

6

DIAGNÓSTICO DO HLB POR TÉCNICAS FOTÔNICAS

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, Fabíola Manhas Verbi Pereira, Paulino Ribeiro Villas Boas, Marcelo Camponez do Brasil Cardinali, Ladislau Martin-Neto, Ednaldo José Ferreira, Polyana Kelly Martins e Juliana Freitas-Astúa

1 Introdução

A produção de citros é uma das atividades econômicas mais importantes do mundo. Aproximadamente 122 milhões de toneladas de frutas cítricas, incluindo laranja, limão, toranja e tangerina são produzidas, correspondendo a quase 17 bilhões de dólares nas vendas de frutas frescas e de suco concentrado no mundo (FAO, 2011). O Brasil é o maior produtor e exportador de laranja do mundo, contribuindo com mais de 18 milhões de toneladas anuais, sendo cerca de 80% produzidas no Estado de São Paulo (IBGE, 2011). Além disso, 50% da produção mundial de suco concentrado é nacional e 98% desta são exportadas (NEVES et al., 2011). O setor ainda gera 230 mil empregos diretos em mais de 300 municípios (NEVES et al., 2011).

O potencial econômico da cadeia citrícola tem sofrido um impacto negativo e considerável nos últimos anos. Pragas e doenças sempre estiveram presentes na citricultura mundial. Contudo, atualmente, a doença de campo que tem causado o maior prejuízo é o *Greening*, também conhecida mundialmente como *Huanglongbing* (HLB), e no Brasil, como Amarelão. Esta doença teve origem na China, em 1919, e tornou seus pomares improdutivos. Ao longo dos anos, a doença disseminou-se para o mundo, sendo hoje encontrada em mais de quarenta países nos

continentes: Ásia, África, Oceania e América do Sul e do Norte (BOVÉ, 2006). O Brasil e os Estados Unidos, os maiores produtores mundiais de citros, tiveram seu primeiro caso de HLB em 2004 e 2005, respectivamente, e atualmente possuem grande parte de seus pomares infectados pela doença.

O HLB é uma doença bacteriana que atinge o floema das árvores infectadas, impedindo o transporte da seiva para os órgãos da planta (BOVÉ, 2006). Ainda não existe cura ou variedade imune à doença. Quando contaminada, plantas novas não chegam a produzir frutos, e plantas adultas tornam-se improdutivas em poucos anos (FUNDECITRUS, 2009). Os sintomas da doença podem demorar de 6 meses a 2 anos para aparecerem (SPANN et al., 2010), dificultando as inspeções visuais e a ação dos produtores para impedir o avanço da doença no campo. Estima-se que, atualmente, haja pelo menos uma árvore assintomática para cada árvore sintomática encontrada no campo (SPANN et al., 2010).

O agente causador da doença é a bactéria *Candidatus Liberibacter* spp, sendo duas espécies encontradas no Brasil: *asiaticus* e *americanus*. A primeira é a mais comum nos pomares brasileiros devido a sua tolerância a altas temperaturas, de até 35° C (LOPES et al., 2009). A bactéria é transmitida principalmente por um psíldeo conhecido como *Diaphorina citri*, um inseto de coloração cinza que mede de 2 a 3 mm de comprimento (Figura 1). O psíldeo está presente em todas as variedades de citros e, também, em plantas ornamentais conhecidas como falsa-murta, as quais também são hospedeiras da bactéria (FUNDECITRUS, 2009). Os adultos alimentam-se da seiva do floema da planta, geralmente em brotos novos e permanecem sobre as folhas e ramos. O inseto adquire a bactéria ao se alimentar de plantas doentes. Além da transmissão via vetor, a doença pode ser transmitida por meio da enxertia de borbulhas de citros contaminadas. As borbulhas são partes do tecido da planta responsáveis pela propagação da espécie. A enxertia é realizada a fim de unir tecidos de plantas diferentes, para melhorar a qualidade da produção e a resistência contra pragas.

Apesar de o HLB ter presença mundial conhecida há quase 100 anos, a doença ainda não possui cura ou método eficaz de controle. O manejo realizado pelos produtores consiste no controle do vetor, erradi-

cação de árvores sintomáticas e plantio de mudas certificadas. Entretanto, essas ações não têm sido suficientes para o controle efetivo da doença. A doença apresenta uma fase assintomática longa, que pode durar de 6 meses a 2 anos (SPANN et al., 2010), tornando a planta uma fonte de inóculo invisível. Além disso, as inspeções visuais apresentam baixa eficiência (BELASQUE JUNIOR et al., 2009), e os sintomas iniciais do HLB podem ser parecidos com o de outras doenças, como a clorose variegada dos citros (CVC) e deficiências de nutrientes, como zinco, manganês, magnésio e cobre (FUNDECITRUS, 2009). A ineficácia do manejo é evidente, dado o aumento dos casos ao longo dos anos.

Um método laboratorial empregado atualmente para detectar a doença é a análise de PCR, sigla do inglês *Polymerase Chain Reaction*. Essa técnica é baseada na análise molecular das folhas em busca do DNA da bactéria causadora do HLB (TEIXEIRA et al., 2008; LI; HARTUNG; LEVY, 2006). Dificuldades no diagnóstico são encontradas em árvores que ainda não manifestam sintomas, pois a baixa quantidade de bactéria pode não ser detectada nas análises. Outra versão deste método é o PCR em tempo real, conhecido como *Real Time-PCR*, cuja sensibilidade é maior e apropriada para o uso em árvores sem sintomas visuais. Entretanto, ambas as técnicas apresentam um custo muito elevado, além de exigir preparo prévio das amostras e ser inviável para uso em larga escala.

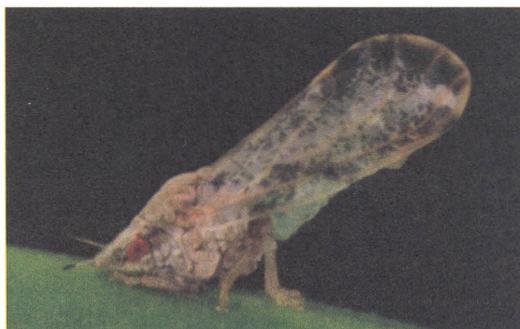


Figura 1 - Psílideo *Diaphorina citri*, vetor do HLB. O inseto mede de 2 a 3 mm de comprimento. Imagem disponível em: <<http://www.research.ufl.edu/publications/explore/v11n1/story1.html>>. Acesso em: 13 dez. 2012.

Os sintomas típicos do HLB que aparecem nas plantas ocorrem nas folhas e nos frutos, como mostrado na Figura 2. As plantas infectadas sintomáticas apresentam, em geral, um mosqueado amarelado assimétrico nas folhas e frutos deformados (BELASQUE JUNIOR et al., 2009). Em alguns casos, as folhas são mais espessas e apresentam um engrossamento nas nervuras. É comum também o aparecimento de sintomas de deficiência de zinco em alguns ramos (GOTTWALD; GRAÇA; BASSANEZI, 2007). Os frutos geralmente são menores, mais ácidos, com o albedo (parte branca da casca) espesso e sementes abortadas. Alguns frutos também podem apresentar um mosqueado amarelado na casca (GOTTWALD; GRAÇA; BASSANEZI, 2007).



Figura 2 - Sintomas típicos de HLB nas folhas (a), na casca do fruto (b) e dentro do fruto (c). Figura adaptada de imagens disponíveis em: <<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/image/Doen%C3%A7as/greening%202009%20018.jpg>>. Acesso em: 22 fev. 2012; <http://fabianoasato.blogspot.com/2010/04/greening-hlb-huanglongbing_06.html>. Acesso em: 22 fev. 2012; Manual técnico HLB (8).

Nesse cenário, é incontestável a necessidade de desenvolvimento de métodos de diagnóstico para a HLB rápidos, de baixo custo e capazes de identificar a doença precocemente. Por conseguinte, um monitoramento constante visando ao controle da doença evitaria a proliferação da bactéria nos campos citrícolas até que a cura da doença seja encontrada.

A presença de patógenos e deficiências nutricionais nas plantas podem acarretar alterações químicas e físicas nas plantas. Essas podem ser oriundas de uma reação específica das plantas ou pela interrupção de um determinado processo fisiológico. Os elementos químicos envolvidos nesses processos são chamados de metabólitos, que, por definição, são produtos do metabolismo de um determinado organismo vivo. Nas plantas, os metabólitos primários estão envolvidos no crescimento e na manutenção da planta, como, por exemplo: lignina, celulose, proteínas, lipídeos, carboidratos e os pigmentos. As plantas ainda produzem metabólitos secundários, muitas vezes relacionados ao mecanismo de defesa da planta. Como exemplo de metabólitos secundários, podem-se citar: alcaloides, flavonoides, terpenoides, compostos fenólicos, aldeídos, álcoois, cetonas e as fitoalexinas.

