

## Diagnóstico de Citrus Greening (HLB) utilizando espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS)

Débora M. B. P. Milori<sup>1\*</sup>, Paulino Villas Boas<sup>1\*</sup>, André Leonardo Vemâncio<sup>2</sup>, Marcelo C. B. Cardinali<sup>3</sup>, Ednaldo J. Ferreira<sup>4\*</sup>, Polyana Kelly Martins<sup>5\*</sup>, Juliana Freitas-Astúa<sup>6\*</sup>, Joana Bresolin<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Pesquisador, Embrapa Instrumentação, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, Brasil

<sup>2</sup> Pós-graduando, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FCLRP, Universidade de São Paulo – USP, Av. Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>3</sup> Pós-graduando, Instituto de Física de São Carlos – IFSC, Universidade de São Paulo – USP, Av. do Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos, Brasil

<sup>4</sup> Analista, Embrapa Instrumentação, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, Brasil

<sup>5</sup> Pós-doc, Centro Apta Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP, Brazil

<sup>6</sup> Pesquisador, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa, s/n. Cruz das Almas, BA, Brazil

\*e-mail: [debora@cnpdia.embrapa.br](mailto:debora@cnpdia.embrapa.br); [paulino@cnpdia.embrapa.br](mailto:paulino@cnpdia.embrapa.br); [mcardinalian@gmail.com](mailto:mcardinalian@gmail.com); [ednaldo@cnpdia.embrapa.br](mailto:ednaldo@cnpdia.embrapa.br); [polyana@centrodecitricultura.br](mailto:polyana@centrodecitricultura.br); [jfastua@centrodecitricultura.br](mailto:jfastua@centrodecitricultura.br); [jbresolin@cnpdia.embrapa.br](mailto:jbresolin@cnpdia.embrapa.br);

**Resumo:** O Greening ou Huanglongbing (HLB) é uma das mais sérias doenças que a citricultura mundial enfrenta. Após causar muitos estragos na Ásia e na África, a doença surgiu no Brasil em 2004 e nos EUA em 2005. Plantas novas infectadas não chegam a produzir e plantas adultas doentes apresentam queda de frutos e perda de produção. O principal sintoma que leva ao diagnóstico em campo é o mosqueado amarelado das folhas, que aparece em média cerca de um ano após a contaminação, já em um estágio avançado da doença. A transmissão ocorre através do psílídeo *Diaphorina citri*, um pequeno inseto que se alimenta da seiva elaborada. O controle realizado pelos produtores consiste em inspeções visuais frequentes para erradicação de plantas sintomáticas e pulverizações constantes para o controle do vetor. Entretanto, isso não está sendo suficiente para a contenção da doença. Nesse contexto, foi avaliado o potencial de uma metodologia para detecção precoce da doença que permita a confecção de mapas de infestação no campo. Para tanto, durante oito meses foram cultivadas mudas de laranja inoculadas com a bactéria candidato *Liberibacter Asiaticus* (LAs), agente causador da HLB, para avaliação da precocidade do diagnóstico da doença utilizando técnicas espectroscópicas e de imagens. Como referência um conjunto de mudas foi mantido saudável. Alterações espectrais foram observadas com ambas as técnicas a partir do primeiro mês após a inoculação, que permitiram a construção de modelos para diagnóstico da doença com uma taxa de acerto superior a 80%.

**Palavras-chave:** citros, diagnóstico precoce, greening, HLB, LIBS.

### *Citrus Greening (HLB) diagnosis using laser-induced fluorescence spectroscopy*

**Abstract:** Greening or Huanglongbing (HLB) is one of the most serious citrus diseases that the world faces. After a lot of damage in Asia and Africa, the disease appeared in Brazil in 2004. Contaminated seedlings fail to produce and mature plants have fruit drop and yield loss. The main symptom leading to diagnosis in the field is mottled yellow leaves, appearing on average about one year after contamination, already in an advanced stage of the disease. Transmission occurs through the *Diaphorina citri* psyllid, a tiny insect that feeds on plant sap. The control carried out by the producers consists in frequent visual inspections for eradication of symptomatic plants and constant spraying

to control the vector. However, this is not been effective in containing the disease. In this context, this project aims to propose a new method to carry out early diagnosis of this disease. To this end, during eight months seedlings were grown and inoculated with the bacterium *Candidatus Liberibacter Asiaticus* (LAs) to assess the early diagnosis of the disease using spectroscopy techniques. As a reference set of seedlings was kept healthy. Spectral changes were observed in leaves from the first month after inoculation for all the techniques, which allowed the building of models for diagnosis with a success rate exceeding 80%.

