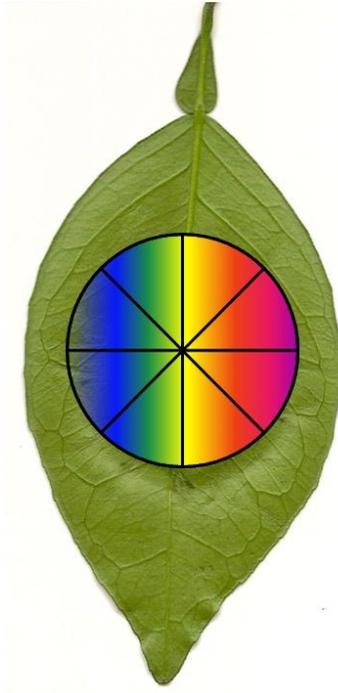


Identificação de variedades genéticas de laranja doce por meio de imagens de fluorescência



ISSN 1678-0434

Novembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 27

**Identificação de variedades genéticas
de laranja doce por meio de imagens
de fluorescência**

Fabiola Manhas Verbi Pereira
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

São Carlos, SP
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 2107 2800

Fax: (16) 2107 2902

<http://www.cnpdia.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,

Dr. João de Mendonça Naime,

Dr. Washington Luiz de Barros Melo

Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto

Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso

Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane

Capa: Fabiola Manhas Verbi Pereira

Editoração eletrônica: Manoela Campos

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

-
- P436i Pereira, Fabiola Manhas Verbi
Identificação de variedades genéticas de laranja doce por meio de imagens de fluorescência. / Fabiola Manhas Verbi Pereira, Débora Marcondes Bastos Pereira Milori. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009.
17 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 27).

1. Imagem de fluorescência. 2. Quimiometria. 3. Variedades genéticas.
4. Laranja doce. 5. Citrus. 6. Produção de mudas. 7. Química analítica.
I. Milori, Débora Marcondes Bastos Pereira. II. Título. III. Série.

CDD 21 ED 543.08584

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
1. Introdução	7
2. Materiais e métodos	8
2.1 Amostras	8
2.2 Sistema de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta.....	9
2.3 Sistema de imagem de fluorescência induzida por laser no comprimento de onda de 473 nm	9
2.4 Tratamento dos dados	9
3. Resultados e Discussões	9
3.1 Avaliações preliminares	9
3.4 Sistema de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta ...	11
3.5 Sistema de imagem de fluorescência induzida por laser no comprimento de onda de 473 nm	13
Conclusões	16
Referências	16

Identificação de variedades genéticas de laranja doce por meio de imagens de fluorescência

Fabiola Manhas Verbi Pereira¹

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori²

Resumo

A produção de laranja doce apresenta algumas questões relacionadas à identificação de suas variedades, inclusive na fase de muda, a qual é difícil ser efetuada por simples inspeção visual ou ainda por técnicas analíticas. Este é um ponto importante considerando que o cultivo da laranja é realizado em áreas extensas. Além disso, o plantio de mudas de variedade diferente daquela planejada, pode acarretar vários problemas graves, tanto no manejo aplicado ao pomar, como na qualidade e características esperadas do fruto pós-colheita. A utilização de métodos genéticos, como exemplo, os marcadores moleculares para identificar variedades de laranja doce ainda é considerada ineficaz, morosa e de custo elevado. Neste contexto, foram estudados perfis de variação de cor a partir de emissões de fluorescência excitada com dois sistemas de imagem distintos. Estes dados mostraram a propriedade de caracterizar algumas variedades comerciais de laranja doce. O potencial futuro deste método analítico é investigar a assinatura específica de cada variedade de citrus.

Termos para indexação: imagem de fluorescência, quimiometria, variedades genéticas, laranja doce, citrus, produção de mudas

¹Química, Dr., Pós-doutoranda em Química, fmverbi@uol.com.br

²Física, Dr., Pesquisadora, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP, debora@cnpdia.embrapa.br

Identification of genetic varieties of sweet orange using fluorescence imaging

Fabiola Manhas Verbi Pereira

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Abstract

The production of sweet orange has some points related to identification of varieties, including the seedling stage that is difficult using visual inspection or even, analytical techniques. This fact is important considering that the culture of orange needs large areas for growing of plantations. In addition, the plantation of different variety from the initial intends can cause some serious problems, as much handling applied to orchard as the quality and the characteristics of the fruits after harvest. The using of genetic methods, as example, molecular markers for identification of varieties of sweet orange is considered inefficient, lengthy and high cost. In this study, the color variation profiles from excited fluorescence emissions were investigated with two different systems of fluorescence imaging. These data showed the property to characterize some representative commercial varieties of sweet orange. The future potential of this analytical method is to investigate the specific signature of each Citrus plant variety.

