

Métodos analíticos desenvolvidos para o monitoramento da doença citrus greening em laranja doce: Imagens de fluorescência e Espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS)



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação*

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 35

Métodos analíticos desenvolvidos para o monitoramento da doença citrus greening em laranja doce: Imagens de fluorescência e Espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS)

Fabíola Manhas Verbi Pereira
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Marcelo Camponez do Brasil Cardinali
Paulino Ribeiro Villas Boas
André Leonardo Venâncio
Mariana de Sá Tavares Russo
Polyana Kelly Martins
Juliana Freitas-Astúa

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Sandra Protter Gouvea
Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Victor Bertucci Neto
Revisão de texto: Raíra Valente
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Foco Comunicação
Imagem Capa: Fabíola Manhas Verbi Pereira
Editoração eletrônica: Foco Comunicação

1ª edição

1ª impressão (2011): 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

P436m Pereira, Fabiola Manhas Verbi

Métodos analíticos desenvolvidos para o monitoramento da doença citrus greening em laranja doce: imagens de fluorescência e espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). / Fabíola Manhas Verbi Pereira, Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, Marcelo Camponez do Brasil Cardinali, Paulino Ribeiro Villas Boas, André Leonardo Venâncio, Mariana de Sá Tavares Russo, Polyana Kelly Martins, Juliana Freitas-Astúa. -- São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.

42 p. – (Embrapa Instrumentação. Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, ISSN: 1678-0434; 35).

1. Fitossanidade. 2. Quimiometria. 3. Laser. 4. Doença em citros. 5. Produção de laranja. 6. Citricultura - Doença. 7. Huanglongbing. 8. Química analítica. 9. Interação da luz com a matéria. I. Milori, Débora Marcondes Bastos Pereira. II. Cardinali, Marcelo Camponez do Brasil. III. Boas, Paulino Ribeiro Villas. IV. Venâncio, André Leonardo. V. Russo, Mariana de Sá Tavares. VI. Martins, Polyana Kelly. VII. Freitas-Astúa, Juliana. VIII. Título. IX. Série.

CDD 21 ED. 543
535

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Parte I: Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzido por Laser (LIBS).....	11
Parte II: Imagens de Fluorescência Molecular	25
Conclusões e Perspectivas	36
Referências	37

Métodos analíticos desenvolvidos para o monitoramento da doença citrus greening em laranja doce: Imagens de fluorescência e Espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS)

Fabíola Manhas Verbi Pereira¹
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori²
Marcelo Camponez do Brasil Cardinali³
Paulino Ribeiro Villas Boas⁴
André Leonardo Venâncio⁵
Mariana de Sá Tavares Russo⁶
Polyana Kelly Martins⁷
Juliana Freitas-Astúa⁸

Resumo

A doença *citrus greening* foi efetivamente detectada nos pomares de citros brasileiros em 2004. Desde os primeiros relatos até o momento atual, a referida doença permanece sem qualquer método de detecção precoce. Dentre as alternativas utilizadas pelos produtores para contornar este problema estão as inspeções visuais de pomares, as erradicações de árvores contaminadas e as pulverizações aéreas para controle dos vetores. Entretanto, estes métodos não são eficazes o suficiente para combater a doença e impedir os prejuízos acumulados até então. Mediante este contexto, serão apresentados métodos analíticos visando o monitoramento da doença *citrus greening* em laranja doce que foram desenvolvidos no Laboratório de Óptica e Fotônica da EMBRAPA Instrumentação (São Carlos/SP).

¹Química, Dr., Pós-doutoranda em Química, Embrapa Instrumentação, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. fmverbi@uol.com.br

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

³Físico, Mestrando em Física, Embrapa Instrumentação, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. mcardinalian@gmail.com

⁴Físico, Dr., Pesquisador, Embrapa Instrumentação, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. paulino@cnpdia.embrapa.br

⁵Engenheiro Físico, Msc., Petrobrás, Salvador/BA, alvenancio@yahoo.com.br

⁶Graduanda em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos/SP, russomarianast@gmail.com

⁷Bióloga, Dr., Pós-doutoranda em Biologia, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis/SP, polyana@centrodecitricultura.br

⁸Engenheira Agrônoma, Dr., Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura e do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cruz das Almas/BA, Cordeirópolis/SP, jfastua@centrodecitricultura.br

Com esta finalidade, foram feitas análises de folhas de citros, contaminadas com a *citrus greening* e também saudáveis, utilizando a espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) e imagens de fluorescência molecular (*Fluorescence Imaging*). Tais dados foram confrontados com análise de reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR, *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*), efetuada para detectar o DNA da bactéria causadora da doença. Os elementos obtidos foram avaliados com ferramentas matemático – estatísticas, tais como teste *t*, análise de componentes principais e SIMCA. Com os resultados dos métodos desenvolvidos foi verificado que os espectros de LIBS conseguiram detectar variações nutricionais entre plantas sadias e doentes, e que as imagens de fluorescência com ambos os sistemas (excitação tanto por radiação ultravioleta quanto por laser) mostraram diferenças significativas entre as duas condições após o primeiro mês de inoculação da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Clas).

Palavras-chave: *citrus greening*, *huanglongbing*, HLB, métodos óticos de análise, quimiometria, laranja doce, citros.

Analytical methods developed to monitor citrus greening disease in sweet orange: Fluorescence Images and Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)

Fabíola Manhas Verbi Pereira
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Marcelo Camponez do Brasil Cardinali
Paulino Ribeiro Villas Boas
André Leonardo Venâncio
Mariana de Sá Tavares Russo
Polyana Kelly Martins
Juliana Freitas-Astúa

Abstract

Citrus greening disease was detected in Brazilian citrus crops in 2004. Since the first reports, this disease keeps without any early diagnostic method. To overcome this situation, the citrus producers do the following alternatives: visual inspections of the orchards, contaminated crops irradiations and air pulverizations to try to control the vector. However, these methods are not efficient to against the citrus greening and also to prevent damages. In this way, in this bulletin will be presented developed analytical methods to monitor citrus greening disease in sweet orange. These methods were developed at "Laboratório de Óptica e Fotônica" (São Carlos/SP). For this objective, diseased and healthy leaves of citrus were analyzed using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) and molecular fluorescence images. Confirmation of the citrus greening was also checked monthly using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) for DNA bacterium of causal agent of citrus greening. The generated data were evaluated using mathematic-statistical tools, such as t test, principal component analysis and soft independent modelling of class analogy). From the results of developed methods, it was verified that LIBS spectra lead to detect nutritional variations between healthy and diseased plants and the fluorescence images of both systems (ultraviolet and laser excitations) showed significant differences for plant condition after the first month of inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) bacteria.

Keywords: citrus greening, huanglongbing, HLB, optical methods of analysis, chemometrics, sweet orange, citrus.

Introdução

O primeiro relato da doença *citrus greening* foi evidenciado na região sul da China em 1919, onde se tornou conhecida como *huanglongbing* (HLB) (GRAÇA, 1991). Desde então, esta doença tem causado consequências graves, principalmente para os produtores de laranja doce de todo o mundo (BOVÉ, 2006; SANKARAN et al., 2010). Nos Estados Unidos da América e no Brasil, a *citrus greening* tem sido considerada uma das piores pragas em plantações de citros desde 2004, causando sérios problemas na produção agrícola de ambos os países (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

A *citrus greening* apresenta mecanismos de infecção das plantas que ainda não são totalmente conhecidos e que apresentam peculiaridades que dificultam a sua detecção precoce, seja utilizando inspeção visual ou sequenciamento genético de DNA do patógeno (BOVÉ; GARNIER, 2002).

