA, T. *Introdução ao processamento de imagens de sensoriamento remoto*. Brasília: EMBRAPA, 2012.

36 STEFFEN, C. A. *Introdução ao sensoriamento remoto*. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais (INPE), 2016.

37 SCURI, A. E. *Fundamentos da imagem digital*. Rio de Janeiro: Tecgraf/PUC-Rio, 2002.

38 LICHTENTHALER, H. K.; SCHWEIGER, J. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 152, n. 2-3, p. 272–282, 1998.

39 PEREIRA, F. M. V. et al. Fluorescence images combined to statistic test for fingerprinting of citrus plants after bacterial infection. *Analytical Methods*, v. 3, n. 3, p. 552, 2011.

40 EISBERG, R; RESNICK, R. *Física quântica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1994.

41 TIPLER, P. A.; LLEWELLYN, R. A. *Física moderna*. 3. ed. Rio de Janeiro : Livros Técnicos e Científicos, 2001.

42 DARTH KULE. *Black body*. 2012. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Corpo_negro.svg>. Acesso em 09 nov. 2016.

43 RANULFI, A. C. et al. Laser-Induced fluorescence spectroscopy applied to early diagnosis of citrus Huanglongbing. *Biosystems Engineering*, v.144, p. 133-144, 2016.

44 NOGUEIRA, A. P. O. et al. Novas características para diferenciação de cultivares pela análise de discriminantes. *Ciência Rural*, v.38, n.9, p 2427-2433, 2008.

45 SAGAWA, C. H. D.; CRISTOFANI-YALY, M. Banco ativo de germoplasma de citros: passado e futuro preservados. 2014. Disponível em: <https://ccsm.br/wp-content/uploads/2017/04/INFORMATIVO_CCSCM_02_2014.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2016.

46 KUBOTA, T. M. K. et al. Laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) for discrimination of genetically close sweet orange accessions (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Applied Spectroscopy*, v. 1, p. 1-12, 2016.

47 HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. 2001. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/459673/1/circTec35.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2015.

48 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Debora Marcondes Bastos Pereira Milori et al. *Method, apparatus and system for diagnosis*

of stresses and diseases in higher plants. US 2012/0123681 A1, 14 Oct. 2009, 17 May 2012.

49 ALMEIDA, C. A. B. et al. Influência da densidade na estimativa da umidade volumétrica em um latossolo vermelho-amarelo. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 5, p. 1056-1068, 2012.

50 CARDINALI, M. C. B. Diagnóstico de Huanglongbing (HLB) em citros utilizando técnicas fotônicas. 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

51 FRANK, E. et al. Using model trees for classification. *Machine learning*, v. 32, n. 1, p. 63–76, 1998.

52 RANULFI, A. C. *Utilização de técnicas espectroscópicas no estudo e caracterização de doenças em citros: HLB (greening) e cancro cítrico*. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

53 LICHTENTHALER, H. K. et al. Plant stress detection by reflectance and fluorescence. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 851, p. 271–285, 1998.

54 PEDRÓS, R. et al. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 7, n. 4, p. 498–502, 2008.

55 BUSCHMANN, C.; LICHTENTHALER, H. K. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 152, n. 2-3, p. 297–314, 1998.

56 TEIXEIRA, D. C. et al. Distribution and quantification of Candidatus Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 22, n. 3, p. 139–150, 2008.

57 AGATI, G. Response of the in vivo chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength. *Pure and Applied Optics: journal of the European optical society part a*, v. 7, n. 4, p. 797–807, 1998.

58 GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Digital image processing. 3rd ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2008.

59 PEREIRA, F. M. V. et al. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 79, n. 12, p. 90–93, 2011.

60 PEREIRA, F. M. V. et al. Fluorescence images combined to statistic test for fingerprinting of citrus plants after bacterial infection. *Analytical Methods*, v. 3, n. 3, p. 552–556, 2011.

61 KIM, J. S. et al. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*, v. 99, n. 1, p. 50-57, 2009.

62 SARAIVA, G. F. R.; ANDRADE, R. S.; SOUSA, M. G.; Termografia por infravermelho como ferramenta de diagnóstico precoce de estresse hídrico severo em soja. *AGRARIAN ACADEMY*, v.1, n. 2; p. 158, 2014.

APÊNDICE A – Potencial de classificação

O procedimento inicial da construção de um classificador é conhecer o potencial de classificação do modelo criado com os atributos retirados dos espectros ou imagens, ou seja, observar se o acerto máximo na classificação do modelo obtido via regressão PLSR através de uma validação cruzada, com 10 *folders*, será superior a 75%. Para estas análises foram utilizados os espectros coletados dos sistemas LIFS e os histogramas das imagens adquiridos dos sistemas de imagens. Dessa forma, foram montados os gráficos com os acertos e os respectivos números de componentes utilizados pelos modelos de classificadores. Com bases nos gráficos foram construídas as matrizes confusões que ilustram os acertos máximos nas classificações das validações cruzadas dos conjuntos, onde as linhas das matrizes representam as classes reais das folhas e as colunas como estas folhas foram classificadas pelos classificadores. Com isso as diagonais principais representam os acertos dos modelos.

As classificações foram divididas de acordo com os conjuntos coletados, como mostrado na sessão 5 dos Materiais e Métodos e testados na sessão 6 dos Resultados, ou seja, foram distribuídos em conjuntos de folhas de laranja, Soja cultivada em estufa, Soja cultivada no campo e Fenotipagens.