Index terms: fluorescence imaging, chemometrics, genetic varieties, sweet orange, citrus, production of seedlings

Introdução

Desde o início da década de 90, o Brasil tem se projetado como maior produtor mundial de laranja, com participação em 80% do comércio internacional de suco de laranja. A safra produzida entre 2007 e 2008, considerando produtos manufaturados, gerou aproximadamente US\$ 2 bilhões em exportações (SÉRIE INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA, 2008).

Esta posição atual se deve principalmente ao avanço tecnológico da cadeia produtiva citrícola, onde pode ser citada a enxertia que visa ampliar as variedades genéticas de citrus e assim, obter plantas com características específicas, tais como maior resistência a pragas, doenças, variações de clima, solo, precocidade na produção e a uniformidade dos pomares. A enxertia consiste em um procedimento relativamente simples, sendo efetuada a junção de parte de uma planta (um ramo de uma variedade específica) em outra planta de variedade diferente. A copa (parte superior) então, será de uma variedade diferente daquela do porta-enxerto (parte inferior, caule e raízes).

No estado de São Paulo, dentre as variedades mais cultivadas 8% correspondem à Hamlin, 28% à Pêra-río, 30% à Valência, 24% à Natal e as outras estão incluídas nos 10% restantes (LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, 2008).

A questão principal é que a identificação das mudas no estágio vegetativo inicial é difícil, devido a variações genéticas muito tênues (SPIEGEL-ROY e GOLDSCHMIDT, 1996) que alteram algumas características da planta e que não são perceptíveis por inspeção visual.

Os métodos existentes para a certificação de variedades de plantas são geralmente, efetuados por análise de perfis de expressão genética. Todavia, marcadores moleculares ainda são considerados ineficazes no caso das variedades de citrus (ANCILLO et al., 2007).

Neste estudo foi avaliado um estudo de caso para imagens de fluorescência geradas a partir de folhas de citrus (LIAKOPOULOS et al., 2001) procedentes de quatro variedades genéticas distintas utilizando a quimiometria para a avaliação das referidas imagens. A quimiometria envolve uma combinação de ferramentas estatísticas-matemáticas direcionadas para a análise multivariada de dados químicos (WOLD et al., 1987; GELADI, 2003). Dentre este tipo de dado podem ser incluídas imagens geradas por técnicas analíticas (GELADI et al., 2004).

A excitação da fluorescência é efetuada por meio da absorção de fótons e geralmente, ocorre em comprimentos de onda maiores que os da radiação de excitação. O tempo médio de duração do estado excitado da fluorescência é menor do que 10^{-5} s. As respostas analíticas para este fenômeno óptico estão na forma de espectros de excitação e de emissão e também pode ser obtidas imagens (VALEUR, 2002).

A imagem proveniente da excitação de fluorescência em uma matriz de amostras vegetais pode apresentar mudanças em suas nuances de cores frente a alterações das propriedades químicas e físicas (BUSCHMANN et al., 2000).

Para estudar estas variações nas cores, considerando suas diferentes escalas, foram utilizados histogramas de cores, denominado também de colorgramas. Os histogramas de cores são definidos como gráficos de distribuição de frequência das cores, onde o eixo da abscissa (x) representa as variáveis, como exemplo vermelho (R, *red*), verde (G, *green*), azul (B, *blue*), matiz (H, *Hue*), saturação (S, *saturation*), valor (V, *value*), luminosidade, e as cores relativas do vermelho, verde e azul dentre outras escalas de cores, e o da ordenada (y) caracteriza as contagens. Os histogramas de cores podem ser calculados a partir de qualquer imagem e não requerem pré-processamento ou tratamento desta (GONZALEZ e WOODS, 2008). Os cálculos de cada escala de cor são baseados em equações descritas por Antonelli et al. (2004).