A primeira dificuldade está relacionada com a forma de infecção da planta (citros): a bactéria denominada *Candidatus Liberibacter* se estabelece no floema, responsável pelos sistemas vasculares das plantas, acarretando na obstrução dele e, conseqüentemente, na distribuição inadequada da seiva para raízes, tronco e folhas (BOVÉ, 2006; BOVÉ; GARNIER, 2002). Este processo, após a infecção da planta, é lento e ocorre em duas fases distintas: inicialmente temos aquela denominada de assintomática e posteriormente a condição sintomática. O vetor natural do patógeno é um inseto denominado *Diaphorina citri*, comumente encontrado nos pomares brasileiros (LOPES et al., 2007).

O período de manifestação da *citrus greening* também é lento, geralmente de 3 a 36 meses referente à fase assintomática. A doença afeta as folhas, ramos e frutos da planta. Após a fase assintomática é evidenciado o surgimento de um ramo ou galho, que se destaca pela cor amarela. As folhas apresentam coloração amarela pálida, com manchas irregulares ou cloroses assimétricas decorrentes de deficiência nutricional de Zn, conforme pode ser visualizado na Figura 1. Por fim as plantas doentes produzem frutos menores e com capacidade menor para produção de suco (GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006; HALBERT; MANJUNATH, 2004).



Fig. 1. Exemplo de uma folha de citros com sintomas iniciais da doença *citrus greening*.

A planta com a bactéria incubada (fase assintomática) também se transforma em uma fonte propagadora complementar da doença, já que um inseto pode ser contaminado ao se alimentar da seiva (BOVÉ, 2006).

Atualmente, para a avaliação completa do processo de infecção da *citrus greening* é necessária uma combinação de informações, como procedência das mudas, localização geográfica dos pomares, periodicidade das inspeções visuais e análises de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a possível detecção do patógeno (BOVÉ, 2006, LOPES et al., 2007).

Para a detecção da *citrus greening* são utilizados atualmente dois métodos: a inspeção visual das árvores em pomares por avaliadores previamente treinados e em escala menor, o PCR (INNIS et al., 1990). As principais limitações destes métodos são, principalmente, a subjetividade na avaliação das plantas, acarretando erros da ordem de 50% ou mais, o diagnóstico, para o caso da inspeção visual e, no caso do PCR, a dificuldade em identificar o DNA da bactéria em árvores de campo (FOLIMONOVA; ACHOR, 2010). Este último fator está associado ao fato de que a fase assintomática pode perdurar entre 3 e 36 meses. No caso da PCR, outra questão apontada é o custo da análise. Além disso, a análise por esta técnica apenas é efetuada primordialmente, quando a árvore já apresenta algum indício de infecção e em número amostral restrito. Estas características não são compatíveis com plantações dedicadas à produção agrícola. Ademais, a bactéria se distribui na planta de forma heterogênea como já apresentado em estudo de Li et al. (2009).

A respeito da bactéria *Candidatus Liberibacter*, vários estudos baseados em sequenciamento genético indicaram três possíveis espécies: *africanus*, *asiaticus* e *americanus* (TEIXEIRA et al., 2005; LI et al., 2006; WANG et al., 2006).

Alguns métodos de diagnóstico da *citrus greening* foram propostos e, dentre eles, foi desenvolvido um kit de detecção da doença (TOSHIKUNI; AKIRA, 2006). O método consiste em quantificar concentrações de ferro e manganês a partir de extratos das plantas doentes, baseando-se no fato de que estes valores são acentuadamente menores nas plantas contaminadas, quando comparados com aqueles das amostras sadias. A limitação deste método está na necessidade de um procedimento de extração para as determinações dos metais, além da inerente geração de resíduos. Outro fator mais limitante é que restringe as determinações a apenas dois micronutrientes, lembrando que variações nos teores de nutrientes também podem estar relacionadas com solo inadequado do ponto de vista nutricional ou adubação ineficiente, dentre outros fatores (NOBEL, 2005).

Hawkins et al. (2010) desenvolveram um método utilizando ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) para avaliar plantas de citros infectadas com *citrus greening*. Os perfis espectrais obtidos de folhas infectadas com esta doença foram comparados com aqueles de folhas contaminadas com outras doenças e também com deficiências nutricionais, tais como de ferro, cobre, zinco, manganês e magnésio.

Para o estudo dos dados de ATR-FTIR foram utilizados modelos construídos com ferramentas quimiométricas, como PCA (*Principal Component Analysis*) e MRL (*Multiple Linear Regression*). Os autores verificaram que as diferenças entre folhas saudáveis e com *citrus greening* foram associadas com a detecção de alterações na faixa de 900 a 1185 cm^{-1} , que caracteriza a presença de carboidratos para este tipo de amostra. Entretanto, o referido estudo não contribuiu para o diagnóstico precoce.

Há estudos relacionados com o tratamento das árvores infectadas com a *citrus greening*, entre estes, foi sugerido por Bové um método para aplicação de antibióticos no sistema radicular ou no tronco (BOVÉ, 1979). Todavia, a questão sobre a distribuição irregular da bactéria na planta se torna novamente uma limitação para a viabilidade deste tipo de procedimento.

O controle do vetor pode ser efetuado por meio de aplicações de pesticidas para evitar a incidência do mesmo (BOVÉ, 2006). Entretanto, já foi comprovada a existência de insetos resistentes. Além disso, este procedimento envolve um impacto ambiental considerável, como por exemplo, a dizimação de insetos polinizadores.

Outra forma utilizada para controlar a doença é a erradicação das árvores sintomáticas (BELASQUE JUNIOR et al., 2009). Entretanto, a probabilidade de árvores assintomáticas serem mantidas nos pomares pode ser alta, já que, como mencionado, os erros decorrentes das inspeções visuais são elevados.

Diante dos problemas apontados nos parágrafos anteriores é incontestável a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo da *citrus greening*, desde a incubação do patógeno, denominada de fase assintomática até a fase sintomática. O monitoramento é fundamental para o controle da doença, evitando assim a proliferação da bactéria nos campos citrícolas até que a cura desta seja encontrada.

Várias estratégias de análise foram estudadas com o intuito de avaliar alterações nas plantas durante as diferentes fases da *citrus greening*, tais como dados gerados pela técnica LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) (LORENZEN et al., 1992; PASQUINI et al., 2007) mostrados na parte I; e dois sistemas distintos para as imagens de fluorescência molecular, abordados na parte II. Os dados gerados por estas técnicas foram avaliados com o auxílio de métodos matemático-estatísticos (GELADI, 2003; SHARAF et al., 1986), e a evolução da doença nas plantas foi simultaneamente investigada com a utilização do método RT-qPCR (*Real Time - Quantitative PCR*).

Para o monitoramento da doença foi elaborado um experimento que teve a duração total de 8 meses, no período de 13 de Julho de 2009 a 01 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 da citrus greening. Outro conjunto com as mesmas características e de igual número de plantas, porém sem inoculações da bactéria, foi mantido como amostras controle.

