

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER PARA DIAGNOSTICAR ATAQUE DE NEMATOIDE NA CULTURA DO ALGODOEIRO EM CASA DE VEGETAÇÃO

HELGA, M. DAREZZO¹, BIANCA, B. BARRETO², LETÍCIA PIAZENTIN DANTAS³, MARCO TULIO DE FREITAS REIS⁴, MARIA EDUARDA COSTA GONÇALVES⁵, DÉBORA, M. B. P. MILORI⁶

¹ Pós-Doutoranda, Embrapa Instrumentação, darezzohelga@gmail.com

² Pós-Doutoranda, Embrapa Instrumentação, babarreto89@gmail.com

³ Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, leticiadantas@estudante.ufscar.br

⁴ Mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, marcotuliodtna@gmail.com

⁵ Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, leticiadantas@estudante.ufscar.br

⁶ Pesquisadora, Embrapa Instrumentação, debora.milori@embrapa.br

Apresentado no
LII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2023
18 a 21 de outubro de 2023 – Ribeirão Preto - SP, Brasil

RESUMO: Em reflexo ao crescimento da cotonicultura brasileira, houve um acréscimo expressivo de doenças incidentes nas lavouras. Entre os principais patógenos da cultura, o nematoide *Aphelenchoides besseyi* se destaca, por provocar perdas expressivas, podendo atingir valores próximos a 100%. Técnicas de manejo para o controle deste patógeno no início da infestação, tornam-se determinantes a cultura pois não há no mercado defensivos agrícolas realmente eficientes. Portanto, o diagnóstico precoce deste patógeno representa um ganho considerável ao cultivo, reduzindo as perdas de produção e garantindo a qualidade do produto final. O objetivo deste trabalho foi a detecção precoce do ataque deste patógeno no algodoeiro através da aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida por laser. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, por intermédio da avaliação de plantas saudáveis e inoculadas com o nematoide. A técnica foi capaz de detectar a presença do patógeno anteriormente ao aparecimento dos primeiros sintomas visuais, com um acerto equivalente 81,8% na classificação entre as plantas doentes em relação as plantas saudáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Espectroscopia de fluorescência induzida por laser, nematoide *A.besseyi*, algodão

APPLICATION OF LASER INDUCED FLUORESCENCE SPECTROSCOPY TECHNIQUE TO DIAGNOSE NEMATODE ATTACK ON COTTON CULTURE IN GREENHOUSE

ABSTRACT: As a result of the growth of cotton farming in Brazil, there was a significant increase in incident diseases in crops. Among the main pathogens of the crop, the nematode *Aphelenchoides besseyi* stands out, for causing significant losses, reaching values close to 100%. Management techniques to control this pathogen at the beginning of the infestation become crucial to the crop, as there are no really efficient pesticides on the market. Therefore, the early diagnosis of this pathogen represents a considerable gain for the crop, reducing production losses and ensuring the quality of the final product. The objective of this work was the early detection of the attack of this pathogen in cotton through the application of the laser induced fluorescence spectroscopy technique. The technique was able to detect the presence

of the pathogen before the appearance of the first visual symptoms, with an accuracy equivalent to 81.8% in the classification between diseased plants in relation to healthy plants.

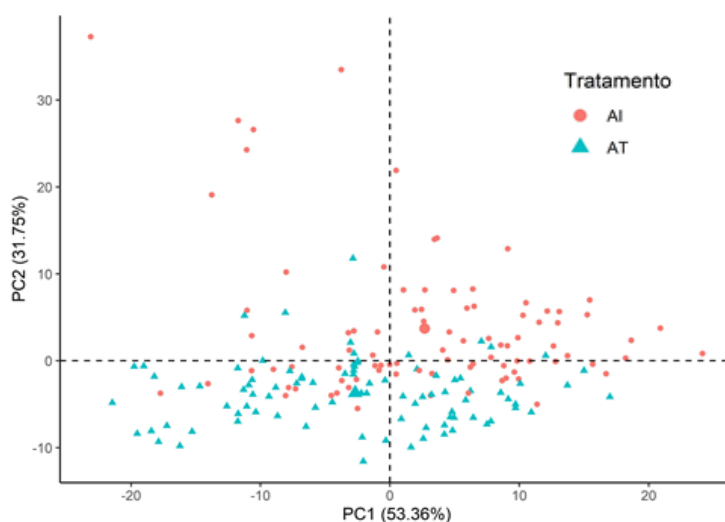
KEYWORDS: Laser induced fluorescence spectroscopy, nematode, cotton