A potencialidade de informação procedente dos histogramas de cores obtidos para imagens de fluorescência está sendo investigada pelo Grupo de Ótica e *Lasers* da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária para, dentre outros estudos, possibilitar a diferenciação de algumas variedades genéticas de citrus. Dentre as principais variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* [L.] osbeck), as mais exploradas para enxertia na produção citrícola são: Natal, Valência, Hamlin e Pêra.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi apresentar uma proposta de método analítico para o reconhecimento das variedades genéticas de laranja doce supracitadas utilizando dois sistemas distintos de técnicas de imagens de fluorescência (HIRUMA, 2005), sendo que as referidas imagens foram avaliadas por meio de histogramas de cores e a ferramenta quimiométrica, PCA (*Principal Component Analysis*).

2 Materiais e Métodos

2.1 Amostras

Um total de 48 folhas de 4 variedades de mudas de laranja doce, 'Natal', 'Valência', 'Hamlin' e 'Pêra' foi coletado e fornecido pela Grupo Fischer - Divisão Citrosuco da cidade de Matão, estado de São Paulo; onde cada variedade foi representada por 12 folhas. Cada uma das 4 variedades citadas foi desenvolvida em porta-enxerto de outra variedade, a de limão-cravo. A eficácia do procedimento de enxertia foi avaliada visualmente por técnicos da mesma empresa cedente das folhas.

Sistema de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta

Para obtenção das imagens de fluorescência induzida por luz ultravioleta foi utilizado uma câmera digital (AxioCamMRc5, Zeiss, Göttingen/Alemanha); 5 M

Pixels de resolução acoplada a um estereomicroscópio (Lumar.v12, Zeiss, Göttingen/Alemanha). A excitação da fluorescência foi promovida com o auxílio de uma lâmpada a vapor de mercúrio, onde foi selecionado somente o comprimento de onda da radiação ultravioleta. O tempo de exposição utilizado foi de 545 ms, com um aumento de 30 x.

Sistema de imagem de fluorescência induzida por laser no comprimento de onda de 473 nm

O sistema de fluorescência induzida por laser foi composto de uma câmera digital (DSC-F828, Sony, Tóquio/Japão) com resolução de 8 M *pixels* e *laser* de diodo com excitação em 473 nm (DPSSL-473-50, Roithner LaserTechnik, Vienna/Áustria), na potência de 6 mW. O aumento máximo foi de 3,6 x. O comprimento de onda de excitação da fluorescência foi o de 473 nm, localizado na faixa do azul (região do visível) do espectro eletromagnético.

Tratamento dos dados

Durante os experimentos, para cada folha foi obtida uma imagem de fluorescência, perfazendo um total de 48 para cada técnica. Os histogramas destas foram gerados utilizando o programa MatLab 2007R (The MathWorks Inc., Natick/Estados Unidos).

Na análise de PCA foi gerada uma matriz para cada sistema composta de 48 x 2560, ou seja, 48 linhas representadas pelas amostras e 2560 colunas representadas pelas variáveis correspondentes às escalas de cores. As classes das amostras para a análise exploratória foram as 4 variedades de citrus, 'Natal', 'Valência', 'Hamlin' e 'Pêra'.

3 Resultados e Discussão

Avaliações preliminares

Um dos primeiros desafios deste estudo foi definir o tamanho mais apropriado das imagens para a constituição do conjunto de dados. As características desejáveis para cada imagem seriam uma boa representatividade e uniformidade. O tamanho do arquivo era outra preocupação já que seriam geradas muitas imagens e isto poderia ser um fator limitante nas avaliações quimiométricas. Com este intuito, foi selecionada uma área da imagem original mantendo-se o mesmo tamanho para todas. Outro parâmetro foi o tempo de exposição para excitar a fluorescência, já que a folha apresenta auto-fluorescência (KARABOURNIOTIS et al., 2001).

Para melhorar o foco das imagens obtidas com o estereomicroscópio foi utilizado um porta-amostra como pode ser visualizado na Figura 1-a. Neste caso a folha foi mantida plana. O número de imagens por folha também foi avaliado,

onde a região central da folha foi dividida em 4 regiões como mostra a Figura 1-b. Para o outro sistema de imagens não foi necessária a utilização de porta-amostra.

