

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Utilização de sensores óticos na
deteção de agentes patogénicos nas
plantas**

Andreia Melissa Guedes da Silva Afonso

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Prof. Doutora Natália Tomás Marques e Prof. Doutor Rui
Manuel Neves Guerra

2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Utilização de sensores óticos na
deteção de agentes patogénicos nas
plantas**

Andreia Melissa Guedes da Silva Afonso

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Prof. Doutora Natália Tomás Marques e Prof. Doutor Rui
Manuel Neves Guerra

2015

Utilização de sensores óticos na deteção de agentes patogénicos nas plantas

Declaração de autoria do trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright:

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, a Professora Doutora Natália Marques e o Professor Doutor Rui Guerra, em primeiro lugar, os ensinamentos transmitidos, o apoio, a disponibilidade e a paciência (sobretudo comigo e com o R) que sempre apresentaram. Em segundo lugar, a atenção que demonstraram ao rever e a tecer comentários à minha tese, tudo para que eu apresentasse o trabalho da melhor forma possível. Em terceiro lugar, agradeço-lhes a proposta do tema da minha tese que me possibilitou de certo modo regressar à Engenharia Eletrónica que frequentei durante dois anos e combinar duas áreas do meu percurso académico de um modo que não pensei ser possível.

À Doutora Ana Cavaco agradeço não só toda a ajuda que me ofereceu, especialmente na parte da fluorescência, mas também a sua simpatia e o fato de me ter animado, sempre que os resultados não correspondiam às minhas expectativas.

Ao Professor Doutor Amílcar Duarte agradeço a enxertia de borbulha em T que realizou nas plantas estudadas nesta tese e as suas sugestões.

À Doutora Fátima Cairrão por ter disponibilizado o seu tempo e experiência, apesar de nem me conhecer.

Agradeço à Professora Doutora Deborah Power e ao Professor Doutor Adelino Canário a permissão de usar o laboratório de Endocrinologia Comparativa e Molecular para execução do trabalho da minha tese. Quero também agradecer aos colegas deste laboratório por me terem recebido bem e me terem ajudado sempre que precisei. Agradeço especialmente ao André Andrade por toda a ajuda que me deu na técnica de *real-time* PCR e por ter esclarecido sempre de boa vontade as minhas dúvidas.

Agradeço a todos os que, embora não sejam mencionados, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi suportado, em parte, pelo projeto do Centro de Eletrónica, Optoeletrónica e Telecomunicações da Universidade do Algarve com a designação UID/Multi/00631/2013 CEOT.

Resumo

A cultura dos citrinos tem grande impacto económico a nível mundial. Um dos principais agentes patogénicos que afeta os citrinos é o *Citrus tristeza virus* (CTV), um *closterovirus* responsável pela morte de milhões de árvores em todo o mundo. Dada a importância da deteção do CTV numa fase inicial da infeção para o controlo da disseminação do vírus, avaliou-se neste trabalho a possibilidade de usar métodos óticos para distinguir plantas saudáveis de infetadas.

Embora a maioria dos trabalhos publicados onde são utilizadas técnicas espectroscópicas o façam numa perspetiva de deteção remota para separação de plantas controlo de plantas infetadas com sintomas explícitos da presença de vírus, os testes neste trabalho foram realizados nas variedades *Citrus clementina* hort. ex Tanaka cv. Fina e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia late, mantidas em estufa, que se mostraram assintomáticas seis meses após a infeção com o isolado do CTV T318A e ao longo do tempo que durou este trabalho. Foram feitas medições dos espectros de refletância e transmitância das folhas nas regiões do visível e infravermelho próximo e da fluorescência da clorofila *a*, desde Outubro de 2014 a Abril de 2015. Todo o pré-tratamento aplicado aos espectros e análise dos mesmos foi feito através de programação em R, incluindo técnicas de análise multivariada, que permitiram a redução do elevado volume de dados a um conjunto de variáveis que descrevem o essencial da variabilidade do problema. Para validação das técnicas espectroscópicas, foi feita a deteção do CTV através do método convencional IC/RT-PCR e por *real time* PCR. Os métodos moleculares detetaram a presença do vírus em três plantas de cada variedade.

Os resultados deste trabalho indicam que é possível detetar a infeção viral, mesmo quando assintomática, através da monitorização dos padrões de evolução temporal dos espectros com uma taxa de sucesso superior a 90%.

Palavras-chave: *Citrus tristeza virus*; espectroscopia Vis-NIR; fluorescência da clorofila *a*; análise das componentes principais; Imunocaptura RT-PCR; PCR em tempo real.

Abstract

Citrus culture has a great economic impact worldwide. One of main pathogens that affect citrus is the *Citrus tristeza virus* (CTV), a *closterovirus* responsible for the death of millions of trees around the world. Given the importance of early detection of CTV for controlling the spread of the virus, this work evaluated the ability of optical methods in distinguishing healthy from infected plants.

Although most papers published where spectroscopic techniques are used do it in a remote sensing perspective for separation of control plants from infected plants with explicit symptoms of virus, the tests in this work have been conducted in the varieties *Citrus clementina* hort. ex Tanaka cv. Fina and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia late, kept in greenhouse, infected with CTV isolate T318A, although asymptomatic six months after infection and during the time interval of the present assays. Measurements of the reflectance and transmittance spectra of the leaves in the regions of visible and near infrared and measurements of chlorophyll a fluorescence were made, from October 2014 to April 2015. All the pre-treatment applied to the spectra and their analysis was done through programming in R, including multivariate analysis techniques, which allowed the reduction of large volume of data to a limited set of variables describing most of the problem's variability. For validation of spectroscopic techniques, CTV was detected by conventional method IC/RT-PCR and by *real-time* PCR. Molecular methods detected virus presence in three plants of each variety.

Results suggest that it is possible to detect the infection even when it is asymptomatic, through monitoring the spectra's time evolution patterns with a success rate of over 90%.

Keywords: *Citrus tristeza virus*; Vis-NIR spectroscopy; Chlorophyll a fluorescence; principal component analysis; Immunocapture RT-PCR; real time PCR

Abreviaturas e acrónimos

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
bp	<i>Base pair</i>
cDNA	DNA complementar
Co-PCR	<i>Co-operational PCR</i>
C _t	<i>Threshold cycle</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
DAS-ELISA	<i>Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleósidos 5'-trifosfatos
dRNA	RNA defetivo
DTBIA	<i>Direct tissue blot immunoassay</i>
EDTA	<i>Tetra-acetato de etileno diamina</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
IC/RT-PCR	<i>Immunocapture/reverse transcription - polimerase chain reaction</i>
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	<i>Kilobases</i>
kDa	Kilodaltons
kNN	<i>K Nearest Neighbors</i>
LB	Meio de cultura Luria Bertani
M	Molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ms	milisegundo
MSC	<i>Multiplicative scatter correction</i>
ng	<i>nanograma</i>

NIR	<i>Near infrared</i>
nm	nanometro
nM	nanomolar
°C	Grau centígrado
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>Principal components analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RII	<i>Ratio of Interdistance to Intradistance</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription - polimerase chain reaction</i>
s	segundo
SG	Savitzky-golay
sgRNA	RNA subgenómico
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
UTR	<i>Untranslated region</i>
v/v	Volume/volume
Vis	Visível
W	Watt
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranósido
λ	Comprimento de onda
μL	microlitro
μM	micromolar
μg	micrograma

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VI
Abreviaturas e acrónimos	VII
1 Introdução	1
1.1 A importância dos citrinos.....	1
1.2 A cultura de citrinos e a tristeza.....	2
1.3 Transmissão do CTV	3
1.4 Sintomatologia causada pelo CTV.....	4
1.4.1 Sintomatologia <i>quick decline</i>	5
1.4.2 Sintomatologia stem pitting	5
1.4.3 Sintomatologia <i>seedling yellows</i>	6
1.5 Estrutura, genoma e replicação do CTV	6
1.6 Controlo do CTV	9
1.7 Diagnóstico do CTV	10
1.8 Conceitos básicos de espectroscopia.....	13
1.8.1 Vantagens e desvantagens.....	15
1.8.2 Princípios básicos da espectroscopia em plantas.....	15
1.8.2.1 Aplicações e potencialidades.....	16
1.9 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	18
1.10 Objetivos.....	20
2 Materiais e métodos	21
2.1 Componente biologia molecular.....	21
2.1.1 Material vegetal e isolado viral	21
2.1.2 <i>Primers</i> usados nas reações de amplificação	21

2.1.3	Reação de IC/RT-PCR.....	23
2.1.3.1	Preparação dos extratos vegetais	23
2.1.3.2	Imunocaptura e RT-PCR	23
2.1.4	Extração de RNA total.....	24
2.1.5	Síntese de cDNA com <i>random hexamers</i>	25
2.1.5.1	Confirmação da síntese de cDNA.....	25
2.1.5.2	PCR para amplificação do gene p25	25
2.1.6	Eletroforese em gel de agarose	26
2.1.7	Extração de DNA de géis de agarose	26
2.1.8	Reação de ligação.....	26
2.1.9	Preparação de células competentes	27
2.1.10	Transformação de células competentes.....	28
2.1.11	Seleção das colónias transformadas.....	28
2.1.12	Precipitação do DNA plasmídico (“miniprep”).....	28
2.1.13	Sequenciação dos genes clonados no vetor pGEM T-Easy e sua análise.....	29
2.1.14	Real-time PCR	29
2.2	Componente ótica.....	31
2.2.1	Seleção das folhas.....	31
2.2.2	Medições.....	31
2.2.2.1	Refletância.....	32
2.2.2.2	Transmitância	36
2.2.2.3	Fluorescência da clorofila <i>a</i>	37
2.2.3	Pré-tratamento dos espectros	39
2.2.3.1	Transformação para absorvância	39
2.2.3.2	Eliminação de <i>outliers</i>	41
2.2.3.3	Centragem na média	42

2.2.3.4	Estandarização	42
2.2.3.5	Suavização e derivação.....	42
2.2.3.6	Correção de efeitos aditivos e multiplicativos	43
2.2.4	<i>Principal component analysis (PCA)</i>	44
2.2.4.1	<i>Ratio of interdistance to intradistance (RII)</i>	48
2.2.4.2	Análise PCA ao longo do tempo	50
2.2.5	<i>Analysis of variance (ANOVA)</i>	52
2.2.6	Algoritmo de k vizinhos mais próximos (kNN)	53
3	Resultados e discussão.....	56
3.1	Deteção do CTV por métodos moleculares baseados no PCR	56
3.1.1	Reação de IC/RT-PCR.....	57
3.1.1.1	Clonagem do gene p25 do isolado viral presente na planta <i>Citrus macrophylla</i>	59
3.1.2	Extração de RNA total.....	60
3.1.2.1	Síntese de cDNA com <i>random hexamers</i>	61
3.1.2.1.1	Clonagem do produto de amplificação do gene p25 das plantas Clementina 'Fina' e 'Valencia late'	62
3.1.3	Real-time PCR	65
3.2	Deteção do CTV por métodos espectroscópicos.....	73
3.2.1	Teste à blindagem da luz externa	76
3.2.2	Panorama geral da evolução dos espectros ao longo do tempo.....	77
3.2.3	Gráficos iniciais	80
3.2.4	PCA.....	83
3.2.4.1	Pré-tratamento: <i>Multiplicative scatter correction</i>	83
3.2.4.2	Pré-tratamento: <i>Savitzky-Golay</i>	85
3.2.4.3	Pré-tratamento: <i>Multiplicative scatter correction + Savitzky-Golay</i>	87

3.2.4.4 Pré-tratamento: <i>Savitzky-Golay + Multiplicative scatter correction</i>	90
3.2.5 PCA aplicado à fluorescência da clorofila <i>a</i>	92
3.2.6 PCA aplicado ao longo do tempo em dados de espectroscopia de VIS/NIR	95
3.2.7 ANOVA.....	101
3.2.8 Aplicação do algoritmo dos k-vizinhos mais próximos (kNN)	104
4 Conclusões.....	108
5 Referências bibliográficas	111
Anexos	129

1 Introdução

1.1 A importância dos citrinos

A cultura dos citrinos é das que tem maior impacto económico a nível mundial, sendo os frutos comercializados frescos ou processados, isto é, sob a forma de sumos e néctares. Estes frutos são muito apreciados do ponto de vista gastronómico e ainda pelo seu valor nutricional e farmacêutico (Ladanyia, 2008; Lacirignola e D’Onghia, 2009). Na verdade, cerca de um terço dos citrinos é consumido após processamento, essencialmente sob a forma de sumo de laranja (Liu *et al.*, 2012). Para além de serem uma fonte de vitamina C (Nagy, 1980), os citrinos contêm macronutrientes, tais como açúcares simples e fibras, e micronutrientes que incluem a tiamina (vitamina B1), a riboflavina (B2), a niacina (B3), o ácido pantoténico (B5), a piridoxina (B6), o ácido fólico (B9), o potássio, o cálcio, o fósforo, o magnésio e o cobre, que são essenciais para a manutenção da saúde e de um crescimento normal (Rouseff e Nagy, 1994; Economos e Clay, 1999).

O maior produtor de citrinos do mundo é a China, seguido do Brasil, União Europeia e Estados Unidos (United States Department of Agriculture, 2015).

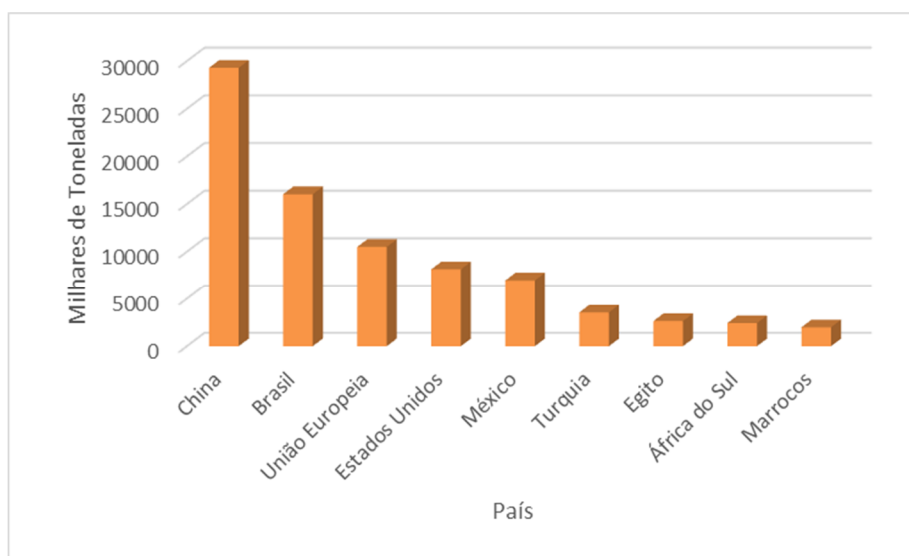


Figura 1.1: Principais produtores mundiais de citrinos (laranjas, tangerinas, toranjas, limas e limões). Adaptado de United States Department of Agriculture (2015).

A cultura de citrinos é o maior setor da agricultura mediterrânica e representa a maior fonte de rendimento para um grande número de agricultores (Lacirignola e D'Onghia, 2009).

Em Portugal, no ano de 2013, foi produzido 236,8 mil toneladas de laranjas, ocupando no país o primeiro lugar na comercialização de frutos frescos (Instituto Nacional de Estatística, 2014). O Algarve é a principal região produtora de citrinos do país. Algumas das variedades que predominam na citricultura algarvia são a clementina 'Fina' (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka cv. Fina) e a laranjeira 'Valencia late' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia late) (Ministério da Agricultura do desenvolvimento Rural e das Pescas, 2007).

1.2 A cultura de citrinos e a tristeza

Os citrinos provavelmente tiveram a sua origem no sudoeste asiático que inclui a região do sul da China e do nordeste da Índia (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

No final do século XIX, o aperfeiçoamento dos transportes marítimos coincidiu com o aumento do interesse botânico e comercial nos citrinos, o que levou à exportação de centenas de plantas da Ásia para outras regiões (Roistacher, 1981).

Em 1836, teve início nos Açores uma epidemia de *Phytophthora sp.* que se alastrou aos países mediterrânicos, destruindo as laranjeiras doces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) (Zaragoza, 2007). Esta epidemia conduziu ao uso da laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) como porta-enxerto por ser resistente à *Phytophthora* (Bordignon *et al.*, 2003), por se adaptar muito bem a solos calcários e por transmitir vigor às variedades enxertadas, levando à produção de frutos de excelente qualidade (Moreno *et al.*, 2008). Por estas razões, rapidamente se tornou o porta-enxerto predominante em várias partes do mundo (Bordignon *et al.*, 2003).

O uso da laranjeira azeda foi fundamental para o desenvolvimento do comércio de citrinos, no entanto também criou condições para uma nova epidemia

chamada Tristeza causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV) (Moreno *et al.*, 2008).

O CTV é um dos mais importantes agentes patogênicos dos citrinos (Harper, 2013; Muniz *et al.*, 2014) e a sua interação com o porta-enxerto laranjeira azeda tem tido efeitos devastadores na indústria de citrinos (Moreno *et al.*, 2008). Os primeiros surtos foram descritos na América do Sul, na década de 1940, e desde essa época o CTV já foi responsável pela morte de mais de 85 milhões de árvores em todo o mundo (Lee *et al.*, 1992; Lee e Keremane, 2013).

Atualmente, o CTV encontra-se disseminado em todas as regiões produtoras de citrinos do planeta (Bordignon *et al.*, 2003). O porta-enxerto *Citrus aurantium*, por ser muito sensível ao CTV, tem sido substituído por porta-enxertos tolerantes ao CTV, nomeadamente as citranjeiras Carrizo e Troyer (Castle, 2010).

1.3 Transmissão do CTV

O Homem é o responsável pela disseminação do CTV a longas distâncias através da comercialização de plantas infetadas. Localmente o CTV é transmitido por várias espécies de afídios num modo semi-persistente, principalmente através do *Aphis gossypii* (Glover) e do *A. spiraecola* (Patch) (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984), sendo o vetor mais eficiente o *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Yokomi *et al.*, 1994). A transmissão deste vírus por *T. citricida* requer um período de aquisição e inoculação de pelo menos 30 minutos (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

O afídio *T. citricida* está presente na Ásia, Austrália, África do Sul, América Central, América do Sul e em diferentes países das Caraíbas (Costa e Grant, 1951; McClean, 1975; Yokomi *et al.*, 1994; Rocha-Peña *et al.*, 1995; Halbert *et al.*, 2004). Na região mediterrânica foi apenas detetado em Espanha e em Portugal (Ilharco *et al.*, 2005).

O afídio *Aphis gossypii* é o principal vetor encontrado na bacia do Mediterrâneo e no norte da América (Dickson *et al.*, 1956; Raccah *et al.*, 1976; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; Yokomi e Garnsey, 1987; Cambra *et al.*, 2000a;

Marroquín *et al.*, 2004). Na região mediterrânica, desde a década de 60, é também encontrado o afídio *A. spiraecola* (Viggiani, 1988).

A transmissão do CTV é afetada pela espécie do afídio vetor, pelo isolado do vírus, pela combinação porta enxerto/variedade e pelas condições ambientais (Roistacher e Moreno, 1990).

Não há evidências de transmissão do CTV através das sementes (McClellan, 1957).

1.4 Sintomatologia causada pelo CTV

A sintomatologia causada pelo CTV e a severidade desta depende do isolado viral, da planta hospedeira e da combinação variedade/porta-enxerto (Moreno *et al.*, 2008).

O uso de plantas indicadoras como a limeira Mexicana [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle], laranjeira azeda (*C. aurantium* L.), laranjeira doce [*C. sinensis* (L.) Osb. cv. Madam vinious], toranjeira (*C. paradisi* Macfadyen cv. Duncan) e a laranjeira doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck) no porta-enxerto laranjeira azeda permite determinar a sintomatologia de um isolado específico do CTV (Garnsey *et al.*, 1987, 2005).

De acordo com a sintomatologia que os isolados do CTV induzem nas plantas indicadoras, estes podem ser classificados de isolados atenuados (*mild*) ou severos, causadores de *quick decline* e de *stem pitting*. A sintomatologia *seedling yellows* está associada a plântulas ou a plantas mantidas em estufa.

As estirpes *mild* do CTV causam sintomas visíveis na limeira Mexicana, no entanto estes raramente são visíveis noutros hospedeiros. Por sua vez, as estirpes severas podem provocar os seguintes sintomas: o *quick decline* (Figura 1.2) de plantas enxertadas na laranjeira azeda; *stem pitting* (Figura 1.3) nas laranjeiras doces e toranjeiras; *seedling yellows* (Figura 1.4) nas plântulas de laranjeira azeda, toranjeira e limoeiro (*C. limon* [L.] Burn. F.) (Niblett *et al.*, 2000; Černi *et al.*, 2008).

1.4.1 Sintomatologia *quick decline*

O declínio súbito consiste na incompatibilidade entre a variedade e o porta-enxerto laranjeira azeda (Saponari *et al.*, 2008) na zona de união do enxerto, causando a necrose do floema (Morera, 1997), o que por sua vez resulta frequentemente na morte da árvore (Sekiya *et al.*, 1991) (Figura 1.2). Como as raízes responsáveis pela absorção de água e de nutrientes do solo são afetadas negativamente na sua função e estrutura (Morera, 1997), as reservas de amido no porta-enxerto são consumidas e ficam inacessíveis à restante parte da árvore, nomeadamente à variedade enxertada (Lee e Bar-Joseph, 2000).



Figura 1.2: *Quick decline* numa laranjeira doce com porta-enxerto de laranjeira azeda [Fonte: Moreno *et al.* (2008)].

1.4.2 Sintomatologia *stem pitting*

As caneluras no caule resultam de diferenciação vascular anormal (Atta *et al.*, 2012), levando ao aparecimento de fendas alongadas nos ramos (Figura 1.3) de laranjeiras doces ou de toranjeiras, acompanhado por uma diminuição não só da qualidade do fruto, como do seu tamanho (Roistacher e Moreno, 1990; Garnsey *et al.*, 2005), independentemente do porta-enxerto utilizado (Černi *et al.*, 2008). Em muitos casos, a redução do tamanho do fruto, torna-o inadequado para venda (Brlansky, 2006).



Figura 1.3: Sintomatologia de *stem pitting* [Fonte: Brlansky (2006)].

1.4.3 Sintomatologia *seedling yellows*

O amarelecimento das plântulas é caracterizado não só pelo declínio e clorose das folhas (Fraser, 1952) (Figura 1.4), mas também pela redução do sistema radicular e, nalguns casos, pela completa cessação do crescimento de plântulas de laranjeira azeda, toranjeira ou limoeiro (McClellan, 1960).



Figura 1.4: Sintomatologia de *seedling yellows* [Fonte: Brlansky (2006)].

1.5 Estrutura, genoma e replicação do CTV

O CTV pertence à família *Closteroviridae* (Bar-Joseph, 1989), género *Closterovirus*, sendo o maior e o mais complexo membro desta família (Folimonova, 2013). Este vírus encontra-se restrito às células do floema de citrinos da família *Rutaceae* (Bar-Joseph *et al.*, 1979a).

As partículas virais do CTV (Figura 1.5) são filamentos flexíveis de 2000nm x 11 nm com uma cápside proteica formada pela proteína p25 (25kDa) e p27 (27 kDa) que revestem, respetivamente, cerca de 97% e 3% do comprimento da partícula viral (Febres *et al.*, 1996; Satyanarayana *et al.*, 2004).

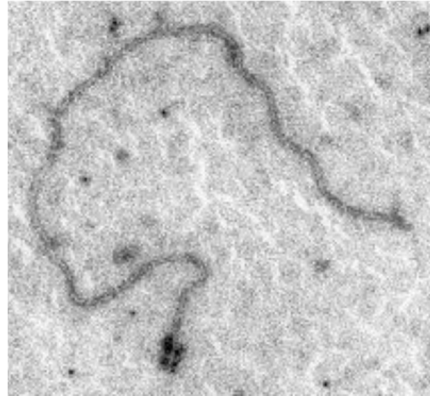


Figura 1.5: Imagem de uma partícula viral do CTV ao microscópio eletrónico [Fonte: (Niblett *et al.*, 2000)].

O genoma do CTV (Figura 1.6) consiste numa cadeia simples positiva de RNA contendo 19296 nucleótidos e está organizado em 12 *open-reading frames* (ORFs) (Karasev *et al.*, 1995; Korkmaz *et al.*, 2008), que codificam cerca de 19 proteínas (Karasev *et al.*, 1995; Atta *et al.*, 2012), com duas regiões não traduzidas [*untranslated regions* (UTRs)] nas extremidades 5' (107 nucleótidos) e 3' (234 nucleótidos) (Karasev *et al.*, 1995; Dawson *et al.*, 2013). Estas dimensões fazem do CTV o maior vírus de plantas conhecido (Karasev *et al.*, 1995; Bordignon *et al.*, 2003).

As duas ORFs da extremidade 5' são traduzidas diretamente do RNA genómico e codificam proteínas relacionadas com a replicação (Hilf *et al.*, 1995). A ORF 1a codifica uma poliproteína com 349 kDa constituída por duas proteases do tipo papaína (PRO), uma metiltransferase (MT) e uma helicase (HEL). A ORF 1b codifica a RNA polimerase RNA dependente (RpRd) que é traduzida via “+1 ribosomal frameshift” (Satyanarayana *et al.*, 2001).

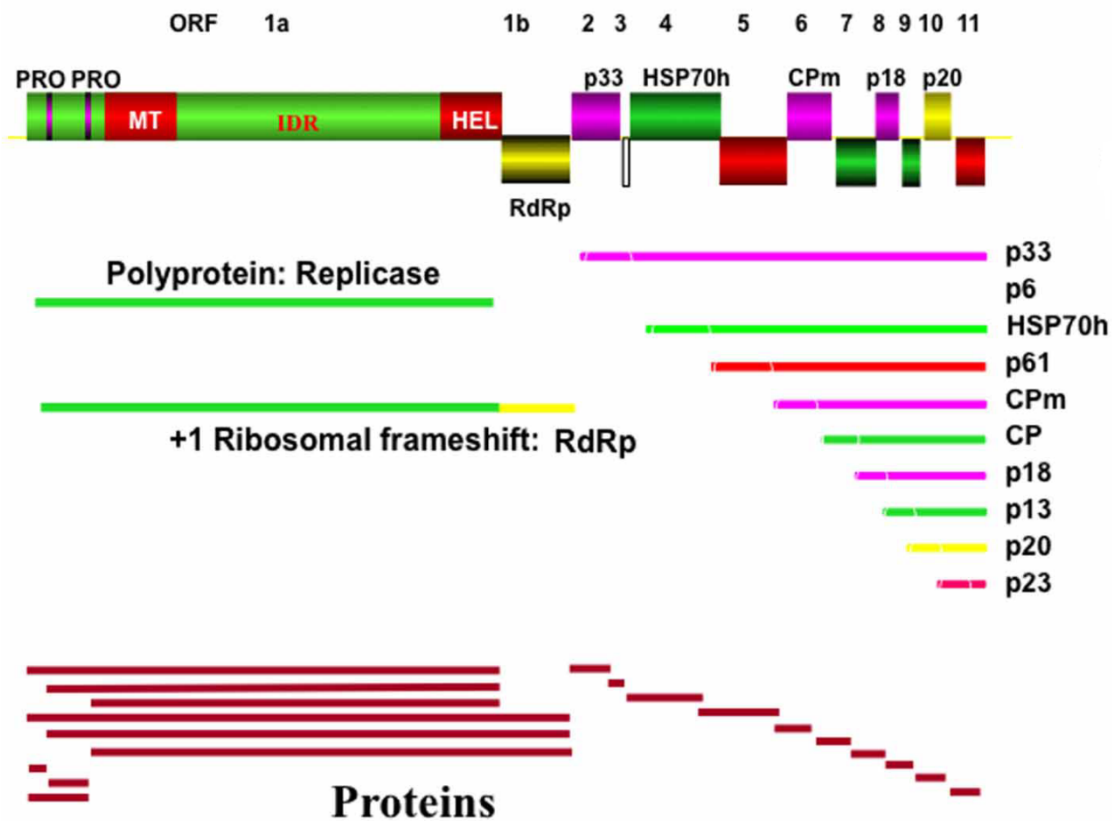


Figura 1.6: Esquema do genoma do CTV. PRO – proteases do tipo papaína; MT- metiltransferase; IDR- Região intergênica; HEL- Helicase; RdRp - RNA polimerase RNA dependente; CPm e CP – proteínas do capsídeo. Em baixo (a diferente cores) são apresentadas os dez RNAs subgenômicos (sgRNAs) e as proteínas esperadas (a vermelho). Adaptado de Dawson *et al.* (2013).

As dez ORFs da extremidade 3' são expressas através dos RNAs subgenômicos (sgRNAs) (Hilf *et al.*, 1995) e codificam as proteínas p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20 e p23 (Moreno *et al.*, 2008). À proteína hidrofóbica p6 é atribuído um papel no movimento do vírus (Dolja *et al.*, 2006; Tatineni *et al.*, 2008); a p65 é homóloga à proteína *heat-shock* HSP70 e juntamente com a p61, p25 e p27 está envolvida na formação da partícula viral (Satyanarayana *et al.*, 2000); a p20 é acumulada nas células infetadas sob a forma de inclusões amorfas (Gowda *et al.*, 2000); a p23 é uma proteína de ligação ao RNA (López *et al.*, 2000) que regula a acumulação assimétrica de cadeias positivas e negativas durante a replicação do RNA viral (Satyanarayana *et al.*, 2002); as proteínas p33, p13 e p18 permitem a interação viral com múltiplos hospedeiros (Tatineni *et al.*, 2011).

A replicação do RNA genómico do CTV envolve a síntese de cadeias negativas que servem de molde para a formação de novas cadeias positivas (Satyanarayana *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2008). Os genes da extremidade 3' não são necessários para a replicação do RNA genómico. Para a replicação do RNA genómico apenas é requerido as UTRs 3' e 5' (Satyanarayana *et al.*, 1999; Dawson *et al.*, 2013).

Para além do RNA genómico (gRNA) e sgRNAs, as células infetadas pelo CTV acumulam RNA defetivo (dRNA) com uma dimensão inferior a 5kb composto pelas extremidades 5' e 3' do gRNA mas com deleções internas (Mawassi *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999). O dRNA é sintetizado pela RNA polimerase RNA dependente durante o processo de replicação (Pathak e Nagy, 2009). A maioria dos dRNAs resulta de erros envolvendo recombinações não homólogas (Mawassi *et al.*, 1995; Che *et al.*, 2002). Esta recombinação aliada à elevada taxa de mutações causadas também pela RdRp (Domingo *et al.*, 1996; Nagy e Simon, 1997) é responsável pela variabilidade genómica do vírus.

1.6 Controlo do CTV

Os danos causados pelo CTV numa dada região dependem das variedades de citrinos predominantes, dos isolados virais e afídios presentes (Garnsey *et al.*, 1998). A caracterização dos isolados virais é feita por indexagem biológica em plantas indicadoras como a limeira Mexicana (Garnsey *et al.*, 1987, 2005) e por métodos moleculares baseados no PCR (Moreno *et al.*, 2008).

A deteção precoce do CTV é considerada a estratégia de controlo mais eficaz (Lin *et al.*, 2000). Por esta razão, os citrinos devem ser avaliados regularmente para que as árvores infetadas sejam removidas com o objetivo de prevenir a propagação do CTV (Adkar-Purushothama *et al.*, 2011). As medidas de quarentena e os programas de certificação têm um papel importante em evitar a introdução e a dispersão do CTV numa dada região (Navarro *et al.*, 2002).

A sintomatologia *quick decline* e *stem pitting* causados por estirpes severas levou à substituição do porta-enxerto laranjeira azeda por outros mais tolerantes ao CTV. No entanto, estes porta-enxertos atualmente mais utilizados

como as citranjeiras Carrizo e o Troyer (Castle, 2010), não estão adaptados a solos alcalinos, presentes na região mediterrânica, e por essa razão não favorecem o crescimento da variedade enxertada, além de serem mais suscetíveis a organismos patogénicos presentes no solo (Dawson *et al.*, 2013).

Na proteção cruzada os citrinos são infetados com um isolado *mild* do CTV que previne uma infeção secundária provocada por isolados severos e por essa razão esta metodologia é designada por pré-imunização (Hull, 2002; Gal-On e Shibolet, 2006). Esta técnica de proteção é utilizada em regiões onde se encontram presentes isolados severos do CTV.

A produção de citrinos resistentes ao CTV através de reprodução convencional ou por métodos biotecnológicos poderá ser outra técnica de controlo da Tristeza (Cambra *et al.*, 2000a). Contudo, o melhoramento genético convencional é comprometido devido à reprodução genética e complexa dos citrinos (Moreno *et al.*, 2008). A apomixia (Frost, 1968; Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996), os níveis elevados de heterozigotia (Soost e Cameron, 1975; Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996), a esterilidade de parte do pólen e/ou óvulos, a auto-incompatibilidade e a incompatibilidade cruzada, e o longo período de juvenilidade (pelo menos cinco anos até ao aparecimento das primeiras flores) tornam o melhoramento genético por reprodução convencional um processo lento e limitado (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

Outras estratégias de controlo incluem o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sensíveis, fiáveis e altamente específicos para o CTV (Cambra *et al.*, 2000a) de forma a eliminar eficientemente as plantas infetadas e manter um nível de vírus muito baixo nos pomares. Além disto, a automatização e a gestão eletrónica dos dados é vital para aumentar a produtividade e a eficiência das análises de rotina para deteção do CTV (López *et al.*, 2003).

1.7 Diagnóstico do CTV

O diagnóstico do CTV tem sido realizado desde há muitos anos por indexagem biológica em hospedeiros sensíveis, sobretudo limeira mexicana ou *C. macrophylla* (Roistacher e Moreno, 1991). Embora fiável este método apresenta alguns inconvenientes, especialmente o longo tempo requerido para

a confirmação da infecção (Vela *et al.*, 1985; Nolasco *et al.*, 2009). Assim, a indexagem biológica, torna-se impraticável para análises em larga escala e em tempo real, tal como é exigido nas campanhas de erradicação e nos programas intensivos de certificação necessários em zonas afetadas pela Tristeza (Cambra *et al.*, 2000b).