Os resultados a serem apresentados estão voltados para os experimentos de LIBS e de imagens, que incluiu estabelecer os parâmetros analíticos e realizar as medidas experimentais, além da interpretação dos dados e proposição dos métodos analíticos.

Parte I: Espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS)

A técnica LIBS possibilita efetuar medidas diretas em amostras condutoras ou não condutoras, independente do estado físico (sólido, líquido ou gasoso) e ainda na forma de aerossóis (SANTOS JUNIOR et al., 2006). 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 a 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 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 à distância em sistemas remotos (WHITEHOUSE et al., 2001), dentre elas, a configuração de um sistema LIBS viabiliza a portabilidade de equipamentos para medidas *in loco* (WAINNER et al., 2001).

Alguns fatores relevantes fazem parte do processo de excitação e emissão e devem ser considerados em estudos com a LIBS. O primeiro está relacionado com a interação entre o laser e a amostra; o segundo corresponde àquela entre o laser e o material gerado por meio da ablação (elétrons, moléculas, átomos, íons e partículas finas); e por último, a energia remanescente do pulso.

A combinação destes três fatores é primordial para que, na condição de excitação e de emissão espectral, sejam atingidas reprodutibilidade e sensibilidade durante as determinações analíticas. Vale ressaltar que os fenômenos que ocorrem entre a interação do laser e a amostra podem ser resumidos em vaporização da amostra, dissociação, aquecimento e transferência de massa e, finalmente, ionização e excitação do material que foi gerado (SIRVEN et al., 2008; COLONNA et al., 2001).

Devido à complexidade da informação analítica gerada por espectros LIBS, o número de estudos relacionados com o desenvolvimento de métodos matemático – estatísticos, para que toda a informação da técnica seja explorada ao máximo, aumentou principalmente entre os períodos de 2000 a 2010 (BRAGA et al., 2010; CLEGG et al., 2009).

Parte Experimental

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* (L.) Osbeck] em porta-enxerto de Citrumelo Swingle [*Citrus paradisi* Macfad. cv. Duncan X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.].

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 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.

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 um procedimento padrão, baseado em uma divisão imaginária nas plantas, representadas por linhas horizontais pontilhadas na Figura 2.

As amostras então foram retiradas do terceiro conjunto de folhas, considerando o sentido de cima para baixo, tendo como referência o ápice da planta, conforme pode ser visualizado também na Figura 2. Este padrão de amostragem foi mantido, porque em uma mesma planta pode haver folhas jovens que são produzidas nas brotações da planta, e folhas maduras que estão há mais tempo na planta. Assim, utilizando a mesma posição nas coletas, foi estabelecido que as folhas tivessem aproximadamente a mesma idade.

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 porque foi necessária uma pausa decorrente de mudança de local de laboratório, atrelada ao fato de que os equipamentos tiveram que ser desmontados para este processo. Assim, para o período do sexto mês, após as inoculações, não foi possível gerar dados.

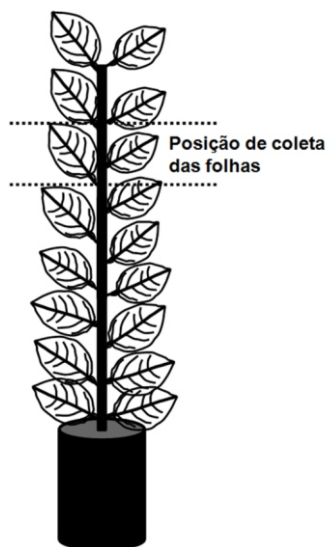


Fig. 2. Posição de coleta das folhas nas plantas de citros para as medidas analíticas.

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 ($\lambda = 1064 \text{ nm}$), 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, que englobam a faixa espectral de 189 a 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 μ s e a energia do laser foi de 50 mJ. As medidas foram feitas 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 como pode ser verificado na Figura 3. As posições das medidas nas folhas foram marcadas manualmente nas direções X e Y.

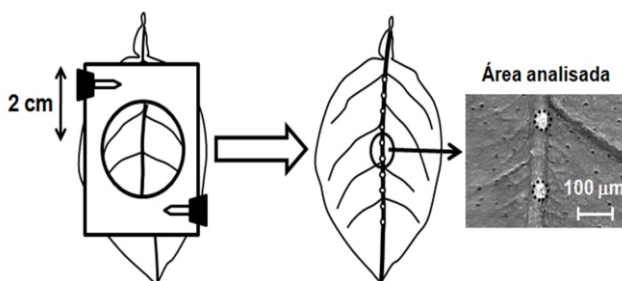


Fig. 3. Representação esquemática dos pontos mapeados nas folhas de citros com a técnica LIBS.

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 mostra a 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.

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 mesmo programa.

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 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.

Resultados e Discussões

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. Estas informações podem ser verificadas com o auxílio da Figura 4.

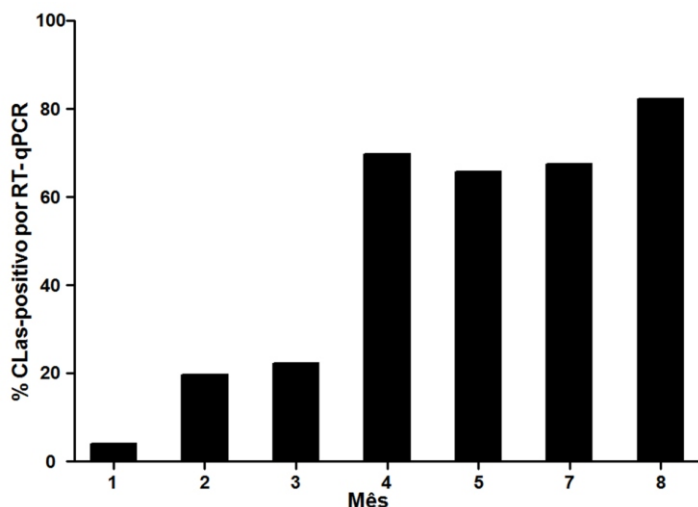


Fig. 4. Valores em porcentagem para as amostras de folhas de citros com diagnóstico positivo para CLAs analisadas utilizando RT-qPCR.

Neste sentido, verificou-se que o diagnóstico da *citrus greening*, 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, muitas vezes para uma determinada amostragem proveniente de planta inoculada não ocorria um diagnóstico positivo em todas as folhas (três por planta). Vale ressaltar que a bactéria efetivamente não se distribui igualmente na planta (LI et al., 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.

Os nossos resultados estão em concordância com estudo reportado na literatura utilizando PCR associado com TEM (*Transmission Electron Microscopy*) sobre detecção precoce do *citrus greening* (FOLIMONOVA; ACHOR, 2010).

Folimonova e Achor avaliaram plantas de citros de uma casa de vegetação e verificaram que a precocidade do PCR no diagnóstico da *citrus greening* 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 com dados da literatura, foi verificado claramente que o diagnóstico da *citrus greening* 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).

De qualquer forma, as amostras inoculadas e que foram diagnosticadas como CLas-negativo, para o início do experimento (os três primeiros meses), foram consideradas doentes nos modelos que serão descritos a seguir.

Tratamento quimiométrico dos dados de LIBS

Um total de 2560 folhas foi analisado, considerando sadias (1273) e doentes (1287). 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). A região da nervura central não apresentou diferenças significativas quanto à composição nutricional para este estudo, em relação às outras partes da folha. Estes resultados estão em concordância com o estudo prévio efetuado com medidas de micro fluorescência de raios-X excitada com radiação síncrotron (μ SR-XRF, *Micro Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence*) (PEREIRA; MILORI, 2010).