Fan et al. (2010) encontraram alterações nas concentrações de diferentes carboidratos em folhas saudáveis, HLB-sintomáticas e HLB-assintomáticas. Foi observado que enquanto o amido e a sacarose aumentaram suas concentrações em folhas HLB-sintomáticas e HLB-assintomáticas, quando comparadas com folhas saudáveis, a maltose decresceu progressivamente de folhas saudáveis para folhas HLB-sintomáticas. Houve também um aumento significativo na concentração de frutose em folhas HLB-assintomáticas comparadas com folhas saudáveis e HLB-sintomáticas.

Alguns trabalhos têm evidenciado alterações nas concentrações de metabólitos secundários devido à presença de patógenos (HAMMERSCHMIDT, 1999). Tais metabólitos secundários devem aumentar em plantas doentes.

No setor de diagnóstico de estresses bióticos e abióticos em plantas, utilizando-se de técnicas fotônicas, Lichtenthaler et al. (LICHTENTHALER et al., 1998) mostraram que é possível detectar estresses em plantas através da reflectância e da fluorescência. De acordo com

o estudo de fluorescência, as folhas quando excitadas no ultravioleta apresentam uma banda larga de emissão no azul e verde, e as emissões características da clorofila, na região do vermelho e infravermelho. As emissões da região azul e verde correspondem principalmente aos ácidos ferúlicos (LICHTENTHALER; SCHWEIGER, 1998). Através das razões entre os picos da região azul-verde e entre os máximos das bandas da clorofila, foi possível diferenciar folhas de plantas com deficiências diversas de plantas saudáveis. Esses diagnósticos indicam que tanto as clorofilas quanto os compostos emissores na região azul-verde alteram suas emissões devido as suas alterações de concentrações, de acordo com a evolução do estresse. Kancheva et al. (KANCHEVA; BORISOVA; ILIEV, 2008) verificaram por meio da fluorescência foliar a possibilidade de detectar alterações na concentração de clorofila. Foi observado que o estresse induzido leva à diminuição dos compostos fotossintéticos das plantas, que afetam a emissão desses compostos na região do vermelho e vermelho distante (entre 600 e 800 nm). Foram evidenciadas as diferenças espectrais em folhas com diferentes concentrações de clorofila através da razão entre os picos de emissão.

Hawkins e colaboradores (HAWKINS et al., 2010) empregaram a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para comparar diferentes doenças, como tristeza, declínio dos citros, cancro-cítrico e algumas deficiências nutricionais. As folhas de plantas com as deficiências nutricionais e com cancro-cítrico não puderam ser distinguidas de HLB. Vale ressaltar que as folhas utilizadas apresentaram sintomas característicos em cada doença ou deficiência. Em outras análises, Hawkins et al. (2010) compararam plantas saudáveis com plantas infectadas com HLB em diferentes estágios da doença, incluindo estágios assintomáticos. Com o uso do FTIR, foi possível atingir a taxa de acerto de 95% no geral. Entretanto, o número de árvores assintomáticas utilizado foi de 6 num universo de 124 árvores HLB-sintomáticas. Além disso, o diagnóstico correto ocorreu em apenas 4 das árvores assintomáticas. Em ambos os trabalhos, as amostras de folhas foram secas em um micro-ondas e trituradas para a realização das medidas.

Usando espectroscopia de infravermelho médio, Sankaran et al. (SANKARAN; EHSANI; ETXEBERRIA, 2010) distinguiram folhas

HLB-sintomáticas de saudáveis e outras com deficiências nutricionais, com taxas de acerto superiores a 95%. Além disso, foi observado também o acúmulo de amido nas folhas infectadas com HLB através de testes químicos. Nesse estudo, as folhas coletadas foram previamente preparadas para as análises. As folhas analisadas foram misturadas com nitrogênio líquido e trituradas, sendo colocadas em seguida para secagem durante 2 dias.

Na literatura, estudos utilizando imagens de fluorescência geradas de folhas de citros permitem também monitorar os processos metabólicos que nelas ocorrem (LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997; MEYER et al., 2003). Nesses estudos são apresentados sistemas de excitação da fluorescência por meio de lasers ou radiação de lâmpadas com filtros específicos para determinado comprimento de onda. A vantagem destes sistemas é a possibilidade de que a fluorescência medida nas folhas, correspondente a diferentes respostas das regiões do espectro, tais como, azul, verde, vermelho e vermelho-distante, pode ser investigada e, principalmente, esses dados podem ser associados às características específicas de cada planta (LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997; MEYER et al., 2003).

Neste capítulo, algumas técnicas fotônicas serão apresentadas como ferramentas potenciais para detectar alterações químicas nas plantas, e que podem transformar-se em sistemas de diagnóstico do HLB durante suas diferentes fases (fases assintomática e sintomática). Foram utilizadas as seguintes técnicas: espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser - LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) (LORENZEN et al., 1992; PASQUINI et al., 2007) e imagens de fluorescência molecular.

2 Princípios Básicos das técnicas fotônicas utilizadas

2.1 Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser - LIBS

O princípio da LIBS está fundamentado no uso de um laser como fonte de energia para promover a vaporização da amostra e excitar a

emissão de radiação eletromagnética a partir de seus elementos e/ou fragmentos moleculares (RADZIEMSKI, 1994). Neste caso, o sinal analítico das espécies excitadas é representado por uma ou mais linhas de emissão na forma de um espectro, em que os eixos da abscissa e da ordenada são correspondentes à faixa de comprimento de onda e à intensidade das linhas de emissão, respectivamente (LORENZEN et al., 1992).

Dentre as características potenciais da LIBS para este estudo, podem ser indicadas: viabiliza mapeamentos nas folhas em diferentes posições; alcança extensa faixa espectral (desde a região do ultravioleta até o infravermelho próximo, de acordo com as configurações de cada sistema), e permite caracterizações orgânicas e inorgânicas simultâneas. Outra vantagem é a possibilidade de efetuar as análises sem necessidade ou com mínimo pré-tratamento das amostras, o que proporciona rapidez e pode acarretar menor custo das análises (POUZAR et al., 2009; GALIOVÁ et al., 2008).

Outras características tornam a LIBS uma técnica atrativa também para experimentos em campo ou a distância em sistemas remotos (WHITEHOUSE et al., 2001), dentre as quais, a configuração de um sistema LIBS viabiliza a portabilidade de equipamentos para medidas *in loco* (WAINNER et al., 2001).

2.2 Imagens de Fluorescência molecular

De forma geral, a luminescência é uma forma de emissão de fótons, a partir de espécies eletrônicas excitadas, que pode ser visualizada em regiões distintas do espectro eletromagnético, tais como ultravioleta, visível ou infravermelho. A emissão de fótons associada à excitação com luz é então chamada fotoluminescência (fluorescência e fosforescência), a qual é um dos efeitos físicos decorrentes desta interação (SKOOG et al., 1998).

Para estudar as variações nas cores das imagens de fluorescência, foi utilizado como estratégia o estudo de variações nos perfis de histogramas de descritores de cores (BOUGUILA; ELGUEBALY, 2010)

provenientes destas mesmas imagens. Os histogramas destes descritores são definidos como gráficos de distribuição de frequências, em que o eixo da abscissa representa as variáveis, por exemplo, *Red* (R), *Green* (G), *Blue* (B), *Hue* (H), *Saturation* (S), *Value* (V), *Luminosity* (L), dentre outras escalas; o eixo da ordenada informa a frequência de pixels para cada variável discretizada do respectivo descritor. Estes histogramas podem ser gerados para qualquer imagem (GONZALEZ; WOODS, 2008). As frequências com as quais cada descritor ocorre, podem ser calculadas com equações descritas na literatura (ANTONELLI et al., 2004).

3 Materiais e Métodos

Para o monitoramento da doença, foi elaborado um experimento que teve a duração total de 8 meses, durante o período de 13 de julho de 2009 a 1º de março de 2010.

Para o referido experimento controlado, um conjunto de plantas de citros de mesma variedade e idade foi submetido a inoculações com uma das espécies da bactéria, a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), causadora do HLB. Outro conjunto com as mesmas características e de igual número de plantas, porém sem inoculações da bactéria, foi mantido como amostras-controle.

3.1 Amostras de Citros e Procedimento de Inoculação da Bactéria

As amostras utilizadas nos experimentos foram plantas saudáveis enxertadas em dezembro de 2008, com as seguintes características: copa de laranja-doce Valência [*Citrus sinensis*] em porta-enxerto de Citrumelo Swingle [*Citrus paradisi* cv. Duncan X *Poncirus trifoliata*].