As técnicas serológicas comumente utilizadas para a deteção do CTV são o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), nomeadamente o *direct tissue blot immunoassay* (DTBIA) (Garnsey e Cambra, 1993) e o *double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS-ELISA) (Bar-Joseph *et al.*, 1979b; Cambra *et al.*, 1979). A metodologia DAS-ELISA foi revolucionária por permitir testar um maior número de amostras num curto período de tempo (Cambra *et al.*, 2000b). A produção de anticorpos monoclonais específicos para o CTV (Permar *et al.*, 1990) resolveu os problemas de especificidade e aumentou a sensibilidade dos testes de ELISA (Atta *et al.*, 2012). Estas técnicas são rápidas de executar e estão associadas a um baixo custo (Saponari *et al.*, 2008). No entanto, a deteção do CTV através de técnicas serológicas apresenta algumas desvantagens: é difícil quando o título viral é baixo (Mathews *et al.*, 1997; Galipienso *et al.*, 2000; Hung *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2005) e/ou quando existe uma distribuição desigual do vírus nas plantas infetadas (Galipienso *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2005; Loconsole *et al.*, 2010). Em geral, as técnicas serológicas são fiáveis durante apenas certos períodos do ano quando o título viral é alto (Mathews *et al.*, 1997). O máximo título viral de CTV ocorre na primavera (Cambra *et al.*, 2000a), enquanto os baixos níveis no verão podem levar à não deteção (Mathews *et al.*, 1997).

Para ultrapassar estas limitações e melhorar a sensibilidade, têm sido desenvolvidos métodos baseados na *polymerase chain reaction* (PCR) (Loconsole *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2015): *reverse transcription - polimerase chain reaction* (RT-PCR) num passo (Hung *et al.*, 2000), RT-PCR em dois passos (Mehta *et al.*, 1997; Hilf e Garnsey, 2000; Huang *et al.*, 2004) e *immunocapture/reverse transcription - polimerase chain reaction* (IC/RT-PCR) (Nolasco *et al.*, 1993).

Os métodos moleculares são sensíveis, altamente específicos (Roy *et al.*, 2005) e rápidos (López *et al.*, 2003).

Quer as técnicas serológicas quer as baseadas no PCR com a utilização de *primers* específicos, permitem a deteção do vírus, mesmo quando camuflados por um número elevado de outros microrganismos. No entanto, a especificidade dos métodos moleculares é maior e está diretamente relacionada com o *design* de *primers* e com o protocolo de amplificação (López *et al.*, 2003).

Quando a sensibilidade da deteção não é suficiente, o *nested-PCR* poderá ajudar, mas ao necessitar de duas rondas de amplificação em diferentes tubos, aumenta bastante o risco de contaminação (Roberts, 1996; López *et al.*, 2003). O desenvolvimento do *nested-PCR* em apenas um tubo é uma alternativa interessante (Olmos *et al.*, 1999, 2003; López *et al.*, 2003), reduzindo drasticamente o risco de contaminação (Cambra *et al.*, 2000a).

Uma outra possibilidade mais sensível do que o PCR convencional é o PCR ELISA que, tal como o nome indica, combina o PCR e o ELISA numa única técnica com um tempo de análise mais curto e um limite inferior de deteção mais baixo (Sue *et al.*, 2014). Este método é similar ao ELISA com a exceção de se detetar ácidos nucleicos em vez de proteínas (Di Pinto *et al.*, 2012). O PCR Elisa incorpora um marcador não radioativo como a digoxigenina (DIG) nos produtos de PCR durante a amplificação (Nolasco *et al.*, 2002), seguido de um passo de imobilização do gene de interesse a uma microplaca (Sue *et al.*, 2014). A deteção é feita através da adição de uma enzima conjugada específica para o DIG e de um substrato colorimétrico (Nolasco *et al.*, 2002). Por sua vez, a modificação entretanto introduzida e que inclui um PCR assimétrico no processo tornou-o mais fácil, mais sensível e menos dispendioso (Nolasco *et al.*, 2002).

Um outro conceito de PCR mais rápido e económico patentado como *co-operational PCR* (Co-PCR) é também utilizado para a deteção do CTV (Olmos *et al.*, 2002), e consiste na transcrição reversa simultânea de dois fragmentos diferentes de um mesmo alvo, um interno ao outro, e na ação simultânea de dois pares de *primers* (López *et al.*, 2003). Contudo, a reduzida quantidade de reagentes (dez vezes menor do que no PCR convencional) aumenta provavelmente a suscetibilidade a inibidores, o que requer a extração *a priori* de RNA (López *et al.*, 2003).

Embora as últimas técnicas de PCR acima referidas consigam detetar um baixo título viral, têm a desvantagem de não ser quantitativas (Saponari *et al.*, 2008).

De fato, apenas o *real-time* PCR combina a amplificação, a deteção e a quantificação num único passo (Weller *et al.*, 2000; López *et al.*, 2003). É uma metodologia mais sensível e rápida quando comparada com o PCR convencional, pois reduz o número de ciclos e passos, além de não ser preciso o passo de eletroforese (Loconsole *et al.*, 2010; Adkar-Purushothama *et al.*, 2011; Saponari *et al.*, 2013; Osman *et al.*, 2015). Porém, esta metodologia exige técnicos especializados, o equipamento e os reagentes de *real-time* PCR são muito caros para análises de rotina, o que limita a disponibilização do método a laboratórios de investigação e não aos laboratórios envolvidos nos programas de certificação dos milhares de árvores existentes geralmente num pomar (Adkar-Purushothama *et al.*, 2011).

1.8 Conceitos básicos de espectroscopia

A espectroscopia quantifica a interação da matéria com um feixe de luz incidente (Naranjo *et al.*, 2014). As características do feixe de luz incidente são modificadas enquanto este passa através de uma amostra devido à absorção diferencial em função do comprimento de onda e aos processos de espalhamento (Sankaran *et al.*, 2010) que resultam de múltiplas refrações provocadas por mudanças do índice de refração dentro da amostra e que dependem também do tamanho, forma e estrutura das partículas (Nicolai *et al.*, 2007). É habitual resumir a interação da luz com a matéria dizendo que a luz incidente pode ser refletida, absorvida ou transmitida (Nicolai *et al.*, 2007), sendo que a transmissão está sujeita aos processos de dispersão referidos acima.

Relativamente à reflexão, é importante salientar, que existem dois tipos possíveis: a reflexão especular, e a reflexão difusa. Na reflexão especular verifica-se que o ângulo de reflexão relativamente à normal à superfície é igual ao ângulo de incidência. Verifica-se na interface com um meio liso e sem efeitos de dispersão. Na reflexão difusa observa-se luz refletida em todos os ângulos, mesmo que a luz incida segundo um ângulo bem determinado. Esta

forma de reflexão tem duas origens distintas: por um lado pode dever-se a uma interface rugosa; por outro, pode dever-se ao espalhamento nos casos em que a luz penetra o meio e subsequentemente emerge na superfície após absorção parcial e espalhamento múltiplo (Boisdé e Harmer, 1996). Assim, apenas as características óticas da reflexão difusa são reconhecidas como dependentes da composição interna da amostra (Boisdé e Harmer, 1996).

A radiação ótica abrange um alcance espectral desde os 100 nm até aos 1000 μm (Zude, 2009), que inclui a região do visível (VIS) que cobre os comprimentos de onda dos 400 aos 700 nm enquanto a do near infrared (NIR) ocupa a gama entre os 700 e os 1000 nm.

A refletância e transmitância são dois modos da espectroscopia VIS e NIR (Fu *et al.*, 2007).

No modo de transmitância a luz incidente ilumina perpendicularmente um lado da amostra e a luz transmitida é detetada no lado oposto (Kawano *et al.*, 1993; Miyamoto e Yoshinobu, 1995; Greensil e Newman, 1999; Schaare e Fraser, 2000) (Figura 1.7) enquanto que no modo de refletância a luz incide e é recolhida no mesmo lado da amostra (Figura 1.7). Como se referiu, a luz volta a emergir na mesma face devido à reflexão superficial (especular ou difusa) e/ou aos processos de espalhamento (Zude, 2009). Dependendo da geometria adotada é possível incluir ou não a componente superficial.

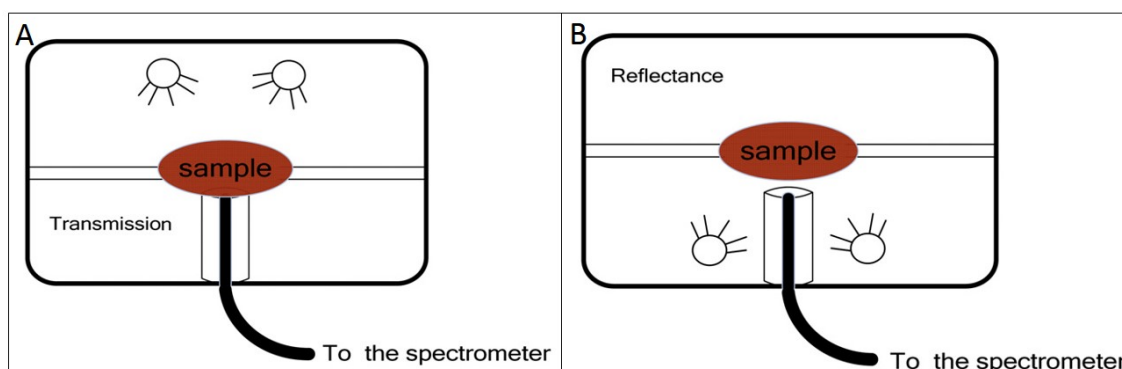


Figura 1.7: Esquema da posição do detetor e da fonte de luz consoante o tipo de medida: A) Transmitância; B) Refletância. Adaptado de Wang *et al.* (2011).

1.8.1 Vantagens e desvantagens

A espectroscopia VIS-NIR é um método rápido (Liew *et al.*, 2008), não destrutivo (Cen *et al.*, 2007), sensível (Delalieux *et al.*, 2009), que requer uma preparação mínima da amostra (Cen *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2007) e que tem uma boa relação eficiência/custo para detecção de doenças em plantas (Sankaran *et al.*, 2010). Contudo, esta técnica não é mais utilizada devido à falta de conhecimentos da análise espectral (Cen e He, 2007).

Os espectros podem ainda ser complicados pelos efeitos de espalhamento, heterogeneidades do tecido, ruído instrumental, efeitos ambientais e outras fontes de variabilidade (Nicolaï *et al.*, 2007). Por isso, é importante minimizar a variabilidade e a interferência do ambiente, como a luz e as flutuações de temperatura ou tê-las em conta no processamento dos dados (Nicolaï *et al.*, 2007), residindo aqui um dos principais problemas da espectroscopia: o elevado volume de dados (Lorente *et al.*, 2015) e a sua variabilidade. Daí a necessidade de extrair a informação essencial dos espectros, usando métodos como o PCA (Xie *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Lorente *et al.*, 2015) (ver 2.2.4 *Principal component analysis (PCA)*).

1.8.2 Princípios básicos da espectroscopia em plantas

A absorção resulta principalmente da vibração das ligações covalentes entre os átomos de oxigénio, carbono, hidrogénio e azoto presentes nos componentes bioquímicos das plantas como o açúcar, lignina, celulose e proteínas (Fourty *et al.*, 1996).

Quanto aos principais elementos responsáveis pelo espalhamento da luz nos tecidos vegetais, estão as membranas plasmáticas e as paredes celulares (McGlone *et al.*, 1997). Para além destas primeiras barreiras, há ainda que ter em conta organelos como cloroplastos e mitocôndrias, e/ou partículas suspensas no citoplasma ou no interior dos organelos, como proteínas ou grãos de amido, que também induzem espalhamento causado pela difração na superfície da partícula/organelo onde o índice de refração é diferente (Il'yasov e Krasnikov, 1991).

Na região visível do espectro, os compostos responsáveis pela absorção da luz são os pigmentos como a clorofila, carotenoides e antocianinas (Abbott, 1999) que absorvem, cada um deles, comprimentos de onda específicos (Zude, 2009). O espectro de absorção das moléculas de clorofila intactas apresenta duas bandas dominantes no azul (por volta dos 420 nm) e no vermelho (cerca de 680 nm), de onde resulta a percepção da cor verde que atribuímos às plantas (Liew *et al.*, 2008).

Na região NIR a absorção de luz é controlada pela estrutura e composição internas da folha (Maas e Dunlap, 1989), nomeadamente por compostos como os glícidos, gorduras e proteínas (Abbott, 1999). Os padrões da refletância são influenciados não só pela composição química das folhas e arquitetura interna, mas também pelas características da superfície da folha (Liew *et al.*, 2008).

1.8.2.1 Aplicações e potencialidades

As propriedades óticas das folhas respondem a uma grande variedade de stresses bióticos e abióticos, nomeadamente: o aumento do dióxido de carbono e outros gases poluentes (Smith *et al.*, 2004; Thomas, 2005), temperaturas e radiações extremas (Janka *et al.*, 2013), níveis tóxicos de metais pesados (Rosso *et al.*, 2005), níveis intensos de radiação ultravioleta e ozono (Bornman e Vogelmann, 1991), disponibilidade limitada de água (Dobrowski *et al.*, 2005) (Graeff e Claupein, 2007), exposição a herbicidas (Smith *et al.*, 2005), condições de salinidade elevada (Peñuelas *et al.*, 1997), disponibilidade de nutrientes (Masoni *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2005), ataque de insetos (Riedell e Blackmer, 1999; Lawrence, 2003), herbivoria, fitopatologias, etc. Uma vez que condições de crescimento desfavoráveis resultam em diferenças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de folhas, caules e raízes, é de esperar um efeito detetável no modo como as plantas interagem com a luz (Delalieux *et al.*, 2007). Por esta razão, os espectros de transmitância e refletância são capazes de revelar alterações/desequilíbrios internos (Fu *et al.*, 2007) e ambos têm sido usados para monitorizar a percentagem de água, temperatura superficial, eficiência fotossintética e alterações estruturais nas plantas no diagnóstico precoce de uma resposta a stresses ambientais (Chaerle e Van Der Straeten, 2000).

Métodos óticos baseados na espectroscopia de Vis-NIR têm, por isso, sido usados para avaliar a qualidade de frutos e vegetais (Shao *et al.*, 2007), sendo um método eficaz para detetar propriedades internas dos frutos como o teor de sólido solúveis, acidez, matéria seca (Ventura *et al.*, 1998; Schmilovitch *et al.*, 2000; Bechar *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006; Cen *et al.*, 2007; Cavaco *et al.*, 2008; Cayuela, 2008), firmeza (Cavaco *et al.*, 2009b), teor de pigmentos fotossintéticos (Cavaco *et al.*, 2010), pH e conteúdo de vitamina C (Xia *et al.*, 2007).

Para além da área alimentar (Li *et al.*, 2007), a espectroscopia NIR, é usada cada vez mais na agricultura para estimar diferentes parâmetros das colheitas como o nível de produtividade (Deering, 1989; Larsolle e Hamid Muhammed, 2007) e na deteção de infestações de insetos e patogénicos de plantas (Steddom *et al.*, 2003), inclusive virais: diagnóstico precoce de infeção de *tomato mosaic virus* em *Nicotiana debneyi* (Bravo *et al.*, 2003), *beet necrotic yellow vein virus* em beterrabas (Steddom *et al.*, 2003) e *tulip breaking virus* em tulipas (Polder *et al.*, 2010), dado que as infeções virais causam uma significativa reorganização do metabolismo celular e levam a numerosas alterações em características físicas e químicas das plantas (Tsogin *et al.*, 1985; Melik-Sarcisov *et al.*, 1987; Polischuk *et al.*, 1997).

Devido à rápida resposta dos pigmentos e das mudanças estruturais nos tecidos das plantas (Zude, 2009), o uso da espectroscopia para detetar situações de *stress*, ainda numa fase inicial do seu desenvolvimento, em plantas apresenta um grande potencial para a otimização do controlo e gestão de culturas agrícolas com elevado valor comercial (Delalieux *et al.*, 2009), sobretudo no contexto da agricultura de precisão.

Estudos recentes mostraram ser possível descobrir alterações espectrais que funcionam como diagnóstico de desvios específicos na saúde nas plantas (Liew *et al.*, 2008). Assim, algumas bandas ao serem específicas na presença de uma determinada doença podem ser usadas para a sua deteção, mesmo antes de os sintomas serem visíveis e severos (West *et al.*, 2003).

A discriminação fidedigna e robusta entre plantas saudáveis e doentes irá depender fortemente da capacidade de identificação de diferenças entre os

respetivos espectros (West *et al.*, 2003). Para tal, é necessário a identificação e seleção das melhores regiões do espectro/comprimentos de onda (Delalieux *et al.*, 2007) e/ou as melhores combinações dos mesmos que permitam essa discriminação (West *et al.*, 2003).

1.9 Fluorescência da clorofila *a*

As plantas absorvem luz, viabilizando assim todo o processo fotossintético, por intermédio de pigmentos específicos que incluem as clorofilas (*a* e *b*) e os carotenóides. Outros pigmentos como antocianinas também são capazes de absorver luz, embora sem impacto no processo fotossintético (DeEll e Toivonen, 2003). Ao nível dos pigmentos fotossintéticos, esta energia absorvida é depois dissipada através de três processos que competem entre si: fotossíntese, dissipação sob forma de calor e emissão de fluorescência pela clorofila *a* do centro de reação do fotossistema II (PSII) (Maxwell e Johnson, 2000; Guidi *et al.*, 2007). A razão F_v/F_m é uma das mais importantes medições da fluorescência (Rolfe e Scholes, 2010) ao ser um indicador da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (PSII) (Kocheva *et al.*, 2004) e geralmente varia entre 0,8 e 0,85 nas plantas, diminuindo em condições de *stress* (Chiu *et al.*, 2015). Embora, em condições fisiológicas favoráveis a maior parte da luz absorvida pelas plantas (cerca de 80-90%) seja catalisada para o metabolismo fotossintético (Buschmann, 2007), 5-15% para dissipação de calor e 0,2-2% para emissão de fluorescência (Chiu *et al.*, 2015), estes processos ao serem competitivos significa que um aumento na fluorescência implica uma diminuição proporcional nos outros dois (Guidi *et al.*, 2007). Deste modo, a medição da fluorescência pode fornecer informações úteis sobre a performance fotossintética das folhas (Baker e Rosenqvist, 2004) ou a presença de fisiopatologias noutros órgãos, nomeadamente em frutos (Guerra *et al.*, 2012).

A fluorescência provou ser um método rápido (Chiu *et al.*, 2015), fiável e não destrutivo que é usado no estudo da performance fotossintética e capaz de avaliar o estado fisiológico de diversos órgãos das plantas (Schreiber e Bilger, 1993; van Rensburg *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1998; Maxwell e Johnson, 2000; Rizza *et al.*, 2001; Kocheva *et al.*, 2004; Guidi *et al.*, 2007; Gardé *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2012), ao identificar e determinar com sucesso situações

de *stress* abiótico provocado por alteração de diversos fatores ambientais (Cavaco *et al.*, 2003; Lundmark *et al.*, 2006; Cherif *et al.*, 2010; Janka *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2015) e de *stress* biótico promovido pela presença/infeção de agentes patogênicos (Marcassa *et al.*, 2006), mesmo na ausência de sintomas visíveis (Guo *et al.*, 2005). Relativamente às fisopatologias provocadas por insetos, vírus, fungos e bactérias, observam-se mudanças no processo fotossintético e manipulação do metabolismo dos glúcidos nas plantas hospedeiras, para seu próprio benefício, que podem, no caso particular dos vírus, mobilizar também todo o metabolismo de síntese proteica para a sua própria replicação e propagação na planta (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008).

Além da fluorescência no vermelho (fluorescência da clorofila *a*), existe fluorescência no azul e no verde derivada dos fenóis da parede celular e dos vacúolos das células vegetais (Stober e Lichtenthaler, 1993). Enquanto a fluorescência da clorofila *a* de folhas intatas varia com o tempo, estando inversamente relacionada com a atividade fotossintética (Krause e Weis, 1991), a intensidade da fluorescência no verde-azul das folhas é constante (Chappelle *et al.*, 1985), podendo ser medida e utilizada para outros fins.

Os desenvolvimentos não só na instrumentação para medição da fluorescência (Baker e Rosenqvist, 2004) e de *software* associado, mas também da consequente simplificação da sua medição e análise (Rolfe e Scholes, 2010) têm levado à difusão do uso desta técnica nos estudos fisiológicos das plantas (Baker e Rosenqvist, 2004), tornando-a mais acessível à comunidade científica não especializada (Rolfe e Scholes, 2010). Contudo, uma das principais desvantagens das medições da fluorescência, a não ser que estejamos a falar de imagiologia de fluorescência (Cavaco *et al.*, 2009a), é que esta fornece informação sobre um único local da folha, onde assenta a sonda do fluorómetro, é que esta fornece informação sobre um único *spot* da folha, não sendo por isso representativo do estado fisiológico de toda a folha e/ou planta (Lichtenthaler *et al.*, 1996). Além disto, vários fatores bióticos e abióticos induzem alterações no metabolismo fotossintético, modificando de modo significativo a emissão da fluorescência (Baker e Rosenqvist, 2004), o que por vezes torna difícil a identificação do fator específico causador do *stress*, sobretudo quando as plantas se encontram no campo, sem controlo das

condições (Pedrós *et al.*, 2008). Como tal, de modo a tornar a utilização da técnica de determinação convencional (fluorómetros modulados ou não modulados) de fluorescência da clorofila *a* mais eficaz, a mesma é usada em combinação com outras técnicas (Maxwell e Johnson, 2000) como, por exemplo, a determinação das taxas de fotossíntese com recurso ao IRGA (*infra red gas analyzer*) (Cavaco *et al.*, 2003).

1.10 Objetivos

O CTV é o agente causal da Tristeza, uma das mais graves doenças dos citrinos. A deteção do vírus numa fase inicial da infeção é importante para o controlo da sua disseminação e certificação de plântulas não infetadas para instalação em pomares. Tendo isto em conta, esta tese teve o seguinte objetivo:

Estabelecer um protocolo de diagnóstico não invasivo e expedito com recurso à aplicação de métodos espectroscópicos, nomeadamente, fluorescência da clorofila *a* e espectroscopia de Vis/NIR, combinado com técnicas de análise multivariada, para identificação de plantas de citrinos infetadas com o isolado do CTV T318A embora assintomáticas.

Para validação do protocolo não invasivo, recorreu-se à deteção do CTV através de métodos convencionais, nomeadamente por IC/RT-PCR e *real-time* PCR, nas plantas de Clementina 'Fina' (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka cv. Fina) e laranja 'Valencia late' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia late).

2 Materiais e métodos

No presente trabalho foi adotada a designação científica das espécies de *Citrus* de acordo com (Cottin, 2002).

2.1 Componente biologia molecular

2.1.1 Material vegetal e isolado viral

Oito plantas Clementina 'Fina' (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka cv. Fina) (numeradas de 1 a 8) e oito plantas 'Valencia late' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia late) (plantas 9 a 16), foram mantidas numa estufa à prova de insetos. Quatro plantas de cada variedade foram inoculadas com o isolado T318A do *Citrus tristeza virus* (CTV) T318A através da enxertia de material vegetal de outras plantas infetadas com este vírus. O isolado T318A, com origem em Espanha, foi cedido pelo Dr. Leandro Peña [Instituto de Biologia Molecular e Celular de Plantas, Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC) - Universidade Politécnica de Valencia (UPV)].

2.1.2 Primers usados nas reações de amplificação

Nas reações de amplificação por *polymerase chain reaction* (PCR) foram utilizados os pares de *primers* apresentados na Tabela 2.1.

O *primer* CTV5 Fw foi desenhado no *software* Geneious (versão 6.1.5).

Tabela 2.1: *Primers* utilizados nas reações de amplificação com o respetivo gene e dimensão do fragmento amplificado.

Designação	Sequência 5'-3'	Gene amplificado	Dimensão aproximada do fragmento	Referência
CTV1 Fw	ATG GAC GAC GAR ACA AAG	Cápside proteica do CTV – Gene p25 (GenBank DQ151548)	670 bp	(Ruiz-Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
CTV2 Rv	TCA ACG TGT GTT YAA TTT CC			-
CTV5 Fw	CAA AAA CAA GGA AAC GAA AGA AG			-
CTV3 Fw	CGC GTG GGT TAT TTT TCG TAC	Parte da ORF 1b-2 (GenBank DQ151548)	148 bp	(Ruiz-Ruiz <i>et al.</i> , 2007)
CTV4 Rv	CGA AGG CAA ACA TCT CGA CTC			
COX Fw	gTA TgC CAC gTC gCA TTC CAg A	Sequência parcial do gene citocromo oxidase (GenBank CX297817)	68 bp	(Li <i>et al.</i> , 2006)
COX Rv	gC CAA AAC TgC TAA ggg CAT TC			
Ubi Fw	GCC GAC TAC AAC ATC CAG AAG G	Ubiquitina (GenBank X58253)	138 bp (em <i>Lycopersicum esculentum</i>)	(Rotenberg <i>et al.</i> , 2006)
Ubi Rv	TGC AAC ACA GCG AGC TTA ACC			
M13 Fw	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	Parte do pGEM T-Easy + inserto	304 bp	-
M13 Rv	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C			

2.1.3 Reação de IC/RT-PCR

2.1.3.1 Preparação dos extratos vegetais

Num almofariz previamente lavado com lixívia, foram macerados 0,2 g da casca do caule e pecíolos em 2 mL de tampão de extração (Anexos, Tabela 1) na presença de carborundum. Para clarificar o extrato, foi realizada uma centrifugação a 2300xg durante 5 min a 4°C.

Foram preparados extratos de todas as plantas envolvidas neste estudo, as Clementinas 'Fina' e as 'Valencia late'.

2.1.3.2 Imunocaptura e RT-PCR

O método da imunocaptura baseou-se no protocolo descrito por Nolasco *et al.* (1993). Tubos de PCR de 200 µL (Ref. 72.737.002, Sarstedt, Alemanha) foram revestidos com 25 µL de uma solução de IgG anti-CTV (Art. 151515, Bioreba, Suíça) diluído 1:1000 em tampão carbonato (Anexos, tabela 1) e colocados a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, os tubos revestidos foram lavados três vezes com tampão PBS-Tween (Anexos, Tabela 1).

De seguida, em cada um destes tubos foram colocados 25 µL do extrato clarificado, permanecendo durante 4h à temperatura ambiente para a captura do antigénio viral. Num dos tubos foi colocado o controlo positivo do CTV constituído por extrato liofilizado de casca e pecíolos de plantas infetadas com o CTV (Art. 151553, Bioreba, Suíça), diluído em tampão de extração.

Após este tempo de incubação, os tubos foram lavados duas vezes com a solução PBS-Tween e uma vez com água MilliQ.

Cada uma das lavagens teve a duração de 3 min.

Foi preparada uma reação de RT-PCR com um volume final de 25 µL composta por 3 mM de MgCl₂ (Promega, EUA), 200 µM de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 200 nM do *primer* CTV1, 200 nM do *primer* CTV2, 40 U de Ribonuclease Inhibitor (Nzytech, Portugal), 200 U de M-MuLV Reverse Transcriptase (Nzytech, Portugal), 0,8 mM de DTT (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 0,4 U de *GoTaq* DNA Polimerase (Promega, EUA),

respetivo tampão 1x e água MilliQ. Para realizar esta amplificação, o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio Rad, EUA) foi programado para 37°C durante 45 min (transcrição reversa), seguido de um passo a 95°C durante 2 min e de 35 ciclos de 94°C durante 30 s (passo de desnaturação), 54°C durante 35 s (passo de *annealing*) e 72°C durante 40s (síntese de DNA), finalizando com um passo a 72°C durante 5 min.

2.1.4 Extração de RNA total

Cerca de 200 mg da casca dos ramos e de pecíolos de cada uma das plantas analisadas foram macerados em azoto líquido num almofariz, previamente lavado com lixívia ou esterilizado, para extração de RNA total com o TRI Reagent (Sigma-Aldrich, EUA). O protocolo realizou-se de acordo com as instruções do fabricante. A seguir ao passo de lavagem do *pellet* de RNA com 1 mL de etanol a 75%, seguiu-se uma centrifugação a 12000xg. Este passo de lavagem foi repetido.

O RNA total foi eluído em 50 µL de água DEPC aquecida a 60°C, quantificado pelo Nanodrop (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, EUA) e guardado a -80°C.

O possível DNA contaminante presente nas amostras foi removido usando o TURBO DNA-free KiT (Ambion, Life Technologies, EUA). Procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA resultante foi quantificado e guardado a -80°C.

Foi realizada uma segunda extração de RNA total para as plantas 5, 6, 8 e 12, dois meses após terem sido re-inoculadas com o vírus do CTV, o que ocorreu no dia 2/3/15. Também para as plantas 3, 4, 13, 14, 15 e 16 foi realizada uma segunda extração de RNA total devido a uma provável contaminação na primeira extração.

2.1.5 Síntese de cDNA com *random hexamers*

Uma mistura de reação contendo 500ng de RNA purificado, 200 ng de Random hexamers (Jena Biosciences, Alemanha) e água DEPC, perfazendo um volume de 14 µL, foi incubada a 65°C durante 5 min. De seguida, foram adicionados 500 µM de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 8U de RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, EUA), 160U de RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, EUA) e respetivo tampão 1X (Thermo Scientific, EUA). Esta mistura de 20 µL esteve depois, durante 10 minutos, a 25°C (passo para maximizar ligação dos *primers*), seguindo-se uma hora e meia a 42°C (transcrição reversa) e, por fim, a 70°C durante 10 minutos (inativação da enzima).

O cDNA sintetizado foi guardado a -80°C.

2.1.5.1 Confirmação da síntese de cDNA

Para confirmar a síntese de cDNA, foi preparada uma reação de PCR com um volume final de 20 µL composta por 2 µL do cDNA sintetizado, 3 mM de MgCl₂ (Promega, EUA), 200 µM de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 200 nM do *primer* Ubi 3 Fw, 200 nM do *primer* Ubi 3 Rv, 0,4 U de *Go Taq* DNA Polimerase (Promega, EUA) e respetivo tampão 5x e água MilliQ. Para realizar esta amplificação, o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio Rad, EUA) foi programado para 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 s (passo de desnaturação), 52°C durante 35 s (passo de *annealing*) e 72°C durante 40s (síntese de DNA), finalizando com 72°C durante 5 min.

Foi incluído um controlo negativo que continha água em vez do cDNA sintetizado.

2.1.5.2 PCR para amplificação do gene p25

O PCR para amplificação do gene p25 do CTV consistiu numa mistura igual à descrita em 2.1.5.1, com a exceção de se terem usado os *primers* CTV2 e CTV5.

Para realizar esta amplificação, o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio Rad, EUA) foi programado de acordo com o descrito em 2.1.5.1, mas com uma temperatura de *annealing* de 56°C.

Foi incluído um controlo negativo que continha água em vez do cDNA sintetizado e um controlo positivo com cDNA da planta *Citrus macrophylla* (planta 24) infetada com o vírus T318A previamente confirmada.

2.1.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Anexos, Tabela 1) e corados com brometo de etídio (Sambrook *et al.*, 1989). Após eletroforese a uma diferença de potencial de 100 V, foram visualizados sob luz UV, sendo a imagem captada e processada através do *software* Alphamager versão 6.0.0. (Alpha Innotech, Alemanha).

O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com bandas de peso molecular conhecido, usando os seguintes marcadores: 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, EUA) (Anexos, Figura 1) ou NZYDNA Ladder III (Nzytech, Portugal) (Anexos, Figura 2).

2.1.7 Extração de DNA de géis de agarose

A agarose que continha a banda de interesse foi cortada, sob luz UV, com uma lâmina. O DNA foi depois extraído utilizando o “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

2.1.8 Reação de ligação

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR das plantas 7 (Clementina ‘Fina’), 9 (‘Valencia late’) e da planta *C. macrophylla* (planta 24), infetada com o vírus T318A, foram ligados no plasmídeo pGEM T-Easy (Promega, EUA) por “TA Cloning”.

A mistura da reação de ligação com um volume final de 10 μ L continha 5 μ L de tampão de ligação 2x, 15 ng do vetor pGEM T-Easy, aproximadamente 30 ng do produto de PCR, 5 U de T4 DNA ligase (Promega, EUA) e água MilliQ.

As reações foram incubadas a 4°C durante a noite.

2.1.9 Preparação de células competentes

O método para preparação de células competentes de *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 α baseou-se no protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1994).

Uma colónia isolada de *E. coli* DH5 α foi colocada a crescer em 5 mL de meio LB líquido a 37°C, durante a noite, com uma agitação de 200 rpm. No dia seguinte, 1 mL da cultura foi adicionada a 50 mL de meio LB líquido e posta novamente a crescer a 37°C com agitação até atingir uma densidade ótica de 0,4-0,5 a 600 nm. De seguida, a cultura foi colocada em gelo durante 10 min e centrifugada a 5000 rpm a 4°C durante 7 min. Após decantar a amostra, o *pellet* bacteriano foi ressuspensão em 5 mL de cloreto de cálcio 0,1 M arrefecido a 4°C e a cultura mantida em gelo durante 10 min. As células foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm durante 10 min a 4°C, decantadas e ressuspensas novamente em 5 mL de cloreto de cálcio 0,1 M para ser repetido o passo de lavagem. De seguida, foi adicionado glicerol de modo a ficar a 30% (v/v). As células foram distribuídas em alíquotas de 50 μ L e armazenadas a -80°C.

Foi confirmado que estas células eram viáveis, através do plaqueamento em meio LB sólido e não resistentes à ampicilina através do plaqueamento em meio LB semi-sólido suplementado com 75 μ g/mL de ampicilina.