A justificativa para as medidas terem sido feitas somente na região da nervura central da parte posterior da folha (Fig. 5a), é que esta região apresenta um diâmetro maior do que aquele da parte anterior da folha (Fig. 5b), propiciando melhor focalização do laser. Outra questão é que a espessura da nervura central é maior também que aquela das laterais da folha e, esta propriedade evitou que os pulsos de laser atravessassem as folhas, como destacado ainda pela elipse em laranja na Figura 5a.

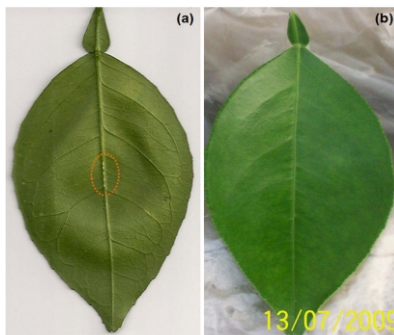


Fig.5. Exemplo de folhas de citros evidenciando as partes (a) Posterior e (b) Anterior.

Foram efetuados testes com outras áreas da folha e, no caso, os pulsos de laser possuíam energia suficiente para penetrar na folha, e medir através da dela o que poderia acarretar em possíveis interferências no espectro, como exemplo, resultantes do anteparo do equipamento onde a amostra era colocada para as medidas.

O desafio deste estudo foi efetuar as medidas diretamente nas folhas, ou seja, sem qualquer pré-tratamento das amostras. Algumas propriedades inerentes às amostras podem afetar a análise direta das mesmas. Estas propriedades estão relacionadas com efeitos de matriz, composição química, espessura, tamanho de partícula e planicidade, dentre outras (KRASNIKER et al., 2001; CABALÍN et al., 2010). Além disso, podem influenciar na interação entre o laser e a amostra e, conseqüentemente, reduzir a intensidade nas linhas dos elementos detectados ou diminuir a razão sinal/ruído nos espectros. Neste sentido, ferramentas quimiométricas foram utilizadas com o objetivo de extrair o máximo de informação deste tipo de espectro (GELADI, 2003; SHARAF et al., 1986; MASSART et al., 2001; BRO; SMILDE, 2003).

Os espectros de LIBS registrados apresentaram alta resolução, aproximadamente 0,1 nm, gerando um número de 13.746 variáveis, como pode ser visualizado na Figura 6a. 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 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.

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.

Outra limitação com estes dados estava relacionada com a linha de base dos espectros. No espectro apresentado na Figura 6a 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).

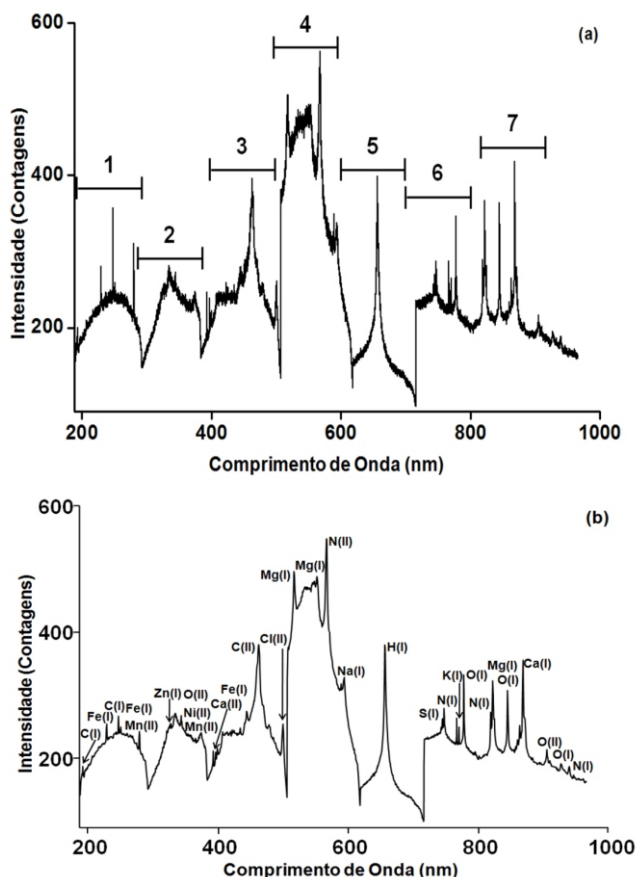


Fig. 6. (a) Espectro de um dos pontos mapeados em uma folha de citros sadia gerado com a LIBS, resolução 0,1 nm e (b) Espectro transformado efetuando a média a cada 10 variáveis independentes, resolução 1,0 nm.

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 à zero (BRO; SMILDE, 2003).

Outras tentativas de pré-processamento dos espectros foram testadas, como o auto escalamento 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.

Um exemplo de espectro de LIBS com as linhas detectadas para uma folha de planta sadia é mostrado na Figura 6b. Com este mesmo espectro foi possível verificar a detecção de seis micronutrientes nas folhas de citros: Fe, Zn, Ni, Mn, Cl e Na. Linhas para os três constituintes principais, C, H e O, e cinco macronutrientes, Ca, N, K, Mg e S, também foram verificadas. As linhas espectrais para cada elemento foram atribuídas com a utilização da base de dados espectrais do *National of Standards and Technology* - NIST (NIST ATOMIC SPECTRA DATABASE).

Os dados gerados foram essencialmente qualitativos e, para este estudo, não foram avaliadas concentrações dos macro e micronutrientes das plantas.

Análises das folhas de citros com os dados de LIBS

A primeira informação proveniente dos dados mostra que não foi possível visualizar qualquer diferença entre as condições (sadia e doente) quando os espectros de todas as amostras (do primeiro ao oitavo mês) foram colocados em um mesmo modelo de análise exploratória com a PCA.

Um dos resultados interessantes gerados pela PCA foi que as amostras mostraram a tendência de diferenciação baseada nas idades das plantas. No caso, o valor médio dos desvios calculado para os sinais analíticos, entre períodos, foi de 56 e 58 contagens, para sadias e doentes respectivamente.

A partir desta informação os conjuntos de dados foram avaliados separadamente por períodos, efetuando-se sete modelos de PCA (um para cada mês estudado). Toda a região espectral foi incluída nestas análises, não sendo efetuada seleção de variáveis. Os modelos por idade também são interessantes e aplicáveis, considerando que a idade das plantas geralmente é um parâmetro bem controlado em plantações de citros e também em casas de vegetação.