INTRODUÇÃO: A receita proveniente da exportação da pluma do algodão cresce anualmente. Concomitantemente ao crescimento da cotonicultura houve o acréscimo expressivo do ataque do nematoide *Aphelenchoides besseyi*, responsável por ocasionar grandes prejuízos econômicos. Tal patógeno apresenta difícil controle pois comporta-se como fitonematóide, parasitando também a parte aérea das plantas, e apresentando capacidade de se disseminar através do contato das folhas das plantas doentes com folhas das plantas saudáveis. Em condições favoráveis, temperaturas médias de 30°C e umidade em torno de 80%, o patógeno apresenta rápida multiplicação, com taxa de infestação de 1 para 250 indivíduos no período de 8 a 10 dias (FAVORETO & MEYER, 2018). Portanto, o diagnóstico precoce representa um ganho considerável ao cultivo, reduzindo as perdas de produção e garantindo a qualidade do produto (GALBIERI, 2021). As plantas quando submetidas a qualquer tipo de estresse, apresentam diminuição na eficiência fotossintética e, por conseguinte, alterações na fluorescência da clorofila (YUSUF et al., 2010). A fluorescência da clorofila tem sido usada como um método assertivo para investigar o conteúdo de clorofila em plantas submetidas a estresses bióticos (BUSCHMANN, 2007). As técnicas fotônicas surgem como uma forma promissora no diagnóstico precoce de doenças devido a alta sensibilidade para detectar qualquer alteração fisiológica nas plantas, além da possibilidade de serem adicionadas a implementos agrícolas, com aplicação direta no campo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida por laser, para diagnosticar o ataque do nematoide em plantas de algodão, cultivadas em ambiente controlado.

MATERIAL E MÉTODOS: O experimento foi conduzido em ambiente controlado, em casa de vegetação sob temperatura de 30°C e umidade relativa de 80%, com sementes de algodão fornecidas pelo IMA, Instituto Mato-Grossense do Algodão, da cultivar IMA 5801B2RF, sendo as plantas cultivadas em vasos de 650 ml com substrato, na densidade de duas por vaso. A inoculação foi realizada no 8º dia após a semeadura, com o auxílio de um borrifador, na concentração de 6.000 nematoides/planta em solução aquosa. O ensaio foi constituído por dois tratamentos, referentes a 75 vasos inoculados e 75 vasos testemunhas. As avaliações, realizadas no período da manhã por 11 dias consecutivos, foram constituídas por 10 amostras (vasos) por dia, 5 inoculadas e 5 testemunhas. Cada uma das duas plantas cultivadas por vaso, foi submetida a técnica de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (450nm) através do equipamento LIFS (Laser Induced Fluorescence System), cujos espectros quantificam a fluorescência da clorofila na banda dos 670 a 790nm, delimitando dois picos referentes a fluorescência. O sistema LIFS é composto por um laser de diodo da Coherent, do modelo Cube, com potência 20mW e excitação em 405nm, e um espectrômetro USB2000-Ocean Optics, com intervalo espectral de 194 a 890nm. O sistema LIFS possui também: cabo óptico, com seis fibras para conduzir a luz de excitação e uma fibra central para coletar a emissão; filtro óptico, para bloquear a luz refletida pelo laser; sistema de refrigeração, para manter a estabilidade do laser. Os espectros são coletados por um software (Diagnóstico) que permite as parametrizações necessárias. Os parâmetros de entrada foram: Quantidade de medições, 4, número de excitações do laser por amostra; Número de Médias, 10, o número de espectros coletados; Tempo de Integração, 30 ms, tempo de exposição dos sensores do espectro até a próxima medição; Boxcar, 8, grandeza ligada a suavização do espectro; Cálculo da área, 450 a 850nm. A excitação da amostra e a aquisição da fluorescência são feitas através de uma sonda composta por um conjunto de fibras ópticas, 6 fibras responsáveis pela excitação da amostra e