Para confirmar a competência das células *E. coli* DH5 α , foi feita transformação genética com 1 μ L de uma “miniprep” diluída 1:20 do plasmídeo NT-TOPO e procedeu-se ao plaqueamento em meio LB semi-sólido com 75 μ g/mL de ampicilina.

2.1.10 Transformação de células competentes

O protocolo para a transformação de células competente foi baseado no descrito por Sambrook *et al.* (1989).

A uma alíquota de 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α foi adicionado 3 μ L da reação de ligação. As células foram mantidas em gelo durante 30 min e de seguida, foram incubadas a 42° C durante 90 s e colocadas diretamente, de novo, no gelo durante 2 min. Adicionou-se 100 μ L de meio LB e durante uma hora as células foram incubadas a 37°C com uma agitação de 200 rpm. Por fim, 50 μ L da cultura bacteriana foi plaqueada em caixas de Petri contendo meio LB sólido, 75 μ g/mL de ampicilina, 80 μ g/mL de X-Gal e 0,5 mM de IPTG.

As caixas de Petri ficaram a incubar a 37°C durante a noite.

2.1.11 Seleção das colónias transformadas

A seleção das colónias transformadas foi feita por seleção das colónias brancas, as quais contêm o fragmento pretendido inserido na região codificante do gene lacZ.

Duas colónias transformadas e isoladas foram cultivadas em 5 mL de meio LB líquido com uma concentração de 75 μ g/mL de ampicilina. As culturas ficaram a incubar durante a noite a 37°C com agitação de 200 rpm para se proceder a uma “miniprep”. A presença do plasmídeo pGEM T-Easy foi confirmada por amplificação do gene p25 com os primers CTV1 e CTV2. A mistura de PCR não diferiu da referida anteriormente (2.1.5.2), com exceção de se ter utilizado 1 μ L da “miniprep” diluída ao invés de 2 μ L de cDNA. Foi incluído um controlo negativo que em vez de DNA levou água.

2.1.12 Precipitação do DNA plasmídico (“miniprep”)

O DNA plasmídico foi precipitado segundo o método da lise alcalina descrito por Birnboim e Doly (1979), eluído em 50 μ L de água MilliQ, quantificado pelo Nanodrop e guardado a -20°C.

Verificada a existência de contaminação por RNA através da eletroforese em gel de agarose, as “minipreps” foram sujeitas à ação de 0,5 mg/mL de RNaseA

a 37°C durante meia hora e purificadas por precipitação com etanol/acetato de sódio. O precipitado de DNA plasmídico foi eluído em 40 µL de água MilliQ, novamente quantificado pelo Nanodrop e guardado a -20°C.

A sequenciação nucleotídica das “minipreps” foi feita no Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer do Centro de Ciências do Mar (CCMAR) da Universidade do Algarve.

2.1.13 Sequenciação dos genes clonados no vetor pGEM T-Easy e sua análise

As sequências nucleotídicas obtidas após sequenciação foram avaliadas usando o CLC Sequence Viewer (versão 6.8.1). Após eliminação da sequência nucleotídica pertencente ao pGEM T-Easy foi determinada a sequência do inserto do gene p25 o isolado viral presente nas plantas 7 e 9 e foi feito o alinhamento com a sequência nucleotídica da cápside proteica do CTV T318A (dados disponíveis no GenBank, DQ151548).

Foi também feita a sequenciação do fragmento amplificado por *real-time* PCR com os *primers* do CTV e com os *primers* do COX, assim como o seu alinhamento com parte da ORF 1b-2 do CTV (GenBank DQ151548) e com a sequência parcial do gene citocromo oxidase (GenBank CX297817), respetivamente.

2.1.14 Real-time PCR

O real-time PCR foi realizado no iCycler IQ Multicolor *Real-time* PCR (Bio Rad, EUA) a partir de um volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL de Sso Fast EvaGreen Supermix 2x (Bio Rad, EUA), 300 nM de cada um dos *primers*, 2 µL de cDNA sintetizado com *random hexamers* (diluído 1:5 em água DEPC) e 4,6 µL de água Sigma. Foram incluídas amostras controlo com cDNA de plantas saudáveis e com água em vez de cDNA (controlo negativo da reação). A amplificação consistiu num passo a 95°C durante 30 s, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5s (passo de desnaturação) e um final a 60°C durante 10s (passo de *annealing* e extensão). O protocolo da amplificação do gene de referência apenas diferiu no passo de *annealing*, tendo sido realizado a 58°C.

O DNA sintetizado é diretamente proporcional à quantidade do corante fluorescente SYBR Green detectado, uma vez que este se insere entre as novas cadeias duplas de DNA formadas (Shiple, 2006).

Por cada amostra amplificada é fornecido a intensidade da fluorescência e o *threshold cycle* (C_t) usando o método automático, assim como a curva de *melting*.

Como cada amostra foi analisada em triplicado, foi calculado a média e o desvio padrão para cada uma.

Para a sequenciação do gene de referência de pequenas dimensões (68 bp), colónias transformadas, que continham a sequência alvo, e isoladas foram colocadas a crescer durante 2 horas a 37°C em meio LB líquido suplementado com 75 µg/mL de ampicilina, tendo-se depois prosseguido para a sua amplificação. A mistura da reação de PCR não diferiu da referida anteriormente (2.1.5.2), com exceção de se ter utilizado 2 µL da cultura, ao invés de 2µL de cDNA e substituídos os *primers* CTV pelos M13. O termociclador My Cycler (Bio Rad, EUA) foi programado para 95°C durante 10 min (ruptura das células de *E.coli*), seguido de 35 ciclos de 95°C durante 15 s (passo de desnaturação), 60°C durante 15 s (passo de *annealing*) e 72°C durante 15s (síntese de DNA), finalizando com 72°C durante 5 min. Foi incluído um controlo negativo que em vez da cultura foi adicionado água. A presença do gene foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (2.1.6) por comparação com uma banda amplificada a partir de uma colónia azul (transformada mas sem o inserto), também posta a crescer nas mesmas condições. A cultura foi adicionada a 5 mL de meio LB líquido suplementado com 75 µg/mL de ampicilina, ficando a incubar durante a noite a 37°C com agitação de 200 rpm. O resultado da “miniprep” seguiu para sequenciação.

2.2 Componente ótica

2.2.1 Seleção das folhas

Em cada uma das dezasseis plantas foram marcados dois ramos (A e B) e etiquetada a quinta folha de cada um, contado a partir do ápice do ramo. Esta escolha foi feita com base em parâmetros como o tamanho e coloração esperados de uma folha totalmente expandida e em pleno estado de maturidade fisiológica, de modo a excluir a interferência de efeitos ontológicos no decorrer da experiência. Caso a quinta folha não estivesse em boas condições, era escolhida a anterior ou a seguinte que se encontrasse em melhor estado.

2.2.2 Medições

As medições de refletância, transmitância, fluorescência e radiância decorreram entre Outubro de 2014 e Abril de 2015 (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Dias em que decorreram as medições mensais de refletância e transmitância. (*) A transmitância foi medida dia 27/10/2014 e a refletância a 30/10/2014.

Dia	Data
1^(*)	27/10/2014 30/10/2014
2	01/12/2014
3	07/01/2015
4	05/02/2015
5	09/03/2015
6	08/04/2015

Foram calculadas as temperaturas e humidade relativa médias que se faziam sentir na estufa durante as medições, semana precedente e dia anterior, recorrendo aos registos automáticos diários de que a estufa dispõe. Em cada dia de medições, foi ainda determinada a radiância ao nível das folhas das plantas.

Foram ainda tiradas, mensalmente, fotografias às folhas medidas, de modo a acompanhar o seu desenvolvimento.

2.2.2.1 Refletância

Os espectros de refletância foram obtidos utilizando uma fibra ótica bifurcada com núcleos de 600 micrometros com uma sonda de refletância incorporada (QR600-7-VIS-125F, Ocean Optics, EUA) (Figura 2.1a), um adaptador para sonda de refletância construída nas oficinas da Universidade do Algarve (Figura 2.1d) e o *software* Ocean Optics Spectra Suite 2008 (versão 6.1).

A sonda de refletância é constituída por 6 fibras exteriores em torno de uma fibra central (Figura 2.1b). O padrão de iluminação da sonda está ilustrado na Figura 2.1c. Esta sonda pode usar-se em contacto direto ou a uma determinada distância da amostra. No entanto, a medição com contacto só é aplicável no caso em que a amostra é espessa e turbida (por exemplo leite, estearina ou uma maçã). As folhas de uma árvore são turbidas (espalham a luz) mas não são suficientemente espessas para oferecer um caminho de volta aos fotões entre as fibras de emissão e a fibra de receção. O único método possível aqui é o de manter a sonda a uma certa distância da folha. Contudo, com este método há dois problemas:

1. É necessário fixar a distância a que a fibra fica da folha, pois uma distância não fixa implicaria a não reprodutibilidade das medidas;
2. Quando a fibra não encosta na amostra há a contaminação do sinal ótico pela luz ambiente.

O adaptador construído nas oficinas tem por objetivo responder a estes dois problemas (Figura 2.1d e Figura 2.1e).

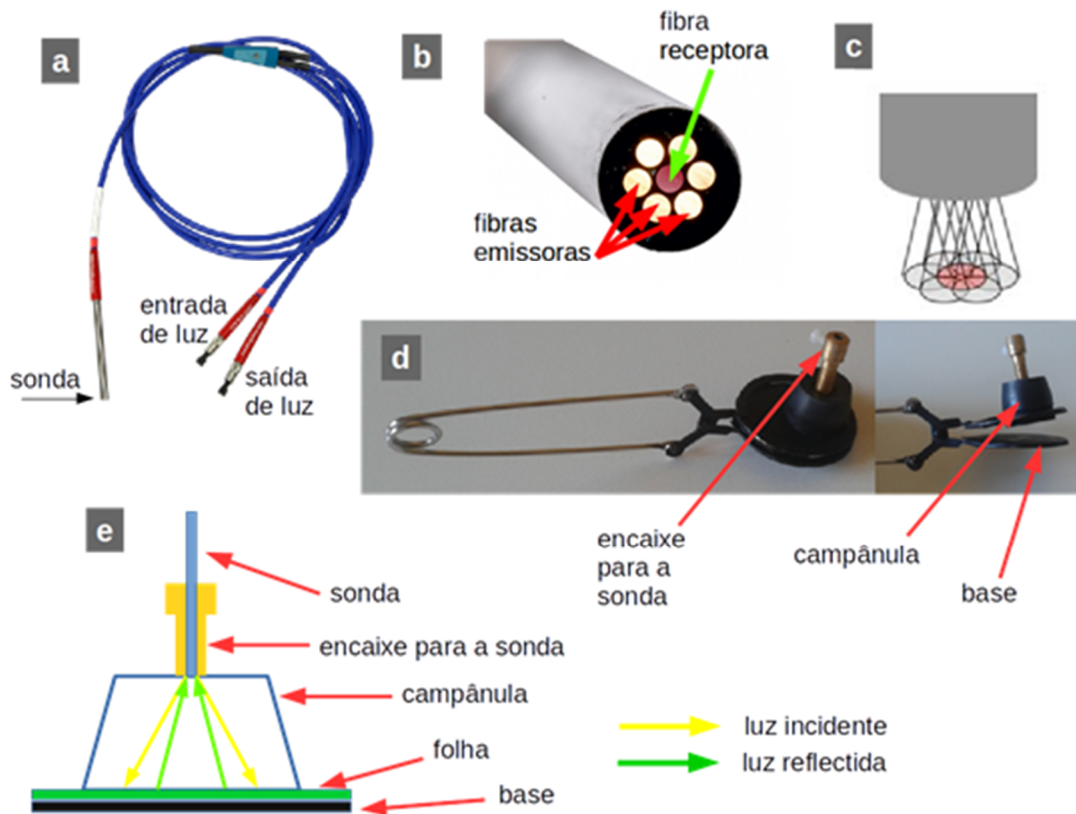


Figura 2.1: a) Fibra bifurcada com sonda de refletância (QR600-7-VIS-125F, Ocean Optics, EUA). b) Detalhe da sonda: contém 6 fibras de emissão no exterior e uma fibra de recepção no interior. c) Ilustração do padrão de iluminação da sonda de refletância. d) O adaptador construído nas oficinas da Universidade do Algarve. e) Ilustração do princípio de funcionamento da sonda no adaptador. (figuras a, b e c retiradas do site da Oceanoptics (2015))

Para adquirir espectros na banda do NIR (700-1100 nm), foi usado o espectrómetro Jaz (Ocean Optics, EUA) (Figura 2.2) que está otimizado para essa banda espectral. Este espectrómetro é portátil e modular, integrando numa só unidade vários módulos com diversas funções. No nosso caso o Jaz contém os seguintes módulos:

- Espectrómetro
- Fonte de luz de tungsténio-halógeno
- Bateria
- Painel de controlo com ligação USB e entrada para cartão de memória

Ainda com vista à obtenção da máxima reprodutibilidade nos resultados, determinou-se a configuração ideal para as medidas nas folhas, o que incluiu a intensidade da luz incidente, o tempo de integração do espectrómetro e o número de espectros adquiridos para fazer a média. Neste caso optou-se por fixar a intensidade da luz em 1524 (unidades lineares arbitrárias, internas ao próprio espectrómetro, em que a intensidade máxima da fonte é normalizada a 4000), um tempo de integração de 10ms e 50 varrimentos.



Figura 2.2: Espectrómetro JAZ (Ocean Optics, EUA) utilizado para medições do NIR.

Para adquirir os espectros na banda do visível (400-700 nm) foi utilizado o espectrómetro USB4000 (Ocean Optics, EUA) (Figura 2.3), tendo como fonte de luz o Jaz, regulado para uma intensidade de luz de 2395, um tempo de integração de 100 ms e 50 varrimentos.



Figura 2.3: Espectrómetro USB4000 (Ocean Optics, EUA) utilizado para medições no visível.

O procedimento da medição é comum a ambos os espectrómetros (Figura 2.4):

1. Antes da leitura do espectro da amostra, foi medido, em primeiro lugar, as chamadas contagens escuras ou *dark* (*D*), mantendo a fonte de luz tapada. As contagens escuras têm origem no ruído térmico do detetor, que é uma CCD (*charge coupled device*) linear. Numa CCD ideal os pixéis apenas acumulariam elétrons em resposta aos fótons incidentes. Numa CCD real há elétrons que são gerados devido à absorção de energia térmica e que portanto são gerados mesma na ausência de luz. Além disso, há ainda o chamado ruído de leitura (*readout noise*), associado à eletrônica de leitura da câmara. Assim a leitura das contagens escuras permite descontar estes efeitos.
2. De seguida foi utilizada uma folha de papel branco normal de impressora para obtenção do espectro de referência (*W*), tendo sido aqui ajustado o tempo de integração de modo a que o máximo da refletância ou transmitância fosse cerca de 90% da saturação. A medição de uma referência permite compensar variações no funcionamento das fontes de luz e/ou do espectrómetro, pois essas variações refletir-se-ão igualmente na referência e na amostra.
3. Finalmente efetuaram-se as medições das amostras, isto é, das folhas dos citrinos (*S*).
4. A temperatura de funcionamento do espectrómetro afeta as contagens escuras os espectros. Assim, para compensar esse efeito, as medições de *dark* e referência eram repetidas a cada quatro plantas.

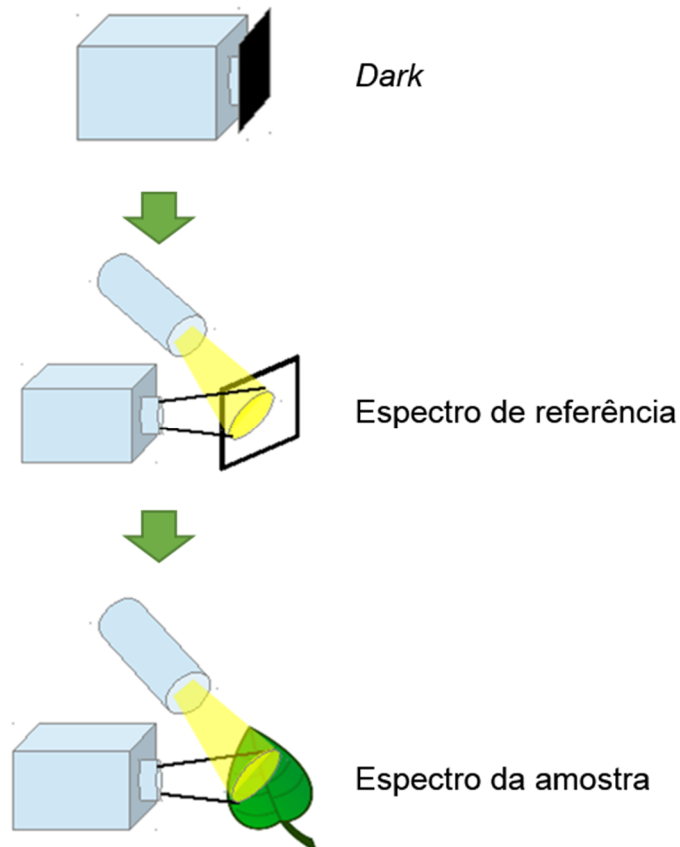


Figura 2.4: Procedimento adotado nas medições de refletância e transmitância.

As medições da refletância (R) ou transmitância (T) para cada amostra (S) foram convertidos para valores relativos segundo a fórmula (Lorente *et al.*, 2015):

$$R \text{ ou } T = \frac{S-D}{w-D} \quad (2.1)$$

2.2.2.2 Transmitância

Os espectros de transmitância foram obtidos utilizando duas fibras óticas com núcleo de 910 micron (Thorlabs, EUA), uma sonda de transmitância construída também nas oficinas da universidade (Figura 2.5) e o *software* Ocean Optics Spectra Suite 2008 (versão 6.1).

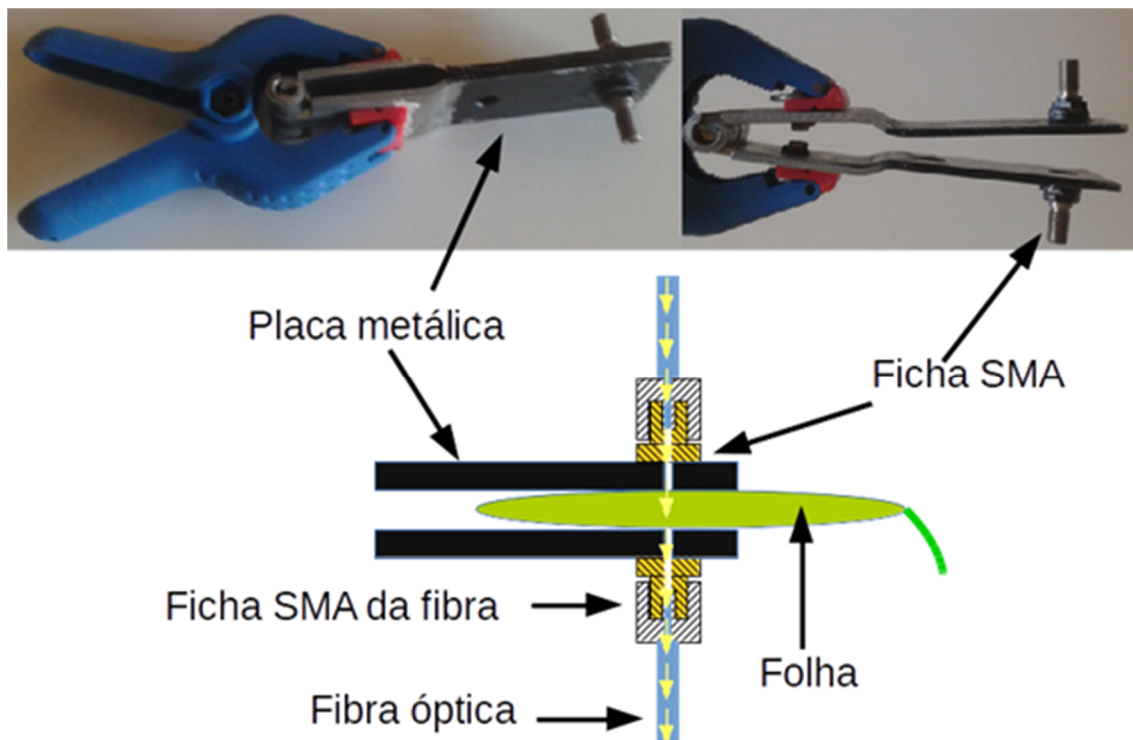


Figura 2.5: Sonda construída nas oficinas da Universidade do Algarve para medição da transmitância.

Para espectros do NIR (700-1100 nm) foi usado o Jaz (Ocean Optics, EUA) (Figura 2.2) com uma intensidade de luz de 895 (escala interna do aparelho), um tempo de integração de 10ms e 50 varrimentos.

Para os do visível (400-700 nm) foi utilizado o espectrómetro USB4000 (Ocean Optics, EUA) (Figura 2.3), tendo como fonte de luz o Jaz com uma intensidade de luz de 3095, um tempo de integração de 80 ms e 50 varrimentos.

O procedimento com ambos os espectrómetros foi igual ao descrito acima para a medição da refletância (Figura 2.4). Também a transmitância foi convertida em valores relativos.

2.2.2.3 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência foi medida nas mesmas datas que a refletância e transmitância, na parte da manhã (Tabela 2.2), exceto se o tempo estivesse nublado. Neste caso, a medição foi feita noutra dia próximo, nessa mesma semana, em que houvesse sol.

Para medir o valor mínimo de fluorescência (F_0), as folhas foram ser adaptadas a condições de escuridão. Para tal, foram colocados *clamps* fechados (Figura 2.6) nas folhas etiquetadas, durante pelo menos 15 minutos, tal como foi feito por Cavaco *et al.* (2003). Depois, com a sonda do fluorómetro não modulado (OS-30P Chlorophyll Fluorometer, Opti-Sciences, EUA) encaixada nos *clamps*, estes eram abertos (Figura 2.6) e uma luz saturante incidida na folha, permitindo a medição da fluorescência máxima (F_m) (DeEll e Toivonen, 2003). O fluorómetro usado determina ainda a razão F_v/F_m [$F_v/F_m = (F_m - F_0)/ F_m$] (Guerra *et al.*, 2012), um indicador do nível de stress da planta (Schreiber e Bilger, 1987).

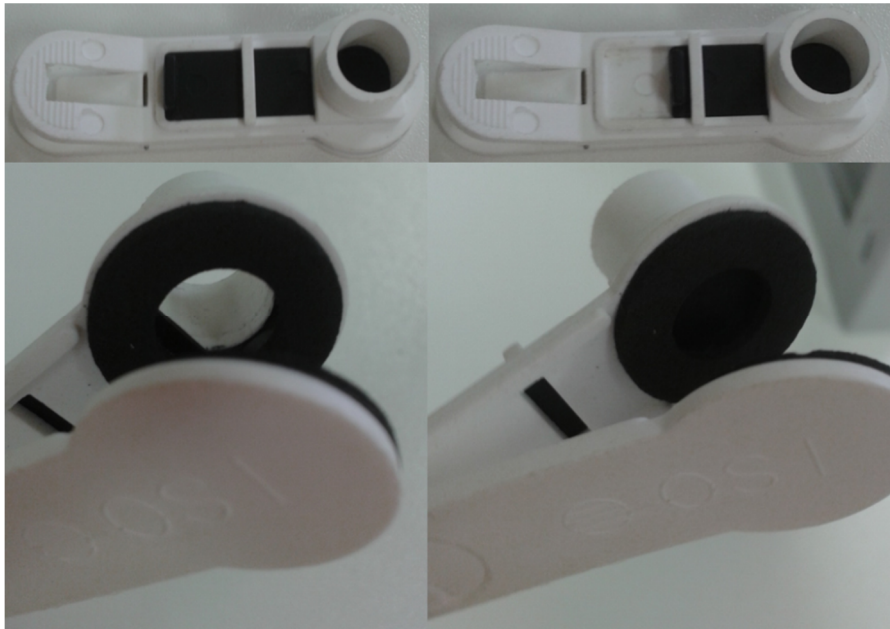


Figura 2.6: *Clamps* utilizados nas medições de fluorescência. Abertos do lado esquerdo e fechados à direita.

Quanto à irradiância, esta foi sempre medida nos mesmos dias da fluorescência, usando o Radiómetro MQ-200 (Apogee Instruments, EUA).

2.2.3 Pré-tratamento dos espectros

Todo o pré-tratamento e análise espectral foram programados com a linguagem computacional R (Matloff, 2011; Wehrens, 2011), utilizando o RStudio (versão 0.98.1103) com as bibliotecas “pls”, “prospectr”, “class” e “MASS”.

2.2.3.1 Transformação para absorvância

Para eliminar as diferenças nos espectros resultantes de constantes multiplicativas originadas, por exemplo, pela espessura da folha, estes são transformados em absorvância (A), usando a lei de Beer-Lambert (Robinson, 1974):

$$A = -\log T \Leftrightarrow A = \log \left(\frac{1}{T} \right) \quad (2.2)$$

Em rigor, a lei de Beer-Lambert, tal como é usada na espectrofotometria não é aplicável à propagação da luz nas folhas porque estas são difusoras, isto é, além da absorção existe ainda o fenómeno da difusão da luz. Numa análise habitual em espectrofotometria a componente de difusão é totalmente desprezável e assim a lei de Beer-Lambert é válida. Assumindo apenas uma componente de absorção e um percurso ótico homogéneo temos que a transmissão T é dada por

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon c L}, \quad (2.3)$$

em que I é a intensidade da luz à saída da amostra, I_0 é a intensidade à entrada, ϵ é o coeficiente de absorção molar, c é a concentração e L é o percurso ótico na amostra. Se se conhecer os valores de ϵ (tabelado) e L (lado da *cuvette*), a concentração na amostra é dada por

$$c = \frac{-\log(T)}{L} = \frac{\log(1/T)}{L}, \quad (2.4)$$

Relativamente aos espectros obtidos nas folhas, a situação é um pouco diferente:

- O valor de ϵ nas folhas corresponde à sobreposição de muitos compostos, de onde sobressaem a água, a clorofila e os carotenoides, mas com milhares de outras contribuições de todas as moléculas presentes. O que

se pode assumir em primeira aproximação é que a distribuição espectral de ϵ para cada um dos compostos, que se pode designar por $\epsilon_i(\lambda)$ [em que $i=1, \dots, N$ indexa os diferentes compostos e λ representa o comprimento de onda], é igual para todas as folhas (porque só depende do composto).

- Os valores de c_i são os valores das concentrações desses compostos em cada folha. Estes valores dependem, naturalmente de folha para folha.
- Finalmente o valor de L corresponde aproximadamente à espessura da folha. Na verdade, os efeitos da difusão da luz traduzem-se num aumento efetivo de L (Arridge *et al.*, 1992). Isto faz com que o valor de L dependa da amostra, não só por causa da espessura mas também das suas propriedades de difusão.

Assim, a transmissão através de uma folha tem a forma

$$T_j = 10^{-L_j \sum_i c_{ij}} \quad (2.5)$$

em que j indexa as folhas (e i indexa os componentes químicos, como já foi indicado acima). A aplicação do logaritmo conduz a uma absorvância que vale

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = L_j \sum_j c_{ij}. \quad (2.6)$$

Assim, a absorvância é um “bilhete de identidade” da folha, no sentido em que o seu valor depende das suas características internas através dos valores c_{ij} e L_j . A aplicação do logaritmo permite linearizar essa dependência, tornando-a mais facilmente tratável. Note-se, no entanto, que agora não é possível determinar as concentrações porque há uma infinidade de componentes e a espessura efetiva é desconhecida.

No entanto, há outro motivo para usar o logaritmo. O valor de I_0 corresponde à medição de referência e o valor de I à medição da amostra. Se a intensidade da fonte de luz variar entre estas duas medidas então há um erro na medição. Supondo que a luz flutuou por um fator multiplicativo a , então a transmitância obtida é $T'=aI/I_0$ e não $T=I/I_0$. Porém,

$$T' = \frac{aI}{I_0} \Rightarrow \log(T') = \log(a) + \log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \log(a) + \log(T). \quad (2.7)$$

Portanto, por derivação em relação ao comprimento de onda obtemos

$$\frac{d\log(T')}{d\lambda} = \frac{d\log(T)}{d\lambda}, \quad (2.8)$$

uma vez que a é uma constante. Deste modo, os espectros transformados para a derivada do logaritmo são imunes a variações multiplicativas e isso permite ter uma maior fiabilidade na análise.

2.2.3.2 Eliminação de *outliers*

Numa série de medidas um *outlier* é uma medida que foge ao padrão dominante. Se se considerar uma variável x que toma valores em $j=1,\dots,M$ amostras, uma medida que se afaste da média $\langle x \rangle$ por mais do que três desvios-padrão σ é habitualmente designada como *outlier*:

$$|x_l - \langle x \rangle| > 3\sigma \rightarrow \text{a amostra } l \text{ é um } \textit{outlier} \quad (2.9)$$

Há sempre uma incerteza nesta classificação. Uma medida extrema pode significar simplesmente uma amostra extrema, mas dentro da lei que explica todas as outras amostras; ou pode ser uma amostra que não é explicada por essa lei. Uma das maiores causas do aparecimento de *outliers* nas medições são erros de medição.

Neste trabalho as medidas são multivariadas: cada espectro tem centenas de variáveis. Optou-se por se fazer uma identificação visual simples dos espectros com padrões muito diferentes da média. Os espectros *outliers* de cada medida (reflectância e transmitância) foram substituídos pela média dos outros do respetivo dia.

Os espectros *outliers* de cada medida (reflectância e transmitância) foram substituídos pela média dos outros do respetivo dia.

2.2.3.3 Centragem na média

Todos os resultados foram centrados na média, de forma a serem interpretados como variações ao redor desta (Nicolai *et al.*, 2007). Para tal, a variável x é transformada na variável centrada x' :

$$x' = x - \langle x \rangle \quad (2.10)$$

No caso dos espectros a cada comprimento de onda medido corresponde uma variável. Assim, este processo de centragem é feito para cada variável.

2.2.3.4 Estandarização

Depois de os espectros serem centrados na média, estes, a cada comprimento de onda, foram divididos pelo desvio padrão (Nicolai *et al.*, 2007). A nova variável transformada x'' é portanto

$$x'' = \frac{x'}{\sigma} = \frac{x - \langle x \rangle}{\sigma} \quad (2.11)$$

A esta transformação completa (centragem na média + estandarização) também se chama auto-escalamento. O auto-escalamento é uma das operações mais habituais em análise multivariada. As variáveis auto-escaladas têm média 0 e desvio padrão unitário. Mais uma vez, este processo é aplicado a todas as variáveis do espectro.

2.2.3.5 Suavização e derivação

Os espectros obtidos contêm ruído. À medida que se percorre o espectro ao longo dos comprimentos de onda amostrados, verifica-se que os valores oscilam erráticamente em torno de uma tendência central. Este ruído é inerente à natureza estatística da luz (*shot noise*), aos elétrons excitados termicamente (*dark noise*) e ao ruído eletrónico do circuito (*readout noise*), sobrepondo-se à tendência suave central.

A suavização e a derivação são técnicas muito usadas em análise multivariada e que permitem remover o ruído e melhorar a resolução espectral (Cen e He, 2007). Para o fazer, foi utilizado o algoritmo de Savitzky-Golay (SG) em que à medida que a janela do filtro se move é aplicado uma regressão polinomial de grau escolhido para ser obtida a derivada de ordem pretendida (Cen e He,

2007). Estes parâmetros têm de ser selecionados com cuidado para evitar a amplificação do ruído existente (Nicolai *et al.*, 2007) e é muito importante escolher a largura ideal para a janela do filtro (Cen e He, 2007), pois este remove informação que não se sabe se será útil (Nicolai *et al.*, 2007). Por esta razão, foram testadas várias larguras (l), de dez em dez, desde 11 até 101 e as derivadas (d) de 1ª e 2ª ordem, mantendo sempre a ordem do polinómio (p) (2ª ordem).

2.2.3.6 Correção de efeitos aditivos e multiplicativos

Já foi referido que a difusão da luz pela amostra invalida a aplicação habitual da lei de Beer-Lambert que, em primeira aproximação, pode ser corrigida com um percurso ótico efetivo dependente das características de difusão. Do ponto de vista dos espectros obtidos, a difusão tem como efeito essencial uma translação vertical. Assim, pode modelar-se os espectros obtidos através de

$$x_k = a + bx_k^{ideal} + \epsilon, \quad (2.12)$$

em que x_k representa o espectro com $k=1, \dots, P$ comprimentos de onda, a e b são parâmetros de ajuste (a = translação, b = constante multiplicativa que dá conta, por exemplo, de variações de intensidade da luz), x_k^{ideal} representa o espectro “ideal”, ou seja, aquele que seria obtido se não existissem efeitos de difusão, efeitos multiplicativos como variações de intensidade ou fontes de ruído ϵ . Tomas e Naes (1988) propuseram este tipo de abordagem, em que x_k^{ideal} é substituído pelas média na amostras:

$$x_k = a + b + \langle x_k \rangle + \epsilon \quad (2.13)$$

Desta forma, uma estimativa deste espectro ideal é obtida comutando e invertendo a equação resultante. O espectro transformado é então

$$x'_k = \frac{x_k - a}{b}. \quad (2.14)$$

Esta transformação foi chamada de *multiplicative scatter correction* (MSC) [ver também (Nicolai *et al.*, 2007)]. Em resumo, esta técnica adapta cada espectro a um de referência através da regressão dos mínimos quadrados (Lorente *et al.*, 2015), corrigindo os efeitos aditivos e multiplicativos dos espectros, resultantes

do fato da luz não percorrer sempre a mesma distância nas amostras analisadas (Cen *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2007). Maiores distâncias dizem respeito a menores valores de reflectância, uma vez que mais luz é absorvida (Cen *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, menos é detetada, o que causa a translação paralela dos espectros (Shao *et al.*, 2007), já referida anteriormente.