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 saudias e outra para aquelas inoculadas. 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 saudias 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 7b. Os macronutrientes foram importantes, principalmente neste estágio, para o crescimento e processos de regulação nas plantas (BUCHANAN et al., 2002; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

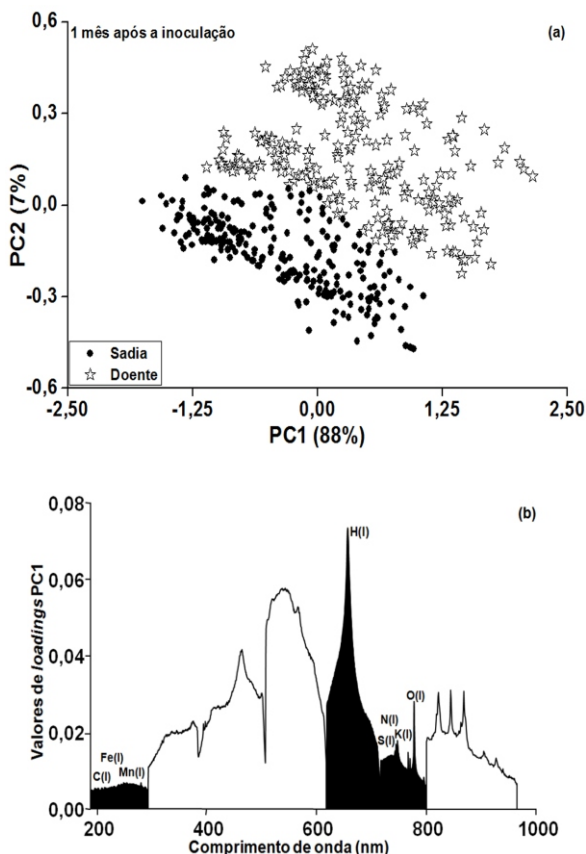


Fig. 7. (a) Gráficos para os *scores* e (b) Pesos das variáveis para matriz de dados com 510 espectros e 1.375 variáveis, após um mês de inoculação.

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 três primeiros meses após a inoculação do patógeno.

Os maiores valores de pesos das variáveis visualizados nas componentes principais, foram utilizados como critério para selecionar os elementos importantes para a condição de amostras sadias mostrados na Tabela 1. Esta informação sempre foi avaliada juntamente com os grupos visualizados nos gráficos de *scores*.

Tabela 1. Variáveis importantes para a discriminação da condição de sadias em folhas de citros, a partir das análises de PCA.

Período das medidas (Mês)		1º	3º	5º	8º
Constituintes principais	C	R	R	N	R
	H	R	R	R	R
	O	R	R	N	R
Macronutrientes	Ca	N	R	N	N
	K	R	R	N	N
	Mg	N	R	R	N
	N	R	R	R	N
Micronutrientes	S	R	R	N	N
	Cl	N	R	N	N
	Fe	R	R	N	R
	Mn	R	R	N	R
	Na	N	R	R	N
	Ni	N	R	N	R
	Zn	N	R	N	R

R = Relevante, N = Negligível

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 *citrus greening*, como regiões com manchas amarelas irregulares, que podem ser verificadas na Figura 1. 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(II) (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), como mostrados na Tabela 1.

Os micronutrientes foram também mais relevantes do que no período anterior, como indicado nesta mesma tabela, sendo atribuídos às novas modificações no metabolismo das plantas durante a fase de crescimento. Estes micronutrientes contribuem para a estrutura de componentes celulares (BUCHANAN et al., 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 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 μ SR-XRF (PEREIRA; MILORI, 2010).

Os resultados dos modelos de PCA, resumidos na Tabela 1, mostram que a linha detectada para o H foi constante sobre os quatro diferentes intervalos. As amostras sadias apresentaram maior tendência de serem associadas com a composição orgânica. No terceiro mês, a presença de micronutrientes como Mn, Cl e Na mostrou evidências sobre novos processos nas plantas sadias. No último período das medidas, as contagens para o Zn reduziram em até 76% para algumas plantas doentes. Neste estágio, a influência do Zn foi relacionada principalmente com o amarelamento das folhas. Estes resultados enfatizaram que plantas maduras, tendo como referência aquelas de condição sadia, apresentaram diferentes características nutricionais, que foram indicadas pelas variações dos seus constituintes como mostra a Tabela 1.

Potencialidades dos modelos de classificação

O potencial dos espectros de LIBS na identificação das plantas infectadas pela *citrus greening* foi estimado por meio dos quatro modelos de classificação, construídos 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 *citrus greening*, utilizando espectros de μ 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, visto 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 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 para os conjuntos de treinamento e de validação foi de 97% e de 100% respectivamente, considerando as folhas de citros doentes, como mostrado na Tabela 2. 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 (Fig. 4).

Tabela 2. Resultados para os conjuntos de treinamento e validação utilizando dados de LIBS e SIMCA.

1 ^o mês					Conjunto de validação (115 espectros)				
Conjunto de treinamento (393 espectros)									
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)	Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	175	28*	0	86	Sadia	55	2*	0	96
Doente	5*	185	0	97	Doente	0*	58	0	100
3 ^o mês					Conjunto de validação (75 espectros)				
Conjunto de treinamento (708 espectros)									
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)	Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	304	42*	1	88	Sadia	25	0*	1	96
Doente	13*	348	0	96	Doente	0*	49	0	100
5 ^o mês					Conjunto de validação (93 espectros)				
Conjunto de treinamento (836 espectros)									
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)	Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	373	62*	2	85	Sadia	42	0*	1	98
Doente	69*	327	3	82	Doente	3*	46	1	92
8 ^o mês					Conjunto de validação (87 espectros)				
Conjunto de treinamento (813 espectros)									
Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)	Condição	Sadia	Doente	Sem classificação	Previsões corretas (%)
Sadia	349	58*	5	85	Sadia	28	7*	3	74
Doente	63*	336	2	84	Doente	4*	43	2	88

*Previsões incorretas

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, foram 96% e 100% de previsões corretas para as folhas doentes, usando como parâmetro os conjuntos de treinamento e validação respectivamente.

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.

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, foram 96% e 100% de previsões corretas para as folhas doentes, usando como parâmetro os conjuntos de treinamento e validação respectivamente. 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 82 e 92%, para os conjuntos de treinamento e validação respectivamente. 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. A distribuição foi sete para o modelo de treinamento e cinco para o de validação. Para o conjunto de treinamento, cinco amostras saudáveis não foram incluídas em qualquer categoria, já para o conjunto de validação, três não foram classificadas.

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 2 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 estes os valores de resíduos e de *leverage* das análises de PCA.

Resultados interessantes foram obtidos durante os últimos períodos (a partir do quinto até o oitavo mês), nos quais os valores das previsões corretas foram menores do que aqueles observados para os períodos anteriores. Mesmo assim eles foram considerados estatisticamente bons, ou seja, o número de previsões foi maior do que 74% para as amostras sadias do conjunto de validação (PEREIRA et al., 2010).

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).

Parte II: Imagens de Fluorescência Molecular

De forma geral, o princípio do fenômeno de fluorescência está fundamentado na luminescência, que 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 é então chamada fotoluminescência (fluorescência e fosforescência), a qual é um dos efeitos físicos decorrentes desta interação (SKOOG et al., 1998).

A emissão da fluorescência ocorre em comprimentos de onda maiores que aquele de excitação. O tempo médio de duração do estado excitado da fluorescência é menor do que 10^{-7} s. Os sinais analíticos para este fenômeno óptico podem ser registrados na forma de espectros de excitação e de emissão e também, como imagens (SKOOG et al., 1998; VALEUR, 2002).

As alternativas potenciais de análises voltadas para diagnóstico de doenças e monitoramento de processos em plantas incluem técnicas de fluorescência molecular (VALEUR, 2002). Os estudos reportados na literatura partem do princípio que a imagem proveniente de excitação da fluorescência, em uma matriz de amostras proveniente de plantas, pode detectar mudanças no metabolismo das referidas amostras. Estas mudanças são registradas nas imagens por diferentes nuances de cores correspondentes àqueles compostos que foram excitados por meio de fluorescência (fluoróforos ou compostos absorventes da radiação de excitação). Estes compostos podem ser intrínsecos à planta ou originados por algum processo externo, e são denominados de metabólitos (BUSCHMANN et al., 2000).