Ao todo, 100 plantas foram inoculadas utilizando o procedimento denominado de enxertia por borbulhas (PEDROSO; SCIVITTARO, 2003). As borbulhas foram retiradas de árvores de laranja-doce com 3 anos de idade, que exibiam sintomas típicos de “*citrus greening*” e que tiveram diagnóstico positivo para CLas. Cada planta foi então inoculada

com duas borbulhas de tamanhos entre 2 e 3 cm de comprimento. Outro total de 100 plantas foi mantido como amostras-controle. Todas as plantas cresceram acondicionadas em sacos plásticos de 4 L contendo o substrato citrus Plantmax (Eucatex, São Paulo, Brasil) e foram mantidas em uma casa de vegetação com temperaturas inferiores a 30°C, durante todo o experimento. As plantas foram irrigadas diariamente e fertilizadas quando necessário.

3.2 Amostragem

Do conjunto de 200 plantas, foram selecionadas 60 de cada condição, sadia e inoculada. O excesso de plantas descrito anteriormente foi utilizado para garantir que não ocorressem possíveis perdas ou problemas com o procedimento de inoculação. Após, decorrido um mês de inoculação, as medidas experimentais com todas as técnicas (LIBS e imagens de fluorescência com os dois sistemas) foram efetuadas mensalmente. Cada planta foi representada por 3 folhas (amostras) que foram coletadas seguindo o mesmo protocolo para análises foliares tradicionais.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos pretos, sob refrigeração, na temperatura de 4 °C. Cada folha foi limpa com o auxílio de algodão umedecido em água deionizada, e a secagem foi efetuada ao ar. A duração dos experimentos foi de 8 meses (julho de 2009 a março de 2010). Os dados para o sexto mês após a inoculação não foram registrados em decorrência de problemas técnicos e operacionais.

3.3 Parâmetros das Medidas de LIBS

As medidas foram executadas utilizando um sistema LIBS2500 (*Ocean Optics, Dunedin, EUA*). Este sistema possui um laser de Nd:YAG ($\lambda=1.064$ nm), com as seguintes características: energia de pico de 50 mJ, duração de cada pulso de 20 ns e 10 Hz de capacidade em taxas de repetição. O sistema de detecção possui sete espectrômetros interligados com fibras óticas e que englobam a faixa espectral entre 189 e 966 nm

de resolução ótica de 0,1 nm e detector CCD (*charge-coupled device*). O tempo de atraso (*delay time*) nas medidas foi de 2 ms e a energia do laser foi de 50 mJ. As medidas foram realizadas em atmosfera ambiente. A distância entre a amostra e as lentes coletoras foi de aproximadamente 7 mm. Cada folha foi colocada entre duas placas de Al presas com a ajuda de prendedores, para melhorar a planicidade da folha e obter maior controle das posições a serem mapeadas. As dimensões destas placas de Al eram de 4,5 x 3,5 cm, e as mesmas possuíam um orifício circular no centro com 2,5 cm de diâmetro, conforme mostrado na Figura 3.

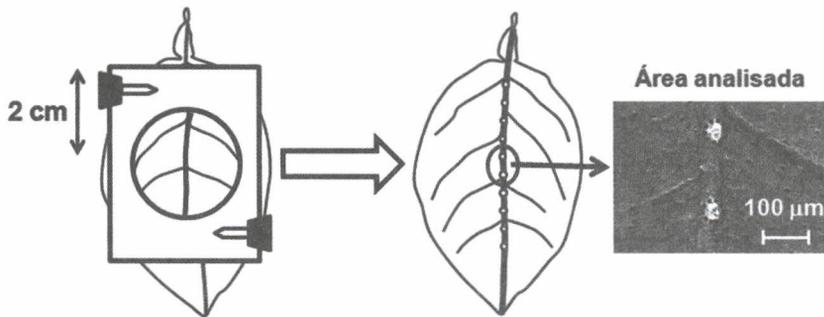


Figura 3 - Representação esquemática dos pontos mapeados nas folhas de citros com a técnica LIBS.

Cada espectro foi obtido com um pulso de laser por ponto mapeado considerando somente a região da nervura central na parte posterior da folha, como mostrado na Figura 3. Assim, um total de 10 espectros foi gerado para cada folha. As distâncias entre os pontos mapeados foram aleatórias. Com a utilização das condições descritas, o pulso de laser não atravessou as folhas, como pode ser também verificado na Figura 3.

3.4 Imagens de Fluorescência Molecular

3.4.1 Sistema de Imagem de Fluorescência Induzida por Radiação Ultravioleta Incoerente

Para a obtenção das imagens de fluorescência induzida por ra-

dição ultravioleta incoerente, foi utilizada uma câmera digital (Axio-CamMRc5, Zeiss, Göttingen, Alemanha); 5 M pixels de resolução, acoplada a um estereomicroscópio SteREO Lumar.V12, também do fabricante Zeiss. A excitação da fluorescência foi promovida com o auxílio de uma lâmpada a vapor de mercúrio de arco curto (radiação incoerente). Para estas imagens, foi selecionado somente o filtro para radiação ultravioleta. O tempo de exposição utilizado foi de 1,17 s, com um aumento de 30 vezes.

As calibrações prévias do estereomicroscópio foram efetuadas com padrões de imagens e, juntamente, com o auxílio de técnicos especializados da Zeiss.

O programa computacional Axio Vision release 4.6.3 (Zeiss) foi utilizado para o ajuste dos seguintes parâmetros: -0,50 brilho, 1,00 contraste e 1,00 gama, com ajuste de 5%. A distância focal variou entre 14 e 15 mm com campo de 12,0 mm. A resolução da imagem foi de 1.292 x 968 pixels (largura x altura) e 24 bits de profundidade de cor. A área de incidência luminosa na folha foi de 0,3 x 1,0 mm.

Para as medidas, as folhas foram presas com o auxílio de dois prendedores entre duas lâminas específicas para experimentos de microscopia (Bioslide, CAT no 7102, Califórnia, E.U.A.). Esse aparato proporcionou melhor foco das imagens geradas pelo estereomicroscópio. As lâminas possuíam as seguintes características: material de vidro transparente, com dimensões de 25,4 x 76,2 mm (largura x altura) e espessura entre 1 e 1,2 mm. Este material não apresentou qualquer tipo de absorção ou emissão fluorescente para a excitação UV.

As imagens foram adquiridas em uma câmara escura, e as exposições foram de aproximadamente 2 segundos para cada medida. As imagens foram efetuadas na parte central e posterior da folha, onde não foi incluída a nervura central devido a problemas de foco. A imagem da nervura central causava problemas no foco e, por isto, não pode ser considerada. De acordo com nossos testes, foi observado que a parte anterior da folha apresenta fluorescência menos intensa do que a parte posterior. Por esta razão, foi adotado que as imagens seriam obtidas apenas da parte posterior da folha. Este procedimento foi repetido para todas as amostras durante todo o

período experimental.

3.4.2 Sistema de Imagem de Fluorescência Induzida por Laser (LIFI)

Para os experimentos de LIFI, foi empregado um sistema de imagem configurado no Laboratório de Óptica e Fotônica (EMBRAPA Instrumentação, São Carlos - SP). Para as investigações das folhas de citros, foi utilizado um laser de diodo que promoveu a excitação no comprimento de onda de 473 nm. As imagens de fluorescência foram registradas com uma câmera digital (DSC-F828, Sony, Tóquio, Japão) com 8 M pixels de resolução.

O sistema de imagem de fluorescência induzida por laser (Figura 4) é composto de laser de diodo no estado sólido cw na região do azul (DPSSL-473-50, Roithner LaserTechnik, Viena, Áustria) e um filtro óptico para a banda de 473 nm (Melles Griot Photonics Components Group, Carlsbad, E.U.A.) de dimensões 50 x 50 x 3 (mm); largura, altura e espessura, respectivamente; com 90% de transmitância no comprimento de onda máximo de 700 nm. Alguns parâmetros delineados a seguir foram necessários para aplicação deste sistema.

As imagens foram adquiridas utilizando 5 mW de potência do laser estabilizada com corrente de 1,10 A. Um esquema do sistema LIFI é mostrado na Figura 8. Cada folha foi fixada utilizando fita adesiva dupla face em um anteparo metálico de cor preta. Este sistema foi configurado no interior de uma câmara escura, para as aquisições das imagens, e o tempo de exposição ao laser foi de aproximadamente 2 segundos. O aumento utilizado na câmera digital foi de 3,6 vezes. As dimensões de cada imagem foram 3.264 x 2.448 pixels (largura x altura) e 24 bits de profundidade. As resoluções vertical e horizontal foram de 72 dpi cada. A função flash foi desativada. A distância focal da câmera foi de 13 mm.