A.1 Conjunto de folhas de laranja para o estudo do HLB

As folhas de laranja utilizadas nestes estudos vieram da fazenda Entre Rios, como descrito na sessão 5.1.1, onde foram utilizadas 150 amostras distribuídas igualmente entre as classes: Sadias, HLB-Assintomática e HLB-Sintomática. O intuito foi observar se as técnicas fotônicas junto com os classificadores eram capazes de separar corretamente as folhas doentes das sadias, de modo a alcançar o potencial de classificação.

A.1.1 Verificação do potencial de classificação de folhas de laranja com HLB utilizando os sistemas de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405 e LIFS-561

Com os espectros retirados de uma mesma folha utilizando os dois sistemas de LIFS foram realizadas as classificações, através de validações cruzadas. Os desempenhos dos modelos com relação ao acerto de classificação e o número de componentes podem ser visto no gráfico figura A1. Já a melhor classificação esta ilustrada na matriz confusão da tabela T1.

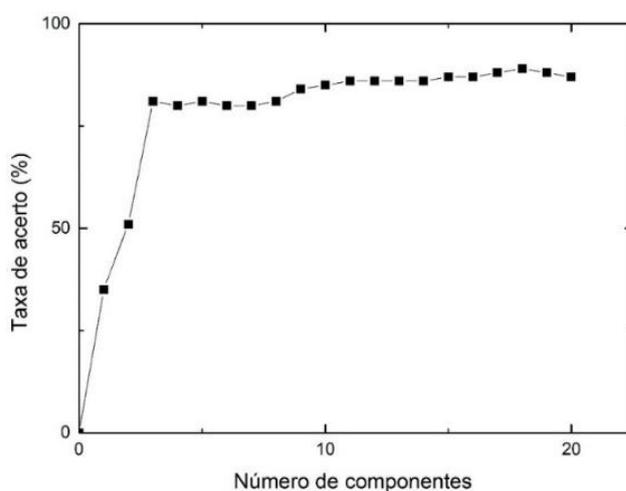


Figura A1 – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar o potencial de separação entre as classes, dos espectros de fluorescência foliar do conjunto de calibração. Os espectros foram retirados dos sistemas LIFS-405 e LIFS-561 onde foram juntados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T.1 – Matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas das regiões abaxiais, com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561. O melhor desempenho foi de 89%, com 18 componentes. Com o resultado superior a 75% o conjunto foi considerado como possuindo o potencial de classificação.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|--------------|-------------------|-----------------|
| | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 86% | 12% | 2% |
| HLB Assintomática | 18% | 82% | 0% |
| HLB Sintomática | 0% | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a matriz confusão é possível observar um acerto de 89% na classificação correta entre folhas saudias e doentes com HLB, habilitando o conjunto a ser considerado como tendo potencial de classificação pelos classificadores.

A.1.2 Verificação do potencial de classificação de folhas de laranja com HLB utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência

Utilizando as informações retiradas dos histogramas de cores das imagens coletadas com o sistema de Imagens de Fluorescência foram realizadas classificações via validações cruzadas. A figura A2 mostra os acertos das classificações e os respectivos números de componentes empregados no modelo. A melhor classificação pode ser vista na matriz confusão da tabela T2.

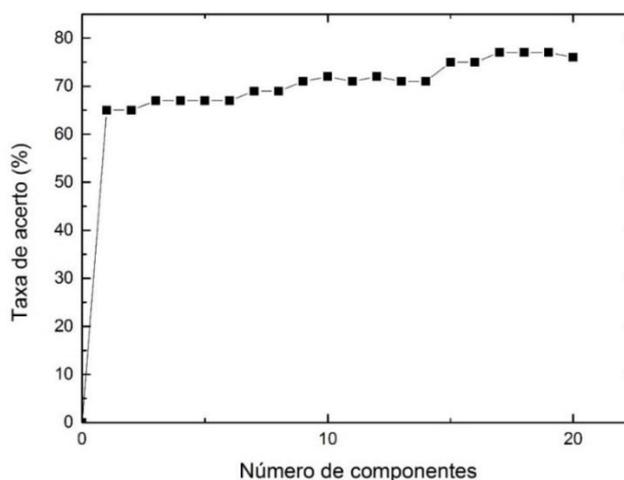


Figura A2 – Gráfico das variações dos acertos de classificações com relações aos números de componentes para testar o potencial de separação entre as classes, das imagens coletadas com o sistema de Imagens de Fluorescência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T2 – Matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Fluorescência. O melhor desempenho foi de 89%, com 17 componentes. Com o resultado superior a 75% o conjunto foi considerado como possuindo o potencial de classificação.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|--------------|-------------------|-----------------|
| | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 76% | 20% | 4% |
| HLB Assintomática | 4% | 76% | 20% |
| HLB Sintomática | 4% | 16% | 80% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio da análise da matriz confusão é possível ver o acerto máximo de 90% na classificação correta, mostrando que o conjunto tem potencial de classificação.

A.1.3 Verificação do potencial de classificação de folhas de laranja com HLB utilizando o sistema Imagens de Refletância com Luz Polarizada

Empregando as imagens retiradas com o Sistema de Imagens com Luz Polarizada na criação de modelos foram feitas as classificações via validações cruzadas, o resultado dos acertos e os respectivos números de componentes são mostrados na figura A3. O melhor desempenho é ilustrado na matriz confusão da tabela T3.