Os metabólitos nas plantas podem ser divididos em duas categorias: primários e secundários. Os primários estão relacionados aos processos essenciais das plantas, tais como fotossíntese, respiração e transporte de nutrientes, sendo comuns a todas as plantas. Os aminoácidos, a clorofila e os carboidratos são alguns exemplos destes compostos. Já aqueles secundários são gerados na planta, e assim podem ser utilizados como indicadores de estresse causado por fatores ambientais ou ainda por doenças, pois não são comuns a todas as plantas. Os compostos alcaloides e fenólicos bem como, os terpenos, são os maiores representantes de tipos de metabólitos secundários (NOBEL, 2005; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

A respeito das respostas da planta aos fatores de estresse é possível inferir que a partir do momento em que a planta foi contaminada, o metabolismo da mesma entra em desequilíbrio e, conseqüentemente, ocorrem alterações químicas e físicas. Isto pode ser fundamentado no fato que folhas sadias com coloração verde apresentam absorção máxima na região do azul (400 - 500 nm) e do vermelho (600 - 700 nm) (LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997).

Na literatura, estudos utilizando imagens de fluorescência geradas para folhas de citros foram avaliados como método de monitoramento de processos em plantas (LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997; MEYER et al., 2003). Nestes 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 proposta por estes sistemas é a possibilidade de que a fluorescência medida nas folhas, correspondente a diferentes respostas das regiões do espectro como azul, verde, vermelho e vermelho-distante, pode ser investigada e, principalmente, estes dados podem ser associados às características específicas de cada planta (LICHTENTHALER; MIEHÉ, 1997; MEYER et al., 2003).

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 de cada descritor de cor, 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 e, o eixo da ordenada caracteriza as contagens de cada descritor. Estes histogramas podem ser gerados para qualquer imagem (GONZALEZ; WOODS, 2008). As frequências com as quais cada descritor ocorrem podem ser calculadas com equações descritas na literatura (ANTONELLI et al., 2004).

Parte experimental

Os procedimentos sobre cada etapa "*Amostras de Citros e Procedimento de Inoculação da Bactéria*", "*Amostragem*" e "*Testes de RT-qPCR*" foram aqueles descritos na Parte I para os experimentos de LIBS. A única diferença é que para a geração das imagens de fluorescência, as referidas eram registradas no mesmo dia em que as folhas foram coletadas.

Sistema de Imagem de Fluorescência Induzida por Radiação Ultravioleta Incoerente

Para obtenção das imagens de fluorescência induzida por radiação ultravioleta incoerente foi utilizada uma câmera digital (AxioCamMRc5, 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 μ 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 1292 x 968 *pixels* (largura x altura) e 24 *bits* de intensidade. 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.). Esta configuração foi útil para aumentar a planicidade das folhas, o que consequentemente proporcionou um 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 de 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 s para cada medida. Foram efetuadas na parte central e posterior da folha, onde não foi incluída a nervura central. A imagem da nervura central causava problemas no foco e por isto não pode ser considerada. De acordo com os nossos testes, foi observado que a parte anterior da folha apresenta fluorescência menos intensa do que 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.

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 é composto de laser de diodo no estado sólido pulsado na região do azul (DPSSL-473-50, Roithner LaserTechnik, Viena, Áustria) e um filtro ótico para a banda de 473 nm (Melles Griot Photonics Components Group, Carlsbad, E.U.A.) de dimensões 50 x 50 x 3 (mm) de 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 (3M do Brasil, Sumaré, Brasil) 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 s. O aumento utilizado na câmera digital foi de 3,6 vezes. As dimensões de cada imagem foram 3264 x 2448 *pixels* (largura x altura) e 24 *bits* de intensidade. As resoluções vertical e horizontal foram de 72 dpi cada. A função *flash* foi desativada. A distância focal da câmera foi de 13 mm.

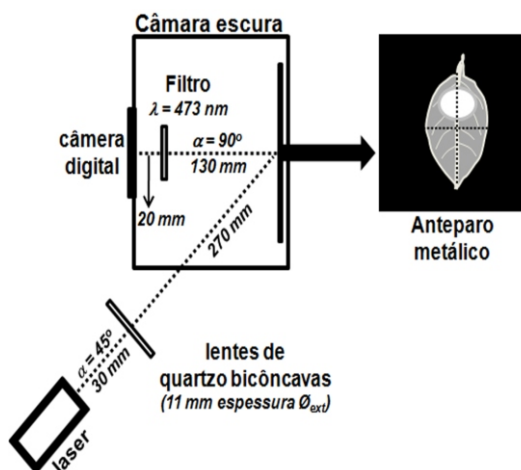


Fig. 8. Configuração do sistema de imagem de fluorescência induzida por laser (LIFI).

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, visto que nas imagens provenientes do estereomicroscópio foi verificada a presença de orifícios (referente aos estômatos, circulados com linhas brancas pontilhadas) e regiões mais escuras com foco deficiente, como exemplificado na Figura 9a; ou ainda, no caso das imagens de LIFI, as áreas com muita saturação poderiam acarretar em informações equivocadas, como mostra a Figura 9b. 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 9.

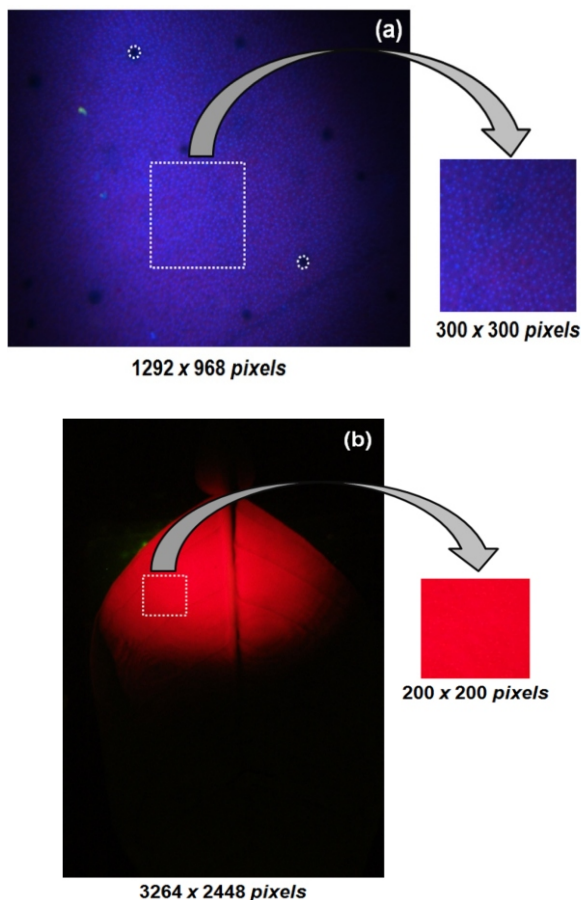


Fig. 9. (a) Imagem de fluorescência induzida por radiação ultravioleta e (b) Imagem de fluorescência induzida por laser (as imagens estão em escalas diferentes).

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, E.U.A.).

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), 769-1024 (L), 1025-1280 R relativo (rR), 1281-1536 G relativo (rG), 1537-1792 B relativo (rB), 1793-2048 (H), 2049-2304 (S), e 2305-2560 (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.