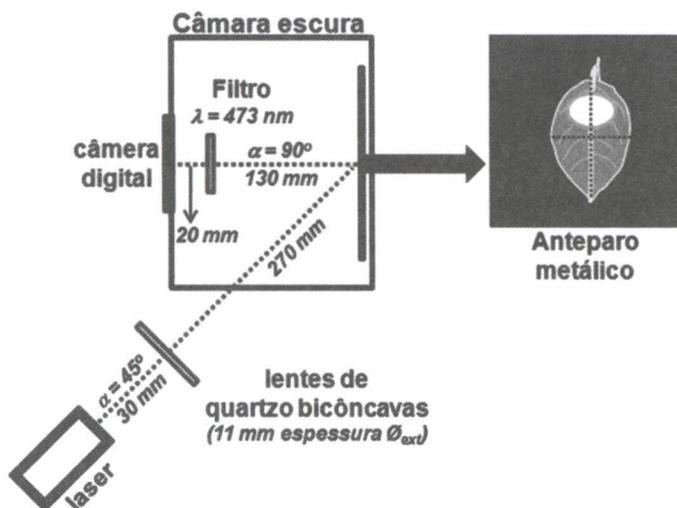


Figura 4 - Configuração do sistema de imagem de fluorescência induzida por laser (LIFI).

3.4.3 Padronização das Imagens

Um dos desafios deste estudo foi estabelecer uma área apropriada a partir das imagens originais para constituir o conjunto de dados. As características desejadas para cada imagem foram boa representatividade e uniformidade. Dado que, nas imagens provenientes do estereomicroscópio foi verificada a presença de orifícios (referente aos estômatos, circundados com linhas brancas pontilhadas) e de regiões mais escuras com foco deficiente, como exemplificado na Figura 5a; ou, ainda, no caso das imagens de LIFI, as áreas com muita saturação poderiam acarretar em informações equivocadas, como mostra a Figura 5b. O tamanho dos arquivos foi outra preocupação, considerando que a grande quantidade de dados poderia introduzir lentidão durante as avaliações dos dados.

Na tentativa de gerar representatividade, uniformidade e rapidez nas análises, uma área de cada imagem original foi selecionada manualmente, no caso daquelas do estereomicroscópio, as dimensões foram 300 x 300 pixels e, para aquelas geradas por LIFI, foi selecionada uma

região de 200 x 200 pixels, como demonstrado na Figura 5.

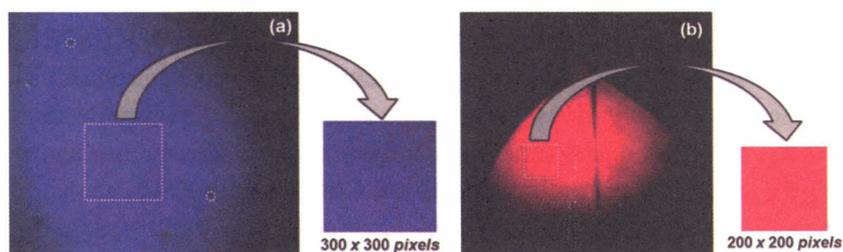


Figura 5 - (a) Imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta, e **(b)** Imagem de fluorescência induzida por laser (as imagens estão em escalas diferentes) (PEREIRA et al., 2011a).

3.4.4 Geração dos Dados e Ferramentas Quimiométricas

Posteriormente, para cada uma das regiões padronizadas (300 x 300 e de 200 x 200 pixels), um histograma para os descritores de cores foi gerado utilizando o programa computacional MatLab 2007R (The MathWorks Inc., Natick, EUA). Para os cálculos, foram empregadas equações descritas na literatura (ANTONELLI et al., 2004). As escalas de cores calculadas foram: 1-256 (R); 257-512 (G); 513-768 (B); 769-1.024 (L); 1.025-1.280 R relativo (rR); 1.281-1.536 G relativo (rG); 1.537-1.792 B relativo (rB); 1.793-2.048 (H); 2.049-2.304 (S); e 2.305-2.560 (I ou V); gerando-se um total de 10 variáveis. Os modelos de PCA foram executados utilizando o programa computacional Pirouette 4.0 rev.2.

3.5 Tratamento dos Dados

O programa computacional Pirouette 4.0 rev.2 (Infometrix, Inc.; Bothell, E.U.A.) foi utilizado para o tratamento dos dados. Todas as ferramentas quimiométricas aplicadas foram executadas com o auxílio deste programa.

3.6 Testes de RT-qPCR

As mesmas folhas que foram submetidas às medidas analíticas com LIBS e imagens também foram utilizadas nos ensaios de RT-qPCR. As partes das folhas utilizadas para a extração do DNA da bactéria CLas foram a nervura central e o pedúnculo. Todo o procedimento, desde a extração do DNA da bactéria ao diagnóstico, foi efetuado no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, situado em Cordeirópolis - SP.

4 Resultados e Discussão

4.1 Resultados dos Testes com RT-qPCR

A importância dos testes efetuados pelo RT-qPCR foi verificar a eficiência do procedimento de inoculação da bactéria nas plantas em estudo. Os ensaios identificaram resultados positivos para CLas que aumentaram gradativamente a cada mês após a inoculação das plantas. Os valores em porcentagem de folhas doentes, nas quais a bactéria foi detectada, foram de 4; 20; 22; 70; 66; 67 e 82% para os meses 1; 2; 3; 4; 5; 7 e 8, respectivamente. A partir do quarto mês, estes valores foram mais expressivos (70% das folhas inoculadas) em relação aos meses anteriores, atingindo 82% para o último mês.

Neste sentido, verificou-se que o diagnóstico do HLB utilizando somente o DNA da bactéria apresenta como limitação principal a necessidade de uma concentração alta da bactéria na amostra; neste caso, na nervura central e nos pedúnculos das folhas. Devido a esta questão é que, muitas vezes, para uma determinada amostragem proveniente de planta inoculada, não ocorria um diagnóstico positivo em todas as folhas (três por planta). Um ponto também relevante já apontado é que a bactéria efetivamente não se distribui igualmente na planta (LI; LEVY; HARTUNG, 2009). Esta última informação, combinada à baixa concentração da bactéria, pode acarretar em falsos diagnósticos negativos. Ainda, foi observado que em algumas plantas o desenvolvimento da bactéria foi mais lento.

Nossos resultados estão em concordância com estudo reportado na literatura utilizando PCR associado com TEM (*Transmission Electron Microscopy*) sobre detecção precoce do HLB (FOLIMONOVA; ACHOR, 2010), no qual Folimonova e Achor avaliaram plantas de citros de uma casa de vegetação e verificaram que a precocidade do PCR no diagnóstico da HLB foi entre 3 e 6 meses para estas amostras. O número de plantas analisadas foi de 35, sendo que antes dos três primeiros meses não foram detectadas as amplificações do DNA da bactéria. Para o terceiro mês, o diagnóstico foi positivo para 25 do total de 35 plantas testadas; nesta fase, as plantas ainda eram assintomáticas e tratava-se de amostragem de folhas jovens. Após seis meses de inoculação, foi obtido um diagnóstico de 100%, em folhas maduras já com sintomas. Após nove meses, os autores verificaram taxas entre 100 e 80% para folhas maduras com cloroses típicas da doença e para folhas jovens assintomáticas, respectivamente. Com os resultados apresentados, associados aos dados da literatura, foi verificado claramente que o diagnóstico da HLB por PCR é difícil de ser alcançado, considerando que vários fatores afetam a detecção da bactéria, tais como tempo de inoculação, distribuição e concentração da bactéria na planta, condição da folha (folhas maduras ou jovens) e estágio da doença (fases assintomática e sintomática).

Apesar de terem sido diagnosticadas como CLAs negativo para o início do experimento (os três primeiros meses), as amostras inoculadas foram consideradas doentes nas próximas análises.

4.2 Resultados do LIBS

Um total de 2.560 folhas foi analisado, considerando sadias (1.273) e doentes (1.287). Dentre estas amostras, em 82% das folhas doentes, foi detectada a presença do DNA da bactéria, ou seja, eram CLAs-positivas para o último período (oitavo mês).

Os espectros de LIBS registrados tinham resolução de aproximadamente 0,1 nm, gerando um número de 13.746 variáveis, como pode ser visualizado na Figura 7a. Estas características tornaram o processamento das análises quimiométricas muito lento, levando-se em consideração

a quantidade de dados sob estudo. Desta forma, os dados foram pré-tratados, efetuando-se a média a cada 10 variáveis independentes. Após esta etapa, a resolução foi alterada de 0,1 nm para 1 nm. O número de variáveis dos espectros mostrado na Figura 6a foi reduzido para 1.375, como indicado na Figura 6b. Este procedimento foi útil na redução do número de variáveis, e adicionalmente diminuiu o ruído dos espectros. Com este tipo de tratamento, não foi encontrado qualquer problema na interpretação dos dados ou perdas de informação analítica que pudessem influenciar na avaliação dos resultados.