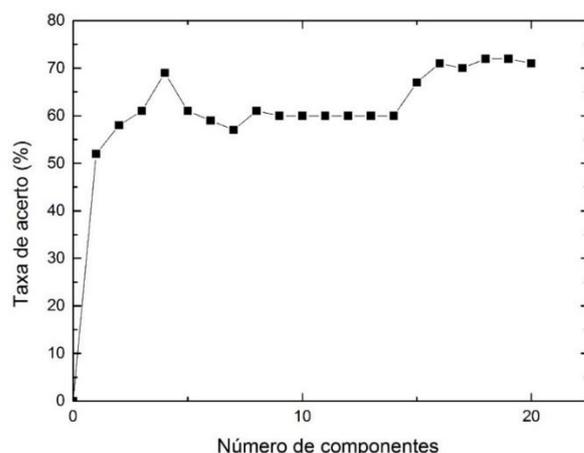


Figura A3 – Gráfico das taxas de acertos pelos números de componentes utilizando todo o conjunto de imagens de refletância com luz polarizada para testar o potencial de classificação da técnica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T3 – Matriz confusão da melhor classificação obtida das medidas realizadas com o sistema de Imagens de Refletância com Luz Polarizada. O melhor desempenho foi de 87%, com 18 componentes. Com o resultado superior a 75% o conjunto foi considerado como possuindo o potencial de classificação.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|--------------|-------------------|-----------------|
| | Sadia | HLB Assintomática | HLB Sintomática |
| Sadia | 88% | 10% | 2% |
| HLB Assintomática | 16% | 58% | 26% |
| HLB Sintomática | 6% | 24% | 70% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a matriz confusão é possível ver que a melhor classificação foi de 89%, caracterizando o conjunto como tendo o potencial de classificação.

A.2 Conjunto de folhas de soja para o estudo de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio

Para o estudo de classificação de folhas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio foram utilizadas as plantas da casa de vegetação da fazenda do LANAPRE, como descrito na sessão 5.1.4, dos Materiais e Métodos. Assim foram analisados três conjuntos de folhas coletadas em datas diferentes, os quais continham 135 amostras distribuídas em três classes: Referência, Deficiência Hídrica Deficiência de Nitrogênio. As folhas foram submetidas as medidas com os sistemas LIFS-405, LIFS-561 e Imagens de Fluorescência, para testar o potencial de classificação dos classificadores criados com os espectros e as imagens, por meio de regressão PLSR, via validação cruzada.

A.2.1 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405

Utilizando os espectros retirados com o sistema LIFS-405 foram realizadas as classificações das folhas do conjunto. A figura A4 ilustra os acertos das classificações e os respectivos números de componentes. Já a matriz confusão da tabela T4 expressa como foi a melhor classificação.

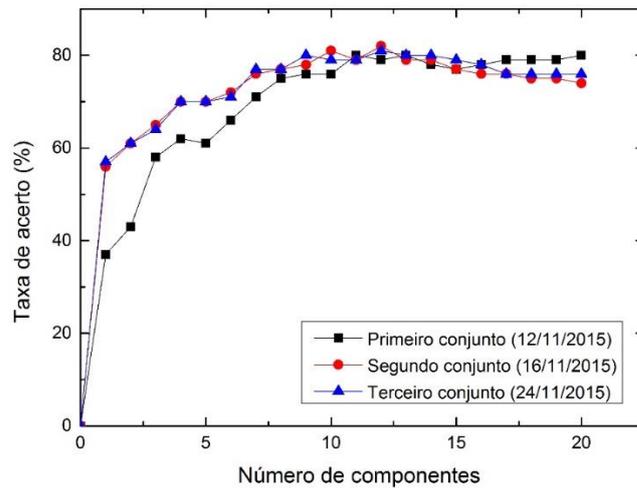


Figura A4 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, dos três conjuntos de folhas. Os espectros foram coletados do sistema LIFS-405 com o intuito de averiguar o potencial de separação entre as classes.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T4 – Os melhores acertos das validações cruzadas com os conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. As medidas foram realizadas com o sistema LIFS-405 nas regiões abaxiais.

a)

| Classificado \ Classe real | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrico |
|----------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Referência | 68% | 25% | 7% |
| Def. Nitrogênio | 29% | 71% | 0% |
| Def. Hídrico | 6% | 7% | 87% |

b)

| Classificado \ Classe real | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrico |
|----------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Referência | 73% | 20% | 7% |
| Def. Nitrogênio | 30% | 70% | 0% |
| Def. Hídrico | 0% | 10% | 90% |

(continua)

(continuação)

Tabela T4 – Os melhores acertos das validações cruzadas com os conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. As medidas foram realizadas com o sistema LIFS-405 nas regiões abaxiais.

c)

| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrico |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classe real | | | |
| Referência | 73% | 7% | 20% |
| Def. Nitrogênio | 3% | 90% | 7% |
| Def. Hídrico | 13% | 7% | 80% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando as matrizes confusões da tabela T4 é possível ver que o conjunto obteve o acerto máximo superiores a 75%, sendo assim considerado como tendo o potencial de classificação.

A.2.2 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561

Empregando os espectros retirados com o sistema LIFS-561 foram obtidos vários classificadores, onde os desempenhos das classificações podem ser vistos na figura A5. As melhores classificações são ilustradas nas matrizes confusões das tabelas T5.