Resultados e Discussão

Avaliação dos descritores de cores

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 se tornou claramente univariada e o uso de métodos multivariados foi desnecessário.

Para confirmar esta observação uma segunda estratégia foi adotada: onde um teste *t* pareado (CHRISTIAN, 2004) foi feito 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, conseqüente, os valores de cada área foi o parâmetro empregado para estas interpretações.

Para um total de 2184 histogramas gerados a partir das imagens para ambas as condições das plantas sadias (1092) e doentes (1092), 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, em que um valor de *t* foi obtido 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 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. Com isso, as avaliações foram então executadas separadamente para cada período.

Avaliação das Áreas dos Histogramas da Cor Verde (AHV) Sistema de Imagem de Fluorescência Induzida por Radiação Ultravioleta

A Figura 10 mostra alguns exemplos de imagens de fluorescência obtidas com a excitação UV, representativas para as folhas saudias e doentes. As colunas à esquerda e à direita das imagens representam folhas saudias e doentes, respectivamente. A partir destas imagens é observado visualmente que as saudias são mais escuras que àquelas 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 10h e 10j. Os histogramas para o verde mostrados na Figura 10 foram ajustados na mesma escala, para efetuar esta comparação.

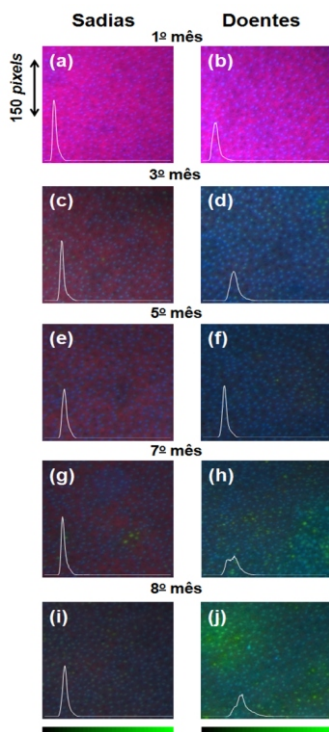


Fig. 10. Exemplos de imagens de fluorescência induzida por radiação ultravioleta incoerente, registradas para diferentes períodos após inoculação com CLas, utilizadas para avaliar plantas de citros saudias e doentes. Os histogramas para o descritor verde estão representados no interior das imagens com linhas brancas.

Outra observação para as imagens exemplificadas na Figura 10 foi relacionada com a intensidade das contagens para as cores da escala verde. No caso das plantas doentes a variação foi entre 3488 e 5875 (diferença de 68%); por outro lado, plantas sadias tiveram variações menores entre 7565 e 9218 (22%) para a mesma escala de cor.

Os histogramas para o verde apresentados na Figura 11 mostraram esta informação muito claramente, como a região destacada em preto nesta mesma figura para a condição de sadias para a folha de citros. Com estas informações pode ser inferido que as cores escuras da escala de verde foram os indicadores da condição sadia e àquelas claras, de doente.

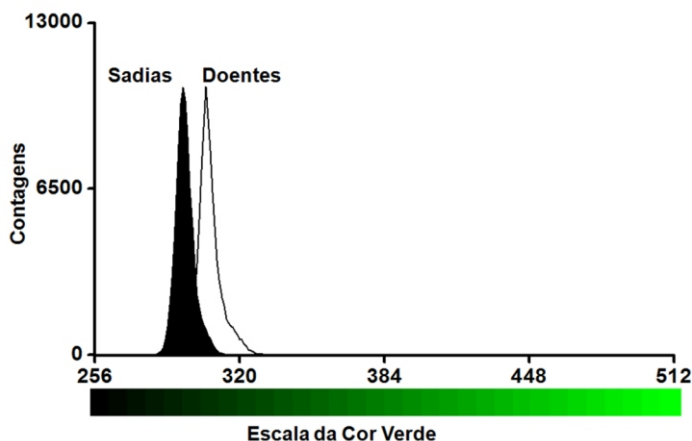


Fig. 11. Histogramas para o descritor verde das imagens de fluorescência induzida por radiação ultravioleta incoerente de folhas de citros sadias e doentes, após cinco meses de inoculação com a bactéria *Clas*.

A Figura 12 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 sadias e doentes utilizando os dados de áreas dos histogramas do verde (Fig. 12). Informação adicional que pode ser observada na Figura 12 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 Fig. 12) 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 cada período (PEREIRA et al., 2011a).

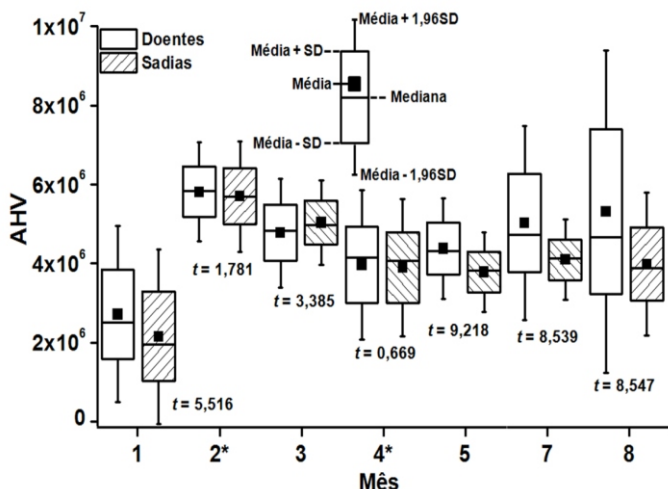


Fig. 12. Gráfico do tipo *Box plot* para as áreas dos histogramas do verde (AHV) provenientes dos 2184 histogramas das imagens de fluorescência induzida por radiação ultravioleta, considerando diferentes períodos após a inoculação com CLas, no intervalo de confiança de 95% ($t_{\text{tab}} = 1,968$, G.L. = 310, $P < 0,05$).

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.

Os primeiros sintomas da *citrus greening* como as regiões com manchas amarelas foram notadas por inspeção visual apenas a partir do terceiro mês de inoculação (Fig. 1). Em campos de cultivo, estes sintomas iniciais podem ser erroneamente interpretados como deficiência nutricional nas plantas ao invés da *citrus greening*. Torna-se importante mencionar que após 8 meses de experimentos algumas plantas inoculadas com a bactéria apresentavam folhas com características visuais saudáveis.

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

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 13.

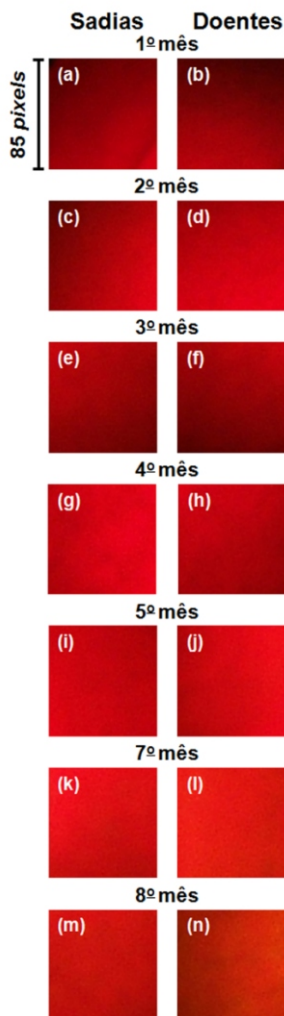


Fig. 13. Exemplos de imagens de fluorescência induzida por laser, registradas para períodos distintos após inoculação com Clas.