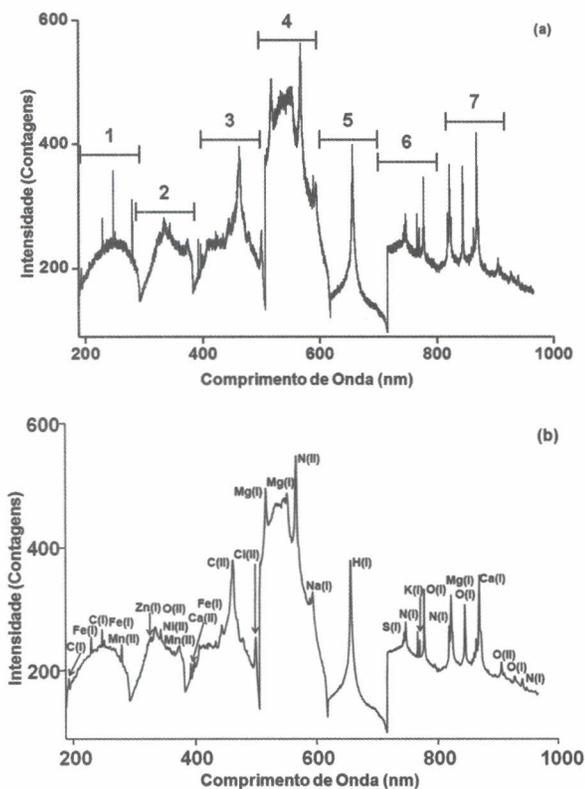


Figura 6 - (a) Espectro de um dos pontos mapeados em uma folha de citros sadia gerado com a LIBS, resolução 0,1 nm, e (b) Espectro transformado efetuando a média a cada 10 variáveis independentes, resolução 1,0 nm (PEREIRA et al., 2010).

O valor médio dos desvios entre os sinais das medidas das réplicas foi de 35 e de 38 contagens, para as folhas sadias e doentes, respectivamente. Os desvios foram calculados efetuando-se a raiz quadrada da variância média entre os sinais para cada variável.

No espectro apresentado na Figura 7a, é possível verificar as diferenças nas linhas de base no início de cada espectrômetro, que estão marcados com os números de 1 a 7. A faixa de cada espectrômetro, em nanômetros, foi 188,84 - 292,43 (1); 286,25 - 383,49 (2); 377,22 - 506,98 (3); 501,33 - 618,15 (4); 612,06 - 716,07 (5); 710,23 - 800,14 (6) e 793,49 - 966,08 (7).

As diferenças no deslocamento da linha de base dos espectros poderiam gerar interpretações equivocadas. Para contornar estas limitações, as estratégias adotadas na matriz X (valores de intensidade) foram a transformação com o logaritmo na base 10 e o pré-processamento centrado na média dos espectros. A vantagem da transformação logarítmica é que diferenças são reduzidas proporcionalmente, no caso de valores muito menores em relação àqueles maiores (MASSART et al., 2001). No pré-processamento com as variáveis dos espectros centrados na média, a média foi subtraída de cada ponto para produzir a matriz centrada na média, que resultou no valor da média sendo igual a zero (BRO; SMILDE, 2003).

Outras tentativas de pré-processamento dos espectros foram testadas como o autoescalamento e a normalização pela linha mais intensa, porém não houve êxito na visualização de grupos bem definidos. Estas estratégias reduziram a variância explicada dos dados e o poder de modelamento das variáveis e, também, introduziram ruído nos dados.

As primeiras medidas com LIBS foram registradas um mês após a inoculação da bactéria CLas. O modelo efetuado pela PCA, para este período, demonstrou 2 grupos bem definidos, um para as plantas sadias e outra para aquelas inoculadas, e a variância explicada total entre as PC1 e PC2 foi de 95%, como mostrado na Figura 7a. A Figura 7b mostra os valores para os pesos das variáveis (*loadings*) e a contribuição de cada elemento para as amostras sadias destacados em preto. Da esquerda para a direita nesta mesma figura, estas regiões foram caracterizadas pelas linhas de: C(I) (193,027 e 247,856 nm), Fe(I) (229,817 e 251,428

nm), Mn(I) (279,482 e 279,827 nm), H(I) (656,279 nm), S(I) (744,335 nm), N(I) (746,831 nm), K(I) (766,490 e 769,896 nm) e O(I) (777,417 nm), como assinalado na Figura 8b. Os macronutrientes foram importantes, principalmente neste estágio, para o crescimento e os processos de regulação nas plantas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2002; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

A partir destes primeiros resultados, foi possível verificar alterações no metabolismo das plantas como consequência da inoculação, ainda na fase assintomática, que durou até os seis primeiros meses após a inoculação do patógeno.

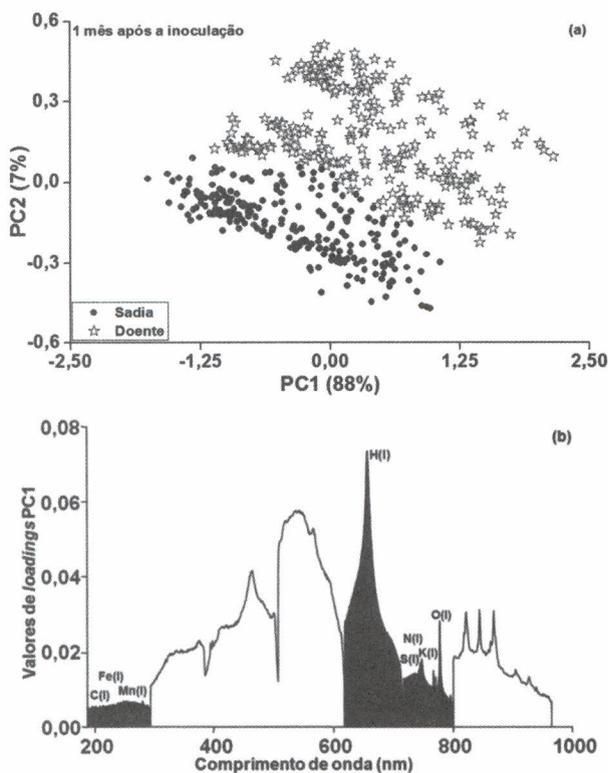


Figura 7 - (a) Gráficos para os *scores*, e (b) Pesos das variáveis para matriz de dados com 510 espectros e 1.375 variáveis, após um mês de inoculação (PEREIRA et al., 2010).

Após três meses, a maioria das plantas inoculadas apresentou a tendência de separação em dois grupos. Os sintomas iniciais observados durante este mesmo período foram folhas com algumas das características iniciais da HLB, tais como: regiões com manchas amarelas irregulares, como pode ser verificado na Figura 2. Para este conjunto de dados, outros elementos adicionais foram importantes para a classificação das amostras sadias, incluindo Fe(I) (229,817, 251,428 e 399,739 nm), C(I) (247,856 nm), Mn(II) (270,845 e 344,199 nm), Mn(I) (279,827 nm), Zn(I) (328,233 nm), Ni(II) (334,924 nm), Ca(II) (393,366 e 396,847 nm), C(II) (426,726 nm), Cl(II) (478,132 nm), Mg(I) (516,732; 517,268; 552,840 e 821,303 nm), N(II) (567,602 nm), Na(I) (588,995 e 589,592 nm), H(I) (656,279 nm), S(I) (744,335 nm), K(I) (766,490 e 769,896 nm), O(I) (777,417 e 844,636 nm), N(I) (818,802 nm), Ca(I) (863,395 nm) e O(II) (868,609 nm). Os micronutrientes foram também mais relevantes do que no período anterior, como indicado nesta mesma tabela, sendo atribuído às novas modificações no metabolismo das plantas durante a fase de crescimento. Estes micronutrientes contribuem para a estrutura de componentes celulares (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2002; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996). Os outros elementos foram importantes na classificação das folhas doentes.

Após cinco meses, as faixas mais importantes dos espectros para classificação das amostras doentes foram representadas pelo Mg(I) (516,732; 517,268 nm e 552,840 nm), N(II) (567,602 nm), Na(I) (588,995 e 589,592 nm) e H(I) (656,279 nm).

Para as últimas medidas, decorridos oito meses de inoculação, os elementos mais importantes para a separação dos *scores* das sadias foram Fe(I) (229,817; 251,428 e 399,739 nm), C(I) (247,856 nm), Zn(I) (328,233 nm), O(II) (328,747 nm), Ni(II) (334,924 nm), Mn(II) (344,199 nm) e H(I) (656,279 nm). Estes resultados foram muito interessantes porque, neste estágio, algumas folhas doentes eram nitidamente sintomáticas, e os elementos Fe, Zn e Mn foram importantes para esta discriminação, de acordo com nosso estudo prévio, utilizando SR-XRF (PEREIRA; MILORI, 2010).