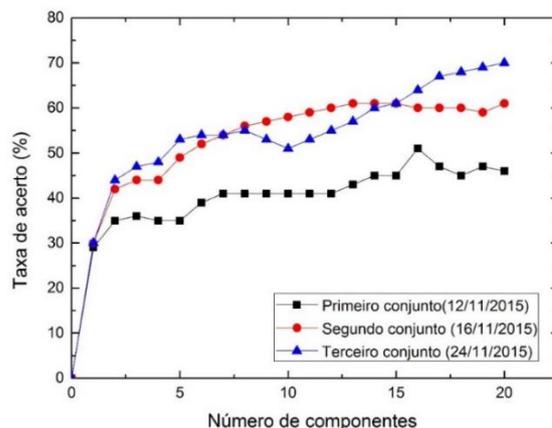


Figura A5 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, dos três conjuntos de folhas. Os espectros foram coletados do sistema LIFS-561 com o intuito de averiguar o potencial de separação entre as classes, que nestes casos não foram atingidos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T5 – Os melhores acertos das validações cruzadas com os conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015; b) Conjunto coletado em 16/11/2015; c) Conjunto coletado em 24/11/2015. As medidas foram realizadas com o sistema LIFS-561 nas regiões abaxiais.

a)

| Classificado \ Classe real | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
|----------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Referência | 44% | 27% | 29% |
| Def. Nitrogênio | 27% | 46% | 27% |
| Def. Hídrica | 18% | 20% | 62% |

b)

| Classificado \ Classe real | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
|----------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Referência | 71% | 9% | 20% |
| Def. Nitrogênio | 31% | 49% | 20% |
| Def. Hídrica | 16% | 20% | 64% |

c)

| Classificado \ Classe real | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
|----------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Referência | 69% | 11% | 20% |
| Def. Nitrogênio | 7% | 82% | 11% |
| Def. Hídrica | 16% | 20% | 64% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudando as matrizes confusões das tabelas T5 é possível ver que os acertos das melhores classificações não alcançaram 75% na classificação correta entre as folhas. Desta forma, o conjunto não foi considerado como possuindo o potencial de classificação por esta técnica.

A.2.3 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja em condições de deficiência hídrica e deficiência de nitrogênio utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência

Agora utilizando os histogramas de cores retirados das imagens coletadas do sistema de Imagens de Fluorescência foram realizadas as classificações das folhas de soja, os resultados das distribuições são ilustrados na figura A6, onde são mostrados os acertos e os respectivos números de componentes.

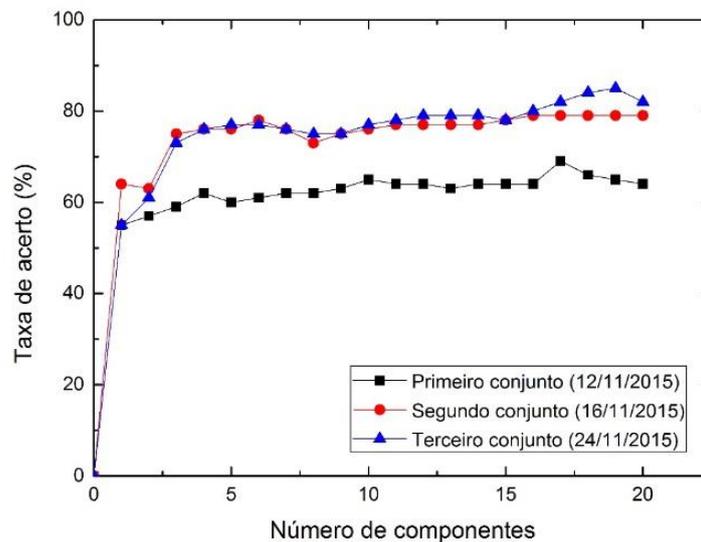


Figura A6 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões adaxiais, dos três conjuntos de folhas. Os espectros foram coletados do sistema de Imagens de Fluorescência com o intuito de averiguar o potencial de separação entre as classes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T6– Os melhores acertos das validações cruzadas com os conjuntos: a) Conjunto coletado em 12/11/2015, b) Conjunto coletado em 16/11/2015,c) Conjunto coletado em 24/11/2015. As medidas foram realizadas com o sistema de Imagem de Fluorescência das regiões adaxiais das folhas.

a)

| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classe real | | | |
| Referência | 49% | 22% | 29% |
| Def. Nitrogênio | 11% | 80% | 9% |
| Def. Hídrica | 13% | 11% | 76% |

b)

| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classe real | | | |
| Referência | 56% | 15% | 29% |
| Def. Nitrogênio | 0% | 91% | 9% |
| Def. Hídrica | 9% | 2% | 89% |

c)

| Classificado | Referência | Def. Nitrogênio | Def. Hídrica |
|------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Classe real | | | |
| Referência | 76% | 0% | 24% |
| Def. Nitrogênio | 2% | 94 | 4% |
| Def. Hídrica | 13% | 0% | 87% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio do estudo das matrizes confusões é possível ver que o conjunto obteve o potencial de classificação alcançado.

A.3 Conjunto de folhas de soja para o estudo do GSFR

Utilizando os conjuntos de folhas de soja proveniente das fazendas Laurindo, Xingu I e Xingu II, foi estudado o potencial de classificação para as técnicas LIFS e Imagens de Fluorescência. Para as análises foram empregadas 315 folhas distribuídas nas classes Sadias e com GSFR, como descrito na sessão 5.1.3 dos Materiais e Métodos.

A.3.1 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja com GSFR utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405

Com os espectros retirados com o sistema LIFS-405 foram realizadas as classificações, por meio de validações cruzadas, dos três conjuntos separadamente. Os acertos das validações cruzadas e os respectivos números de componentes dos modelos são apresentados na figura A7. As tabelas T7 ilustram as matrizes confusões das melhores classificações.