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 porque 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.

O resultado extraído 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 3.

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 que para as sadias no 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 3. Valores de t de *Student* pareado calculados a partir da média dos descritores de cores para imagens de fluorescência para folhas sadias e daquelas inoculadas com a bactéria CLas. Os valores de t marcados com asterisco são maiores que aquele do t_{crit} .

Mês	n	G.L.	Valores de <i>t</i> para os descritores de cores										<i>t</i> _{crit} , <i>P</i> < 0.05 % (+ CLas)	
			R	G	B	H	S	V	rR	rG	rB	L		
1 ^a	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
2 ^a	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
3 ^a	351	349	1,547	2,161*	1,280	0,342	1,523	1,547	2,383*	0,622	1,041	1,650	1,967	
4 ^a	345	343	3,371*	1,734	2,689*	1,348	2,233*	3,371*	0,701	2,320*	2,516*	3,171*	1,967	70
5 ^a	354	352	0,155	3,282*	0,584	1,758	3,506*	0,155	1,976*	3,477*	1,161	0,150	1,967	
7 ^a	411	409	0,606	6,611*	1,374	9,961*	3,844*	0,606	5,992*	8,170*	3,779*	1,840	1,966	
8 ^a	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 *citrus greening*, 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, que poderia ser efetuada automaticamente utilizando uma rotina de programa computacional. Isto poderia tornar as avaliações mais rápidas. De qualquer forma, a utilidade da informação das imagens de fluorescência foi estabelecida.

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

As plantas, independente da condição (doente ou sadia), mostraram diferenças na idade, mês a mês. Assim, os modelos foram executados para cada período separadamente. Aqueles individuais mostraram-se potencialmente úteis e aplicáveis na impressão digital de folhas de citros doentes e sadias, visto que a idade das plantas é um parâmetro bem controlado nos campos de cultivo.

O método desenvolvido com espectros gerados por LIBS associado à ferramenta quimiométrica SIMCA apresentou índices de acertos superiores a 97% para as folhas doentes, com maior potencial para o diagnóstico precoce que o PCR, de apenas 4% de detecções positivas para CLas, no primeiro período (mês 1).

Todos estes dados relatados levam a considerar que a LIBS juntamente com métodos matemático - 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 do teste *t* apresentou um padrão para o monitoramento da *citrus greening*. As vantagens deste método incluem análises sem pré-tratamento químico das amostras, eliminação da natureza subjetiva casada com a inspeção visual e alternativa potencial em relação ao método PCR.

O fenômeno da fluorescência associado a um padrão de variação de um descritor de cor nas plantas se apresentou como indicativo de alguns processos de estresse relacionados à infecção com a bactéria *Clas*.

Estes dois sistemas empregaram uma técnica consolidada para a avaliação das plantas, introduziram um novo modelo de análise (histogramas dos descritores de cores e de teste *t*) e utilizam um método não destrutivo que, em muitos casos, pode minimizar o tempo e o custo das análises e, claramente, pode revelar mais informação do que a inspeção visual.

Um dos exemplos de aplicação dos métodos de imagens é gerar uma biblioteca com padrões de imagens de fluorescência para plantas de citros doentes, ou ainda aquelas sadias. O uso deste tipo de ferramenta poderia minimizar a presença de plantas assintomáticas nas plantações controlando a disseminação da doença, desde o primeiro mês.

As perspectivas quanto à busca do diagnóstico ou elucidação dos efeitos na planta são novos estudos que 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.

Referências

- 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 o 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. 1542-1549, 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.

BOVÉ, J. M.; **Treatment of citrus greening by application of penicillin-G ampicillin or carbenicillin.** Institute National de la Recherche Agronomique (INRA) FR2419674-A1 e FR2419674-A.16 de Novembro de 1979.

BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Clare, v. 163, n. 6, p. 1083-1098, 2002.

BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; SANTOS JR., D.; KRUG, F. J. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 66-74, 2010.

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. 1366 p.

BUSCHMANN, C.; LANGSDORF, G.; LICHTENTHALER, H. K. Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. **Photosynthetica**, Dordrecht, v. 38, n. 4, p. 483-491, 2000.

CABALÍN, L. M.; GONZÁLEZ, A.; RUIZ, J.; LASERNA, J. J. Assessment of statistical uncertainty in the quantitative analysis of solid samples in motion using laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 680-687, 2010.

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

CLEGG, S. M.; SKLUTE, E.; DYAR, M. D.; BAREFIELD, J. E.; WIENS, R. C. Multivariate analysis of remote laser-induced breakdown spectroscopy spectra using partial least squares, principal component analysis, and related techniques. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 79-88, 2009.

COLONNA, G.; CASAVOLA, A.; CAPITELLI, M. Modelling of LIBS plasma expansion. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 567-586, 2001.

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

GALIOVÁ, M.; KAISER, J.; NOVOTNÝ, K.; NOVOTNÝ, J.; VACULOVIČ, 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.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy - Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 767-782, 2003.

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

GRAÇA, J. V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (sternorrhyncha: psyllidae) and citrus greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

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. 6007-6010, 2010.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. 482 p.

KRASNIKER, R.; BULATOV, V.; SCHECHTER, I. Study of matrix effects in laser plasma spectroscopy by shock wave propagation. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 609-618, 2001.

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**, St. 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.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BARBOSA, J. C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 4, p. 463-468, 2007.

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. 1029-1035, 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.

NIST - The National Institute of Standards and technology. **NIST Atomic Spectra Database**: version 4. Gaithersburg, 2011. Disponível em: <<http://physics.nist.gov/asd3>>. Acesso em: jun. 2010. [Online].

NOBEL, P. S. **Physicochemical and Environmental Plant Physiology**. 4th ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. 600 p.

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. 18 p. (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.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ÁSTUA. 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.

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.

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.; MISHRA, A.; EHSANI, R.; DAVIS, C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 1-13, 2010.

SANTOS JUNIOR, D.; TARELHO, L. V. G.; KRUG, F. J.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L.; VIEIRA JUNIOR, N. D. Espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS) - fundamentos, aplicações e perspectivas. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 24, p. 72-81, 2006.

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

SIRVEN, J. B.; MAUCHIEN, P.; SALLÉ, B. Analytical optimization of some parameters of a Laser-Induced Breakdown Spectroscopy experiment. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, n. 10, p. 1077-1084, 2008.

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

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

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus huanglongbing in São Paulo state, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, n. 3, p. 173-179, 2005.

TOSHIKUNI, M.; AKIRA, S. **Method and kit for detecting citrus greening disease**. JP 2006267092-Am. 05 Oct. 2006. Hiroshima University, Dokuritsu Gyosei

VALEUR, B. **Molecular fluorescence**: principles and applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 402 p.

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.

WANG, Z.; YIN, Y.; HU, H.; YUAN, Q.; PENG, G.; XIA, Y. Development and application of molecular-based diagnosis for 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. the causal pathogen of citrus huanglongbing. **Plant Pathology**, Malden, v. 55, n. 5, p. 630-638, 2006.

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.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Instrumentação

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP

Telefone: (16) 2107 2800 - Fax: (16) 2107 2902

www.cnpdia.embrapa.br - sac@cnpdia.embrapa.br

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L