2.2.4 Principal component analysis (PCA)

A análise de componentes principais ou PCA (de *Principal Component Analysis*) permite a redução da quantidade de dados quando existe uma correlação entre eles (Wehrens, 2011). Isto é particularmente útil quando o número de variáveis é muito elevado, como no caso da espectroscopia.

A ideia do PCA vai ser ilustrada através de um exemplo simples. Este exemplo permitirá ainda explicar a forma fundamental como os dados são armazenados em matrizes e como são tratados em análise multivariada. Imagine um experimentador muito ingênuo que mede a massa de três amigos e que pensa que para aumentar a informação sobre as amostras pode escrever a massa em libras (*pounds*, lb), quilogramas (kg) e *stone* (uma unidade arcaica ainda em uso nos países anglo-saxônicos)¹. Obteve então a seguinte tabela:

Tabela 2.3: Massa dos três amigos em diferentes unidades.

	lb	kg	stone
João	156	71	11.2
Maria	117	53	8.3
Pedro	150	68	10.7

Evidentemente não há informação adicional nas colunas “kg” e “stone” relativamente à coluna “lb”. O exemplo pretende ilustrar os conceitos fundamentais do PCA. Seja então X a matriz das observações: cada linha é

¹ 1kg = 0.1574730444178 stone; 1 kg = 2.204622621849 lb

uma amostra (João, Maria e Pedro) e cada coluna é uma variável (lg, kg e stone):

$$X = \begin{bmatrix} 156 & 71 & 11.2 \\ 117 & 53 & 8.3 \\ 150 & 68 & 10.7 \end{bmatrix} \quad (2.15)$$

Cada amostra pode ser encarada como um ponto no espaço das variáveis. Assim, neste caso existe um espaço tri-dimensional, com as variáveis x_1 ="lb", x_2 ="kg" e x_3 ="stone". Neste espaço as coordenadas do ponto "João" são (156;71;11.2).

A análise em componentes principais é obtida através de uma factorização da matriz dos dados na forma

$$X = TP^T, \quad (2.16)$$

em que T se chama a matriz dos *scores* e P a matriz dos *loadings*, e o sobrescrito T quer dizer "transposto". O significado destas matrizes será explicado a seguir. Existem muitas formas de decompor uma matriz em fatores, mas a que é relevante para o PCA chama-se "decomposição em valores singulares" que permite obter

$$X = UDV^T. \quad (2.17)$$

Esta decomposição permite descrever a matriz num outro espaço de coordenadas com as características que a seguir se explicam.

Usando a função $\text{svd}()$ ² do R obtém-se (Matloff, 2011)

$$U = \begin{bmatrix} -0.634 & 0.762 & -0.132 \\ -0.475 & -0.520 & -0.710 \\ -0.609 & -0.388 & 0.692 \end{bmatrix}, D = \begin{bmatrix} 271 & 0 & 0 \\ 0 & 0.225 & 0 \\ 0 & 0 & 0.026 \end{bmatrix}, V = \begin{bmatrix} -0.909 & -0.410 & 0.077 \\ -0.413 & 0.854 & -0.318 \\ -0.065 & 0.321 & 0.945 \end{bmatrix}. \quad (2.18)$$

As matrizes T e P serão então

$$T = UD = \begin{bmatrix} -171.763 & 0.171 & -0.003 \\ -128.712 & -0.117 & -0.017 \\ -165.041 & -0.087 & 0.017 \end{bmatrix}, P = V^T = \begin{bmatrix} -0.909 & -0.413 & -0.065 \\ -0.410 & 0.854 & 0.321 \\ 0.077 & -0.318 & 0.945 \end{bmatrix}. \quad (2.19)$$

² $Y = \text{svd}(X)$ origina uma lista Y com as matrizes U , D e V .

A forma como se multiplica T e P para obter X mostra que se está implicitamente a usar um novo espaço, com novas variáveis, que são as **direções principais**. Realmente, a estrutura da igualdade $X=TP$ pode escrever-se de forma mais detalhada na seguinte forma:

$$X = \begin{bmatrix} Am_1(x_1) & Am_1(x_2) & Am_1(x_3) \\ Am_2(x_1) & Am_2(x_2) & Am_2(x_3) \\ Am_3(x_1) & Am_3(x_2) & Am_3(x_3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Am_1(pc_1) & Am_1(pc_2) & Am_1(pc_3) \\ Am_2(pc_1) & Am_2(pc_2) & Am_2(pc_3) \\ Am_3(pc_1) & Am_3(pc_2) & Am_3(pc_3) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} pc_1(x_1) & pc_1(x_2) & pc_1(x_3) \\ pc_2(x_1) & pc_2(x_2) & pc_2(x_3) \\ pc_3(x_1) & pc_3(x_2) & pc_3(x_3) \end{bmatrix} \quad (2.20)$$

Por exemplo, para obter a componente da amostra 1 ($Am_1 = \text{João}$) na variável x_1 (= libra), a que chamamos $Am_1(x_1)$ [elemento (1,1) da matriz X], é preciso efetuar o cálculo

$$Am_1(x_1) = Am_1(pc_1) * pc_1(x_1) + Am_1(pc_2) * pc_2(x_1) + Am_1(pc_3) * pc_3(x_1) = \sum_{i=1}^3 Am_1(pc_i) * pc_i(x_1), \quad (2.21)$$

em que $Am_1(pc_1)$ é a componente da amostra 1 na nova variável pc_1 , $pc_1(x_1)$ é a componente da direção pc_1 segundo a direção x_1 , e assim sucessivamente para os outros termos da soma.

Identificando as matrizes T e P como as matrizes usadas na explicação do produto de matrizes, concluímos que a decomposição em componentes principais tem a seguinte estrutura:

- matriz T (*scores*): linhas = amostras; colunas = direções principais. Assim, os valores desta matriz dão as componentes das amostras segundo as direções principais, ou seja, as **componentes principais** (que vamos chamar de PC's, de *principal components*)
- matriz P (*loadings*): linhas = componentes principais; colunas = variáveis iniciais (no nosso caso libra, kg e *stone*). Assim, os valores desta matriz dão a forma como se combinam as variáveis iniciais para originar as variáveis associadas às direções principais. Dito de outra forma, dão o peso de cada variável inicial na formação das novas variáveis.

Vejamos então o que o nosso experimentador concluiria a partir da análise PCA. Da matriz T vê-se que as três amostras mostram o mesmo padrão: a primeira componente muito maior do que as outras duas (primeira coluna de T = primeira componente tem valores muito mais elevados que os das outras

duas colunas). Por esta razão, basta apenas uma variável para descrever os dados. Os dados são, na verdade, univariados, e uma descrição em termos de, por exemplo, kg apenas, daria a mesma informação.

Para construir a direção principal, a primeira linha da matriz dos *loadings* dá a receita: (-0.9086) de libras + (-0.4125) de kg + (-0.0649) de *stones*. Note-se que os coeficientes estão na mesma proporção da conversão entre as unidades. Na decomposição PCA o sinal é arbitrário. Deste modo, podemos multiplicar todos os valores da matriz P por -1 e continuamos a obter uma decomposição correta.

Falta ainda explicar porque é que a segunda e terceira componentes principais não são exatamente zero. A razão é que a conversão de unidades sofreu um arredondamento na ordem de 0.1%, a mesma proporção que se encontra entre a primeira e segunda componentes. Por este motivo, as três variáveis iniciais não eram perfeitamente proporcionais entre si, o que originou uma segunda componente principal residual.

Além disto, a matriz D permite calcular a fração da variância FV_i explicada por cada componente i:

$$FV_i = \frac{d_i}{\sum_{j=1}^a d_j}, \quad (2.22)$$

em que os d_j são os valores diagonais da matriz D, a é a dimensão da matriz D (que em geral é diferente do número de amostras). No exemplo dado obtém-se $FV_1=0.999999302$, ou seja, 99.99993% da variabilidade explicada por uma só variável.

Pode-se ainda ver do exemplo que a primeira PC cobre a maior parte da variação dos dados possível. A segunda é ortogonal à primeira, cobrindo o máximo de variação restante possível, e assim sucessivamente PC (Cen *et al.*, 2007).

O exemplo dado pode ser expandido a qualquer caso mais complicado. Embora este exemplo tivesse três variáveis, no caso de um espectro pode

haver mil variáveis. Contudo, a decomposição PCA aplica-se de igual forma. Em particular, cada espectro tem um *score* para cada PC.

2.2.4.1 Ratio of interdistance to intradistance (RII)

A forma clássica de visualizar as amostras numa análise PCA é fazer um gráfico das componentes principais, geralmente as duas primeiras. Neste gráfico cada ponto (= amostra) tem por coordenadas as suas componentes principais. A separação das amostras por classes faz-se, em primeira abordagem, por inspeção visual: as classes são distintas se formam aglomerados distintos no plano das componentes principais. Por outro lado, não há uma forma institucionalizada de quantificar este espaçamento através de um parâmetro único. Assim, implementou-se neste trabalho um quantificador simples para a separação entre os aglomerados. Este quantificador é inspirado no quantificador *RII - Ratio of Interdistance to Intradistance* introduzido em Ulloa *et al.* (2013). Basicamente, o valor de RII é dado pela seguinte razão:

$$\frac{\text{a distância entre os centros de massa dos agregados}}{\text{a soma das médias das distâncias de cada amostra ao centro de massa do seu agregado}}$$

Assim, o RII compara a distância entre os agregados (*interdistance*) com a distância média “dentro” dos agregados (*intradistance*).

Este quantificador foi utilizado para tentar separar os dados em dois grupos (plantas controlo e plantas infetadas). A classificação pode então ser feita do seguinte modo:

- $RII > 1$ existe separação dos grupos
- $0,7 < RII < 1$ zona indeterminada
- $RII < 0,7$ não existe separação.

O algoritmo desenvolvido permite ainda desenhar paralelogramos em torno dos agregados para melhor visualização. O algoritmo está descrito na Figura 2.7 e é constituído pelos seguintes passos:

1. Determinar o centro de massa dos dois grupos (=média de PC1 e PC2 para o grupo das amostras controle e para o grupo das infetadas);
2. Desenhar um segmento a unir os dois centros de massa e calcular o vetor dessa direção;
3. Calcular o vetor perpendicular à direção anterior. Estes dois vetores definem um novo sistema de eixos no aglomerado do controle, Oxy , e outro no aglomerado das infetadas, $O'xy$, obtido do primeiro por translação ao longo do eixo dos xx ;
4. Calcular a posição relativa de cada amostra em relação ao centro do seu aglomerado;
5. Transformar essas posições relativas para o novo sistema dos eixos Oxy ;
6. Calcular os quantis de ordem 0.75 para a distribuição das posições relativas segundo os dois novos eixos e separando os casos $x>0$, $x<0$, $y>0$ e $y<0$ ³. Obtêm-se assim oito quantis, quatro para o aglomerado dos controles e quatro para o das infetadas (cada quarteto de quantis é representado por $Qx+$, $Qx-$, $Qy+$ e $Qy-$);
7. Traçar as linhas dos paralelogramos paralelas aos eixos Oxy dos quantis determinados;
8. RII é igual à distância entre os centros a dividir pela soma de $Qy+$ (infetadas) com $Qy-$ (controle).

³ Dado o número relativamente baixo de amostras em cada grupo, considerou-se não fazer sentido calcular o desvio padrão das distâncias das amostras ao centro do aglomerado segundo cada direção.

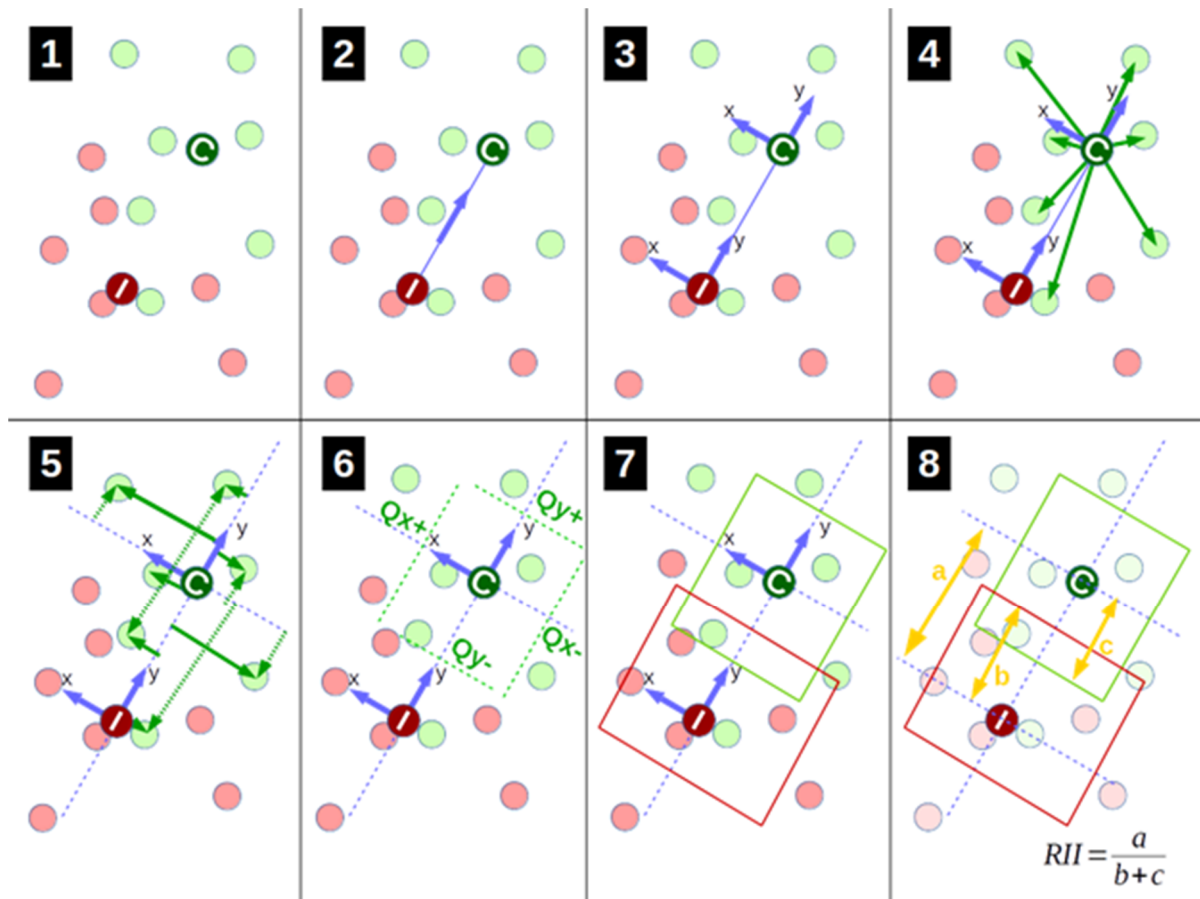


Figura 2.7: Passos para a determinação do valor de RII.

2.2.4.2 Análise PCA ao longo do tempo

A análise PCA simples permite observar diferenças entre os grupos (saudáveis e infetadas) para cada dia. No entanto, seria mais útil ainda comparar padrões de evolução temporal entre os dois grupos. Os espectros de cada grupo mostram uma história ao longo do período em que decorreram as seis medições. Será que é possível comparar as histórias das plantas e assim encontrar padrões adicionais? O método adotado está descrito na Figura 2.8 e corresponde à implementação mais simples do que habitualmente se descreve por *N-way PCA* (Henrion, 1994). Neste caso trata-se de um PCA de três entradas, ou *3-way*, que corresponde a um tensor com 3 dimensões: amostras x refletâncias x dias. A análise que é feita corresponde ao desdobramento (*unfolding*) do tensor para duas dimensões e posterior aplicação da técnica habitual do PCA. Métodos mais sofisticados como Tucker3 ou PARAFAC

(Henrion, 1994) poderiam ainda dar mais informação, mas não foi possível realizar essa análise no tempo útil desta tese.

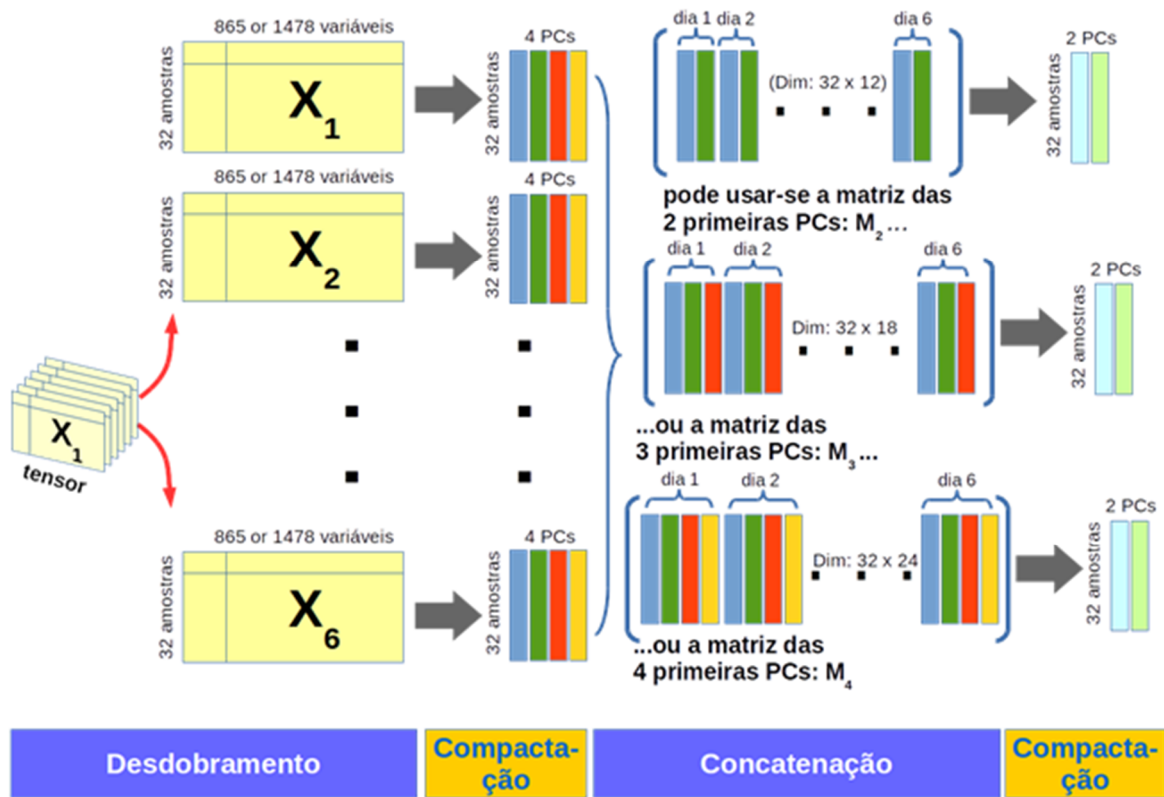


Figura 2.8: Método do desdobramento. Cada dia de medição origina uma matriz 32×865 (no caso das medidas do Jaz) ou 32×1478 (no caso das medidas do USB4000). Cada matriz representa uma “folha” do tensor que contém todas as medidas (amostras \times refletância \times dias). Cada folha é compactada através de PCA para quatro componentes principais. De seguida todas as componentes principais são concatenadas para formar a matriz final M que contém informação sobre todos os dias. Finalmente aplica-se de novo o PCA à matriz M , condensando a informação essencial sobre a evolução temporal das amostras.

O tensor das medidas é constituído por linhas = amostras, colunas = comprimentos de onda e folhas = dias. O método do desdobramento consiste em aplicar a este tensor a seguinte sequência de passos:

1. Separar cada uma das folhas X_i ($i=\text{dia}=1, \dots, 6$).
2. Compactar cada folha X_i a um número pré-estabelecido de componentes principais.

3. Concatenar as componentes principais assim obtidas numa só matriz, M, que desta forma retém a informação essencial de cada um dos dias.
4. Compactar M através da aplicação de PCA.

As componentes principais obtidas no passo 4 contêm a informação essencial sobre a evolução das amostras ao longo dos seis dias.

Como será visto na secção dos resultados, esta técnica conduz a uma separação entre grupos muito mais marcada do que o PCA simples em cada dia.

2.2.5 Analysis of variance (ANOVA)

A análise estatística conhecida por ANOVA (*Analysis Of VAriance*) é usada para separar e estimar as diferentes causas de variação (Miller e Miller, 2010). Numa experiência clássica em que a ANOVA pode ser aplicada tem-se um conjunto de amostragens feitas em populações submetidas a tratamentos diferentes e pretende-se saber se as medições refletem essa diferença. Pode fazer-se a explicação com um exemplo que é simultaneamente a aplicação feita neste trabalho. Considere-se a medição da refletância a um dado comprimento de onda λ , $R(\lambda)$. Neste trabalho esta medição é feita em dois tratamentos: nas folhas de plantas sãs e nas folhas de plantas infetadas. A questão é saber se há justificação para reconhecer no conjunto total das medidas o efeito da infeção. Assim, a ANOVA testa se as diferenças entre as médias das amostras (expressa através da variância entre tratamentos) são demasiado grandes para serem explicadas apenas por erro aleatório (Miller e Miller, 2010). Para tal, foi adota-se a hipótese nula de todas as amostras pertencerem a uma mesma população. Calcula-se então o valor de p que representa a probabilidade de a hipótese nula ser verdadeira (Miller e Miller, 2010) através do parâmetro F:

$$F = \frac{\text{variância entre tratamentos}}{\text{variância dentro dos tratamentos}}. \quad (2.23)$$

O valor de F é analisado e dá uma probabilidade de a hipótese nula ser verdadeira. Para efeitos da análise realizada neste trabalho consideraram-se os seguintes níveis de significância:

- $p < 0,001$: separação entre grupos é muitíssimo significativa
- $0,001 < p < 0,01$: separação muito significativa
- $0,01 < p < 0,05$: separação significativa
- $0,05 < p < 0,1$: *borderline*

Esta técnica foi utilizada com o intuito de determinar a que comprimentos de onda as amostras fazem parte de duas populações distintas. Os pressupostos da ANOVA são, plausivelmente, observados neste trabalho: i) independência das populações; ii) normalidade (isto é, os valores observados em cada tratamento centram-se num valor médio e distribuem-se em torno dele de forma gaussiana); iii) igualdade das variâncias.

Foram testados vários pré-tratamentos prévios à aplicação da ANOVA: i) usar apenas o algoritmo de Savitzky-Golay; ii) apenas o MSC; iii) o MSC seguido do Savitzky-Golay e vice-versa.

2.2.6 Algoritmo de k vizinhos mais próximos (kNN)

O algoritmo de k vizinhos mais próximos [*k nearest neighbors* (kNN)] é um algoritmo simples que armazena todas as amostras e que classifica uma nova baseando-se na similaridade da medição (Jabbar *et al.*, 2013). Para tal, determina quais os k vizinhos mais próximos da amostra que se pretende classificar, sendo-lhe atribuída a classificação que predomina nessa vizinhança. Embora neste trabalho as amostras sejam caracterizadas pelos espectros, o kNN não foi aplicado diretamente estes, mas apenas a um conjunto reduzido de variáveis (comprimentos de onda). Essa seleção será explicada mais à frente. Para efeitos da explicação importa compreender que se o número de variáveis seleccionadas for P , então cada amostra é representada num espaço P -dimensional. A distância entre as amostras é calculada como a distância euclideana e é essa a base para escolher os vizinhos.

Para se compreender melhor o funcionamento deste algoritmo, vejamos um exemplo. Este exemplo baseia-se no dado pelo *site* da StatSoft (StatSoft, 2015) Pretende-se classificar uma nova amostra que é representada na Figura 2.9 pela bola vermelha, tendo em conta a classificação dos vizinhos mais próximos.

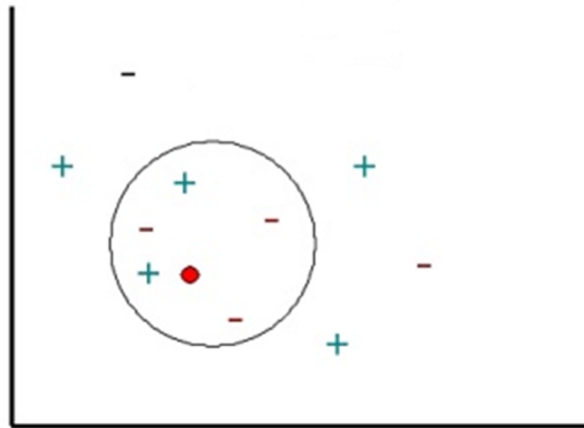


Figura 2.9: Representação de uma nova amostra (bola vermelha) que se pretende classificar com cinco vizinhos próximos. Imagem adaptada do *site* da StatSoft (2015).

Se se considerar $k = 1$, ou seja apenas um vizinho próximo, verifica-se que a amostra mais próxima da bola vermelha tem símbolo positivo, fazendo com que também lhe seja atribuída esta classificação; se $k = 2$ nenhuma classificação lhe é atribuída uma vez que os dois vizinhos mais próximos não têm o mesmo símbolo; se $k = 3$, a nova amostra será considerada negativa; se $k = 4$ ou $k = 5$ será considerada novamente negativa.

Neste trabalho, como o número de amostras é limitado escolheram-se três vizinhos ($k = 3$). Os dados foram separados por variedade e por estado (saudáveis ou infetadas). O processo adotado foi a da validação cruzada que foi realizada por ciclos. Em cada ciclo uma das amostras era deixada de fora. Portanto, cada amostra era, à sua vez, desconhecida e classificada com base na informação assumida acerca das outras amostras. A função `knn()` do R atribui uma probabilidade a cada amostra de pertencer ao grupo das infetadas. O processo é repetido para todas as amostras e para todos os dias. Desta forma, cada amostra recebe uma probabilidade de estar infetada em cada um

dos seis dias. A probabilidade final da infeção representada nas figuras é calculada como a média das probabilidades desses seis dias.

Para determinar quais os melhores comprimentos de onda dos espectros a utilizar nesta classificação, calculou-se os valores médios e desvios padrão dos valores dos espectros das plantas controlo e das plantas infetadas para os vários comprimentos de onda. Calculou-se então a razão

$$\rho = \frac{\overline{S_{\lambda C}} - \overline{S_{\lambda I}}}{\sigma[S_{\lambda C}] + \sigma[S_{\lambda I}]} \quad (2.24)$$

em que o S representa o espectro, λ quer dizer que os valores são calculados para cada comprimento de onda, a barra representa o valor médio, σ representa o desvio padrão e C e I querem dizer respetivamente controlo e infetadas. Quanto maior for esta diferença, maior é a separação entre os espectros dois grupos. A matriz dos espectros foi ordenada de acordo com os valores de ρ (a primeira linha com o maior valor de ρ), de modo a serem selecionados os cinco melhores comprimentos de onda. Para isso impôs-se ainda a condição de existirem entre os cinco melhores comprimentos de onda pelo menos dez índices, isto é, à medida que se selecionam os comprimentos de onda (λ), cada novo λ tem de estar pelo menos 10 λ afastado dos que já foram selecionados, evitando assim os dados aglomerados.

Ao contrário dos métodos baseados no PCA, o kNN é um método supervisionado, no sentido em que assumimos explicitamente na construção do modelo que as amostras são controlo ou infetadas. No PCA nada se assume sobre as amostras e procura-se que a aglomeração das amostras no espaço das componentes principais se verifique como uma consequência da diferença intrínseca entre as amostras.

3 Resultados e discussão

3.1 Detecção do CTV por métodos moleculares baseados no PCR

No estudo do uso de sensores óticos para a deteção do CTV em plantas de citrinos foi necessário determinar, através de métodos convencionais da biologia molecular, quais das plantas *Citrus clementina* hort. ex Tanaka e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck previamente infetadas com o isolado T318A pela técnica da enxertia por borbulha em T, estavam infetadas com CTV. Para tal, utilizaram-se maioritariamente duas técnicas distintas (Figura 3.1) cujos resultados foram comparados entre si.

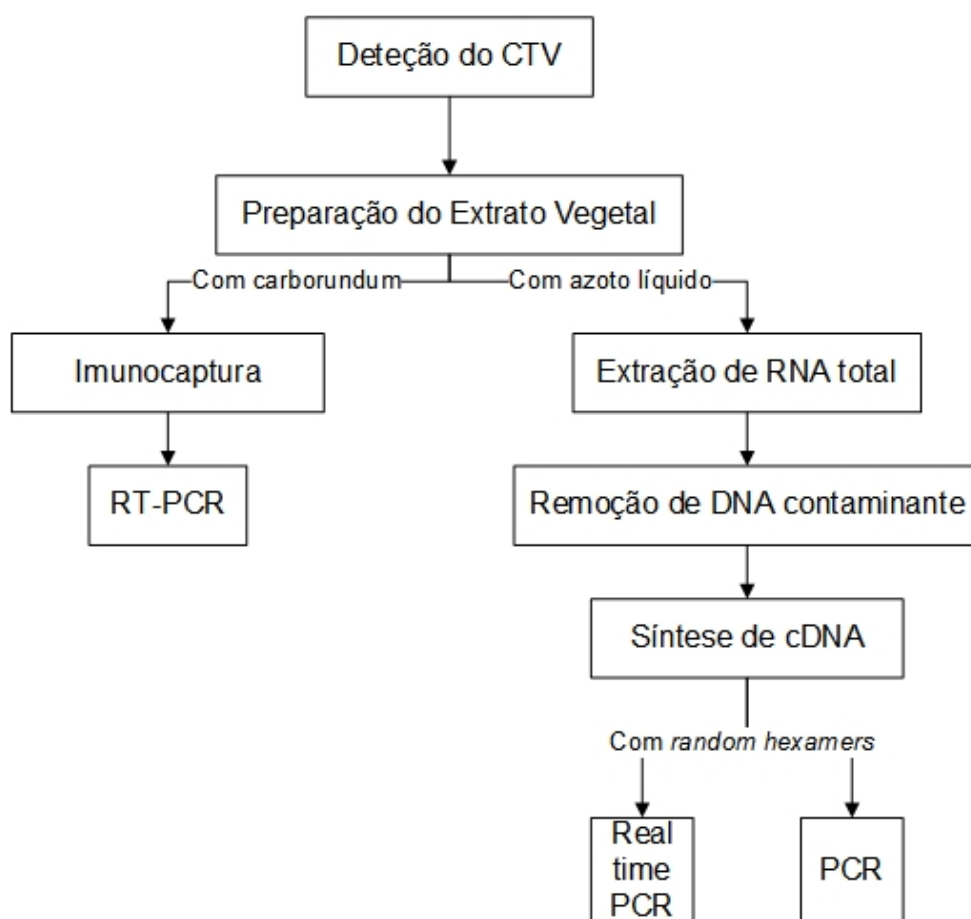


Figura 3.1: Esquema das técnicas utilizadas, ao longo deste trabalho, para deteção do CTV T318A nas plantas Clementina ‘Fina’ e ‘Valencia late’.

3.1.1 Reação de IC/RT-PCR

Os extratos vegetais de *Citrus macrophylla* (plantas 21 e 24) obtidos após a maceração da casca de ramos com tampão de extração foram usados na otimização da reação de IC/RT-PCR. A variedade *Citrus macrophylla* Wester foi escolhida para estes ensaios por ser uma das variedades em que o título viral do CTV é mais elevado (Folimonova *et al.*, 2008).

Para proceder à reação de IC/RT-PCR, foi inicialmente testado, de entre as diferentes marcas de tubos de PCR disponíveis no laboratório (Sarstedt e BioRad), aquelas cuja qualidade do plástico favorecia a imobilização do anticorpo. Neste ensaio foi usado o controlo positivo do CTV fornecido no *kit* da Bioreba. Verificou-se que o anticorpo se ligava bem aos tubos de qualquer uma das marcas.

O volume de *Ribonuclease Inhibitor* e de *M-MuLV Reverse Transcriptase* a utilizar, assim como a temperatura de *annealing* na reação de RT-PCR foram otimizados e estão descritos em 2.1.3.2.

Na análise dos resultados de RT-PCR a partir dos extratos vegetais de *Citrus macrophylla* (plantas 21 e 24) (Figura 3.2), verificou-se que a banda obtida para a planta 24 e o controlo positivo da Bioreba apresentaram uma banda com cerca de 670 bp, o que está de acordo com a dimensão do gene da cápside proteica do CTV (p25). Na planta 21 não foi detetada a presença do vírus. Nestas análises confirmou-se a ausência de amplificação do gene p25 aquando do uso de extratos vegetais congelados. Por esta razão, todos os extratos vegetais usados foram preparados no próprio dia.

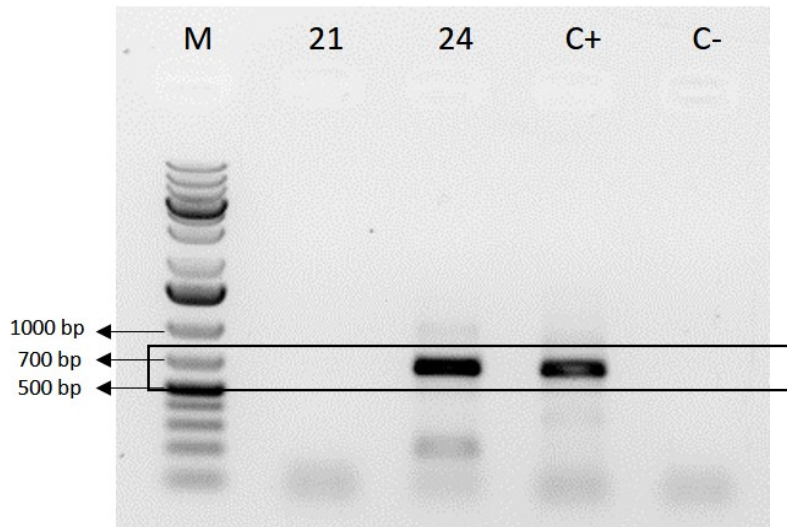


Figura 3.2: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados por RT-PCR com os *primers* CTV1 e CTV2. M) Marcador GeneRuler 1kb Plus; 21) planta 21; 24) planta 24; C+) controlo positivo (Bioreba); C-) controlo negativo.