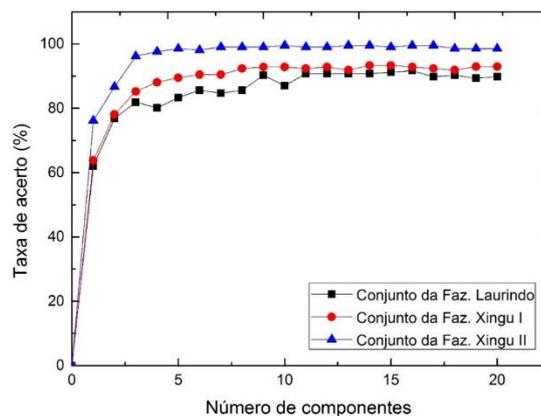


Figura A7 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, com o sistema LIFS-405, dos três conjuntos de folhas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes, onde neste caso todos os conjuntos tiveram o acerto máximo superior a 75%.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T7 – Matrizes confusões representando os melhores desempenhos das validações cruzadas dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. Onde é possível observar que todos os conjuntos alcançaram o potencial de classificação.

a)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|-------------------------------|------|-------|
| | GSFR | 93% |
| Sadia | 9% | 91% |

b)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|-------------------------------|------|-------|
| | GSFR | 91% |
| Sadia | 5% | 95% |

(continua)

(continuação)

Tabela T7 – Matrizes confusões representando os melhores desempenhos das validações cruzadas dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. Onde é possível observar que todos os conjuntos alcançaram o potencial de classificação.

c)

| Classificado Classe real | GSFR | Sadia |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| | GSFR | 99% |
| Sadia | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

O estudo das matrizes confusões das tabelas T7 mostra que os três conjuntos possuem o potencial de classificação, pois todos os acertos foram superiores a 75%.

Desta forma, foi estudado o potencial de classificação para uma análise com os três conjuntos agrupados. Os resultados dos acertos das validações cruzadas e os respectivos números de componentes são ilustrado na figura A8. Já a melhor classificação pode ser vista na tabela T8.

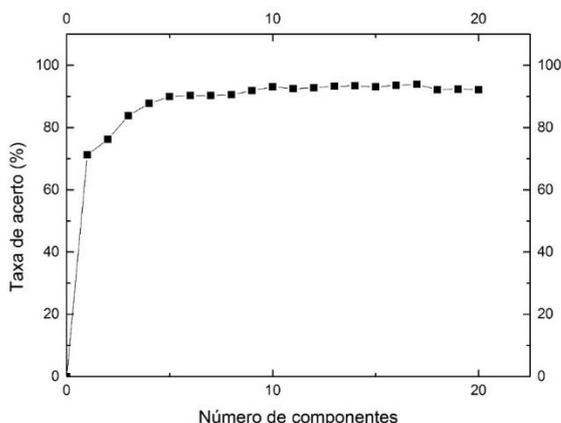


Figura A8 – Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os três conjuntos agrupados. O intuito era estudar o potencial de classificação, para construir um classificador universal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T8 – Matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando os espectros das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 94%, onde foi alcançado o potencial de classificação do conjunto.

| Classificado Classe real | GSFR | Sadia |
|-----------------------------|-------------|------------|
| | GSFR | 93% |
| Sadia | 5% | 95% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise da matriz confusão da tabela T8 mostra que mesmo para os conjuntos analisados simultaneamente, o potencial de classificação foi alcançado, mostrando que as classes sadia e doente possuem características espectrais que as diferenciam.

A.3.2 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja com GSFR utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561

Utilizando o mesmo procedimento com o Sistema LIFS-561, com o intuito de estudar o potencial de classificação, foram construídos os gráficos das figuras A9 e figura A10. Onde foram estudados os conjuntos separadamente e todos os conjuntos de uma só vez. As tabelas T9 e Tabela T10 mostram como foram as melhores classificações dos modelos criado via regressão PLSR.

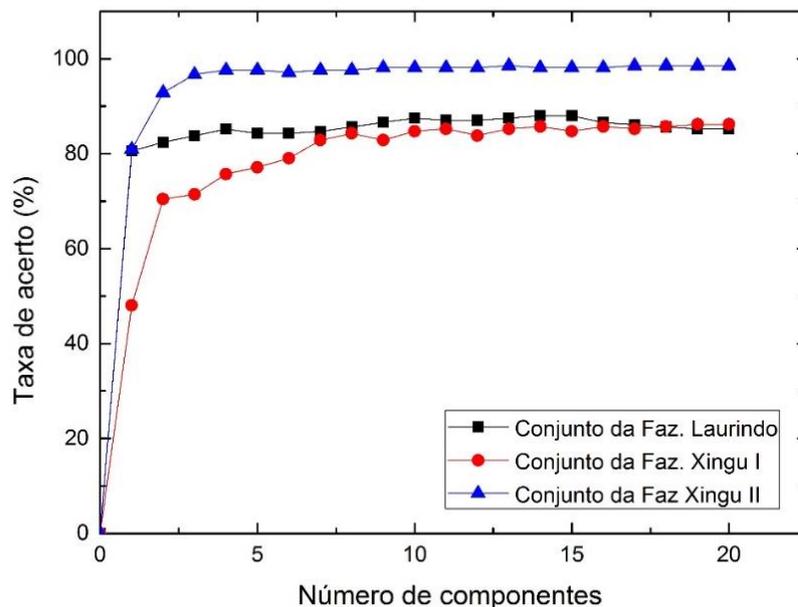


Figura A9 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões abaxiais, com o sistema LIFS-561, dos três conjuntos de folhas coletados nas diferentes fazendas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