O potencial dos espectros de LIBS na identificação das plantas doentes foi estimado por meio dos quatro modelos de classificação cons-

truídos utilizando o método supervisionado SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*) (SHARAF et al., 1986) com os dados de toda a faixa espectral. Foram testados também mais dois métodos, o KNN (*Kth Nearest Neighbour*) e o PLS-DA (*Partial Least Squares - Discriminant Analysis*), entretanto os melhores modelos foram aqueles gerados para o SIMCA. O método SIMCA foi aquele que gerou, também, os melhores resultados obtidos com o estudo prévio da HLB, utilizando espectros de SR-XRF (PEREIRA; MILORI, 2010).

Estes períodos (primeiro, terceiro, quinto e oitavo meses) foram selecionados por terem sido bem representativos para a condição de folhas saudáveis e doentes, dado que a maior tendência de separação em dois grupos foi verificada nas análises de PCA para estes períodos da doença.

O melhor pré-processamento das variáveis dos espectros de LIBS para todos os modelos de classificação foi o mesmo efetuado para as análises de PCA. Todos os modelos foram ajustados utilizando três variáveis latentes para cada classe (sadias e doentes), com variância explicada entre 96% e 99%.

As amostras para a composição dos conjuntos de dados foram selecionadas utilizando como parâmetro os gráficos de scores dos modelos de PCA. Todas as amostras selecionadas para os conjuntos de treinamento, dos modelos de classificação, foram modeladas pelo método SIMCA em uma das duas categorias e não houve problemas com amostras anômalas. Para aqueles modelos de classificação construídos para o primeiro mês de testes, é possível verificar que o número de previsões corretas de validação foi de 100%, considerando-se as folhas de citros doentes, como mostrado na Tabela 1. Estes resultados são promissores para a análise da doença, quando comparados com o diagnóstico por meio de PCR, que foi de apenas 4% para o mesmo período (Figura 6).

O modelo para o terceiro mês apresentou valores de previsão para classificação dos dados que foram reprodutíveis, tendo como parâmetro o primeiro período. No caso, foi 100% de previsões corretas para as folhas doentes. De acordo com os resultados de PCR, 22% das folhas foram CLas-positivas. Um total de duas amostras, uma para cada modelo de treinamento e validação, não foram classificadas em nenhuma categoria.

No quinto mês, as previsões corretas para as amostras doentes foram de 92% para o conjunto de validação. Com o PCR, o número de amostras positivas para a bactéria foi de 66%. Cinco amostras no total não foram classificadas em nenhuma classe. Para este caso, foram duas e três, para as categorias sadias e doentes, respectivamente. No conjunto de dados para a validação, uma amostra de cada condição não foi classificada em qualquer condição.

Os conjuntos de dados para o oitavo mês demonstraram previsões corretas entre 84% e 88%. De qualquer forma, estes resultados são comparáveis com aqueles obtidos com o PCR com o qual foi diagnosticada a presença da bactéria em 82% das folhas doentes para o mesmo período. Estes valores foram considerados adequados, mas o número de amostras que não foram classificadas em nenhuma condição aumentou.

Os erros de previsão foram também esperados nos modelos de classificação, já que as amostras que são utilizadas para validação foram distintas daquelas utilizadas no treinamento. E o número de medidas que não foram classificadas em nenhuma categoria foi muito baixo, quando comparado ao número total de espectros utilizados para cada modelo.

O número de espectros mostrados na Tabela 1 foi variável de acordo com a disponibilidade de material das plantas, e alguns espectros foram excluídos nos modelos por se apresentarem como potenciais *outliers*, conforme alguns parâmetros avaliados, dentre os quais os valores de resíduos e de leverage das análises de PCA.

Estes modelos foram preliminares e são passíveis de terem suas informações amplificadas. Além disso, as concentrações dos elementos com o decorrer da inoculação precisam ser investigadas para verificar a capacidade analítica de detecção da LIBS. Outra questão é que outro experimento em condições controladas pode ser executado para acompanhar a infecção por um período maior que o estudado (08 meses).

Tabela 1- Resultados de validação por classes utilizando dados de LIBS e SIMCA (PEREIRA et al., 2010).

Conjunto de validação (115 espectros)				
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	55	2*	0	96
Doente	0	58	0	100

Conjunto de validação (75 espectros)				
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	25	0*	1	96
Doente	0*	49	0	100

Conjunto de validação (93 espectros)				
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	42	0*	1	98
Doente	3*	46	1	92

Conjunto de validação (87 espectros)				
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	28	7*	3	74
Doente	4*	43	2	88

4.2 Resultados das imagens de fluorescência

As avaliações preliminares dos histogramas para os descritores de cores foram executadas pela PCA. O objetivo foi ter uma visão geral sobre os dados, considerando os dez descritores (R, G, B, L, rR, rG, rB, H, S, V). Com o auxílio da PCA, foi observado que variações produzidas pela fluorescência foram verificadas entre as imagens, e apontou a influência apenas do descritor verde, de 257 a 512. Neste caso, a natureza dos dados tornou-se claramente univariada, e o uso de métodos multivariados foi desnecessário.

Para confirmar esta observação, uma segunda estratégia foi adotada: sendo feito um teste t pareado (CHRISTIAN, 2004) para avaliar qual era efetivamente o descritor que mais diferenciava as imagens. A intenção foi identificar qual dos dez apresentava as maiores diferenças entre as imagens das folhas de plantas sadias e doentes. Assim, as áreas provenientes de cada uma das dez escalas de cores foram calculadas a partir dos histogramas para os descritores de cores e, conseguinte, os valores de cada área foi o parâmetro empregado para estas interpretações.

Para um total de 2.184 histogramas gerados a partir das imagens para ambas as condições das plantas sadias (1.092) e doentes (1.092), os valores das áreas de cada cor (total de dez) foram sistematicamente comparados, conforme detalhado a seguir. Uma planilha eletrônica foi configurada para estes cálculos, sendo obtido um valor de t para as áreas de cada descritor, de todas as imagens adquiridas. A partir desta informação, o verde foi confirmado como aquele com maior valor de t para todas as imagens. O intervalo de confiança avaliado no teste t foi de 95%. Este número de histogramas foi decorrente do fato de que, em algumas coletas, o número de folhas (entre sadias e doentes) foi menor, e assim como a análise era pareada, foi necessário manter um número menor de amostras (do que aquele mostrado para os dados do LIBS) para efetuar as comparações.

É importante salientar que as amostras também apresentaram diferenças baseadas na idade das plantas, assim como ocorreu para a técnica LIBS. Assim, as avaliações foram então executadas separadamente para cada período.

4.2.1 Avaliação das Áreas dos Histogramas da Cor Verde (AHV)

4.2.1.1 Sistema de Imagem de Fluorescência Induzida por Radiação Ultravioleta

A Figura 8 mostra alguns exemplos de imagens de fluorescência obtidas com a excitação UV, representativas para as folhas saudáveis e doentes. As colunas à esquerda e à direita das imagens representam folhas saudáveis e doentes, respectivamente. A partir destas imagens, é observado visualmente que as saudáveis são mais escuras do que aquelas doentes. Os perfis dos histogramas do descritor verde (no interior das imagens) das plantas de citros mostram claras alterações das áreas. Esta informação é nítida, em especial para as imagens da Figura 8h e 8j. Os histogramas para o verde mostrados na Figura 8 foram ajustados na mesma escala, para efetuar esta comparação.

Outra observação para as imagens exemplificadas na Figura 8 foi relacionada com a intensidade das contagens para as cores da escala verde. No caso das plantas doentes, a variação foi entre 3.488 e 5.875 (diferença de 68%); por outro lado, plantas saudáveis tiveram variações menores, entre 7.565 e 9.218 (22%) para a mesma escala de cor.

A Figura 9 mostra um gráfico do tipo Box plot para todo o período do estudo apresentado, e o primeiro mês apresentou uma diferenciação significativa entre as folhas saudáveis e doentes, utilizando os dados de áreas dos histogramas do verde (Figura 8). Informação adicional que pode ser observada na Figura 9, é a média (representada por quadrados pretos), mediana (linha horizontal no interior dos Box plot) e o intervalo que retém 95% do conjunto amostral: média \pm 1,96SD (SD, desvio-padrão). Após a inoculação, os períodos nos quais as maiores diferenças foram verificadas pelo teste t, são 1; 3; 5; 7 e 8 meses. Diferenças significativas não foram observadas para os meses 2 e 4 com o teste t (marcados por asteriscos na Figura 9), utilizando o verde. Estas observações foram confirmadas utilizando o valor de t tabelado, que foi igual a 1,968; para $n = 310$ graus de liberdade, para todas as amostras de doente.