Foram feitos extratos de casca de ramos de todas as plantas de clementina ‘Fina’ e ‘Valencia late’ (ver 2.1.3.1) quer das plantas inoculadas com o isolado do CTV T318A (plantas 5 a 12), assim como das plantas controlo (plantas 1 a 4 e 13 a 16). Procedeu-se à posterior reação de IC/RT-PCR que permitiu concluir sobre a presença do vírus nas plantas Clementina ‘Fina’ 7 e nas ‘Valencia late’ 9, 10 e 11, além da *Citrus macrophylla* 24 (Figura 3.3 e Figura 3.4), que passou a ser usada como controlo positivo (Figura 3.4).

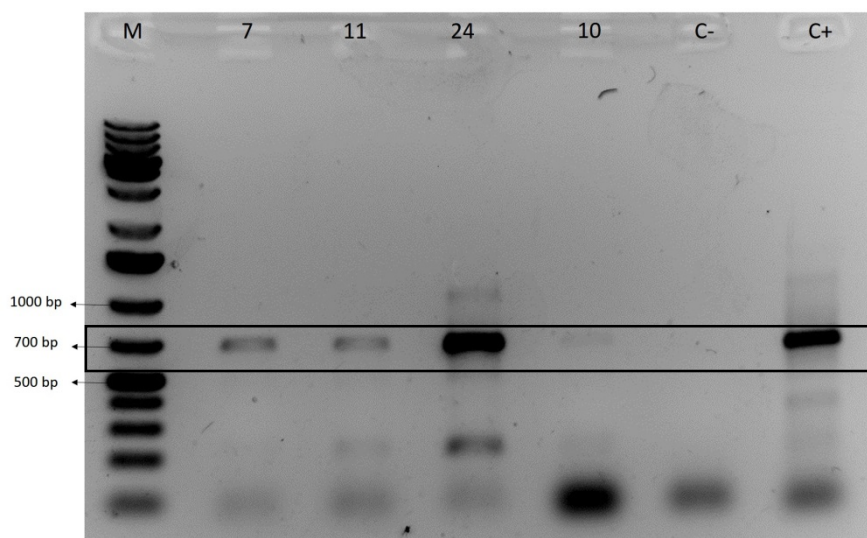


Figura 3.3: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados por RT-PCR com os *primers* CTV1 e CTV2. M) Marcador GeneRuler 1kb Plus; 7) planta 7; 11) planta 11; 24) planta 24; 10) planta 10; C-) controlo negativo (planta 16); C+) controlo positivo (Bioreba).

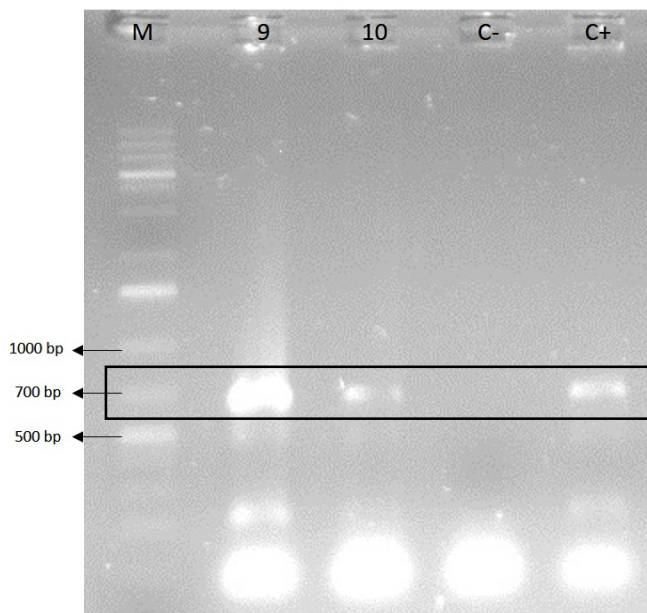


Figura 3.4: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados por RT-PCR com os *primers* CTV1 e CTV2. M) Marcador GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder; 9) planta 9; 10) planta 10; C-) controlo negativo (Planta 16); C+) controlo positivo (planta 24).

3.1.1.1 Clonagem do gene p25 do isolado viral presente na planta *Citrus macrophylla*

A banda do gel de agarose correspondente à amplificação do gene p25 do isolado viral da planta 24 foi extraída, purificada e clonada no vetor pGEM T-Easy (Figura 3.5). Foi feita a transformação genética de células de *Escherichia coli* e a “miniprep” obtida a partir de uma colónia isolada foi enviada para sequenciação para confirmar a presença do isolado do CTV T318A (Figura 3.12).

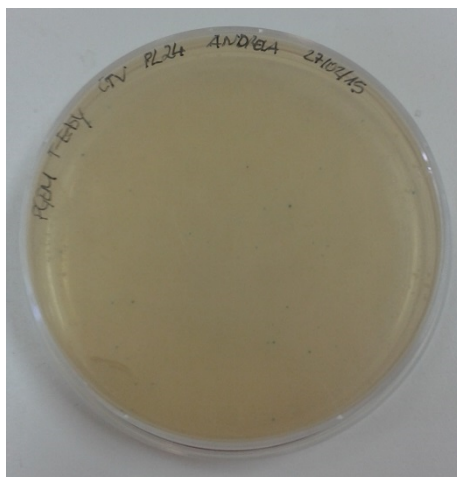


Figura 3.5: Colônias transformadas de *E.coli* com o pGEM T-Easy contendo o produto de RT-PCR amplificado da planta 24, obtido com os *primers* CTV1 e CTV2.

As análises de IC/RT-PCR revelaram que apenas quatro das oito plantas inoculadas com o CTV T318A estavam infetadas, nomeadamente as plantas 7, 9, 10 e 11. Por esta razão, foi feita uma re-inoculação do vírus nas plantas Clementina 'Fina' 5, 6 e 8 e na 'Valencia late' 12 por enxertia de borbulha em T.

De notar que algumas das enxertias efetuadas nas plantas 5 a 12 não pegaram e provavelmente esta pode ser uma das explicações para a ausência de amplificação nalgumas das plantas que foram inoculadas com o isolado viral T318A.

3.1.2 Extração de RNA total

A extração de RNA total das amostras é necessária para se proceder à análise por real-time PCR. Esta técnica tem a vantagem de ser mais sensível do que o IC/RT-PCR (Narayanasamy, 2011).

Após a extração do RNA total para todas as amostras estudadas e remoção do DNA contaminante com o TURBO DNA-free Kit, foi feita uma eletroforese em gel de agarose para algumas das amostras (plantas 5, 6, 8, 12, 13 e 24), tendo-se confirmado que estavam limpas de DNA (Figura 3.6).

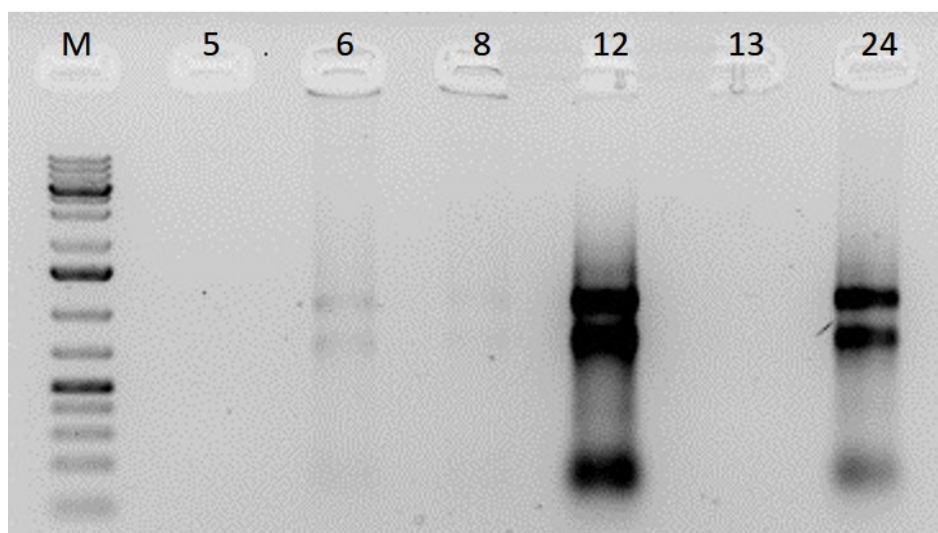


Figura 3.6: Eletroforese em gel de agarose a 1% do RNA extraído, após remoção do DNA contaminante. M) Marcador GeneRuler 1kb Plus; 5) planta 5; 6) planta 6; 8) planta 8; 12) planta 12; 13) planta 13; 24) planta 24.

3.1.2.1 Síntese de cDNA com *random hexamers*

Procedeu-se à síntese do cDNA com *random hexamers* e posterior limpeza do DNA contaminante com o TURBO DNA-free Kit. De seguida, foi feito um PCR com os *primers* da ubiquitina para se verificar se a síntese do cDNA tinha ocorrido. Esta análise foi feita em todas as amostras, embora só algumas constem das figuras a seguir apresentadas (Figura 3.7 e Figura 3.8).

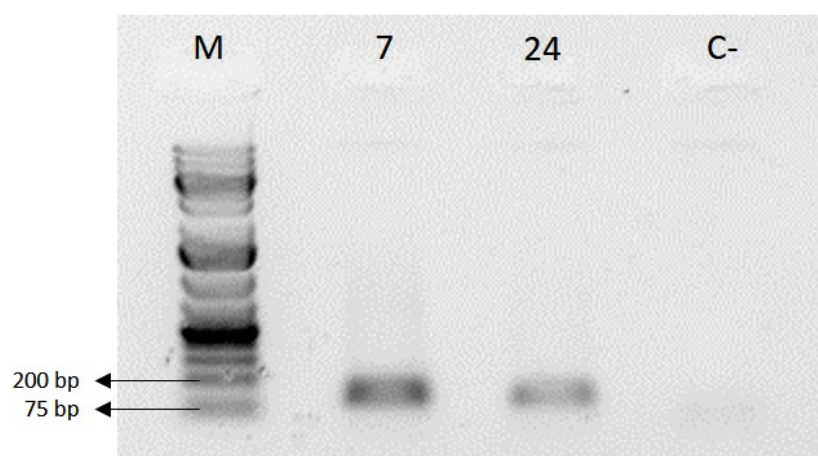


Figura 3.7: Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da reação de PCR com os *primers* Ubi3. M) Marcador GeneRuler 1kb Plus; 7) planta 7; 24) planta 24; C-) controlo negativo.

Na Figura 3.7 confirma-se a presença de uma banda entre os 75bp e os 200 bp. O gene da ubiquitina que se pretendia amplificar tem 138 bp, portanto a dimensão da banda obtida corresponde ao esperado, o que significa que houve realmente síntese de cDNA.

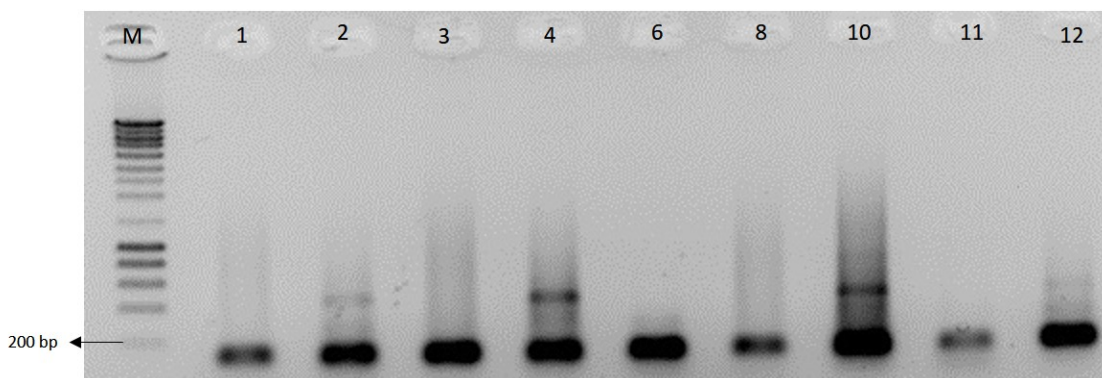


Figura 3.8: Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da reação de PCR com os *primers* Ubi3. M) Marcador NzyDNA Ladder III; 1) planta 1; 2) planta 2; 3) planta 3 (2ª Extração); 4) planta 4; 6) planta 6 (Extração após re-inoculação); 8) planta 8 (Extração após re-inoculação); 10) planta 10; 11) planta 11; 12) planta 12.

Na Figura 3.8, além da banda esperada com 138 bp, observou-se que algumas das amostras apresentavam uma outra banda. Isto mostrou que a ubiquitina não é um bom gene de referência para uma reação de real-time PCR.

3.1.2.1.1 Clonagem do produto de amplificação do gene p25 das plantas Clementina 'Fina' e 'Valencia late'

Foi feito um PCR para amplificação do gene p25 das plantas infetadas pelo isolado T318A, as plantas Clementina 'Fina' 7 (Figura 3.9) e 'Valencia late' 9, ou seja, uma amostra de cada uma das variedades estudadas. O objetivo foi a clonagem do gene p25 para confirmar a presença do isolado viral T318A nestas plantas. Foram escolhidas estas plantas dado que, anteriormente na reação de IC/RT-PCR, apresentaram uma banda com a dimensão esperada (670 bp) com razoável intensidade.

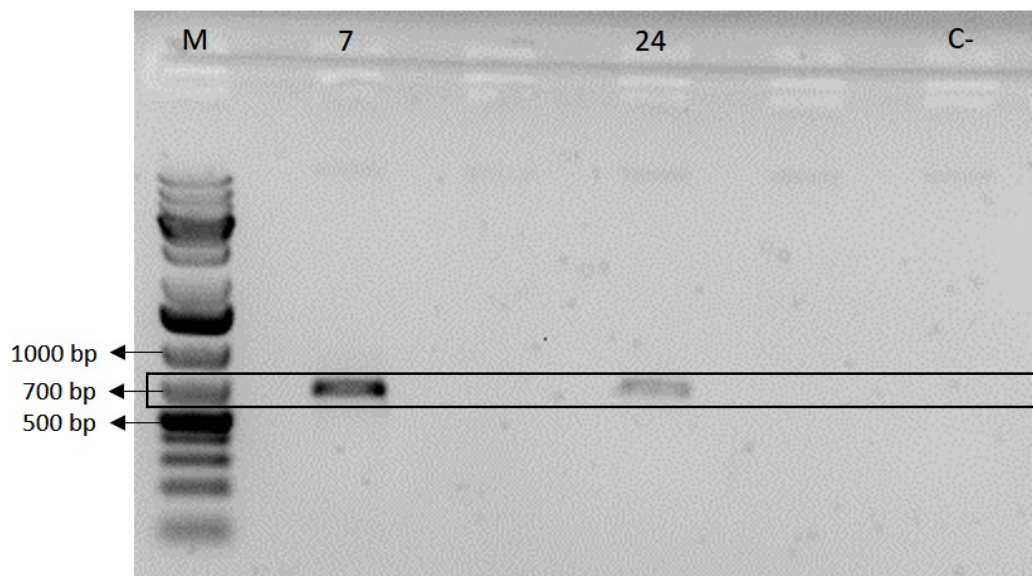


Figura 3.9: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados por PCR com os *primers* CTV 2 e CTV5 realizado. M) Marcador GeneRuler 1kb Plus; 7) planta 7; 24) planta 24; C-) controlo negativo.

A banda de interesse foi cortada do gel de agarose a 1%, o DNA foi purificado e clonado no vetor pGEM T-Easy. Foi feita a transformação genética de células de *E.coli* (Figura 3.10 e Figura 3.11) e a preparação de uma “miniprep” a partir de uma colónia isolada, tendo o resultado sido enviado para sequenciação (Figura 3.12).

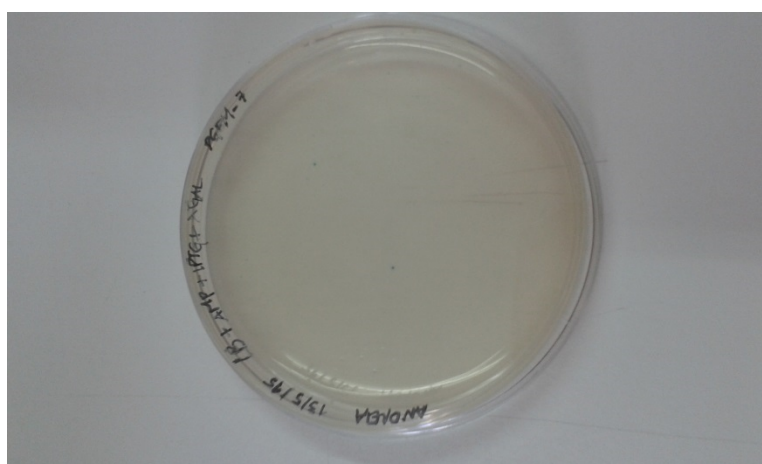


Figura 3.10: Colónias transformadas de *E.coli* com o pGEM T-Easy contendo o produto de PCR do gene p25 da planta Clementina ‘Fina’ 7.

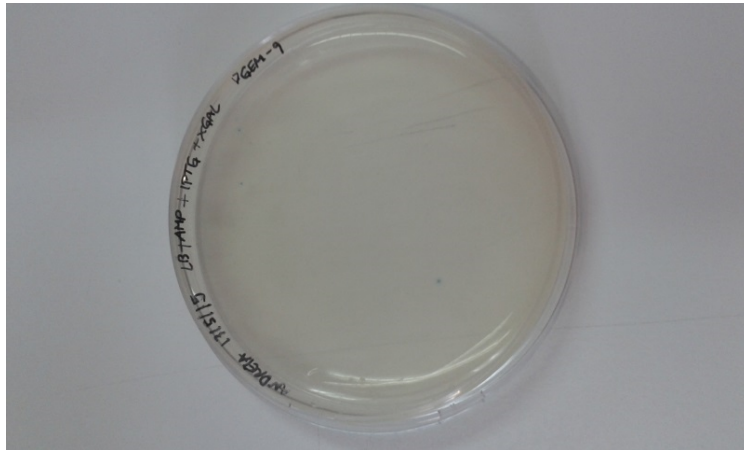


Figura 3.11: Colônias transformadas de *E.coli* com o pGEM T-Easy contendo o produto de PCR do gene p25 da planta 'Valencia late' 9.

As sequências nucleotídicas do gene p25 presente no isolado das plantas Clementina 'Fina' 7, 'Valencia late' 9 e *C. macrophylla* 24 foram alinhadas com a sequência da cápside proteica do isolado T318A do CTV disponível no GenBank (DQ151548), sendo apresentadas na Figura 3.12.

permitiu que a curva de *melting*, quer na amplificação do gene de referência quer na do gene alvo CTV, apresentasse um único pico (Figura 3.13). A existência de um único pico na curva de *melting* significa que não foram amplificados produtos resultantes de ligações inespecíficas e que não ocorreu *primer-dimer*. A otimização do programa de *real-time* PCR permitiu também detetar uma contaminação nas amostras das plantas 'Valencia late' controlo (plantas 13 a 16) e em duas das Clementinas 'Fina' controlo (plantas 3 e 4). Esta contaminação poderá ter ocorrido aquando da extração do RNA total através do uso de almofarizes desinfetados com lixívia, mas não esterilizados. É provável que a extração destas amostras tenha ficado contaminada após a maceração dos extratos de uma das plantas com maior título viral. Por esta razão, foi feita uma segunda extração do RNA total das plantas 'Valencia late' controlo (plantas 13 a 16) e em duas das Clementinas 'Fina' controlo (plantas 3 e 4), tendo-se usado desta vez almofarizes esterilizados.

Nas curvas de *melting* apresentadas na Figura 3.13 e para os valores de C_t obtidos (Tabela 3.1 e Tabela 3.2), as amostras das plantas 3, 4, 13 a 16 correspondem às da segunda extração, enquanto as das plantas 5, 6 e 8 foram extraídas dois meses após a re-inoculação do vírus.

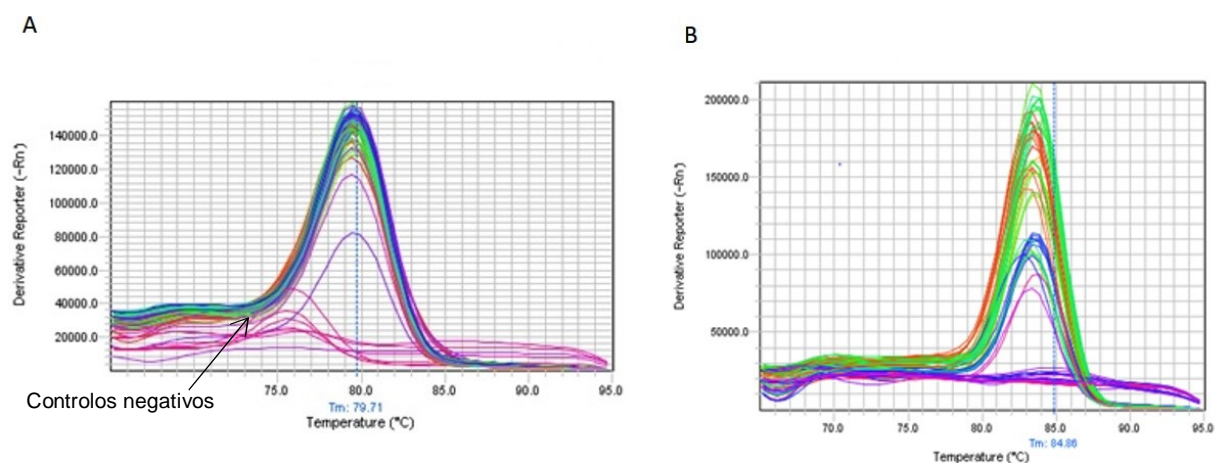


Figura 3.13: Curvas de *melting* obtidas na amplificação do: A) gene de referência COX; B) gene alvo CTV.

Na amplificação do gene de referência COX, verificou-se que todas as amostras apresentam um valor de C_t aproximado (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: *Threshold cycle* (C_t) obtido na amplificação por *real-time* PCR do gene de referência COX.

Planta	Variedade	Ct	
		Média	Desvio padrão
4	Clementina 'Fina'	18,03	0,16
5		17,65	0,14
6		20,32	0,05
7		19,31	0,10
8		17,40	0,06
9	Valencia 'late'	17,99	0,08
10		17,41	0,13
11		18,35	0,07
12		18,91	0,14
13		18,00	0,29

A determinação do valor mediano dos C_t de um conjunto de três réplicas de cada amostra (planta), associado ao desvio padrão dos respectivos valores, permitiu concluir que de entre as oito plantas inoculadas com o CTV T318A apenas quatro (plantas 7, 9, 10 e 11) apresentavam um título viral elevado (Tabela 3.2). Por sua vez, nas plantas em que se realizou uma nova inoculação (Clementinas 'Fina' 5, 6 e 8 e 'Valencia late' 12), o título viral detetado foi muito baixo, nomeadamente nas plantas 6 e 12.

Tabela 3.2: *Threshold cycle* (C_t) obtido na amplificação por *real-time* PCR do gene alvo CTV.

Planta	Variedade	Ct	
		Média	Desvio padrão
4	Clementina 'Fina'	Não detetado	
5		27,80	0,15
6		33,79	0,26
7		16,40	0,27
8		27,01	0,11
9	Valencia 'late'	16,59	0,16
10		16,36	0,10
11		16,17	0,25
12		33,69	0,34
13		Não detetado	

Uma das explicações possíveis para o título viral extremamente baixo nas plantas 6 e 12 é a de uma má união na zona de enxertia do material vegetal infetado com a planta que se pretendia inocular com o vírus (Figura 3.14).



Figura 3.14: Fotografia da zona de enxertia da planta 6.

A partir dos valores da Tabela 3.2 as plantas foram divididas em dois grupos: plantas infetadas (I) e plantas controlo ou saudáveis (S) (Tabela 3.3). Esta divisão teve em conta o valor de *threshold cycle* (C_t) da amostra. As plantas 6 e 12 foram consideradas saudáveis uma vez que em ensaios anteriores do real-time PCR apresentaram um $C_t > 35$. Os valores apresentados na Tabela 3.2 dizem respeito apenas ao último ensaio realizado. De acordo com Kokkinos e Clark (2006), valores de $C_t > 35$ podem ser considerados negativos numa reação de real-time PCR para a deteção de vírus. Neste trabalho foi igualmente considerado que valores de C_t acima de 35 correspondiam a plantas com ausência de vírus ou com um título viral não detetável.

Tabela 3.3: Agrupamento das plantas em dois grupos: plantas saudáveis (S) e infetadas (I). A cor verde diz respeito às saudáveis e a vermelha às infetadas.

Planta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Classificação	S	S	S	S	I	S	I	I	I	I	I	S	S	S	S	S

Foi utilizada a análise ANOVA (ver 2.2.5) para os valores de C_t do gene COX (Tabela 3.4) e também do CTV (Tabela 3.5) para determinar se existiam diferenças significativas entre os dois grupos estabelecidos (plantas infetadas e plantas controle).

Tabela 3.4: Resultados da ANOVA obtido com os valores do C_t para o gene COX.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,530	1	1,530	1,966	0,198	5,318
Dentro de grupos	6,224	8	0,778			
Total	7,754	9				

Tabela 3.5: Resultados da ANOVA obtido com os valores do C_t para o gene alvo CTV.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	678,785	1	678,785	26,920	0,001	5,318
Dentro de grupos	201,718	8	25,215			
Total	880,503	9				

Pela análise da Tabela 3.4, verifica-se que não existem diferenças significativas entre o grupo das plantas saudáveis e o grupo das plantas infetadas para um intervalo de confiança de 95% ($p > 0,05$ e $F_{amostra} < F_{crítico}$) no que diz respeito ao gene de referência, o que comprova que todas as amostras têm aproximadamente a mesma quantidade de cDNA, validando a quantificação relativa realizada.

Quanto aos valores de C_t obtidos para a amplificação da sequência alvo do CTV, a Tabela 3.5 demonstra que existem diferenças significativas entre as plantas infetadas e as plantas saudáveis para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$ e $F_{amostra} > F_{crítico}$), o que significa que as plantas foram corretamente agrupadas em dois grupos distintos.

Foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação do gene de referência COX e da sequência alvo CTV 1a-b. O DNA foi extraído e purificado. No caso do fragmento amplificado com os

primers COX, o DNA foi ainda clonado no vetor pGEM T-Easy (Figura 3.15) por ser demasiado pequeno (68 bp) e após obtenção da “miniprep”, foi sequenciado (Figura 3.16). No caso da sequência alvo 1b-2, após o DNA ter sido purificado procedeu-se à sequenciação direta (Figura 3.17).

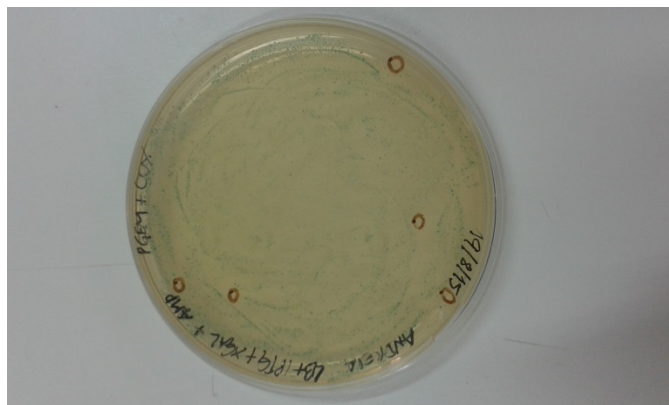


Figura 3.15: Colónias transformadas de *E.coli* com o pGEM T-Easy contendo o produto de amplificação do gene COX, obtido por real-time PCR.

```

                                     20
                                     |
Gene Referencia_COX ANNCTNTCNC TGGATGGAAT GCCCTTAGCA GTTTTGGC 38
Citocromo oxidase_GenBank CX297817 ATGCTTAGCGC TGGATGGAAT GCCCTTAGCA GTTTTGGC 38

```

Figura 3.16: Alinhamento do gene de referência amplificado por *real-time* PCR com parte da sequência do citocromo oxidase (GenBank CX297817). Mismatches assinalados a vermelho.

```

                                     20           40           60           80
CTV val  GNC CGACGCT AGCGATGGTC AAGCGGATGA CTTAGCGACA GGTTGATAGT TTGTTTCAGTT CTCGCTGAGA GCTAACACGG 80
CTV cle  ACCCGACGCT AGCGATGGTC AAGCGGATGA CTTAGCGACA GGTTGATAGT TTGTTTCAGTT CTCGCTGAGA GCTAACACGG 80
CTV ORF1b-2 GenBank DQ151548 ACCCGACGCT AGCGATGGTC AAGCGGATGA CTTAGCGACA GGTTGATAGT TTGTTTCAGTT CTCGCTGAGA GCTAACACGG 80

                                     100
CTV val  GTAGTCGAGT CGAGATGTTT GCCTT --CG 107
CTV cle  GTAGTCGAGT CGAGATGTTT GCCTT GACN 109
CTV ORF1b-2 GenBank DQ151548 GTAGTCGAGT CGAGATGTTT GCCTT CGCG 109

```

Figura 3.17: Alinhamento do gene alvo amplificado por *real-time* PCR com a ORF 1b-2 do genoma do isolado T318A do CTV (GenBank DQ151548). Mismatches assinalados a vermelho.

Ao comparar os resultados obtidos anteriormente por IC/RT-PCR (deteção de vírus nas plantas 7, 9, 10 e 11) (ver 3.1.1) com os do real time PCR, verificou-se que o IC/RT-PCR apenas foi capaz de detetar o CTV nas plantas que

apresentavam um título viral mais elevado (Tabela 3.2), o que confirma a sensibilidade limitada da técnica de IC/RT-PCR.

Para a detecção do CTV muitos estudos têm usado a técnica de *real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR)* (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2008; Saponari *et al.*, 2008; Ananthakrishnan *et al.*, 2010; Loconsole *et al.*, 2010; Yokomi *et al.*, 2010), em vez do *real-time PCR* usado neste trabalho.

Na técnica de *real-time RT-PCR*, a síntese de cDNA e a amplificação ocorrem num único passo, enquanto que no *real-time PCR* é preciso realizar primeiro a síntese de cDNA, confirmar que esta ocorreu e só depois é feita a amplificação. O *real-time RT-PCR* permite assim reduzir o número de passos, o que torna esta mais rápida. A redução do número de passos minimiza também a probabilidade de ocorrerem erros assim como contaminações.

As técnicas moleculares para detecção do CTV usadas neste trabalho, IC/RT-PCR e *real-time PCR* apresentaram várias desvantagens: é necessário a maceração das amostras, ou seja, são métodos destrutivos; são morosas; trabalhosas; requerem o consumo de reagentes (Sankaran *et al.*, 2010) que no caso do *real-time* são muito caros (Adkar-Purushothama *et al.*, 2011); a sua especificidade depende do *design* de *primers* e do protocolo de amplificação (López *et al.*, 2003); apresentam um risco elevado de contaminação, especialmente o *real-time PCR*; e no caso do IC/RT-PCR é preciso ainda a realização de uma eletroforese em gel de agarose para se visualizar a banda específica que confirma a presença do produto de amplificação do gene viral.

Uma outra técnica comumente utilizada para detecção de vírus em plantas é a ELISA (Sankaran *et al.*, 2010). Embora esta técnica esteja associada a um baixo custo (Saponari *et al.*, 2008), apresenta várias limitações de relevo dado que a detecção do CTV através de técnicas serológicas é difícil quando o título viral é baixo (Mathews *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2005) e/ou quando existe uma distribuição desigual do vírus nas plantas infetadas (Roy *et al.*, 2005; Loconsole *et al.*, 2010). Além disto, as técnicas serológicas apenas são fiáveis durante certos períodos do ano quando o título viral é alto (Mathews *et al.*, 1997).

Todas as desvantagens enunciadas limitam o uso dos métodos convencionais para análises de rotina. Dado que um dos objetivos das análises de rotina é também a deteção do CTV numa fase inicial de infeção, quando o título viral na planta ainda é baixo, é essencial o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido e de baixo custo que permita aumentar a produtividade dessas análises (López *et al.*, 2003). Por esta razão, os métodos espectroscópicos surgem como possível alternativa aos métodos convencionais, apresentando grande potencial para a otimização do controlo do CTV e da gestão de culturas agrícolas com elevado valor comercial (Delalieux *et al.*, 2009).

3.2 Deteção do CTV por métodos espectroscópicos

Nesta secção descrevem-se os resultados obtidos através dos métodos espectroscópicos e das técnicas de análise multivariada descritas na secção de materiais e métodos.

Como previamente explicado nos materiais e métodos, as plantas encontravam-se a crescer numa estufa que proporcionava condições intermédias entre as de total variabilidade encontradas em estudos de campo e as esperadas de um fitotron com condições de irradiância (Tabela 3.6), temperatura (Tabela 3.6 e Tabela 3.7) e humidade relativa (Tabela 3.7) totalmente pré-definidas e controladas. As variações nas condições ambientais em que as plantas se encontraram durante este estudo, nomeadamente as diferenças observadas na temperatura entre as diferentes estações, particularmente, nos meses de inverno (Cavaco *et al.*, 2003), poderão ter contribuído para alguma variabilidade na resposta do metabolismo primário do

carbono e assim para a resposta espectroscópica das plantas, sobrepondo-se ao *stress* biótico provocado pela infecção do CTV que se pretende determinar. Em resultado disto, as várias técnicas e respetiva robustez foram testadas ao máximo no sentido de se perceber se poderiam cumprir com o objetivo principal definido anteriormente.

Tabela 3.6: Irradiância e temperatura médias registadas na estufa durante a medição de fluorescência.

Data	03-12-14	07-01-15	05-02-15	09-03-15	13-04-15
Radiância média ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	-	25,896	38,477	38,408	62,523
Temperatura média (°C)	20	16,5	14,5	21,5	24,5

Tabela 3.7: Temperaturas e humidades relativas durante as medições de transmitância e refletância.