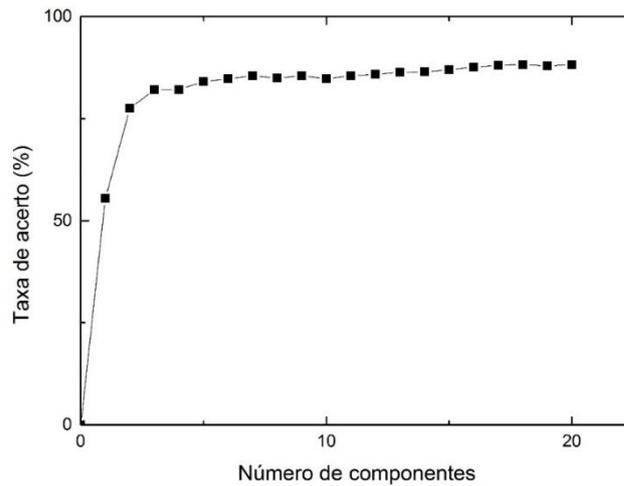


Figura A10 – Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os conjuntos das três fazendas simultaneamente. O objetivo era estudar o potencial de classificação, para obter um classificador universal.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T9 – Matrizes confusões dos melhores desempenhos das validações cruzadas dos conjuntos das Fazendas: a) Laurindo, b) Xingu I e c) Xingu II. Onde é possível observar que todos os conjuntos alcançaram o potencial de classificação.

a)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|----------------------------|------|-------|
| GSFR | 83% | 17% |
| Sadia | 7% | 93% |

b)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|----------------------------|------|-------|
| GSFR | 77% | 23% |
| Sadia | 6% | 94% |

c)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|----------------------------|------|-------|
| GSFR | 97% | 3% |
| Sadia | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T10 – Matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando os espectros das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 88%, onde foi alcançado o potencial de classificações do conjunto.

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|-------------------------------|-------------|--------------|
| GSFR | 83% | 17% |
| Sadia | 7% | 93% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando as matrizes confusões da tabela T9 é possível observar que todos os conjuntos alcançaram o potencial de classificação, destacando o acerto de 99% do conjunto Xingu II. Já o estudo da tabela T10 permite afirmar que ao agrupar todos os conjuntos a classificação continua sendo superior a 75%, tornando o conjunto com as folhas das três fazendas aptas a ter o potencial de classificação.

A.3.3 Verificação do potencial de classificação de folhas de soja com GSFR utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência

Utilizando os histogramas de cores para retirar os atributos e criar os classificadores, como feito para as imagens de laranja foram montados os gráficos das figuras A11 e figura A12, onde mostram os acertos das validações cruzadas com os respectivos números de componentes, dos modelos construído via regressão PLSR. A figura A11 ilustra as classificações utilizando os conjuntos das três fazendas separadamente, e a figura A12 as classificações com os conjuntos agrupados. Já os acertos máximos das validações cruzadas podem ser vistos nas tabelas T11 e tabela T12, dos conjuntos individualmente analisados e todos juntos, respectivamente.

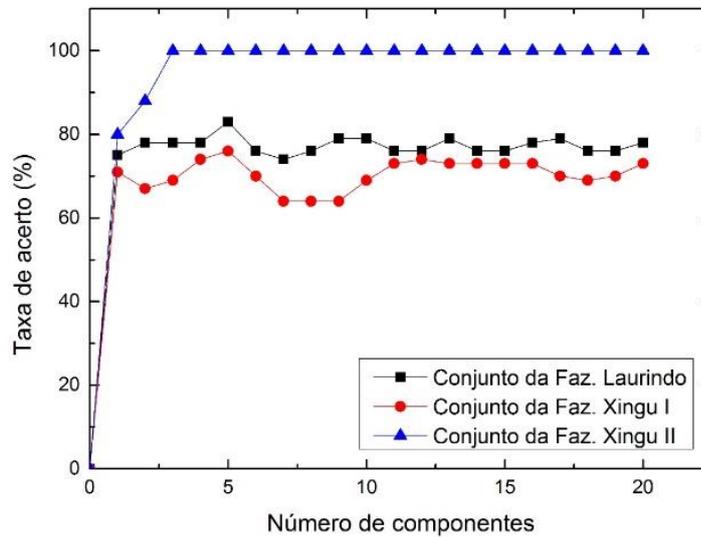


Figura A11 – Variações dos acertos das validações cruzadas com relações aos números de componentes, para os classificadores criados com medidas nas regiões adaxiais, com o sistema de imagens de fluorescência, dos três conjuntos de folhas coletados nas diferentes fazendas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

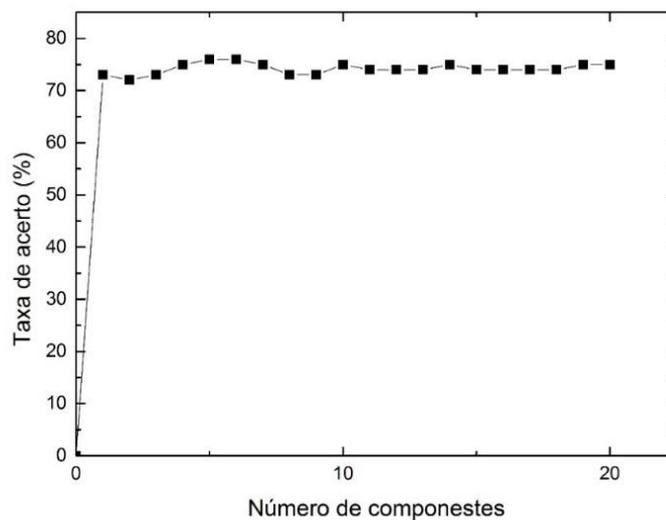


Figura A12- Gráfico das taxas de acertos com relações aos respectivos números de componentes, do classificador criado com os três conjuntos juntos, num total de 152 imagens sendo 76 de cada classe. O intuito era estudar o potencial de classificação, para construir um classificador universal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T11 – Matrizes confusões com as melhores classificações das validações cruzadas. O intuito do estudo é estudar o potencial de separação entre as classes.