1 central relativa à emissão da fluorescência, respondendo pela captação e pelo encaminhamento até o espectrômetro. O padrão de aquisição dos espectros foi realizado no primeiro par de folhas/cotiledonar, na parte adaxial e central, com a sonda posicionada em um ângulo de 90°, adjacente a nervura central. O pré-processamento do conjunto de dados referiu-se à remoção dos comprimentos de onda inferiores a 449nm e a correção da linha de base dos espectros, com a posterior obtenção das médias para cada comprimento de onda. No Processamento dos dados, primeiramente foi realizada a Análise Exploratória PCA, Análise de Componentes Principais, para avaliar a potencialidade de uma classificação e, em seguida, procedeu-se a predição do conjunto de dados por intermédio do Programa WEKA, versão 3.8, seguindo as etapas de padronização e classificação, no contexto de aprendizagem de máquina (Machine Learning). Para tanto, foram separados dois grupos provenientes do conjunto de dados original, o conjunto de Treino, correspondente a 70% dos dados, e o de Teste, constituído pelos 30% dos dados restantes. Para o conjunto de Treino foram empregadas 10 validações cruzadas (QUEIROZ et al., 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Por intermédio da Análise Exploratória PCA (Principal Component Analysis), observa-se que a somatória das Componentes Principais 1 e 2 explicam mais de 85% da variância dos dados (Figura 1a), mostrando a tendência a separação das classes Inoculada (AI) e Testemunha (AT) no decorrer dos 11 dias de avaliação através da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser, sistema LIFS. Ressalta-se que apenas a Componente Principal 1, PC1, responde sozinha por 53,36% da variância do conjunto de dados e, que a propensão a separação das classes Inoculada e Testemunha foi mantida em cada um dos dias de avaliação pela Técnica LIFS, após análise das PCAs diárias. Porém, observa-se que no tratamento Testemunha as variâncias estão mais próximas ao centróide, mostrando maior uniformidade dos dados. Com relação a classificação baseada em Machine Learning, através do Programa WEKA (Figura1b), entre os diferentes modelos aplicados, o que resultou em maior acurácia na identificação das amostras Inoculadas e Testemunhas, foi o Random Forest, algoritmo de aprendizagem de máquina que cria predição baseado em árvores de decisão. Considerando-se as 88 amostras destinadas ao grupo de Teste, o algoritmo Random Forest classificou corretamente 72 amostras, com uma acurácia equivalente a 81,8%. Desta forma, foi verificada a assertividade na classificação de 33 amostras Inoculadas e de 39 amostras Testemunhas.



RandomForest

Correctly Classified Instances 81,8 %

Incorrectly Classified Instances 18,2 %

Confusion Matrix

a b - classified as

33 11 / a = AI

5 39 / b = AT

Figura 1 (a) Gráfico de Scores da PCA, constituído por 11 dias de avaliação pela técnica LIFS, com as PC1 e PC2 representando 53,36% e 31,75% da variância do conjunto de dados,

respectivamente. Amostras Inoculadas (AI) e Amostras Testemunhas (AT) e (b) Random Forest, com acurácia de 81,8%, na classificação de Amostras Inoculadas (AI) e Amostras Testemunhas (AT).

CONCLUSÕES: Os resultados mostram a capacidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (LIFS) no diagnóstico de plantas de algodão contaminadas com o nematoide *A. Besseyi*, cultivadas em Casa de Vegetação, antecedendo 6 dias do aparecimento dos primeiros sintomas visuais nas plantas. Porém, novos ensaios devem ser conduzidos para confirmar a eficiência do sistema LIFS na detecção deste patógeno.

AGRADECIMENTOS: Este trabalho foi financiado pela Embrapa Instrumentação, CNPq, COMDEAGRO e IMA.

REFERÊNCIAS:

- BUSCHMANN, C. Variability and application of chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research*, v.92, n.2, p.261-71, 2007.
- FAVORETO, L.; MEYER, M. C. Diagnose, hospedeiros e manejo de *Aphelenchoides besseyi*. In CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 35, 2018, Bento Gonçalves, RS. Anais...Brasília: Embrapa, 2018. p.60-62.
- GALBIERI, R., “*Aphelenchoides besseyi* no algodoeiro,” XI Encontro Técnico Algodão Fundação Mato Grosso Integração: A chave que abre nossos horizontes (2021).
- YUSUF, M.A. et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic Brassica juncea plants alleviates abiotic stress: 33 Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1797, p. 1428- 1438 (2010).
- QUEIROZ, D.M. et al. *Agricultura Digital*. 1ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2020.