	Dia 1		Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
	27/10/14	30/10/14	01/12/14	07/01/15	05/02/15	09/03/15	08/04/15
Temperatura média durante as medidas (°C)	25,9	26,9	23,1	19,0	19,0	25,1	18,9
Temperatura máxima no dia das medidas (°C)	26,8	27,5	25,1	22,3	21,6	25,9	19,4
Temperatura mínima no dia das medidas (°C)	18,6	19,5	13,3	8,9	8,0	12,7	18,5
Temperatura média do dia anterior (°C)	25,4	23,3	17,9	14,8	16,3	19,2	19,3
Temperatura média da semana anterior (°C)	30,0	26,4	18,0	14,4	16,2	18,8	22,0
Humidade média relativa durante as medidas (%)	68,3	55,5	60,0	65,0	46,9	43,6	69,0
Humidade média relativa durante o dia anterior (%)	71,7	83,2	80,0	70,5	57,8	47,4	61,6
Humidade média relativa da semana anterior (%)	39,0	57,3	80,5	66,0	68,9	53,0	58,7

3.2.1 Teste à blindagem da luz externa

Em primeiro lugar realizou-se um teste de robustez ao equipamento. Como já se referiu, a luz ambiente pode interferir nas medições de refletância e/ou transmitância. Neste trabalho era preciso verificar se as sondas (ver Figura 2.1 e Figura 2.5) seriam imunes à luz ambiente. Assim, realizou-se tanto na leitura da refletância como da transmitância, uma medição em que se fez incidir diretamente uma luz de 45W numa folha, por cima das sondas, seguida de uma outra, desta vez, na ausência da luz referida.

Em ambos os espectros da refletância (Figura 3.18), o sensor foi colocado exatamente no mesmo local da amostra. O mesmo foi feito no caso da transmitância (Figura 3.19).

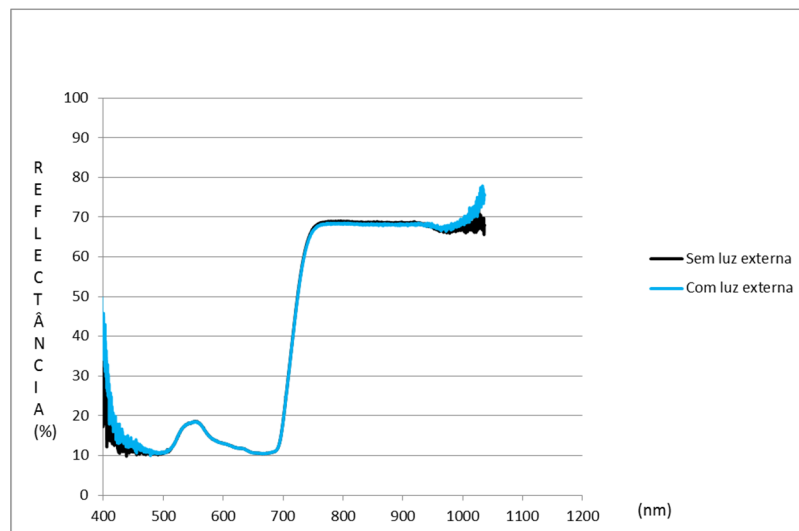


Figura 3.18: Espectros da refletância obtidos sem qualquer tratamento, usando o USB4000, na ausência e na presença de uma lâmpada de 45W a incidir diretamente na amostra, com os seguintes parâmetros: intensidade da luz do espectrómetro 524 (escala interna), tempo de integração 200 ms e 50 varrimentos.

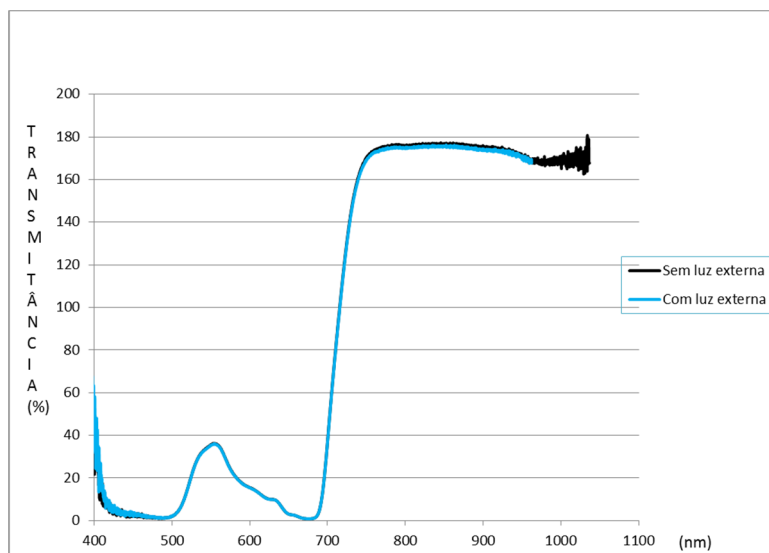


Figura 3.19: Espectros da transmitância obtidos sem qualquer tratamento, usando o USB4000, na ausência e na presença de uma lâmpada de 45W a incidir diretamente na amostra, com os seguintes parâmetros: intensidade da luz do espectrómetro 2095, tempo de integração 100 ms e 50 varrimentos.

Analisando a Figura 3.18 e Figura 3.19, é possível verificar que no caso da reflectância quer no da transmitância, que os dois espectros coincidem perfeitamente, exceto nas extremidades, dado ser aqui que se localiza grande parte do ruído. Isto permite afirmar que as sondas têm um bom isolamento, no que diz respeito à luz exterior, e que portanto, esta não tem influência nos resultados.

3.2.2 Panorama geral da evolução dos espectros ao longo do tempo

A Figura 3.20 e Figura 3.21 ilustram a evolução dos espectros ao longo dos seis dias para duas plantas, como exemplo. Os valores do gráfico correspondem à transformação $\log(R\%)$, em que $R\%$ é o valor da reflectância em percentagem. Não é uma escolha habitual, mas permite comparar os valores de forma mais intuitiva do que a transformação para a absorvância $A = \log(1/R)$.

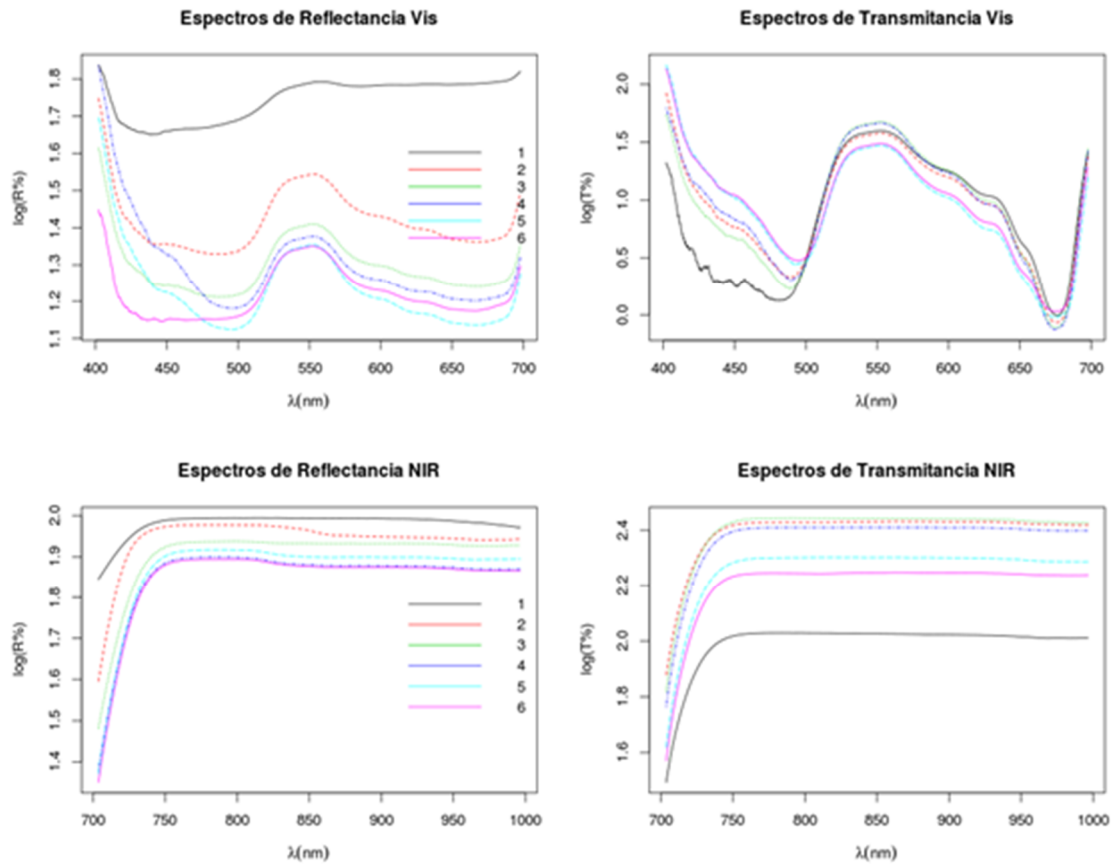


Figura 3.20: Evolução dos espectros ao longo dos seis dias. Exemplo da planta 12 (grupo de controlo da 'Valencia late').

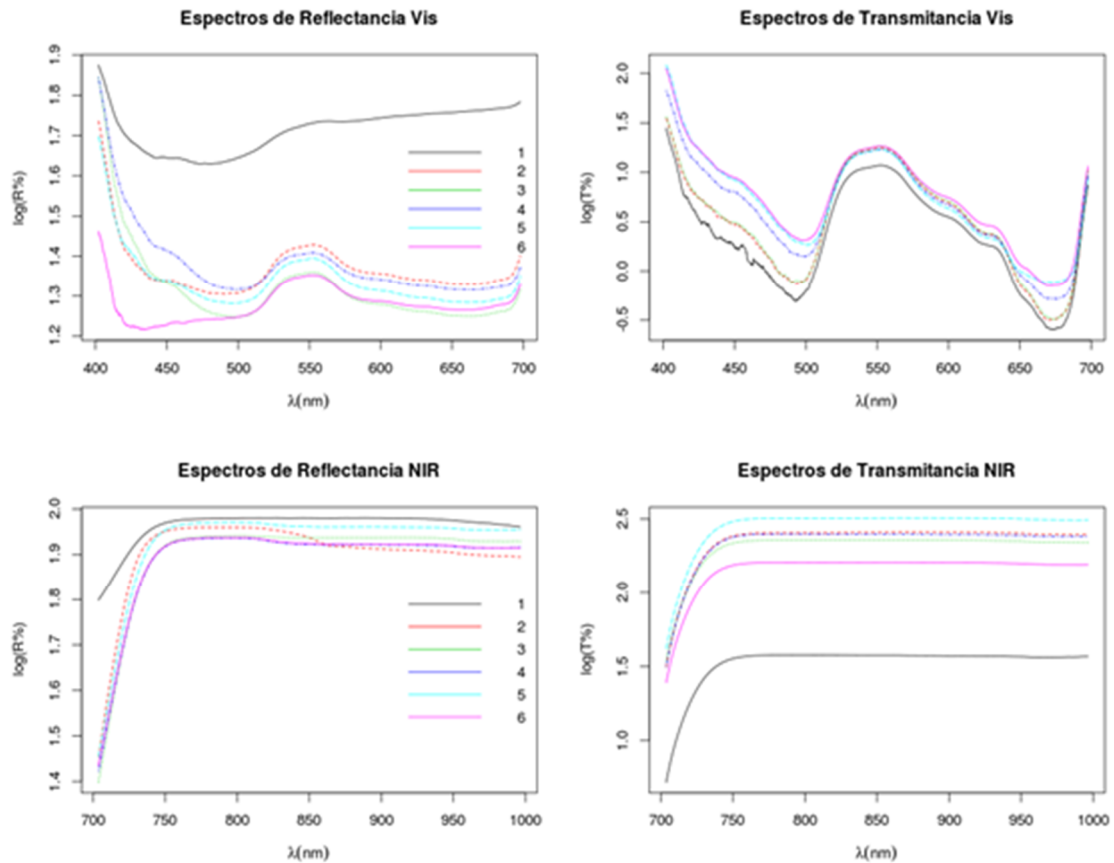


Figura 3.21: Evolução dos espectros ao longo dos seis dias. Exemplo da planta 9 (grupo de infetadas da ‘Valencia late’).

Os gráficos mostram claramente os efeitos descritos na introdução: a clorofila (diminuição das intensidades refletida e transmitida nas zonas 450-500 nm e 630-690 nm) e também o *plateau* na zona do NIR, onde a refletância é elevada.

Uma das características mais óbvias é a diferença de refletância VIS e transmitância NIR entre o primeiro dia e os restantes. Esta diferença deve-se, muito provavelmente, ao fato de as folhas ainda serem muito jovens na primeira medição. Mesmo à vista desarmada percebia-se que estas folhas tinham uma coloração verde mais suave. Portanto, é de esperar que a refletância pelas folhas jovens seja muito mais alta, o que de facto se verifica.

Note-se ainda que os valores elevados da refletância no visível são confirmados pelas medições no NIR com outro espectrómetro. Os valores observados no fim dos gráficos VIS e no princípio dos gráficos NIR (na zona dos 700 nm) são consistentes entre si.

Relativamente aos outros dias, não há um padrão tão claro. Nas refletâncias verifica-se ainda um padrão de decréscimo ao longo dos primeiros dias, embora não seja claro nos últimos. Nas transmitâncias o padrão ainda é menos claro, o que sugere que os efeitos da absorção e estrutura interna da folha complicam a compreensão do padrão de transmissão ao longo do tempo.

Finalmente, quanto à comparação entre as medidas obtidas para uma folha infetada (Figura 3.21) e para uma folha de controlo (Figura 3.22) não há nenhum padrão óbvio que permita distinguir de forma fácil as plantas. Para detetar esse tipo de padrões é preciso fazer o gráfico de todas as plantas ao mesmo tempo, o que será feito na secção seguinte.

3.2.3 Gráficos iniciais

Antes de se ter dado início à redução do volume de dados através dos métodos multivariados (que têm a desvantagem de não terem uma interpretação direta e intuitiva), foi possível logo nos primeiros gráficos verificar que, em certos dias, existe uma tendência de separação entre as plantas controlo e as infetadas (Figura 3.22, Figura 3.23, Figura 3.24), o que aparentou ser promissor, sobretudo nas 'Valencia late' (Figura 3.22 e Figura 3.23) e essencialmente na região do visível.

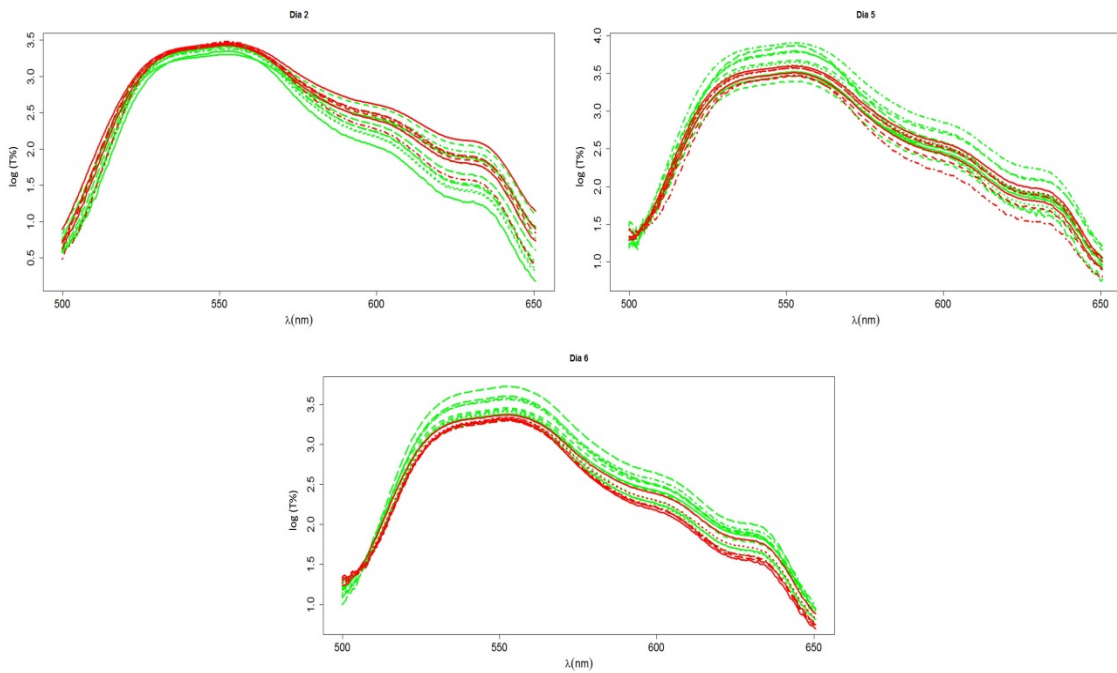


Figura 3.22: Espectros de transmitância visível obtidos nos dias 2, 5 e 6 para as ‘Valencia late’ após pré-tratamento com MSC. As linhas a verde correspondem às plantas controlo e as vermelhas às infetadas com o CTV T318A.

Analisando a Figura 3.22, é possível constatar que de fato existe uma tendência de separação entre os dois grupos, porém esta não é coerente ao longo dos dias, uma vez que no dia 2 a transmitância é superior para as plantas infetadas enquanto nos dias 5 e 6 se verifica o contrário.

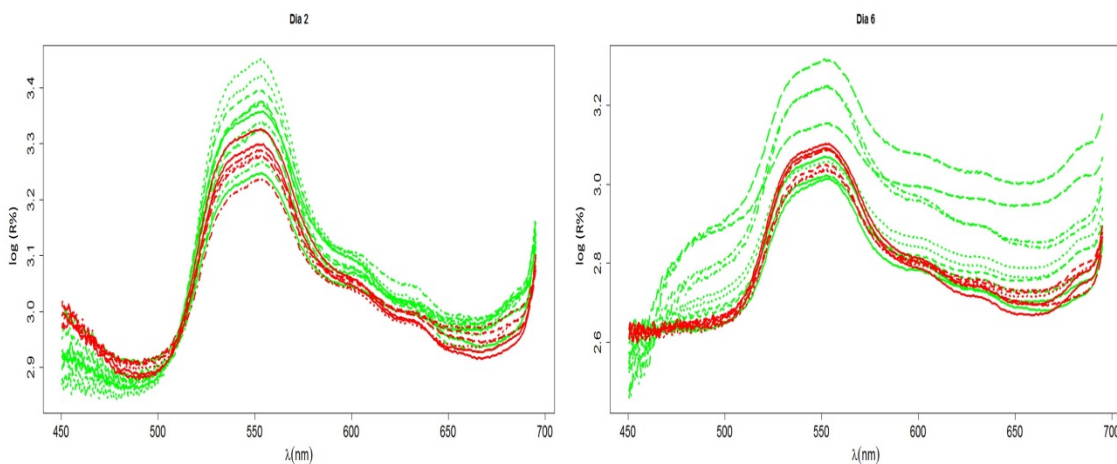


Figura 3.23: Espectros de refletância visível obtidos nos dias 2 e 6 para as ‘Valencia late’ após pré-tratamento com MSC. As linhas a verde correspondem às plantas controlo e as vermelhas às infetadas com o CTV T318A.

Na Figura 3.23, a tendência de separação é igual em ambos os dias (refletância maior nas plantas controlo), mas comparando as Figura 3.23 e Figura 3.24 que dizem respeito à refletância no visível, volta-se a verificar uma falta de coerência dado que nas 'Valencia late' a refletância é maior nas plantas controlo (Figura 3.23) enquanto nas Clementinas 'Fina' (Figura 3.24) é maior nas plantas infetadas.

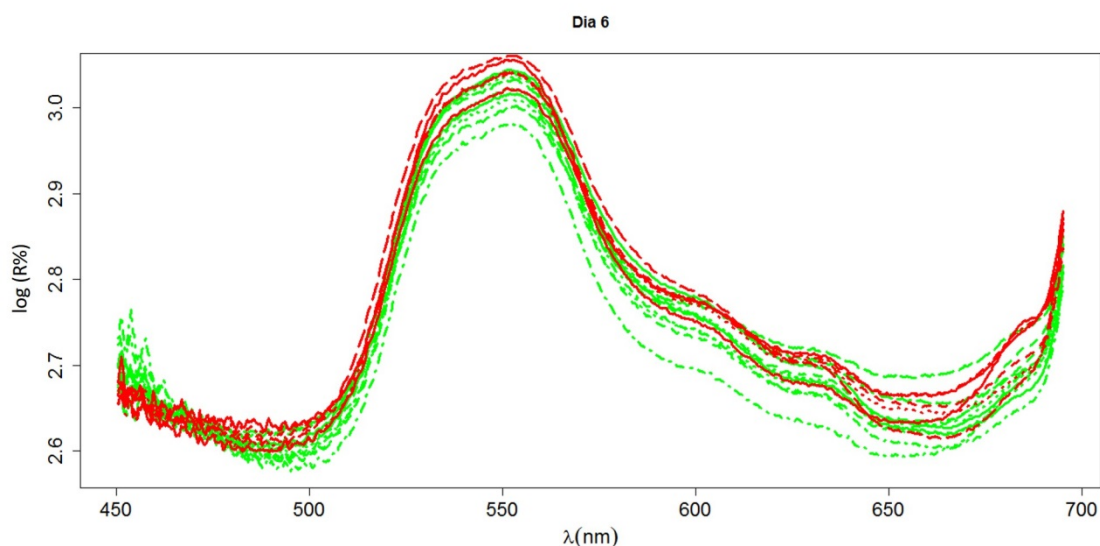


Figura 3.24: Espectros de refletância visível obtidos no dia 6 para as Clementinas 'Fina' após pré-tratamento com MSC. As linhas a verde correspondem às plantas controlo e as vermelhas às infetadas com o CTV T318A.

Embora se tenha tentado minimizar os efeitos externos e de operação, esta falta de coerência pode ser provocada por fatores ambientais e outras fontes de variabilidade, tais como o estado de desenvolvimento da folha, temperatura, humidade, disponibilidade de água e luz que influenciam o comportamento fisiológico das folhas e consequentemente o padrão da refletância e da transmitância. Estes fatores variam consoante o dia da medição (Tabela 3.7) e caso o efeito do vírus seja suave, é possível que se sobreponham à presença do CTV e influenciem de modo diferente o espectro. Além disto, as plantas podem responder de diversas formas a estes agentes, o que origina padrões de refletância e transmitância variados não só dentro de uma mesma espécie mas também, e principalmente, entre variedades diferentes. De fato, a sintomatologia apresentada para uma mesma doença dentro do mesmo grupo

de plantas pode ser muito dispar, dado que diferentes plantas apresentam diferentes níveis de resistência ao vírus (Cavaco, 2003).

Segundo dados da literatura, o *stress* causado pela infecção de patogénicos afeta a absorção pelos pigmentos (Larsolle e Hamid Muhammed, 2007), levando a um aumento da refletância na região do visível (Polischuk *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 2003; Steddom *et al.*, 2003; West *et al.*, 2003; Larsolle e Hamid Muhammed, 2007). Isto está apenas de acordo com a Figura 3.24, contudo é importante salientar que, nos trabalhos acima referidos, a diferença na refletância foi entre plantas saudáveis e plantas infetadas sintomáticas, o que difere do que apresentado nesta tese, uma vez que neste caso particular, todas as plantas infetadas são assintomáticas.

Os gráficos iniciais da refletância NIR apresentaram menores diferenças entre os dois grupos de plantas, tal como aconteceu noutros artigos (Polder *et al.*, 2010).

3.2.4 PCA

Usando o método do PCA, que permite a redução da quantidade de dados quando existe uma correlação entre eles (Miller e Miller, 2010), pretendia-se visualizar uma separação mais clara entre os dois grupos e no máximo de dias de medição possível. Com este intuito, testou-se várias combinações das técnicas utilizadas no pré-tratamento, dado que não era conhecido *a priori* qual/quais e em que ordem possibilitaria(m) melhores resultados. Foram também testadas diferentes larguras para a janela do SG quando utilizado.

3.2.4.1 Pré-tratamento: *Multiplicative scatter correction*

No caso das 'Valencia late', utilizando apenas o MSC e não o SG, o máximo conseguido foi uma boa separação em dois dias na região do visível tanto na refletância (Figura 3.25) como na transmitância.

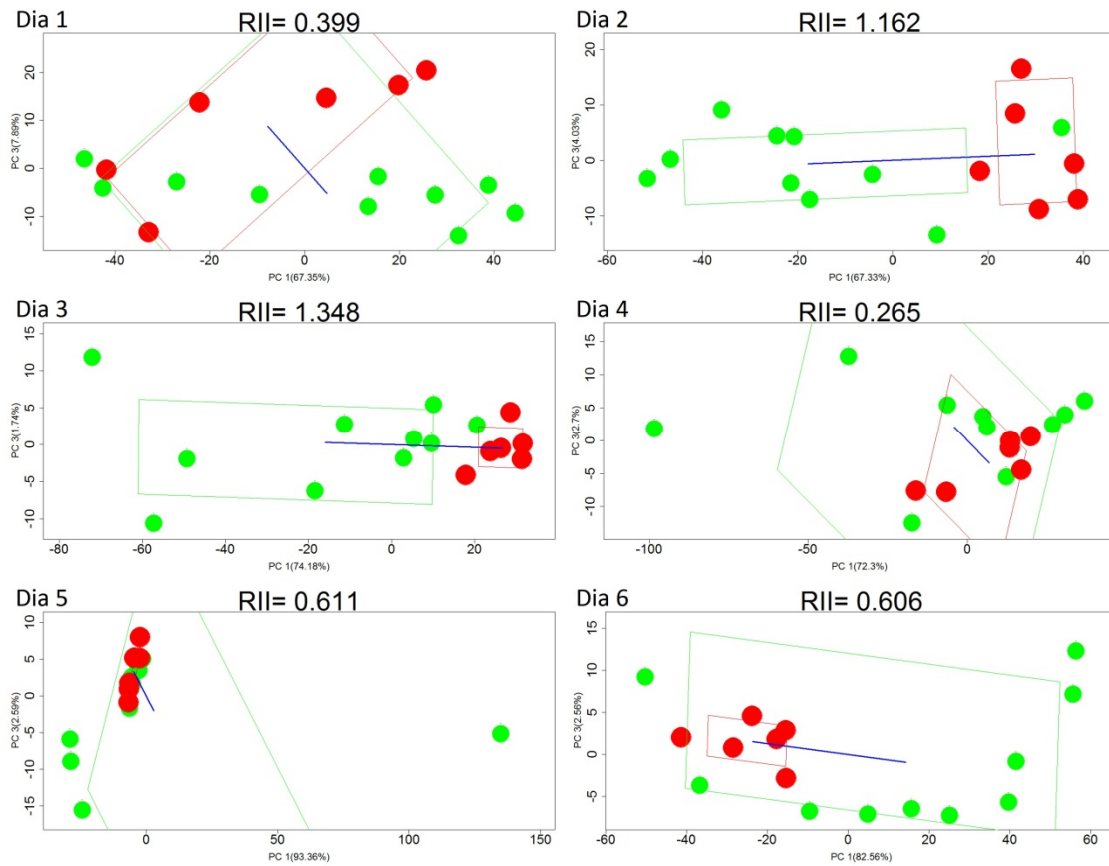


Figura 3.25: PCA aplicado aos espectros de refletância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as ‘Valencia late’ após pré-tratamento com MSC. Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

Nas Clementinas ‘Fina’ foi conseguida uma boa separação apenas no último dia de medição da refletância NIR (Figura 3.26).

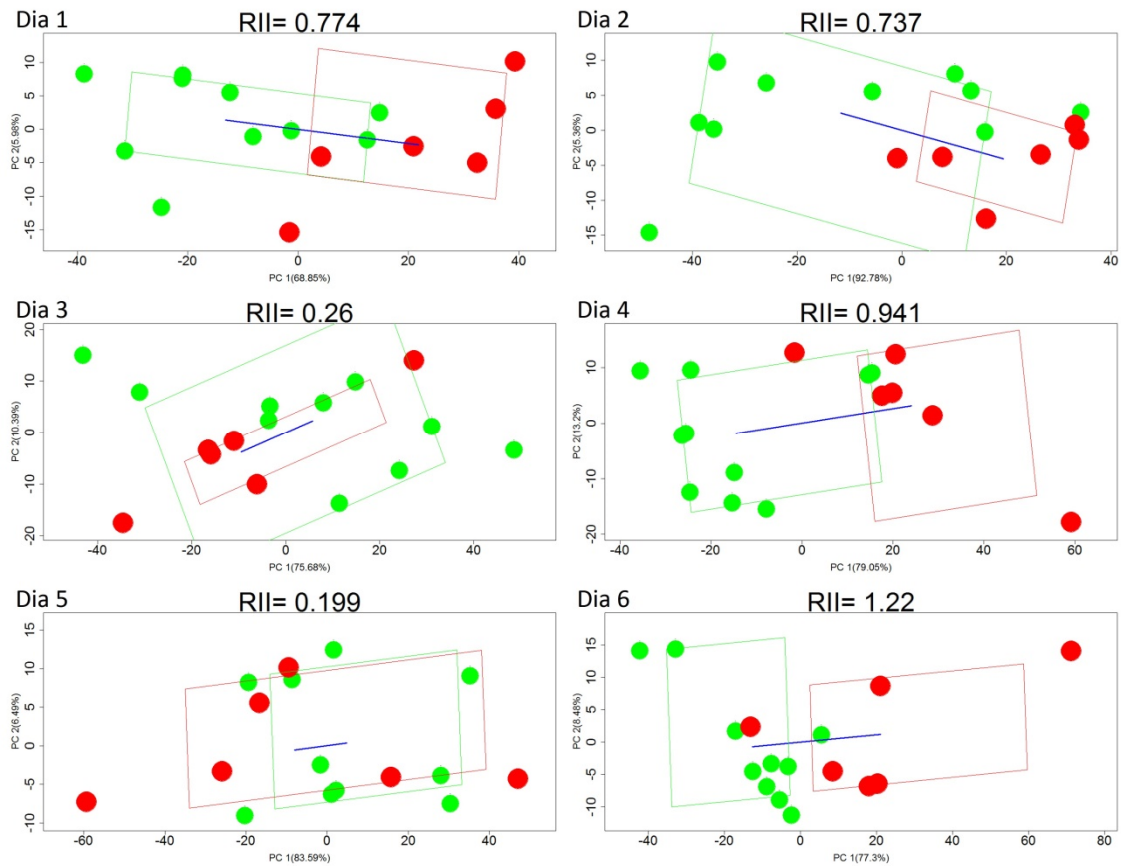


Figura 3.26: PCA aplicado aos espectros de refletância NIR obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas ‘Fina’ após pré-tratamento com MSC. Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

3.2.4.2 Pré-tratamento: Savitzky-Golay

Usando apenas o SG no pré-tratamento, continuou a verificar-se uma maior separação nas ‘Valencia late’, contudo para ambas as variedades os resultados melhoraram bastante pois conseguiu-se uma boa separação no dobro dos dias.

Nas ‘Valencia late’ houve uma boa separação das plantas infetadas e das controlo em quatro dias de medição na transmitância visível (Figura 3.27), enquanto nas Clementinas ‘Fina’ tal só se constatou em dois dias na refletância visível (Figura 3.28).