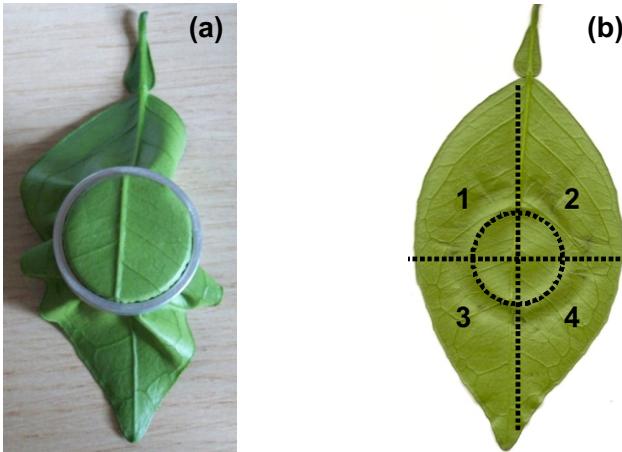


Fig. 1. (a) Folha colocada em porta-amostra para obtenção das imagens no estereomicroscópio e (b) Regiões de análise da folha.

As avaliações preliminares dos histogramas de cores foram efetuadas com a ferramenta quimiométrica PCA. O intuito era avaliar quais as variáveis apresentavam importância para a discriminação das amostras e principalmente se havia alguma diferença entre as variedades genéticas com a utilização das escalas de cores. Na Figura 2 pode ser verificado como um histograma de cores (ou colorograma) pode ser representado em duas dimensões.

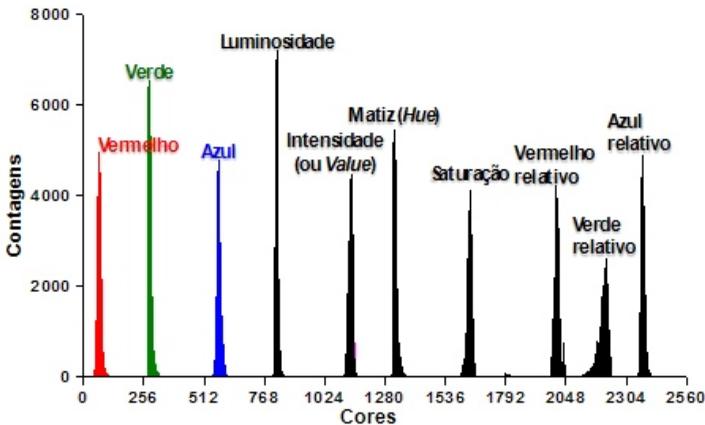


Fig. 2. Exemplo de histograma de cores (ou colorograma) para uma imagem de fluorescência proveniente de folha de citrus.

Sistema de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta

Para aquisição das imagens de fluorescência induzida por radiação ultravioleta foi utilizado um estereomicroscópio. Um exemplo de imagem gerada por este sistema considerando os critérios descritos na seção **Avaliações preliminares** pode ser verificado na Figura 3.

As dimensões da imagem são de 1292 (largura) x 968 (altura) *pixels*. Para cada imagem foi selecionada uma região de 300 x 300 *pixels*, com maior homogeneidade, evitando-se orifícios escuros, que podem ser visualizados na mesma figura.

As 4 regiões estudadas não apresentaram diferenças significativas. Assim, optou-se para este estudo utilizar apenas uma imagem proveniente de cada folha, mantendo-se como padrão a área designada de 1 conforme mostrado na Figura 1-b.

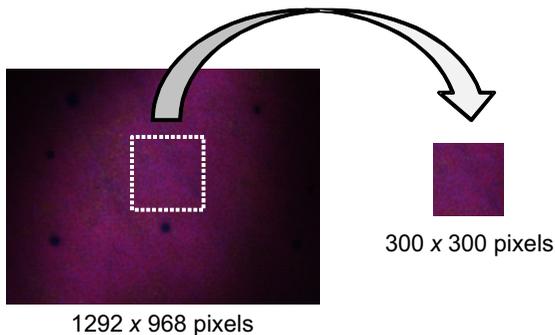


Fig. 3. Exemplo de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta para a variedade Natal.