**Keywords:** citrus, early diagnostic, greening, HLB, LIBS.

## 1. Introdução

A doença de campo mais preocupante atualmente no ramo da citricultura é a Citrus Greening ou Huanglongbing (HLB). Esta é uma doença bacteriana que vem causando perdas enormes na produção do Brasil e do mundo.

O agente causador da doença, a bactéria denominada *Candidatus Liberibacter*, se estabelece no floema da planta acarretando sua obstrução e conseqüentemente, distribuição inadequada da seiva para raízes, tronco e folhas (BOVÉ, 2006). Este processo, após a infecção da planta é lento e ocorre em duas fases distintas: inicialmente temos aquela denominada de assintomática (geralmente entre 3 e 36 meses) e posteriormente a condição sintomática. A doença afeta as folhas, ramos e frutos da planta. Na fase sintomática 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. Por fim as plantas doentes produzem frutos menores e com capacidade menor para produção de suco (BOVÉ, 2006).

O vetor natural do patógeno é um inseto alado denominado *Diaphorina citri*, comumente encontrado nos pomares brasileiros (LOPES et al., 2007).

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).

A principal técnica reconhecida para diagnóstico da doença é o PCR (INNIS et al., 1990). Entretanto, há uma grande dificuldade na aplicação desta técnica em folhas de árvores de campo, pois a bactéria se distribui de forma bastante heterogênea na planta (LI et al., 2009). Além disso, o custo da análise e a sensibilidade do método inviabilizam sua aplicação em larga escala.

Atualmente, o controle da doença no Brasil se alicerça em três procedimentos: produção de mudas saudáveis em viveiros telados, inspeção visual e erradicação de plantas sintomáticas e controle da população do inseto vetor. A principal limitação da inspeção visual é a subjetividade na avaliação das plantas acarretando erros da ordem de 50% no diagnóstico. O controle do vetor pode ser efetuado por meio de aplicações de pesticidas para evitar a incidência do mesmo (BOVÉ, 2006). Entretanto, já foi comprovado que há espécies de insetos resistentes. Além disso, este procedimento envolve um impacto ambiental considerável, como exemplo, levando à dizimação de insetos polinizadores. A erradicação das árvores sintomáticas não garante que todas as árvores doentes sejam eliminadas, pois é estimado que em torno de 75% das árvores doentes, aquelas em fase assintomática, sejam mantidas nos pomares. Diante do exposto, é incontestável a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos para o diagnóstico 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 e assim, evitar a proliferação da bactéria nos campos citrícolas, até que a cura desta doença seja encontrada. Na literatura são demonstrados alguns métodos utilizando-se ferramentas espectroscópicas (PEREIRA et al., 2010a, 2010b, 2011a, 2011b). Neste trabalho, é avaliado o desempenho da espectroscopia de fluorescência induzida por laser para o diagnóstico de mudas em fase assintomática.

## 2. Material e métodos

Para o monitoramento da doença foi elaborado um experimento que teve a duração total de 8 meses, durante o período de 13 de Julho de

2009 a 01 de Março de 2010. Foram utilizadas mudas 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.]. Deste conjunto de plantas de mesma variedade e idade, 60 mudas foram submetidas a inoculações com uma das espécies da bactéria, a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), principal causadora da citrus greening no Brasil. Outro conjunto com as mesmas características e de igual número de plantas, porém sem inoculações da bactéria, foi mantido como amostras controle. Decorrido um mês após a inoculação, as medidas experimentais com a técnica fluorescência induzida por laser (LIFS) foram efetuadas mensalmente. Cada planta foi representada por 3 folhas (amostras) que foram coletadas seguindo o procedimento: as amostras foram retiradas do terceiro conjunto de folhas, considerando o sentido de cima para baixo, tendo como referência o ápice da planta. 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.

Foram realizadas medidas de LIFS utilizando um sistema portátil desenvolvido pela Embrapa Instrumentação. Neste sistema um laser em 561 nm (20 mW) excita a folha através de um cabo óptico bifurcado que também coleta o sinal de fluorescência. O sinal é enviado a um monocromador e um conjunto de fotodiodos calibrados que gera um espectro que pode ser armazenado no software de controle do sistema.