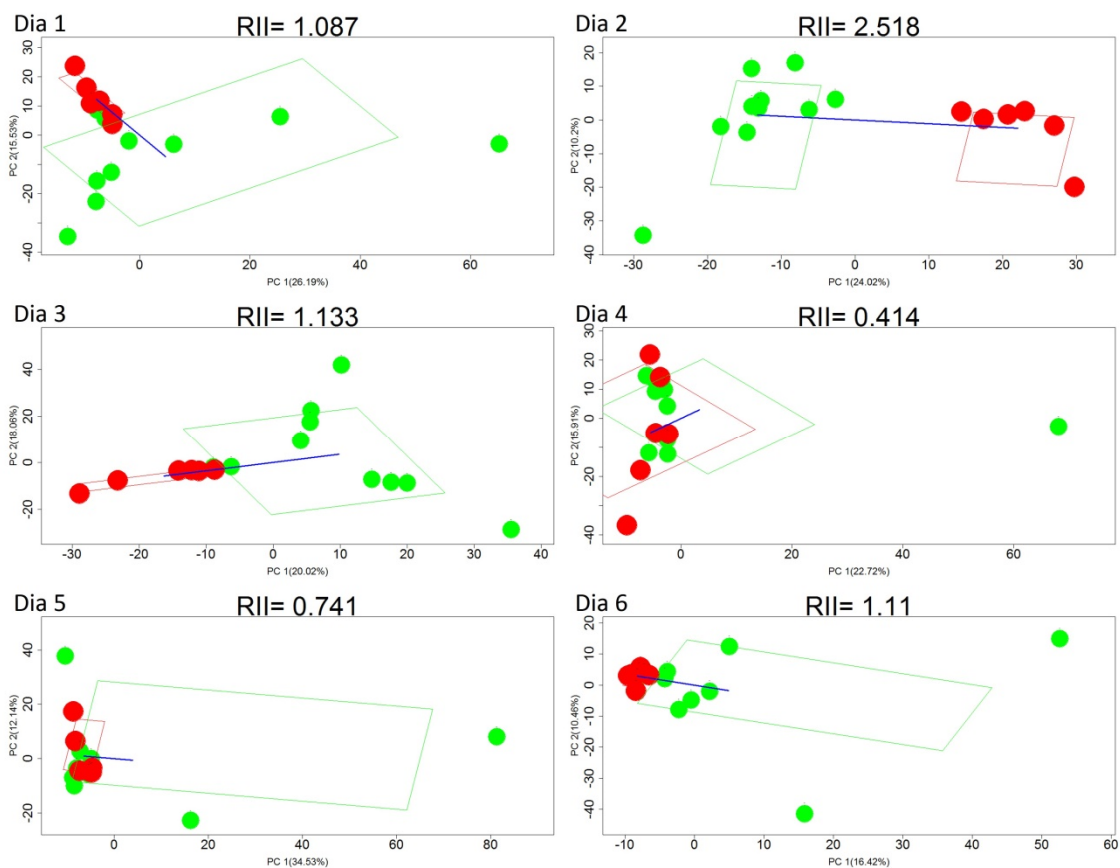


Figura 3.27: PCA aplicado aos espectros de transmitância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as ‘Valencia Late’ após pré-tratamento com SG (l=11, d=2 e p=2). Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

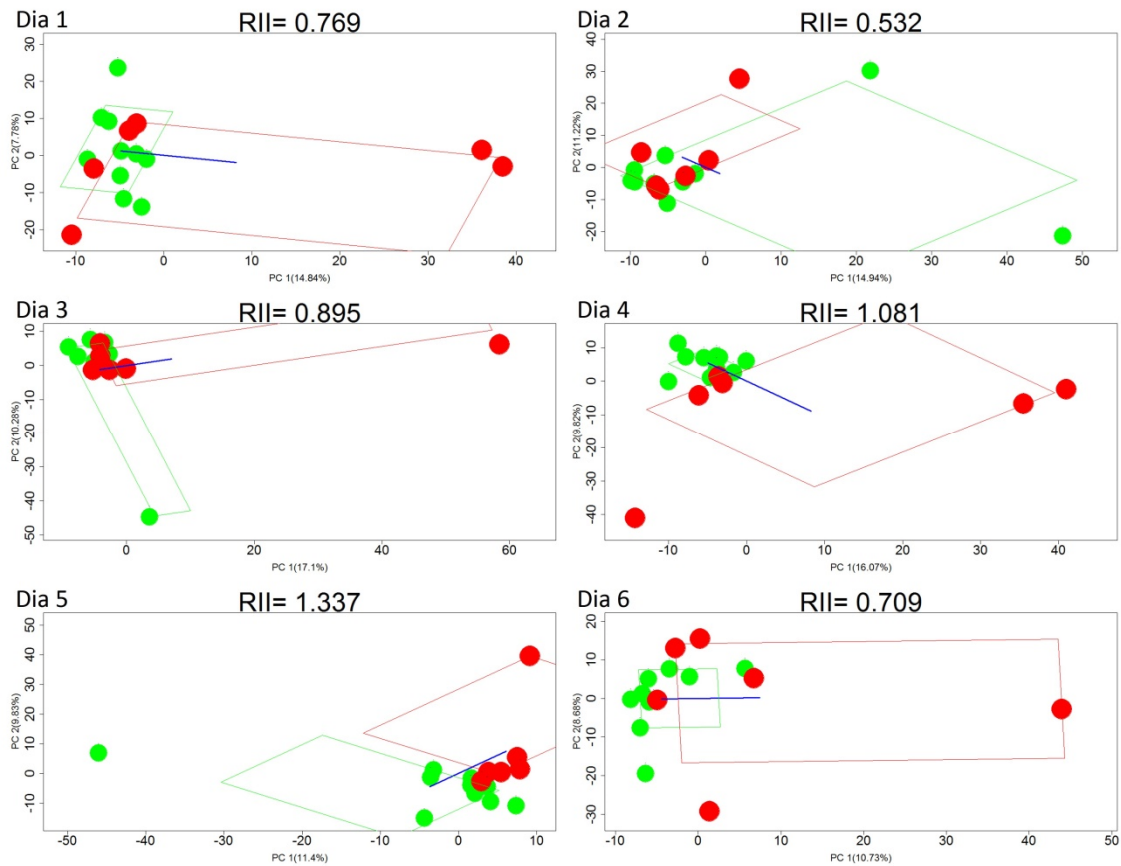


Figura 3.28: PCA aplicado aos espectros de refletância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas ‘Fina’ após pré-tratamento com SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às folhas controle e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

3.2.4.3 Pré-tratamento: *Multiplicative scatter correction + Savitzky-Golay*

Se se usar o MSC seguido do SG, mantém-se exatamente os mesmos quatro dias de separação e novamente na transmitância visível para as ‘Valencia late’ (Figura 3.29). Isto sugere uma consistência dos resultados para esta variedade. A região do visível, principalmente a transmitância, parece ser mais suscetível a diferenças nos espectros medidos a partir das ‘Valencia late’ e o fato de a separação ser novamente nos mesmos quatro dias não será coincidência. Para explicar esta situação, analisou-se alguns dos fatores de variabilidade presentes nos vários dias, nomeadamente a temperatura e a humidade relativa, e verificou-se que os dois dias em que a separação ficou aquém das expectativas, correspondem precisamente aos dois dias em que a humidade relativa durante as medidas e durante o dia anterior atingiu valores mais baixos (Tabela 3.7).

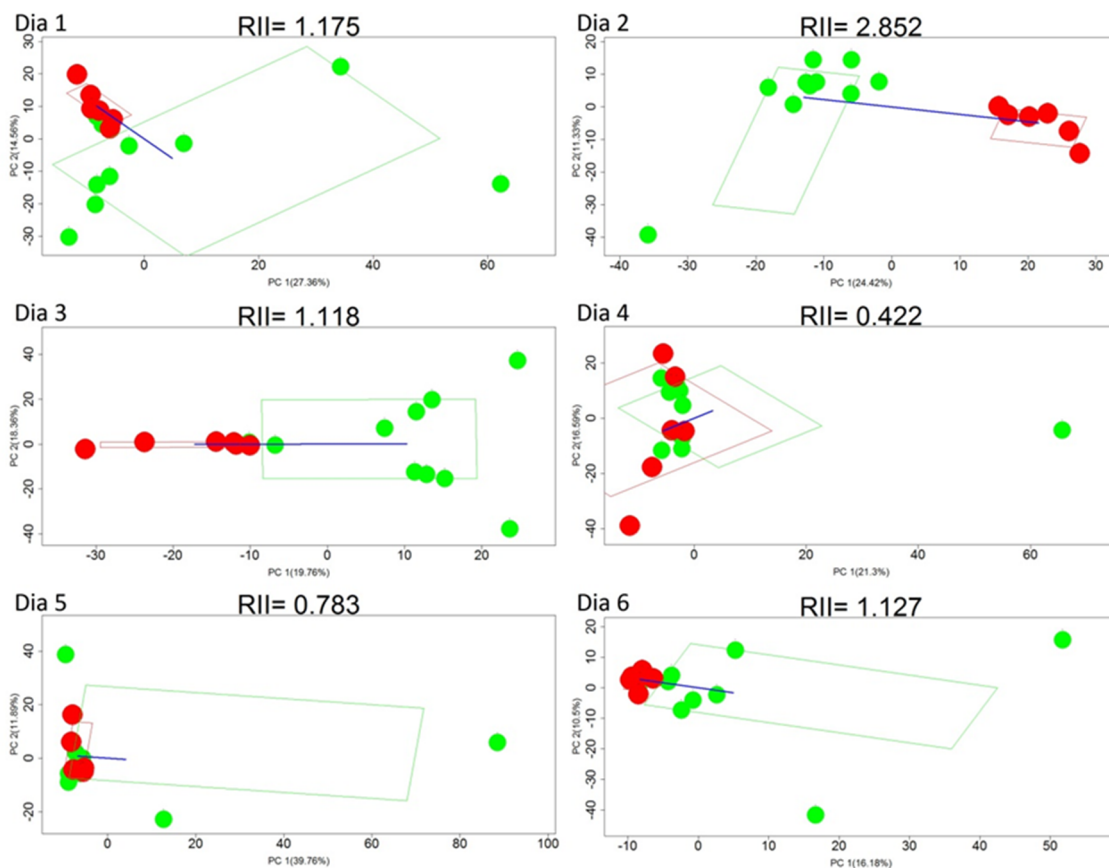


Figura 3.29: PCA aplicado aos espectros de transmitância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as ‘Valencia late’ após pré-tratamento com MSC seguido de SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

A transpiração nas plantas, de onde resulta perda de água para o exterior da planta, ocorre em simultâneo com a entrada de dióxido de carbono nos estomas, que será depois reduzido na fotossíntese em fotoassimilados que a planta usa para manter todo o seu metabolismo e assegurar o seu crescimento (Ache *et al.*, 2010). Esta taxa de transpiração é regulada pelo nível de abertura dos estomas (Bauer *et al.*, 2013). Ora quando a humidade relativa é baixa, os estomas têm tendência a fechar (Darwin, 1898), o que altera a taxa de fotossíntese e a própria turgidez dos tecidos também diminui (Ache *et al.*, 2010). É muito plausível que estes efeitos tenham mascarado o efeito associado ao vírus, que se distingue nos outros dias.

No caso das Clementinas 'Fina', os valores melhoram ligeiramente ao passarem de dois para três dias com boa separação entre os grupos, tendo-se mantido estes melhores resultados na refletância visível (Figura 3.30).

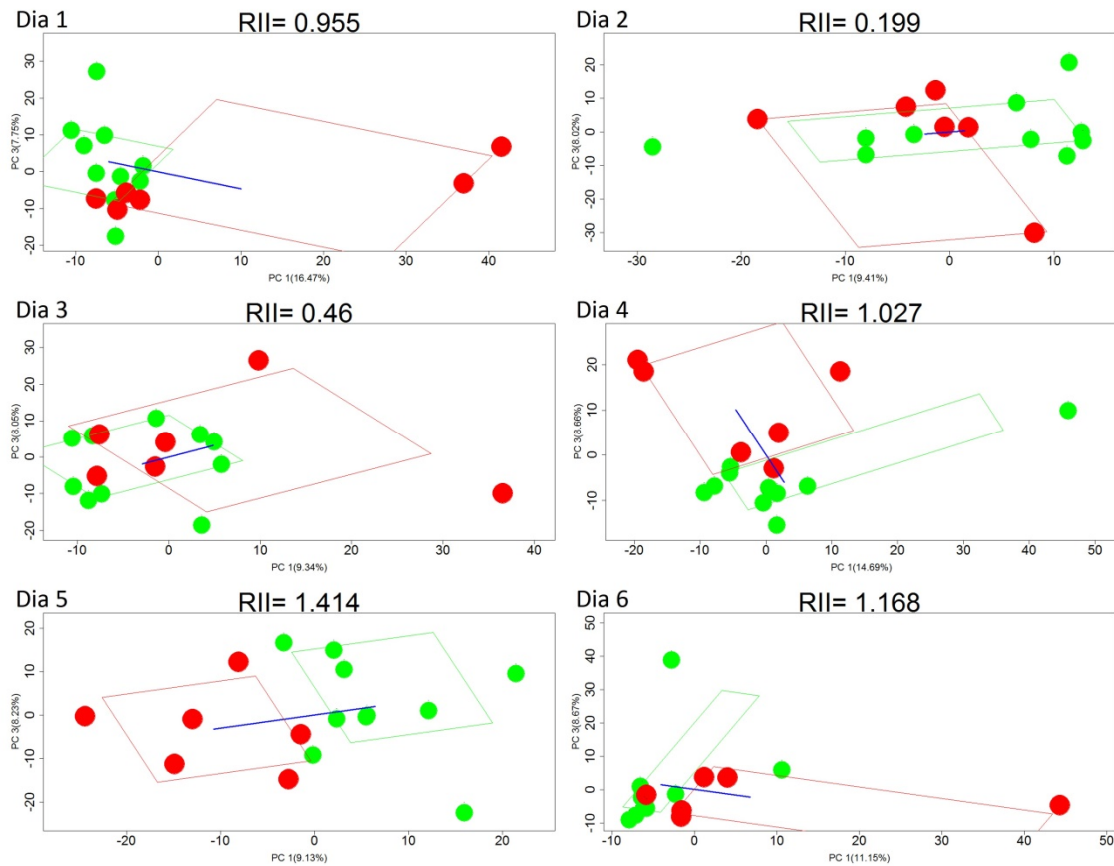


Figura 3.30: PCA aplicado aos espectros de refletância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas 'Fina' após pré-tratamento com MSC seguido de SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

3.2.4.4 Pré-tratamento: *Savitzky-Golay* + *Multiplicative scatter correction*

Usando o SG seguido do MSC, voltou a ter-se quatro dias com uma boa separação e novamente na transmitância visível nas ‘Valencia late’ (Figura 3.31).

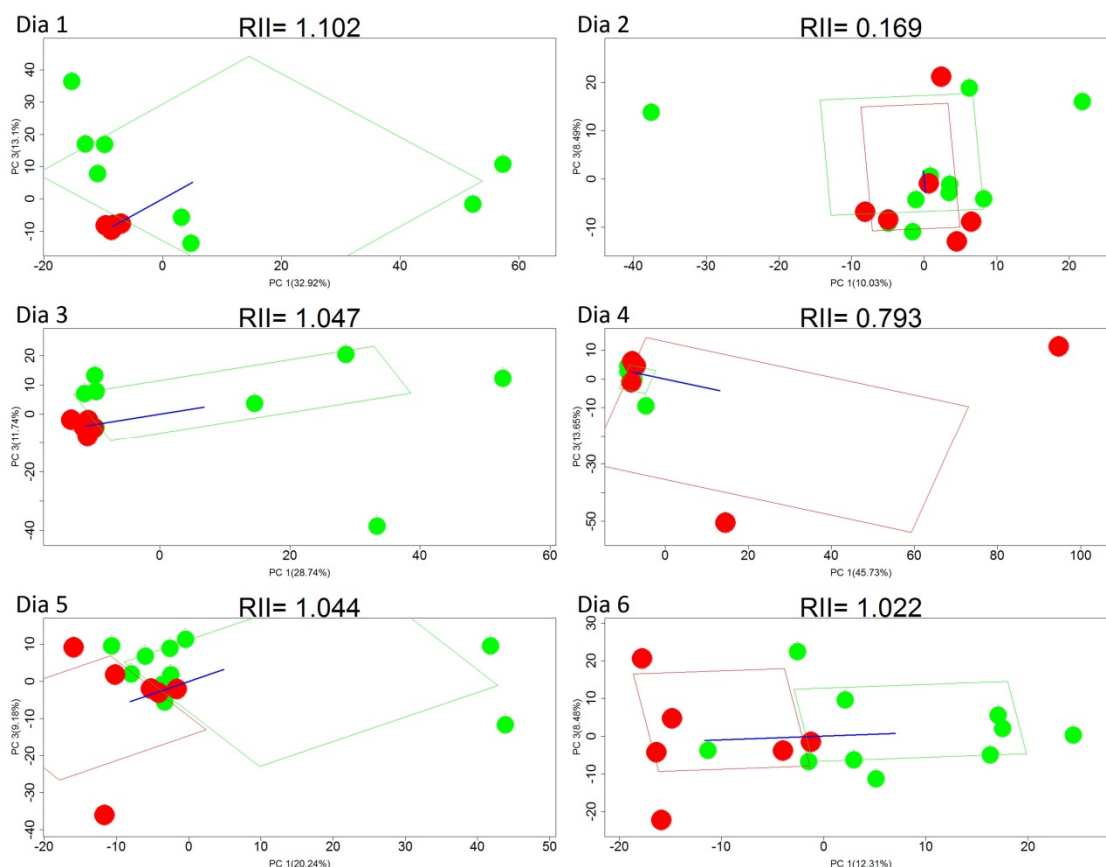


Figura 3.31: PCA aplicado aos espectros de transmitância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as ‘Valencia late’ após pré-tratamento com SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$) seguido de MSC. Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

Para as Clementinas ‘Fina’ os melhores resultados foram agora conseguidos na refletância NIR e somente em dois dias houve uma boa separação entre as plantas infetadas e as controlo (Figura 3.32).

Independentemente, dos métodos utilizados no pré-tratamento e da ordem destes verificou-se sempre uma maior separação nas ‘Valencia late’. Fica a dúvida se os espectros destas refletem mais facilmente as alterações provocadas pela presença do CTV simplesmente por estas plantas serem mais sensíveis a este ou por albergarem em média um título viral maior (três plantas

‘Valencia late’ com um título viral elevado contra apenas uma das Clementinas ‘Fina’) (Tabela 3.2). Qualquer que seja a razão, estes dados, juntamente com o número menor de enxertias necessárias para que haja inoculação do CTV, mostram que, à partida, a ‘Valencia late’, de entre as duas espécies estudadas, é aparentemente a menos resistente à infeção pelo vírus, e portanto um melhor hospedeiro para num futuro próximo se estudar a deteção de vírus através de métodos espectroscópicos.

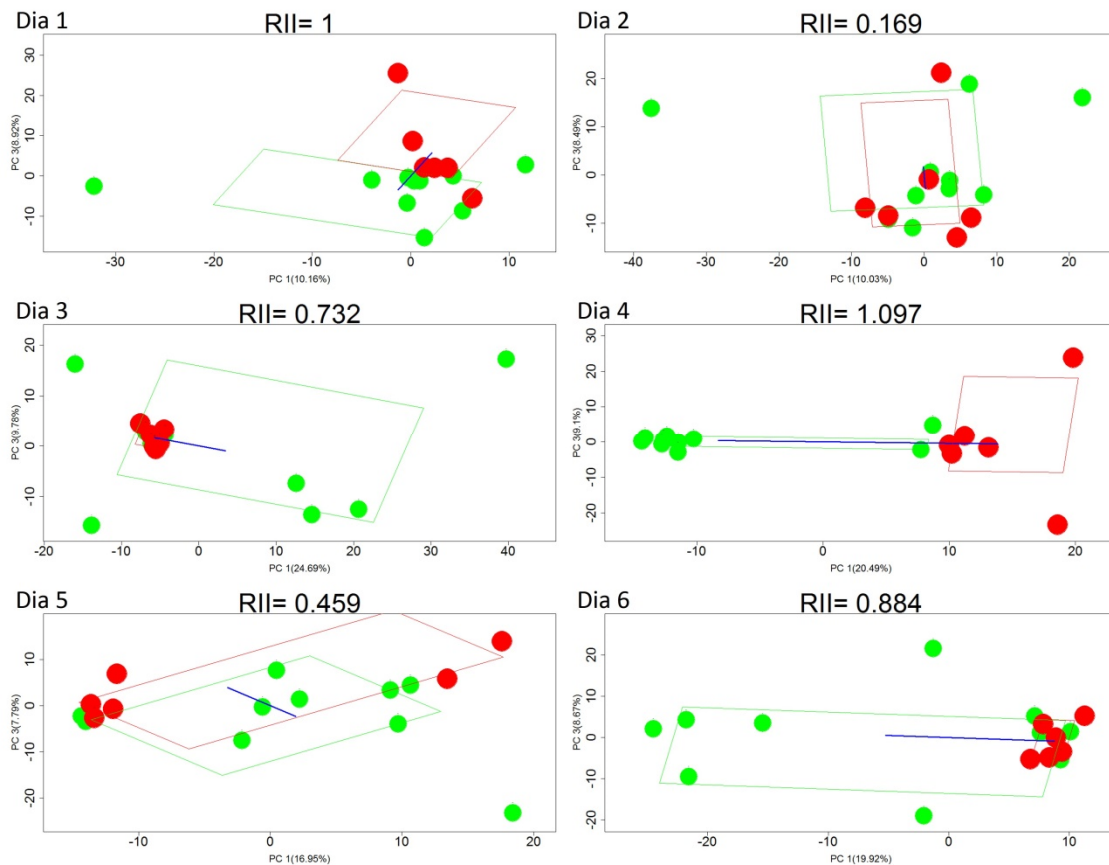


Figura 3.32: PCA aplicado aos espectros de refletância NIR obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas ‘Fina’ após pré-tratamento com SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$) seguido de MSC. Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

3.2.5 PCA aplicado à fluorescência da clorofila a

Para tentar melhorar os resultados obtidos, combinou-se os espectros da refletância e da transmitância com os valores da fluorescência medidos (Figura 3.33). Para fazer essa junção foi preciso efetuar uma transformação prévia, já que a dimensão dos espectros (865 ou 1478 variáveis) é muito maior do que a dimensão dos dados de fluorescência (2 variáveis por amostra). A solução passou por compactar a informação dos espectros através de PCA e juntar as três primeiras PCs às variáveis de fluorescência.

Os resultados estão patentes na Figura 3.33. Verificou-se que em ambas as variedades o nível de separação conseguido piorou.

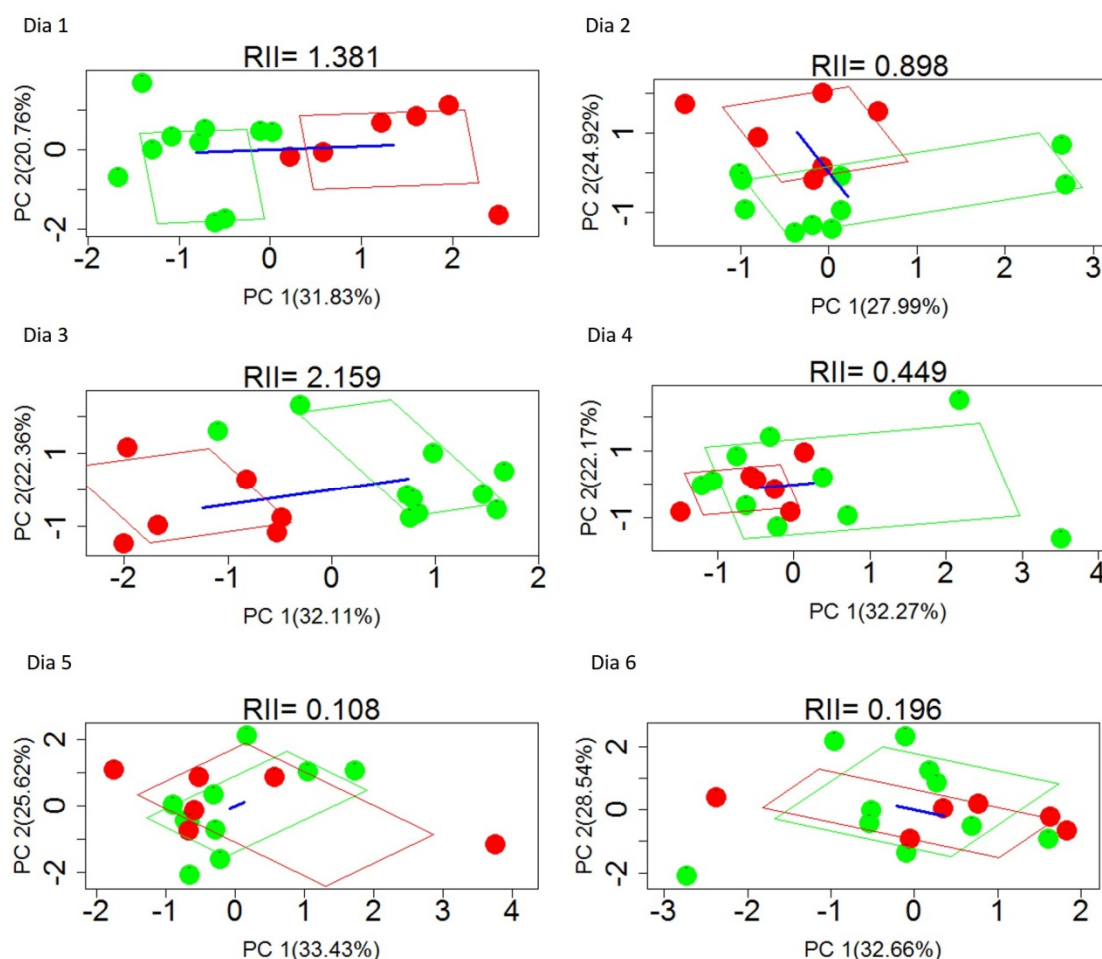


Figura 3.33: Melhores resultados obtidos no PCA aplicado à combinação dos espectros de transmitância NIR com os valores de fluorescência em cada um dos dias de medição para as 'Valencia late' após pré-tratamento com SG (l=11, d=2 e p=2) seguido de MSC. Os pontos a verde correspondem às folhas controle e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

O PCA aplicado apenas aos valores de fluorescência medidos quer nas Clementinas 'Fina' (Figura 3.34) quer nas 'Valencia late' (Figura 3.35) mostrou ainda que a fluorescência de clorofila *a*, embora seja uma técnica de referência usada na determinação do estado fisiológico e performance fotossintética de plantas em condições de *stress* biótico ou abiótico (Maxwell e Johnson, 2000), no caso da infecção pelo CTV T318A das duas variedades de citrinos analisadas ao longo deste estudo, não permitiu nem por si só nem em combinação com a espectroscopia de Vis/NIR a identificação das plantas infetadas.

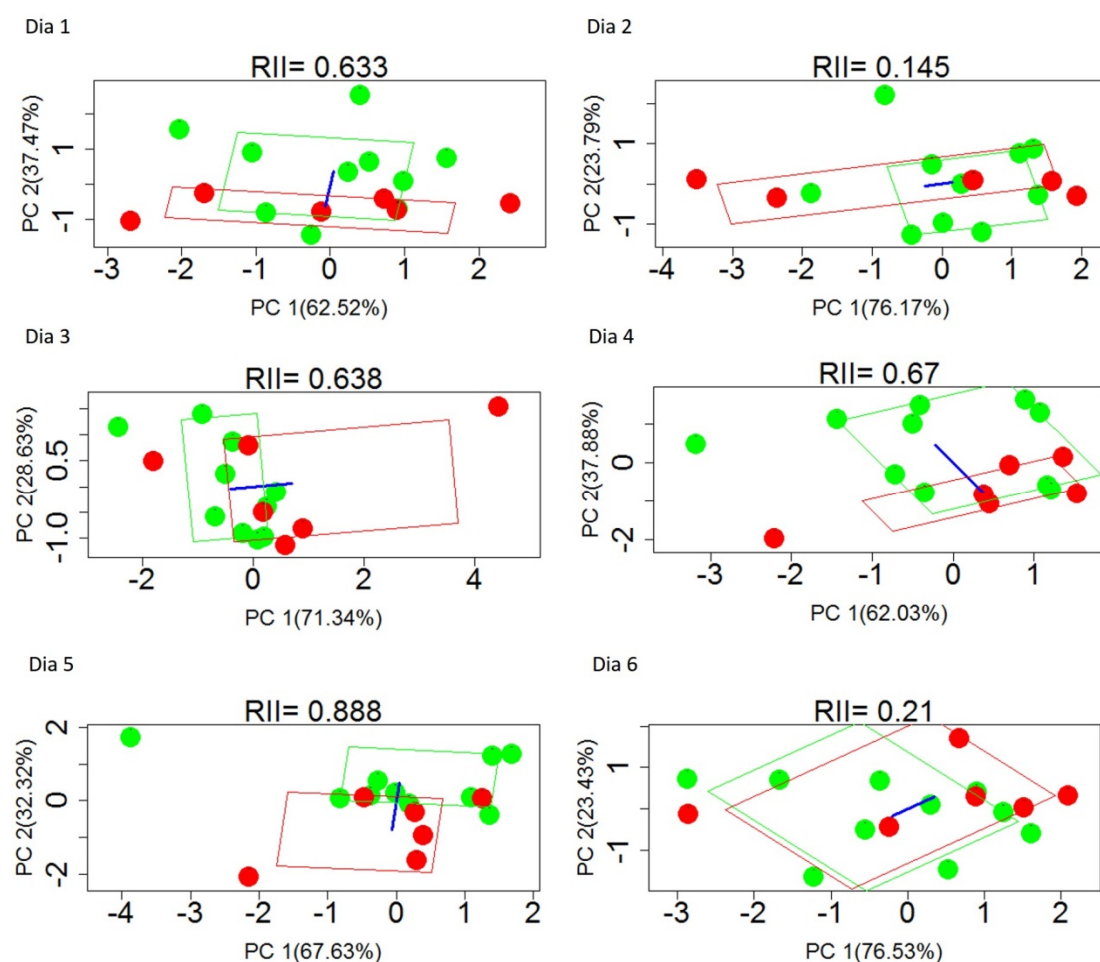


Figura 3.34: PCA aplicado aos valores de fluorescência obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas 'Fina'. Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

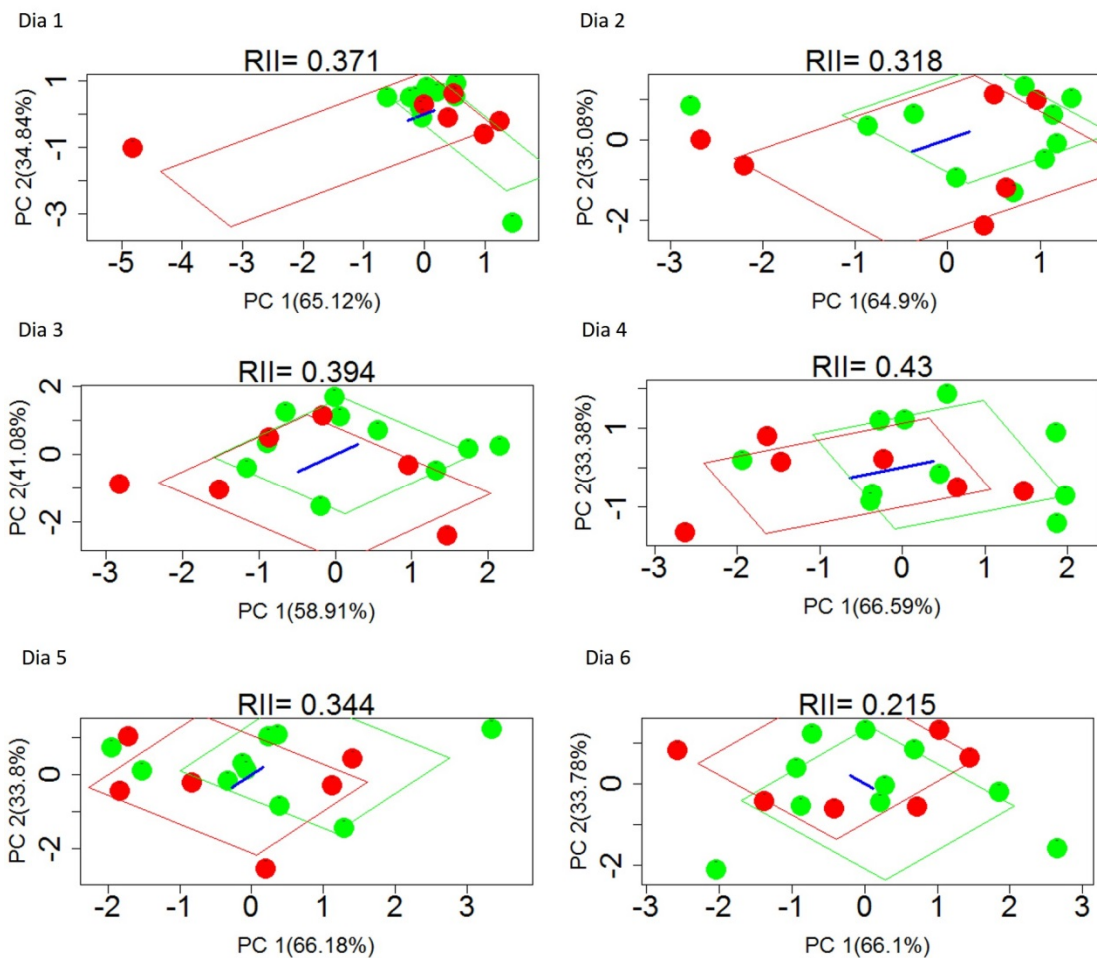


Figura 3.35: PCA aplicado aos valores de fluorescência obtidos em cada um dos dias de medição para as 'Valencia late'. Os pontos a verde correspondem às folhas controle e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A.

A extrema sensibilidade do metabolismo primário do carbono das plantas à variação dos fatores ambientais como a temperatura que como se observa na Tabela 3.6 foi variando ao longo do tempo, acaba por se sobrepor ao efeito do vírus no sistema foliar das duas variedades de citrinos estudadas. Embora as medições da fluorescência tenham sido feitas sempre aproximadamente à mesma hora, a temperatura variou bastante nos vários dias, chegando a existir uma diferença de 10°C entre o dia de temperatura mais baixa e o de mais elevada (Tabela 3.6).

Seria preciso trabalhar sempre em condições ambientais controladas para garantir o total potencial da fluorescência da clorofila a no contexto pretendido.

Ao comparar a separação dos grupos usando os valores de fluorescência com os resultados obtidos do PCA aplicado apenas aos espectros, verifica-se que a variabilidade externa causada por fatores abióticos se sobrepõe mais facilmente às alterações provocadas pela presença do vírus no caso da fluorescência do que na espectroscopia. Assim, para o efeito pretendido (separar os grupos) os dados de fluorescência não têm informação útil. Por isso, a junção dos dados de fluorescência aos de espectroscopia é equivalente a adicionar ruído aos dados de espectroscopia com a consequente perda de capacidade de separação dos grupos.

3.2.6 PCA aplicado ao longo do tempo em dados de espectroscopia de VIS/NIR

Os resultados apresentados nas secções anteriores mostram que pode haver influência da presença do vírus nos espectros, mas que essa influência pode ser mais ou menos ocultada por outros efeitos, a começar pelas alterações que acompanham o desenvolvimento da folha. Surgiu então a ideia de procurar caracterizar os grupos não apenas com base em análises pontuais, em cada dia, mas através da evolução temporal completa. As variações fisiológicas da folha e as condições externas são as condicionantes que evoluem ao longo do tempo, de igual forma para os dois grupos. A resposta espectral também varia ao longo do tempo, em resposta a essas condicionantes, mas é esperado que a presença do CTV induza mudanças nessa resposta. Globalmente os padrões de resposta dos dois grupos serão diferentes, mesmo que possam coincidir em alguns pontos do percurso. Isto permite resolver o problema dos dias em que não há separação, colocando-os no contexto de uma perspectiva mais abrangente.