A análise exploratória dos histogramas de cores provenientes das 4 variedades mostrou que se todas foram incluídas em um mesmo modelo há uma diferenciação evidente apenas entre 3 grupos das variedades, ou seja, Hamlin (losangos azuis), Natal (quadrados vermelhos) e Valência (cruzes roxas), alcançando um total de 52% de variância explicada com as componentes principais (PC, *principal component*) 1 e 2 e um total de 77% da variância explicada com 4 componentes principais. Os *scores* para a variedade Pêra (triângulos verdes) não formam um grupo definido ficando espalhados entre os grupos das outras variedades como mostra a Figura 4-a.

As variáveis selecionadas partindo dos resultados de análises exploratórias anteriores, foram as escalas das cores verde entre 259 e 352, e aquelas da matiz (*hue*) entre 1293 e 1393 demonstradas na Figura 4-b. Estas escalas se configuraram as mais relevantes para os resultados das análises exploratórias que serão mostradas a seguir.

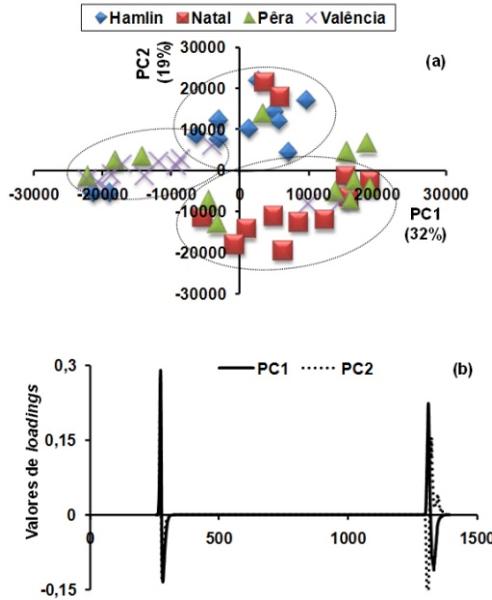


Fig. 4. Gráficos para (a) *scores* das 4 variedades na mesma análise de PCA e (b) *loadings* correspondentes utilizando as variáveis das escalas de cores verde e matiz para o sistema de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta.

Embora, algumas amostras das variedades foram visualizadas em outros grupos, como exemplos, duas da Hamlin (losângos azuis) estão no grupo da Valência, duas da Natal (quadrados vermelhos) se encontram no grupo da Hamlin e duas da Valência (cruzes roxas) ficaram agrupadas com a Natal, pode ser verificada que prevalece a tendência de separação em grupos entre as variedades.

A partir destes resultados foram efetuadas análises exploratórias utilizando as variáveis selecionadas, verde e matiz, considerando os seguintes pares entre classes tais como, Natal e Hamlin, Valência e Pêra, Hamlin e Valência, Hamlin e Pêra, Natal e Valência e, Natal e Pêra englobando todas as combinações possíveis, os gráficos podem ser verificados na Figura 5.

Ainda com os gráficos dos *scores* da Figura 5 foi verificado que as variedades Hamlin e Natal não puderam ser distinguidas utilizando as imagens de fluorescência (Fig. 5-a). Isto já havia sido verificado quando estas mesmas variedades foram colocadas no mesmo modelo com as outras 2 variedades (Fig. 4-a).

Os gráficos da Figura 5, designados pelas letras b, d e f evidenciaram que a variedade Pêra foi mais diferenciada em relação às variedades Hamlin e Natal do

que da Valência. Com os gráficos 5-b, 5-c e 5-e pode ser verificado que a variedade Valência, entre 75 e 83% das amostras (9-10 *scores*), se apresenta melhor separada das outras, Hamlin e Natal, com exceção da Pêra. No caso da Hamlin foi encontrada esta diferença apenas entre as PC1 e Pc4.