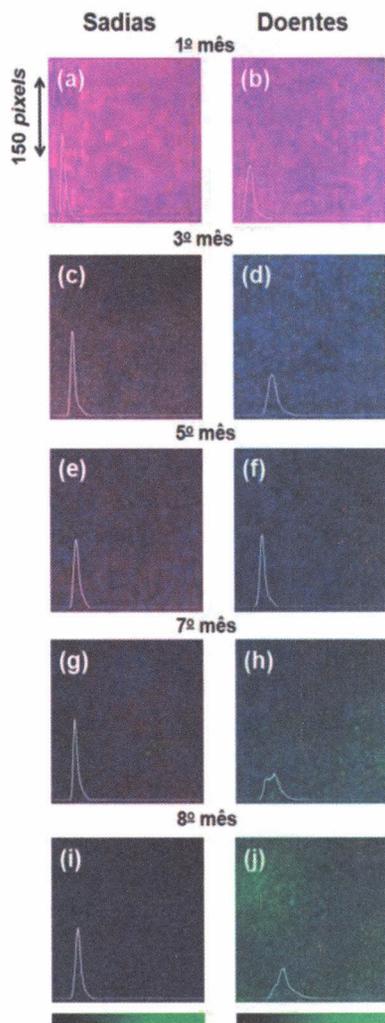


Figura 8 - Exemplos de imagens de fluorescência induzida por radiação ultravioleta incoerente, registradas para diferentes períodos após inoculação com CLAs, utilizadas para avaliar plantas de citros sadias e doentes. Os histogramas para o descritor verde estão representados no interior das imagens com linhas brancas (PEREIRA et al., 2011a)

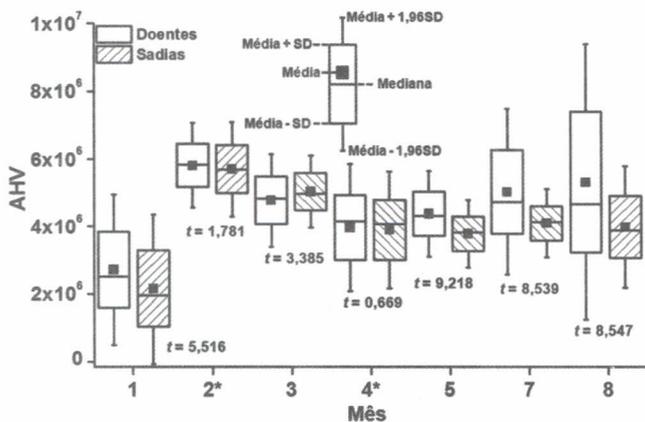


Figura 9 - Gráfico do tipo *Box plot* para o descritor verde das imagens de fluorescência induzida por radiação ultravioleta, considerando diferentes períodos após a inoculação com CLÃS (PEREIRA et al., 2010).

Entretanto, a informação mais importante foi o fato de que diferenças no primeiro mês entre folhas doentes e sadias foram observadas utilizando o método proposto. Estas diferenças foram também reproduzíveis para os meses 3; 5; 7 e 8.

Comparando estes dados com aqueles de PCR, verificou-se que bons resultados foram alcançados. Como se tratou de um experimento controlado, e a condição das amostras foi preestabelecida, pode-se inferir que a resposta da fluorescência variou devido ao efeito da bactéria no metabolismo da planta.

4.2.1.2 Sistema de Imagem de Fluorescência Induzida por Laser

No caso do sistema de fluorescência induzida por laser, as variações da fluorescência nas imagens foram tênues e não poderiam ser avaliadas simplesmente por investigação visual, o que poderia acarretar interpretações equivocadas e incompletas, como exemplificado na Figura 10.

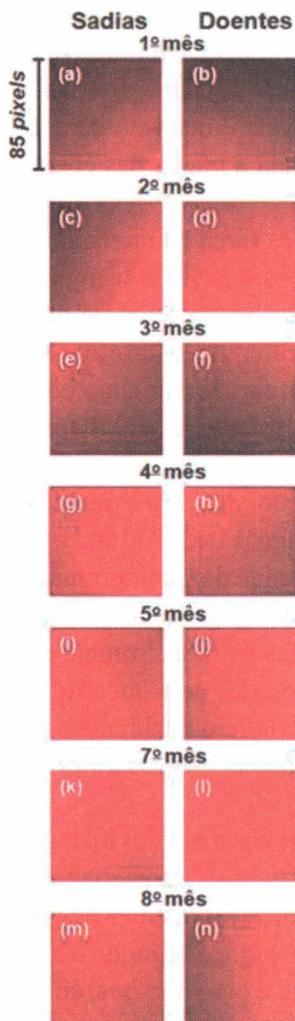


Figura 10 - Exemplos de imagens de fluorescência induzida por laser, registradas para períodos distintos após inoculação com CLÁS (PEREIRA et al., 2011b).

As investigações das análises de PCA também apontaram a importância apenas da cor verde para diferenciação entre plantas sadias e doentes. Assim, foi adotada a mesma estratégia de análise feita para

o sistema de imagens anterior, em que as áreas dos dez descritores de cores, para cada uma das imagens, foram sistematicamente avaliadas, e a variável de maior influência foi também aquela do verde, de acordo com os valores de *t*, avaliados no intervalo de confiança de 95%. Para este caso, também foi utilizada a média das cores para a avaliação pareada dos valores de *t*.

Em ambos os casos (área ou média dos descritores das cores), os valores para o verde atuaram como uma impressão digital para a maioria dos meses. Neste caso, os histogramas do descritor verde foram fundamentais para mostrar as diferenças entre amostras doentes e sadias. Além disso, foram importantes para tornar claro por que desde o primeiro mês diferenças entre folhas doentes e sadias foram detectadas. Este é um ponto relevante, considerando que, utilizando somente a inspeção visual como critério de avaliação, não é possível verificar qualquer diferença significativa para as imagens de LIFI.

A informação extraída dos histogramas proporcionou informação suficiente como impressão digital das variações de fluorescência para determinar a condição das plantas. Somente no caso do quarto mês, as imagens foram diferenciadas pela cor azul. As diferenciações com o descritor verde foram também verificadas para os meses subsequentes e podem ser confirmadas com os valores de *t*, como mostrado na Tabela 2.

Os valores gerados por meio dos histogramas do descritor verde, a partir das imagens, não demonstraram uma tendência linear. Estes valores foram maiores para as amostras doentes do que para aquelas sadias para o primeiro mês, diminuiu entre o segundo e o terceiro meses, e aumentou novamente entre o quinto e oitavo meses, ao nível de confiança de 95%.

Tabela 2 - Valores de t de Student pareado calculados a partir da média dos descritores de cores para imagens de fluorescência para folhas sadias e aquelas inoculadas com a bactéria CLas. Os valores de t marcados com asterisco são maiores que aquele do t_{crit} (PEREIRA et al., 2011b).

Mês	n	G.L.	Valores de t para os descritores de cores										t _{crit} , P < 0.05	% (+CLas)
			R	G	B	H	S	V	rR	rG	rB	L		
1o	408	406	2,657*	8,481*	1,381	3,290*	6,656*	2,657*	7,103*	5,808*	0,616	3,090*	1,966	<5
2o	345	343	0,697	2,659*	1,646	0,251	0,952	0,697	1,883	1,368	2,260*	0,747	1,967	20
3o	351	349	1,547	2,161*	1,280	0,342	1,523	1,547	2,383*	0,622	1,041	1,650	1,967	
4o	345	343	3,371*	1,734	2,689*	1,348	2,233*	3,371*	0,701	2,320*	2,516*	3,171*	1,967	
5o	354	352	0,155	3,282*	0,584	1,758	3,506*	0,155	1,976*	3,477*	1,161	0,150	1,967	70
7o	411	409	0,606	6,611*	1,374	9,961*	3,844*	0,606	5,992*	8,170*	3,779*	1,840	1,966	
8o	345	343	0,110	6,208*	1,736	3,027*	1,335	0,110	6,512*	5,588*	2,964*	1,625	1,967	>80

Este método pode ser considerado passível de ser implementado para o diagnóstico da HLB, considerando que as imagens podem ser adquiridas sem qualquer pré-tratamento das folhas, e as diferenças entre as condições foram reprodutíveis para a maioria dos meses. Neste sentido, este sistema de imagens de fluorescência demonstrou potencialidade, e o teste t pareado revelou informações relevantes das imagens para a identificação da doença (PEREIRA *et al.*, 2011b).

Algumas melhorias para ambos os métodos das imagens, apresentados, são necessárias para aplicações futuras, como a seleção do tamanho das imagens e da cor poderia ser efetuada automaticamente, utilizando uma rotina de programa computacional. Isto poderia tornar as avaliações mais rápidas.

5 Conclusões e perspectivas

O procedimento controlado da inoculação, associado aos dados das medidas de LIBS avaliados com métodos quimiométricos, foi efetivo para as investigações das variações tênues da composição mineral e orgânica das plantas doentes e sadias.