a)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|----------------------------|------|-------|
| GSFR | 86% | 14% |
| Sadia | 19% | 81% |

b)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|----------------------------|------|-------|
| GSFR | 83% | 17% |
| Sadia | 31% | 69% |

c)

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|----------------------------|------|-------|
| GSFR | 100% | 0% |
| Sadia | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T12 – Matriz confusão da melhor classificação das validações cruzadas, utilizando os espectros das três fazendas. A partir da matriz confusão é possível observar o acerto de 76%, onde foi alcançado o potencial de classificações do conjunto.

| Classificado \ Classe real | GSFR | Sadia |
|----------------------------|------|-------|
| GSFR | 85% | 15% |
| Sadia | 34% | 66% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando os gráficos das figuras A11 e Figura A12 e as matrizes confusões da tabela T11 e tabela T12 é possível notar que o conjunto da fazenda Xingu II obteve a melhor classificação, onde o acerto chega a 100%. Pode-se afirmar também que para a técnica de Imagens de Fluorescência o conjunto obteve o potencial de classificação

A.4 Fenotipagem

A.4.1 Verificação do potencial de classificação de diferentes cultivares de soja utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-405

As análises com diferentes variedades de soja cultivadas em campo são extremamente importantes para auxiliar os estudos de fenotipagens, na tentativa de desenvolver espécies resistentes a diferentes condições de estresses e com altas produtividades. Assim utilizando as variedades TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR, como descrito na sessão 5.1.3 dos Materiais e Métodos, foram utilizadas as técnicas LIFS e Imagens de Fluorescência para diferenciar e classificar as três variedades de soja.

Utilizando os espectros retirados com o sistema LIFS-405 foi construído o gráfico da figura A13, com os acertos das classificações dos três diferentes cultivares de soja e os respectivos números de componentes. A matriz confusão da tabela T13 ilustra como foi distribuída a melhor classificação.

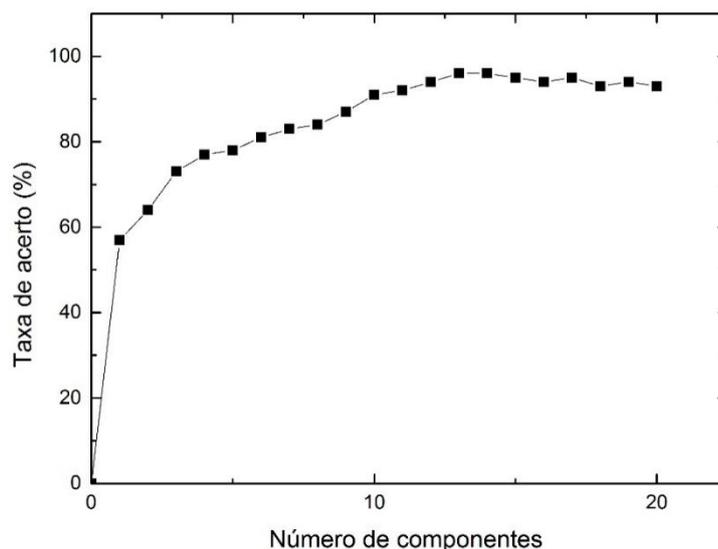


Figura A13 – Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, para o classificador criado com os cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR produzidas nas fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, respectivamente. O intuito é estudar o potencial de reparação entre as diferentes variedades utilizando os espectros coletados com o sistema LIFS-405.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T13 – Matriz confusão da melhor classificação feita via validação cruzada, com os espectros coletados com o sistema LIFS-405, das amostras das fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II. Onde o objetivo é estudar o potencial de classificação do conjunto.

| Classificado Classe real | Classificado | | |
|-----------------------------|--------------|---------|---------|
| | TMG1188RR | TMG4182 | M9144RR |
| TMG1188RR | 96% | 2% | 2% |
| TMG4182 | 2% | 91% | 7% |
| M9144RR | 0% | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor

Através das análises do gráfico da figura A13 e da matriz confusão da tabela T13 é possível constatar o acerto máximo de 96% empregando 13 componentes. Desta forma, o conjunto foi considerado como possuindo o potencial de classificação para a técnica LIFS-405, concomitantemente com os classificadores, na diferenciação dos três cultivares de soja. Nota-se pela matriz confusão da tabela T13 que a maioria das folhas foram classificadas de forma correta, destacando o acerto da variedade produzida na Fazenda Xingu II (M9144RR), que teve todas as suas folhas classificadas de forma correta, mostrando que os espectros desta variedade são bem característicos da cultura.

A.4.2 Verificação do potencial de classificação de diferentes cultivares de soja utilizando o sistema de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser – LIFS-561

Seguindo o mesmo procedimento realizado com o sistema LIFS-405, utilizando o mesmo conjunto, foram empregados o sistema LIFS-561 para diferenciar as diferentes variedades de soja. Desta forma, construiu-se o gráfico da figura A14, com o acerto das validações cruzadas do classificador construído via regressão PLSR, e a tabela T14 com o acerto máximo da classificação.