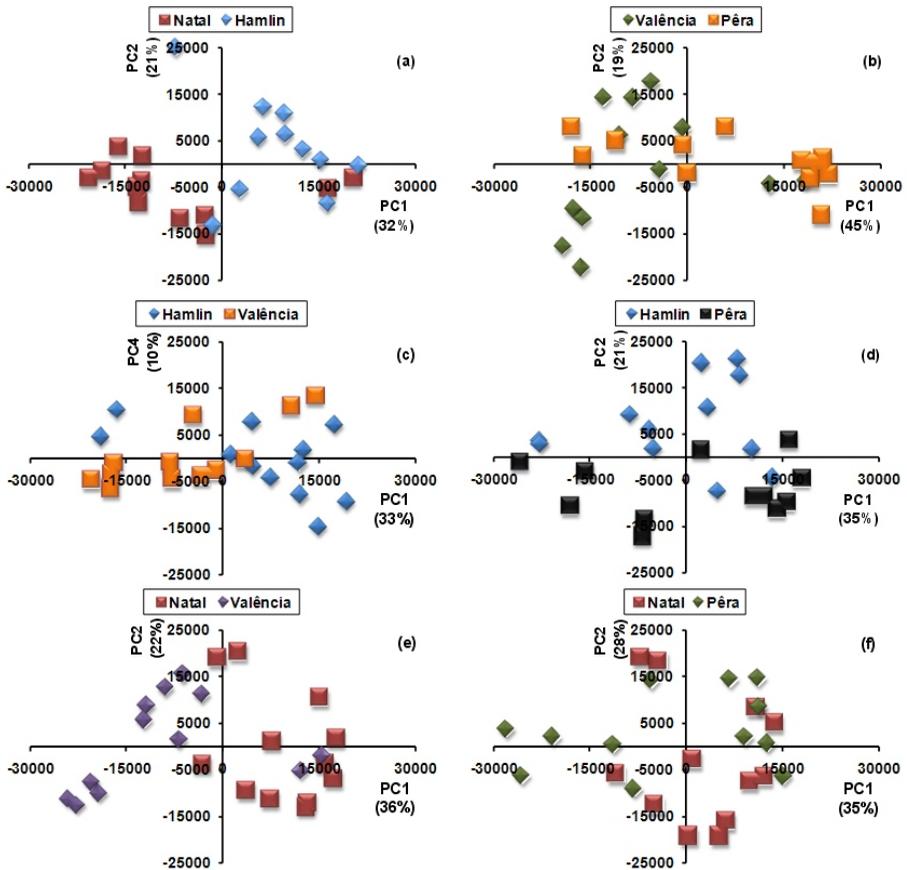


Fig. 5. Gráficos para (a-f) *scores* das variedades utilizando as variáveis das escalas de cores verde e matiz para o sistema de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta.

Sistema de imagem de fluorescência induzida por laser no comprimento de onda de 473 nm

O sistema de imagem de fluorescência induzida por laser no comprimento de onda de 473 nm se encontra instalado no Laboratório de ótica e lasers, localizado na Embrapa Instrumentação Agropecuária. Os componentes e a disposição dos mesmos podem ser visualizados na Figura 6.

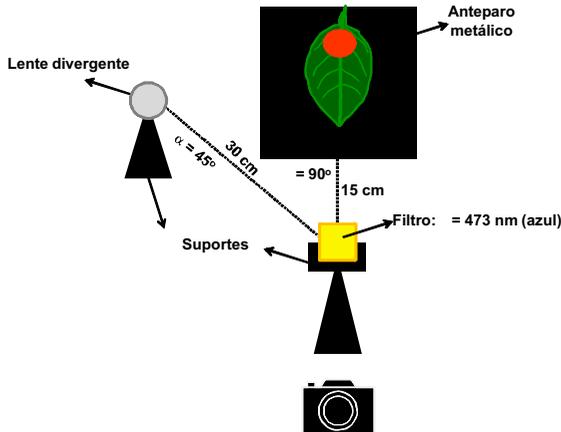


Fig. 6: Sistema de fluorescência induzida por laser, $\lambda = 473 \text{ nm}$.

As diferenças sobre o sistema de imagens apresentado anteriormente é que a folha foi fixada em um anteparo metálico com o auxílio de fita adesiva, não havendo necessidade de porta-amostra e a radiação de excitação da fluorescência é efetuada com um laser somente em um comprimento de onda ($\lambda = 473 \text{ nm}$) na região do azul, faixa do espectro visível.

Os resultados das análises de PCA mostraram também, que a maioria dos *scores* da variedade Natal ficou separada das demais variedades. Esta informação pode ser verificada com o auxílio da Figura 7-a. O gráfico da Figura 7-b mostra que as variáveis de maior informação eram aquelas da escala de cores da matiz (*hue*) entre 1280 e 1311, consequentemente estas foram utilizadas para as investigações posteriores.