As mesmas folhas que foram submetidas às medidas analíticas com LIFS 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.

### 3. Resultados e discussão

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. Na Figura 1 são mostrados espectros típicos das plantas saudáveis e inoculadas após dois meses da inoculação. Como as mudas estavam em fase de crescimento, a variação espectral devido ao crescimento era maior do que a variação pela doença. Desta forma, foram analisados os resultados por mês, comparando os grupos saudáveis e inoculados. Para cada mês foi construído um modelo para classificação das plantas utilizando redes neurais artificiais (ANN). O resultado por muda está sintetizado na Tabela 1.

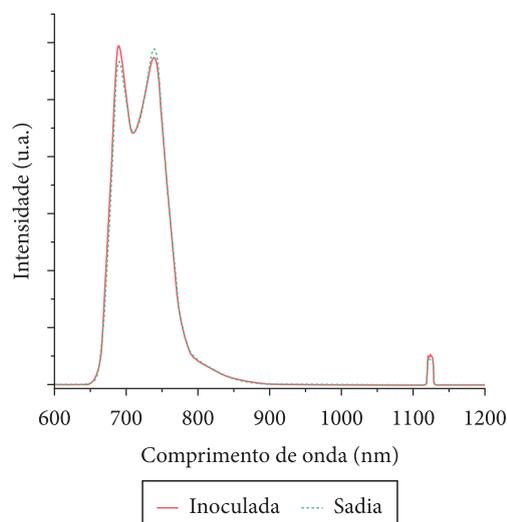


Figura 1. Espectro típico de LIFS para folhas retiradas de plantas saudáveis e plantas inoculadas dois meses após a inoculação.

Tabela 1. Taxas de acerto obtidas pelas ANNs para os dados de LIFS de cada um dos lotes de amostras do experimento de diagnóstico precoce. A tabela contém ainda o valor médio e o desvio padrão para cada mês. Os laudos foram emitidos por planta.

Mês	Média	Desvio padrão
1	47%	13,0%
2	60%	10%
3	63%	9%
4	63%	5%
5	65%	8%
6	-	-
7	72,6%	8%
8	80,1%	11%

No sexto mês do experimento não foram realizadas medidas em função de problemas com o transporte das amostras.

O desempenho do método aqui utilizado para diagnóstico de plantas assintomáticas possui eficiência comparável à das inspeções visuais comumente adotadas nas fazendas para diagnóstico de plantas já sintomáticas. Além disso, os resultados obtidos na fase sintomática da doença são superiores aos da inspeção visual. Desta forma, o experimento realizado aponta para um grande potencial da técnica para realização de diagnóstico em fase assintomática da doença.

#### 4. Conclusões

A distinção global média esteve em torno de 60% já no segundo mês. Esse resultado tem grande importância, já que se trata de plantas inteiramente assintomáticas e recém-contaminadas. Portanto, as diferenças espectrais começaram a manifestar quatro meses antes do aparecimento dos sintomas da doença, visíveis apenas a partir do sexto mês, e mesmo assim apenas em um número reduzido de plantas. Esse resultado indica que o diagnóstico pode ser feito desde o início do desenvolvimento da doença, e com precisão muito superior ao que vem sendo obtido pelo método de controle por inspeção visual em fase sintomática.

#### Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro; e o Grupo Fischer - Divisão Citrosuco e ao Centro AptaCitros Sylvio Moreira pelo apoio na execução do projeto.

#### Referências

- BOVÉ, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. 482 p.
- LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, n. 2, p. 139-144, 2009. PMID:19159305. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-2-0139>
- 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**, v. 119, n. 4, p. 463-468, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-007-9173-1>
- 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**, v. 25, n. 3, p. 351-355, 2010. <http://dx.doi.org/10.1039/b920980h>
- PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ÁSTUA, J. Evaluation of the effects of Candidatus Liberibacter asiaticus on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. **Talanta**, v. 83, p. 351-356, 2010. PMID:21111145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.021>
- PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Fluorescence images combined to statistic test for fingerprinting of citrus plants after bacterial infection. **Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 552-556, 2011a. <http://dx.doi.org/10.1039/C0AY00538J>
- PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; CARDINALI, M. B.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 79, n. 1, p. 90-93, 2011b.