Os principais constituintes, os macro e os micronutrientes, apresentaram variações nas análises que foram muito importantes para a diferenciação das plantas sadias e doentes, ainda na fase assintomática (duração de até três meses após a inoculação).

Os períodos de inoculação 1; 3; 5 e 8 meses foram aqueles em que as alterações nutricionais foram marcantes, de acordo com os espectros de LIBS e os modelos de PCA e de SIMCA.

O método desenvolvido com espectros gerados por LIBS, associado à ferramenta quimiométrica SIMCA, apresentou acurácias superiores a 97% para as folhas doentes, apresentando maior potencial para o diagnóstico precoce do que o PCR, com apenas 4% de detecções positivas para CLas, para o primeiro período (mês 1).

Todos estes dados relatados levam a considerar que a LIBS combinada com métodos matemáticos - estatísticos se apresenta como ferramenta de grande potencialidade na avaliação dos efeitos da bactéria

CLas e das consequências da infecção na composição nutricional em plantas de citros.

A aquisição das imagens de fluorescência, combinadas com as áreas dos histogramas do descritor verde e o teste t, apresentou um padrão para o monitoramento do HLB. As vantagens deste método incluem análises sem pré-tratamento químico das amostras, eliminação da natureza subjetiva associada com a inspeção visual e alternativa potencial em relação ao método PCR.

As perspectivas quanto à busca do diagnóstico ou elucidação dos efeitos na planta é que novos estudos estão sendo propostos na literatura como alternativa ao PCR e que o tema ainda pode e necessita ser explorado. As informações extraídas com os dados de LIBS e imagens de fluorescência descritas são potenciais e podem ser amplificadas. Os efeitos concomitantes de outras doenças também precisam ser testados. Os metabólitos secundários originados nas plantas após a infecção precisam também ser elucidados. Os métodos de análise apresentados demonstram a potencialidade de serem aplicados em questões da agricultura.

6 Referências Bibliográficas

ANTONELLI, A.; COCCHI, M.; FAVA, P.; FOCA, G.; FRANCHINI, G. C.; MANZINI, D.; ULRICI, A. Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.515, n.1, p.3-13, 2004.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G. F.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JUNIOR, R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando ao controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v.34, n.3, p.137-145, 2009.

BOUGUILA, N.; ELGUEBALY, W. Integrating spatial and color information in images using a statistical framework. *Expert Systems with Applications*, Oxford, v.37, n.2, p.1.542-1.549, 2010.

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

BRO, R.; SMILDE, A. K. Centering and scaling in component analysis. **Journal of Chemometrics**, Malden, v.17, n.1, p.16-33, 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2002. 1.366p.

CHRISTIAN, G. D. **Analytical Chemistry**. 6. ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. 818p.

FAN, J.; CHENB, C.; BRLANSKYB, R. H.; GMITTER JR., F. G.; LIA, Z.-G. Changes in carbohydrate metabolism in citrus sinensis infected with "Candidatus Liberibacter asiaticus". **Plant Pathology**, Saint Paul, v.59, n.6, p.1.037-1.043, 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção total de citros em 2009**. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 05 de setembro de 2011.

FOLIMONOVA, S. Y.; ACHOR, D. S. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. **Phytopathology**, Saint Paul, v.100, n.9, p.949-958, 2010.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Relatório Anual do Fundecitrus 2009**. Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2009.pdf>

GALIOVÁ, M.; KAISER, J.; NOVOTNÝ, K.; NOVOTNÝ, J.; VACULOVÍČ, T.; LIŠKA, M.; MALINA, R.; STEJSKAL, K.; ADAM, V.; KIZEK, R. Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Applied Physics A**, Heidelberg, v.93, n.4, p.917-922, 2008.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. (Ed.). **Digital Image Processing**. 3. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2008. 954p.

GOTTWALD, T. R.; GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. **Citrus Huanglong-**

bing: the pathogen and its impact. 2007. Disponível em: <<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/12085/1/IND44030779.pdf>> Acesso em: 09 de outubro de 2011.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.37, n.1, p.285–306, 1999.

HAWKINS, S. A.; PARK, B.; POOLE, G. H.; GOTTWALD, T. R.; WINDHAM, W. R.; ALBANO, J.; LAWRENCE, K. C. Comparison of FTIR spectra between huanglongbing (citrus greening) and other citrus maladies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.58, n.10, p.6.007-6.010, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspax_201101.pdf>. Acesso em: 08 de novembro de 2011.

KANCHEVA, R. H.; BORISOVA, D. S.; ILIEV, I. T. Chlorophyll fluorescence plant as a stress indicator. **Recent developments in remote sensing from space**, v.5, p.301–306, 2008.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n.1, p.104-115, 2006.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v.99, n.2, p.139-144, 2009.

LICHTENTHALER, H. K.; MIEHÉ, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in Plant Science**, London, v.2, n.8, p.316-320, 1997.

LICHTENTHALER, H. K.; WENZEL, O.; BUSCHMANN, C.; GITELSON, A. Plant stress detection by reflectance and fluorescence. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v.851, n.1, p.271–285, 1998.

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, Gena, v.152, n.2-3, p. 272–282, 1998.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A. J.; MARIN, D. R. Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v.93, n.3, p.257–262, 2009.

LORENZEN, C. J.; CARLHOFF, C.; HAHN, U.; JOGWICH, M. Applications of laser-induced emission spectral analysis for industrial process and quality control. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v.7, n.6, p.1.029-1.035, 1992.

MASSART, B.; GUO, Q.; QUESTIER, F.; MASSART, D. L.; BOUCON, C.; DE JONG, S.; VANDEGINSTE, B. G. M. Data structures and data transformations for clustering chemical data. **TRAC - Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v.20, n. 1, p. 35-41, 2001.

MEYER, S.; CARTELAT, A.; MOYA, I.; CEROVIC, Z. G. UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.383, p.757-769, 2003.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. 2010. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao_Marcos_Fava_evento_valor.pdf>. Acesso em: 04 de setembro de 2011.

PASQUINI, C.; CORTEZ, J.; SILVA, L. M. C.; GONZAGA, F. B. Laser induced breakdown spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.18, n.3, p.463-512, 2007.

PEDROSO, R. O.; SCIVITTARO, W. B. **Normas e padrões para produção de mudas certificadas de citros em parceria com a Embrapa**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2003. 18p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 114).

PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P. Investigation of the stages of citrus greening disease using micro synchrotron radiation X-ray fluorescence in association with chemometric tools. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v.25, n.3, p.351-355, 2010.

PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ÁSTUA, J. Fluorescence images combined to statistic test for fingerprinting of citrus plants after bacterial infection. **Analytical Methods**, [S. l.], v.3, n.3, p.552-556, 2011a.

PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; CARDINALI, M. C. B.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ÁSTUA, J. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. **Computers and Electronics in Agriculture**, Oxford, v.79, n.1, p.90-93, 2011b.

PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ÁSTUA, J. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. **Talanta**, London, v.83, n.2, p.351-356, 2010.

POUZAR, M.; ČERNOHORSKÝ, T.; PRŮŠOVÁ, M.; PROKOPČÁKOVÁ, P.; KREJČOVÁ, A. LIBS analysis of crop plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v.24, n.7, p.953-957, 2009.

RADZIEMSKI, L. J. Review of selected analytical applications of laser plasmas and laser ablation, 1987-1994. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 218-234, 1994.

SANKARAN, S.; EHSANI, R.; ETXEBERRIA, E. Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (Greening) in citrus leaves. **Talanta**, London, v.83, n.2, p.574-581, 2010.

SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R. **Chemometrics**. New York: John Wiley & Sons, 1986. 352 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5. ed. Orlando: Harcourt Brace & Company, 1998. 960p.

SPANN, T. M.; ATWOOD, R. A.; DEWDNEY, M. M.; EBEL, R. C.; EHSANI, R.; ENGLAND, G.; FUTCH, S.; GAVER, T.; HURNER, T.; OSWALT, C.; ROGERS, M. E.; ROKA, F. M.; RITENOUR, M. A.; ZEKRI, M. IFAS guidance for Huanglongbing (Greening) management. **Citrus Industry**, Gainesville, v.91, n.4, p.6-13, 2010.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT E. E. **Biology of citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230p.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUEIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVE, J. M. 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**, Amsterdam v.22, n.3, p.139–150, 2008.

WAINNER, R. T.; HARMON, R. S.; MIZIOLEK, A. W.; MCNESBY, K. L.; FRENCH, P. D. Analysis of environmental lead contamination: comparison of LIBS field and laboratory instruments. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v.56, n.6, p.777-793, 2001.

WHITEHOUSE, A. I.; YOUNG, J.; BOTHEROYD, I. M.; LAWSON, S.; EVANS, C. P.; WRIGHT, J. Remote material analysis of nuclear power station steam generator tubes by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v.56, n.6, p.821-830, 2001.