As análises exploratórias também foram efetuadas em pares, para ser avaliada a potencialidade de informação destes dados, utilizando a seleção de variáveis da escala matiz. Todos os gráficos dos *scores* referentes a estas análises foram representados na Figura 8. Ainda nesta mesma figura, os resultados foram ordenados entre as seguintes variedades: Natal e Hamlin (Fig. 8-a), Valência e Pêra (Fig. 8-b), Hamlin e Valência (Fig. 8-c), Hamlin e Pêra (Fig. 8-d), Natal e Valência (Fig. 8-e) e, por último Natal e Pêra (Fig. 8-f).

Os grupos que apresentaram alguma propensão para formar grupos distintos foram as variedades Natal e Valência e Natal e Pêra representadas nos gráficos das Figuras 8-e e 8-f, respectivamente.

Estes dados levam ao fato de que este sistema conseguiu distinguir mais nitidamente as amostras de Pêra daquelas da Natal, 83% das amostras (10 *scores*) em comparação ao sistema de imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta.

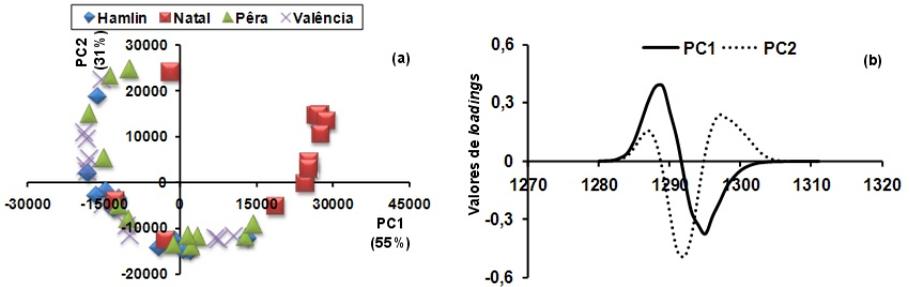


Fig. 7. Gráficos para (a) *scores* das 4 variedades na mesma análise de PCA e (b) *loadings* correspondentes das variáveis da escala de cor matiz para o sistema de imagem de fluorescência induzida por laser, $\lambda = 473 \text{ nm}$.