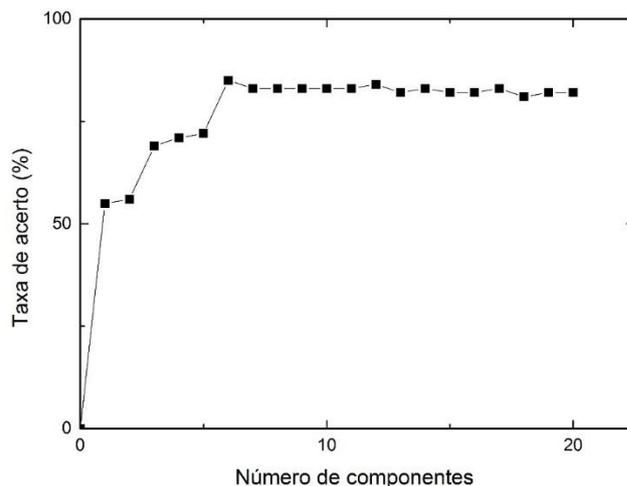


Figura A14 – Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, para o classificador criado com os cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR produzidas nas fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, respectivamente. Os espectros foram coletados com o sistema LIFS-561, da região abaxial das folhas. O intuito é estudar o potencial de reparação entre as diferentes variedades.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T14 – Matriz confusão da melhor classificação feita via validação cruzada, com os espectros coletados com o sistema LIFS-405, das amostras das fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II. Onde o objetivo é estudar o potencial de classificação do conjunto.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|--------------|------------|------------|
| | TMG1188RR | TMG4182 | M9144RR |
| TMG1188RR | 79% | 12% | 9% |
| TMG4182 | 12% | 82% | 6% |
| M9144RR | 5% | 2% | 93% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise do gráfico da figura A14 permite constatar que com 6 componentes, ocorre o maior acerto que é de 85%. Com o estudo da tabela T14 é possível afirmar que a grande confusão acontece entre as folhas da fazenda Parnaíba (TMG1188RR) e Xingu I (TMG4182). Nota-se também que as folhas da fazenda Xingu II (M9144RR) tiveram as melhores classificações, assim como no sistema LIFS-405. Assim o conjunto de folhas com as três variedades atingiu o potencial de classificação utilizando o sistema LIFS-561, pois obteve o acerto máximo superior a 75% na validação cruzada.

A.4.3 Verificação do potencial de classificação de diferentes cultivares de soja utilizando o sistema de Imagens de Fluorescência

Utilizando o mesmo conjunto dos estudos com os sistemas LIFS-405 e LIFS-561, foram retiradas as imagens com o sistema de Imagens de Fluorescência. A partir das imagens foram retirados os histogramas de cores para obter os descritores e construir o classificador através de regressão PLSR. Desta forma, por meio dos acertos das validações cruzadas e os respectivos números de componentes, foi construído o gráfico da figura A15, onde o intuito da classificação era separar as três variedades de soja. Assim foi construído a matriz confusão da tabela T15, com a classificação que alcançou o maior acerto.

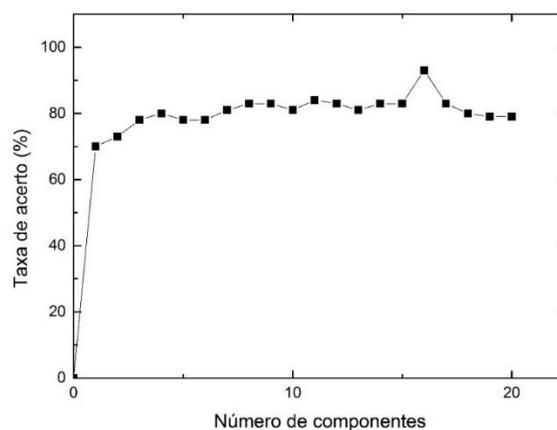


Figura A15 – Gráfico das taxas de acertos das validações cruzadas com relações aos respectivos números de componentes, para o classificador criado com os cultivares TMG1188RR, TMG4182 e M9144RR produzidas nas fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II, respectivamente. As imagens foram tiradas das regiões adaxiais das folhas. O objetivo é estudar o potencial de reparação entre as diferentes variedades.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela T15 – Matriz confusão da melhor classificação feita via validação cruzada, com as imagens coletadas com o sistema de Imagens de Fluorescência, das amostras das fazendas Parnaíba, Xingu I e Xingu II. Onde o objetivo é estudar o potencial de classificação do conjunto.

| Classificado \ Classe real | Classificado | | |
|-------------------------------|--------------|---------|---------|
| | TMG1188RR | TMG4182 | M9144RR |
| TMG1188RR | 74% | 26% | 0% |
| TMG4182 | 22% | 78% | 0% |
| M9144RR | 0% | 0% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o estudo do gráfico da figura A15 é possível dizer que o maior acerto foi de 84%, e aconteceu com o classificador contendo 11 componentes. Já com a análise da matriz confusão da tabela T15 nota-se que a melhor classificação foi do cultivar M9144RR produzido na fazenda Xingu II, como aconteceram com os sistemas LIFS, mostrando que para o sistema de Imagens de Fluorescência a variedade também tem características próprias bem definidas. A matriz confusão também permite dizer que a maior parte dos erros aconteceu nas classificações das folhas da fazenda Xingu I e Paranaíba, dando indicio que para a técnica de Imagens de Fluorescências os cultivares TMG1188RR e TMG4182 possuem características similares. Assim, com um acerto máximo na classificação superior a 75 % por meio de validação cruzada, permite afirmar que o conjunto das imagens dos três diferentes cultivares, adquiridos com o sistema de Imagens de Fluorescência, apresenta o potencial de classificação.