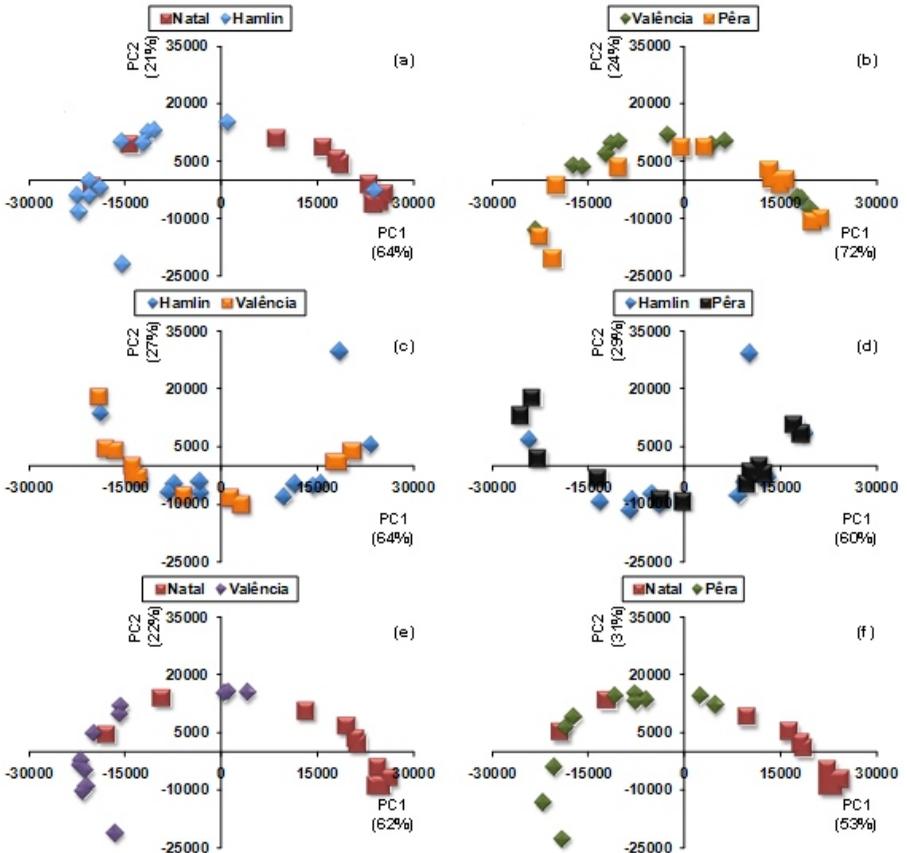


Fig. 8. Gráficos para (a-f) *scores* das variedades utilizando as variáveis da escala de cor matiz para o sistema de imagem de fluorescência induzida por laser, $\lambda = 473 \text{ m}$.

Conclusões

Com o método analítico proposto foi viável efetuar avaliações das variedades de citrus com um menor número de etapas, custo reduzido frente aos métodos existentes e ainda, não é consumido qualquer reagente químico para a aquisição das imagens. Os dois sistemas de imagem são complementares e podem se configurar como uma alternativa aos métodos já existentes. As conclusões adicionais do método foram listadas a seguir:

- (i) Contribuição de um método empregando uma técnica já consolidada para a diferenciação das variedades genéticas de laranja doce;
- (ii) Desenvolvimento de um novo padrão de análise;
- (iii) Utilização de método não-destrutivo, que, em muitos casos, pode minimizar efetivamente o tempo e os custos necessários para a análise;
- (iv) Desenvolvimento de um método ausente de subjetividade e com maior detalhamento do que a inspeção visual.

A vantagem principal da utilização de imagens de fluorescência é que estas podem ser consideradas como uma impressão digital de cada variedade genética. Os resultados obtidos foram preliminares, porém, a viabilidade da certificação de mudas se apresenta como um dos potenciais de aplicação.

Referências

- ANCILLO, G.; GADEA, J.; FORMENT, J.; GUERRI, J.; NAVARRO, L. Class prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling. **Journal of Experimental Botany, Oxford**, v. 58, n. 8, p. 1927-1933, 2007.
- 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.
- BUSCHMANN, C.; LANGSDORF, G.; LICHTENTHALER, H. K. Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. **Photosynthetica**, Prague, v. 38, n. 4, p. 483-491, 2000.
- GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy Part1. classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 767-782, 2003.
- GELADI, P.; SETHSON, B.; NYSTRÖM, J.; LILLHONGA, T.; TORBJÖRN, L.; BURGER, J. Chemometrics in spectroscopy Part 2. Examples. **Spectrochimica Acta Part B**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 1347-1357, 2004.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. 3rd ed. New Jersey: Upper Saddle River, 2008. 954 p.

HIRUMA, T. Photonics Technology for Molecular Imaging. **Proceedings of the IEEE**, New York, v. 93, n. 4, p. 829-843, 2005.

KARABOURNIOTIS, G.; TZOBANOGLU, D.; NIKOLOPOULOS, D.; LIAKOPOULOS, G. Epicuticular Phenolics Over Guard Cells: Exploitation for in situ Stomatal Counting by Fluorescence Microscopy and Combined Image Analysis. **Annals of Botany**, London, v. 87, n. 5, p. 631-639, 2001.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA (ISSN 0103-443X), V. 20, Nº 12, P. 1-60, 2008.

LIAKOPOULOS, G.; STAVRIANAKOU, S.; KARABOURNIOTIS, G. Analysis of Epicuticular Phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* Leaves: Evidence for the Chemical Origin of the UV-induced Blue Fluorescence of Stomata. **Annals of Botany**, London, v. 87, n. 5, p. 641-648, 2001.

SÉRIE INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA (ISSN 1980-346X), V. 19, Nº 1, P. 1-132, 2008.

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

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 402 p.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 37-52, 1987.

Agradecimentos

À FAPESP (2007/08618-2) pela bolsa de pós-doutorado concedida à primeira autora (F.M.V.P.), ao CNPq (578576/2008-2), à FINEP (98/14270-8) e ao Grupo Fischer - Divisão Citrosuco pela cessão das amostras de folhas de citrus.



Embrapa Instrumentação Agropecuária

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