Para fazer a análise temporal adotou-se o algoritmo explicado na secção 2.2.4.2 Análise PCA ao longo do tempo e o mesmo procedimento que anteriormente no que diz respeito ao teste do pré-processamento. Esta forma mais abrangente de avaliar os dados apresentou resultados muito superiores aos que se obtiveram com base numa análise dia a dia. O PCA aplicado à matriz resultante da concatenação dos primeiros scores, dos segundos, dos dois primeiros, dos três primeiros e até mesmo dos quatro primeiros scores

revelou sempre um bom valor de RII. Esta estratégia mostrou uma clara separação entre as plantas infetadas e as controlo em todos os scores acima referidos, não só nas 'Valencia late' como também nas Clementinas 'Fina'.

Nas 'Valencia late' além da transmitância visível (Figura 3.36) foi conseguida também uma clara separação na refletância (Figura 3.37) e transmitância NIR (Figura 3.38), ou seja, em quase todos os modos da espectroscopia analisados.

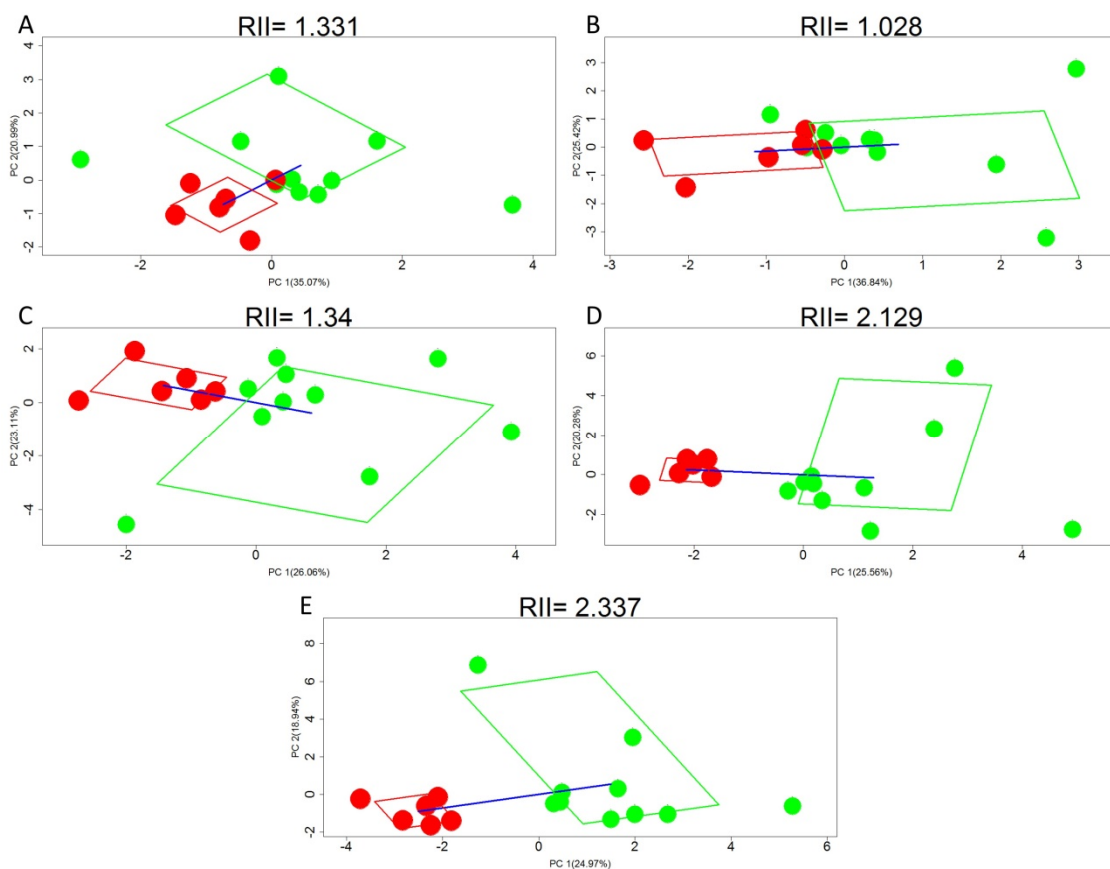


Figura 3.36: PCA aplicado ao PCA dos espectros de transmitância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as 'Valencia late' após pré-tratamento com MSC seguido de SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às plantas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A. A) PCA no primeiro score; B) PCA no segundo score; C) PCA nos primeiros 2 scores; D) PCA nos primeiros 3 scores; E) PCA nos primeiros 4 scores.

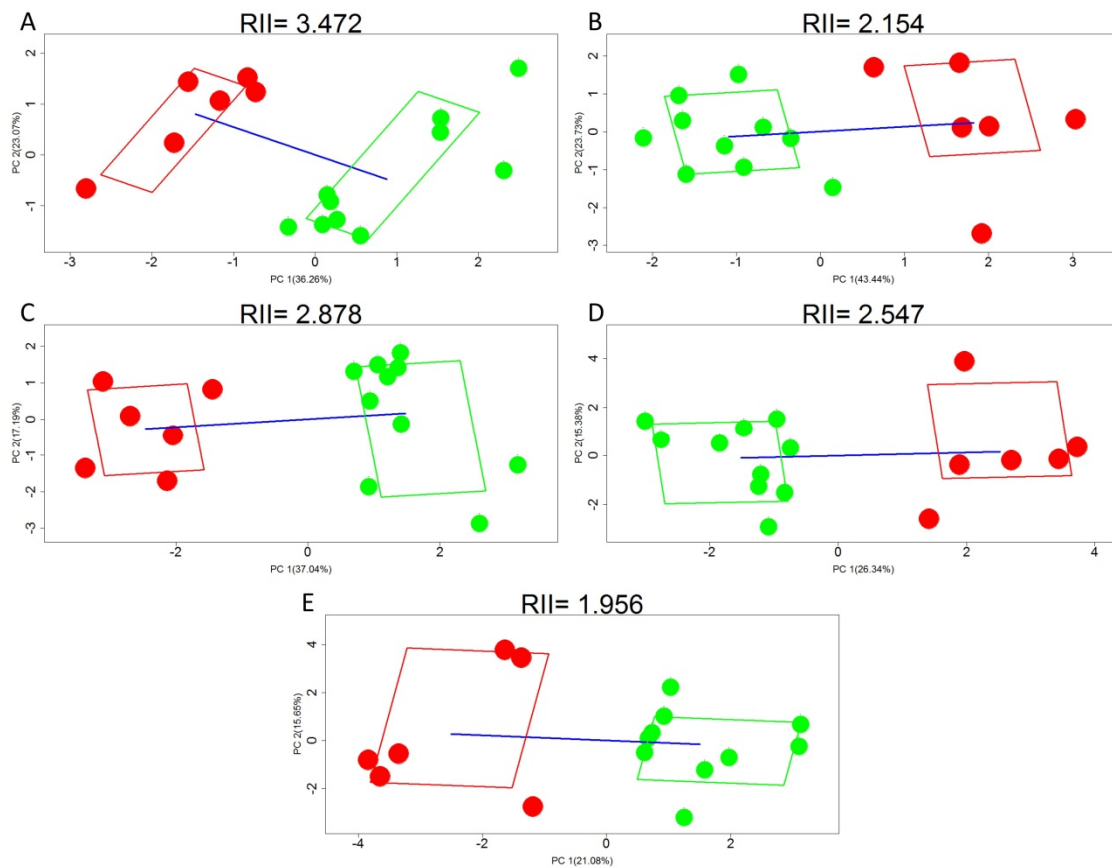


Figura 3.37: PCA aplicado ao PCA dos espectros de refletância NIR obtidos em cada um dos dias de medição para as 'Valencia late' após pré-tratamento com SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às plantas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A. A) PCA no primeiro score; B) PCA no segundo score; C) PCA nos primeiros 2 scores; D) PCA nos primeiros 3 scores; E) PCA nos primeiros 4 scores.

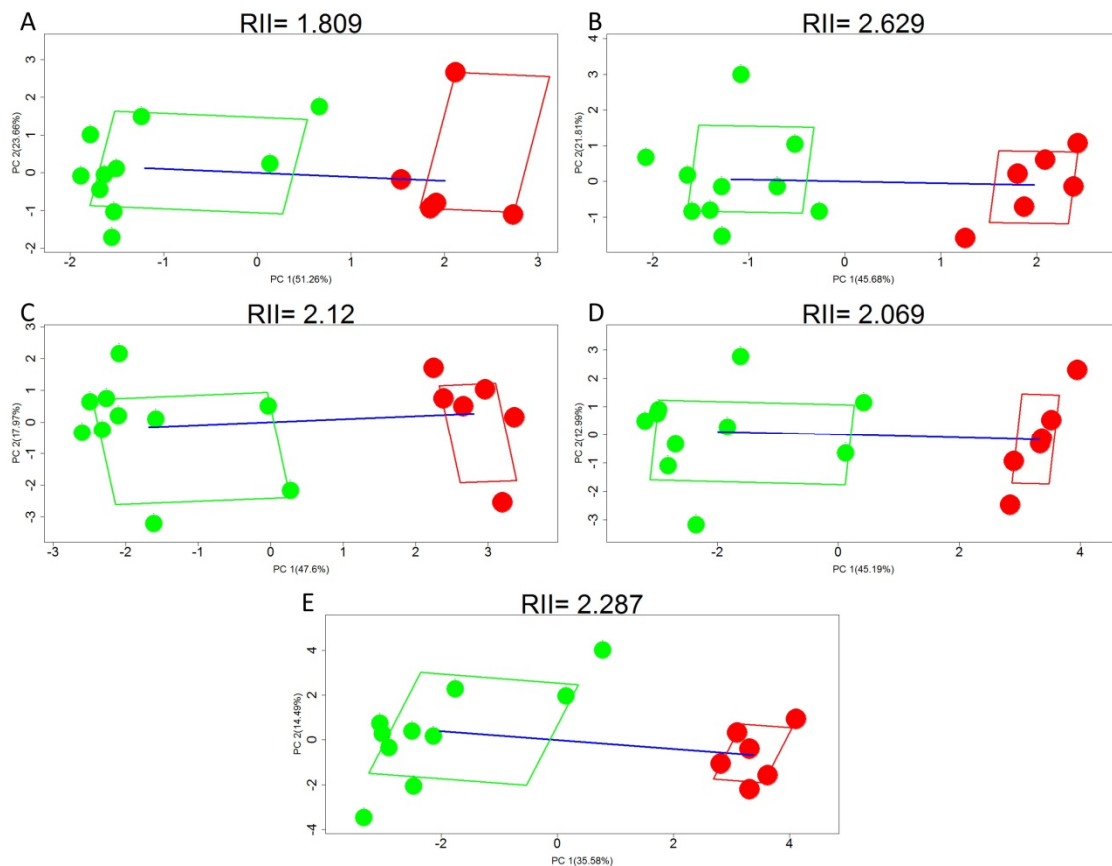


Figura 3.38: PCA aplicado ao PCA dos espectros de transmitância NIR obtidos em cada um dos dias de medição para as 'Valencia late' após pré-tratamento com SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às plantas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A. A) PCA no primeiro score; B) PCA no segundo score; C) PCA nos primeiros 2 scores; D) PCA nos primeiros 3 scores; E) PCA nos primeiros 4 scores.

Nas Clementinas 'Fina', esta clara separação foi conseguida na refletância NIR (Figura 3.39) e na refletância visível (Figura 3.40).

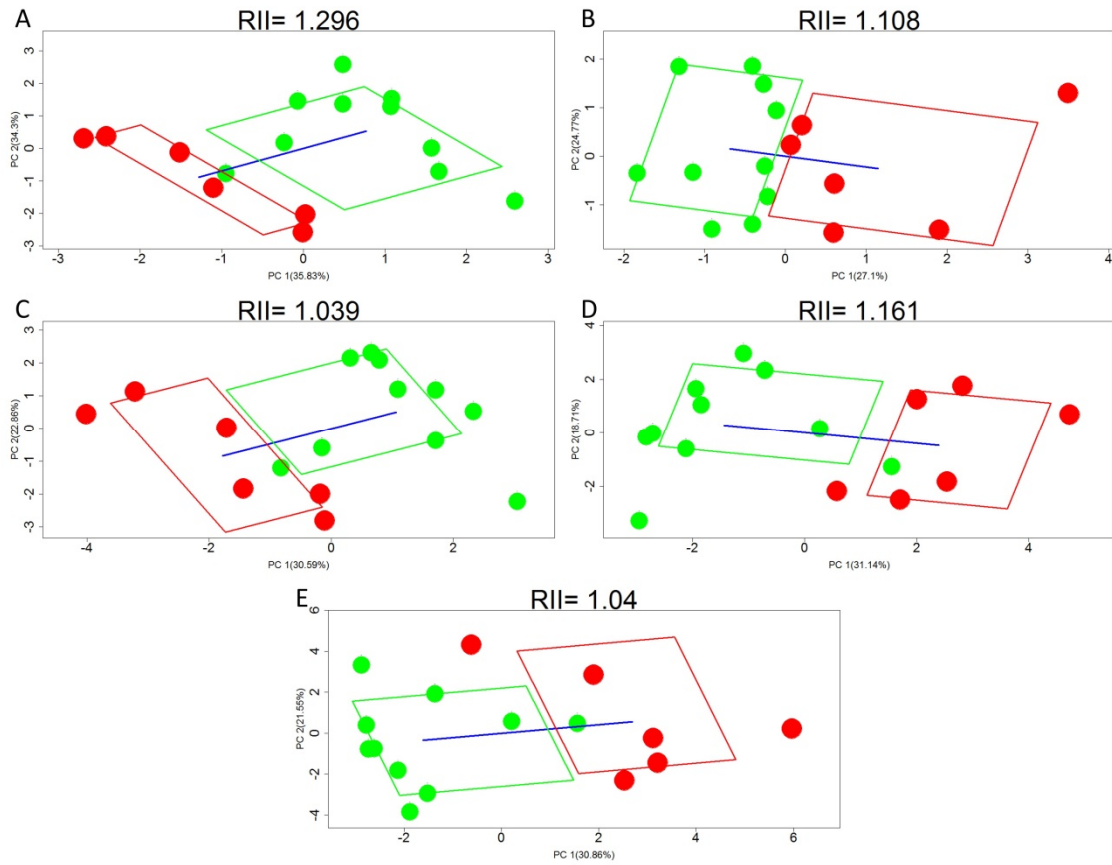


Figura 3.39: PCA aplicado ao PCA dos espectros de refletância NIR obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas 'Fina' após pré-tratamento com SG ($l=21$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às folhas controle e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A. A) PCA no primeiro score; B) PCA no segundo score; C) PCA nos primeiros 2 scores; D) PCA nos primeiros 3 scores; E) PCA nos primeiros 4 scores.

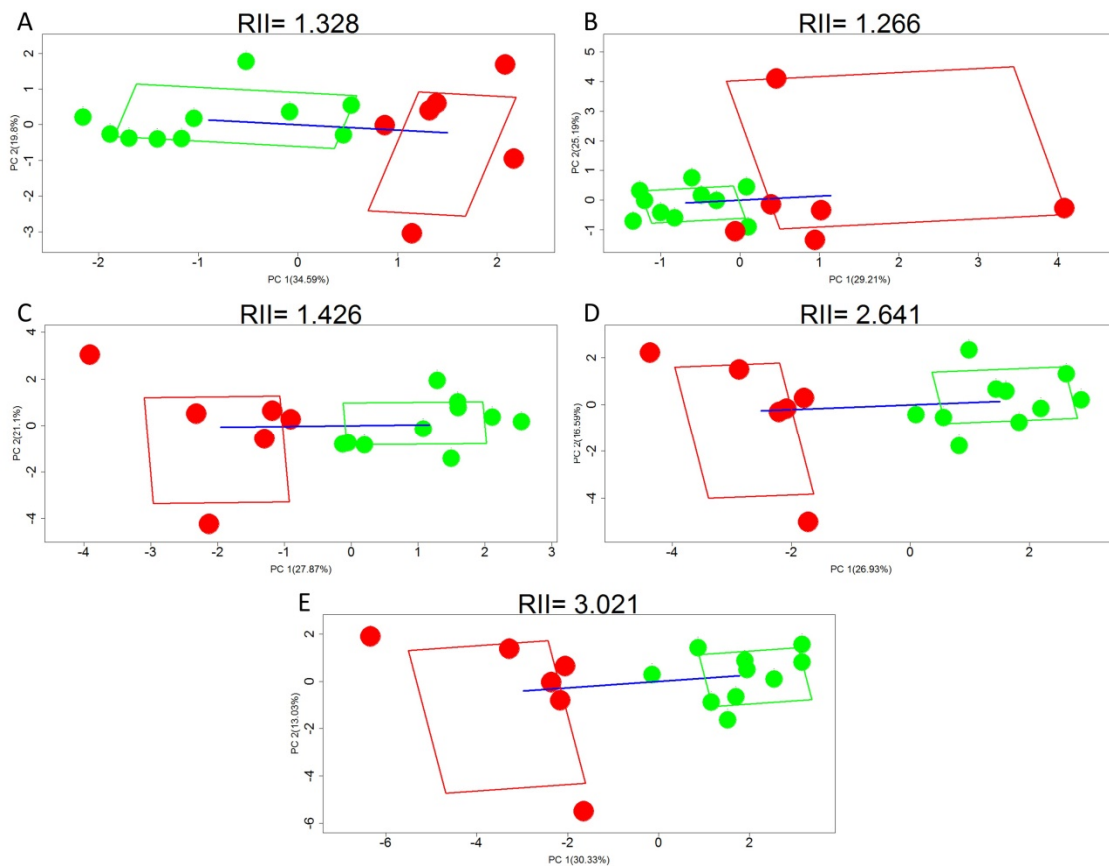


Figura 3.40: PCA aplicado ao PCA dos espectros de refletância visível obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas ‘Fina’ após pré-tratamento com MSC seguido de SG ($l=11$, $d=2$ e $p=2$). Os pontos a verde correspondem às plantas controlo e os vermelhos às infetadas com o CTV T318A. A) PCA no primeiro score; B) PCA no segundo score; C) PCA nos primeiros 2 scores; D) PCA nos primeiros 3 scores; E) PCA nos primeiros 4 scores.

Estes resultados são bastante promissores dado que sugerem que uma análise ao longo do tempo, em vez de dia a dia, pode compensar a variabilidade dominante causada por outros fatores, tais como a temperatura e a humidade relativa e a própria evolução fisiológica das folhas, ou seja, o fator idade.

A conclusão principal a retirar é que o acompanhamento da evolução das folhas pode revelar a presença do vírus, mesmo que assintomático, enquanto que uma análise pontual, baseada nas medições de um dia apenas, pode não ser suficiente para fazer uma classificação.

3.2.7 ANOVA

A identificação precoce de diferenças entre os espectros das plantas infetadas assintomáticas e controlo, poderá também ser facilitada caso se identifique a que comprimentos de onda ou em que combinações destes existe esta separação (West *et al.*, 2003). Para este fim, foi utilizada a ANOVA.

Os dados anteriores sugerem que a importância relativa dos vários comprimentos de onda se altera ao longo do tempo, consoante os efeitos que se expressam mais. Por outro lado, é difícil fazer uma interpretação do PCA ao longo do tempo em termos de comprimentos de onda, pois os processos de compactação, concatenação e de novo compactação (ver Figura 2.8) misturam todos os comprimentos de onda.

Aplicou-se então a ANOVA para cada comprimento de onda e para cada dia. Os melhores resultados conseguidos são apresentados nas Figura 3.41 e Figura 3.43 para as 'Valencia late' e Clementina 'Fina', respetivamente.

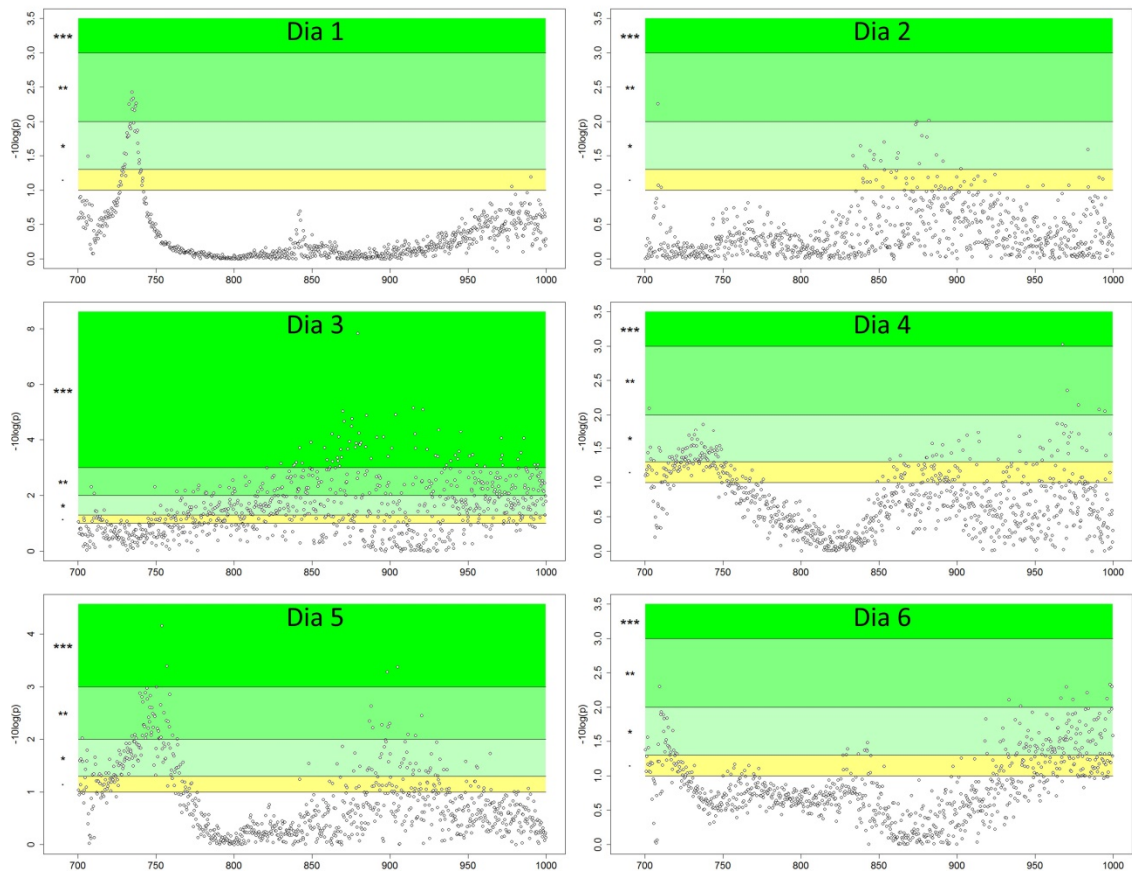


Figura 3.41: ANOVA aplicada aos espectros de transmitância NIR obtidos em cada um dos dias de medição para as 'Valencia late' após pré-tratamento com MSC. • $0,05 < p < 0,1$; * $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Na Figura 3.41, verifica-se que além de um pico por volta dos 730-750 nm (dias 1, 4 e 5), há uma preponderância dos comprimentos de onda a partir dos 850 nm (dias 3, 4, 5 e 6). A interpretação da importância destes comprimentos de onda pode vir do gráfico de absorção da água (Figura 3.42). A zona 730-750 nm é um pico local de absorção, enquanto a zona por volta dos 850 nm corresponde a um leve ponto de inflexão. É portanto plausível que pequenas alterações ao nível da estrutura da folha se repercutem mais nestas zonas espectrais. Não existe, no entanto, uma evidência clara da importância da zona em torno dos 970 nm, onde existe novo pico de absorção.

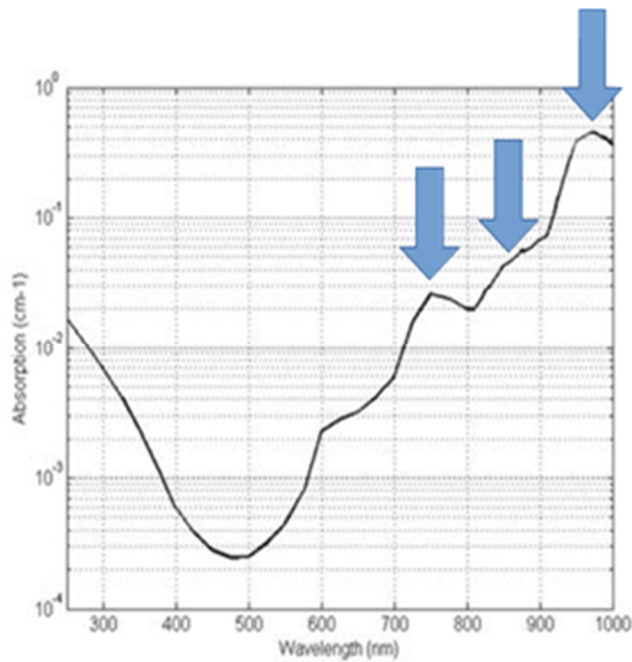


Figura 3.42: Espectro de absorção da água na zona do VIS-NIR. As setas indicam as zonas que estão tendencialmente mais relacionadas com a separação dos grupos [Fonte: Wikimedia Commons (2009)].

No caso das Clementinas 'Fina' (Figura 3.43) verifica-se novamente uma preponderância dos comprimentos de onda por volta dos 700-750 nm (dias 2, 4 e 6), uma inflexão significativa por volta dos 850 nm (dias 2 e 4), reproduzindo aproximadamente as zonas mais importantes observadas nas 'Valencia late'.

Os gráficos obtidos apresentam flutuações resultantes do ruído dos dados (o ruído dos espectrómetros). Esta flutuação poderia ser suavizada através da filtragem por SG, mas as conclusões seriam essencialmente as mesmas.

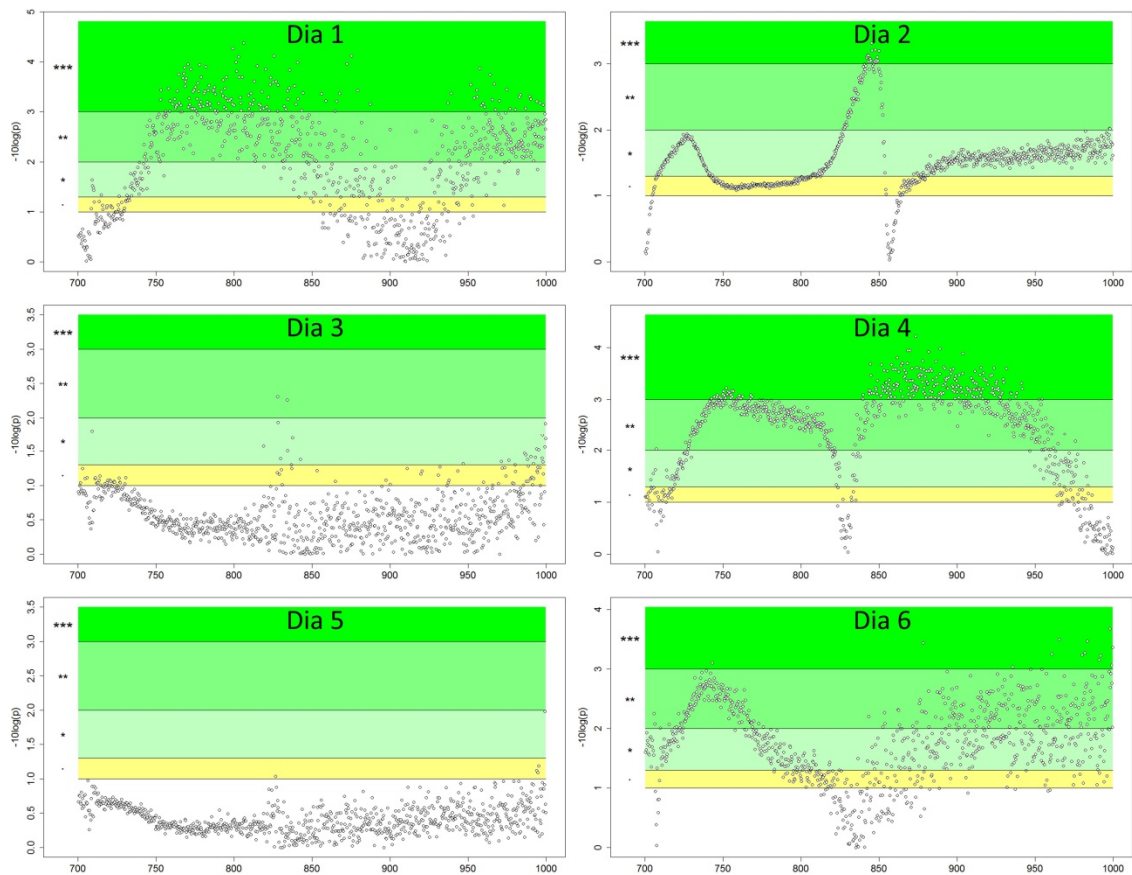


Figura 3.43: ANOVA aplicada aos espectros de refletância NIR obtidos em cada um dos dias de medição para as Clementinas 'Fina' após pré-tratamento com MSC. • $0,05 < p < 0,1$; * $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.2.8 Aplicação do algoritmo dos k-vizinhos mais próximos (kNN)

A análise final teve por objetivo realizar uma validação dos resultados. Os resultados até agora sugerem que é possível classificar as amostras com base numa análise temporal. No entanto, o que acontecerá se não se conhecer as amostras e as quisermos classificar?

É possível projetar as componentes principais de uma amostra desconhecida no plano das componentes principais e averiguar qual o grupo (controlo ou infetada) de que a projeção fica mais perto. Embora isto seja fácil de fazer para o PCA simples (que deu resultados ambíguos em vários dias), não é simples de implementar no esquema do desdobramento usado para analisar as amostras ao longo do tempo, que produziu resultados claros de separação.

Optou-se então por aplicar um outro algoritmo, o kNN, para fazer a validação, isto é, para construir um modelo de previsão e aplicá-lo a amostras desconhecidas. O procedimento foi descrito na secção 2.2.6 Algoritmo de k vizinhos mais próximos (kNN) e também leva em conta a evolução temporal das amostras. Resumindo, a análise com o kNN tem o intuito de determinar a taxa de sucesso da classificação das amostras com base na análise da evolução temporal dos espectros.

No caso das 'Valencia late' (Figura 3.44) nenhuma das folhas foi classificada erradamente, no entanto existem duas que foram consideradas infetadas embora tivessem igual probabilidade de serem denominadas saudáveis ou infetadas.

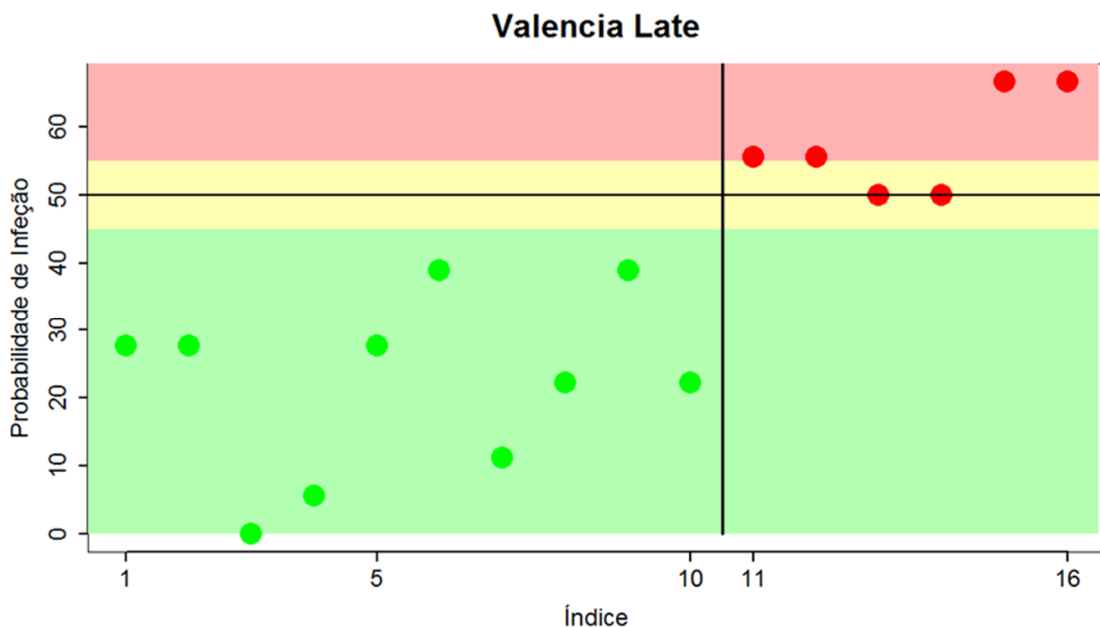


Figura 3.44: Probabilidade de infeção de cada uma das folhas analisadas das 'Valencia late' quando aplicado o SG ($l=71$, $d=2$, $p=2$) a seguir ao MSC aos espectros de refletância NIR. Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas.

Quanto às Clementinas 'Fina' (Figura 3.45), segundo o método do kNN, uma das folhas considerada infetada tem uma probabilidade de infeção de cerca de 20% e portanto deveria ter sido considerada saudável.

Como de cada planta foram analisadas duas folhas e só uma foi mal classificada, significa que a outra folha apresentou uma probabilidade de infeção elevada tal como era esperado. Estas duas folhas faziam parte de ramos distintos da mesma planta e portanto é possível que estas diferenças na probabilidade de infeção resultem de uma distribuição desigual do vírus ao longo da planta. Tendo em conta os valores destes dois gráficos, conclui-se que o uso da refletância NIR para distinguir folhas saudáveis de folhas infetadas com o CTV (assintomáticas) classificou incorretamente uma de entre 32 folhas, ou seja, aproximadamente 97% de taxa de sucesso. Se as duas folhas que apresentaram igual probabilidade de poderem ser denominadas saudáveis ou infetadas forem também consideradas mal classificadas, o valor desce de 97% para 91%. Contudo, 91% continua a ser um valor superior aos 90% de folhas bem classificadas por Sasaki *et al.* (1998) quando utilizaram a refletância para distinguir numa fase precoce da infeção folhas de pepino infetadas das saudáveis.

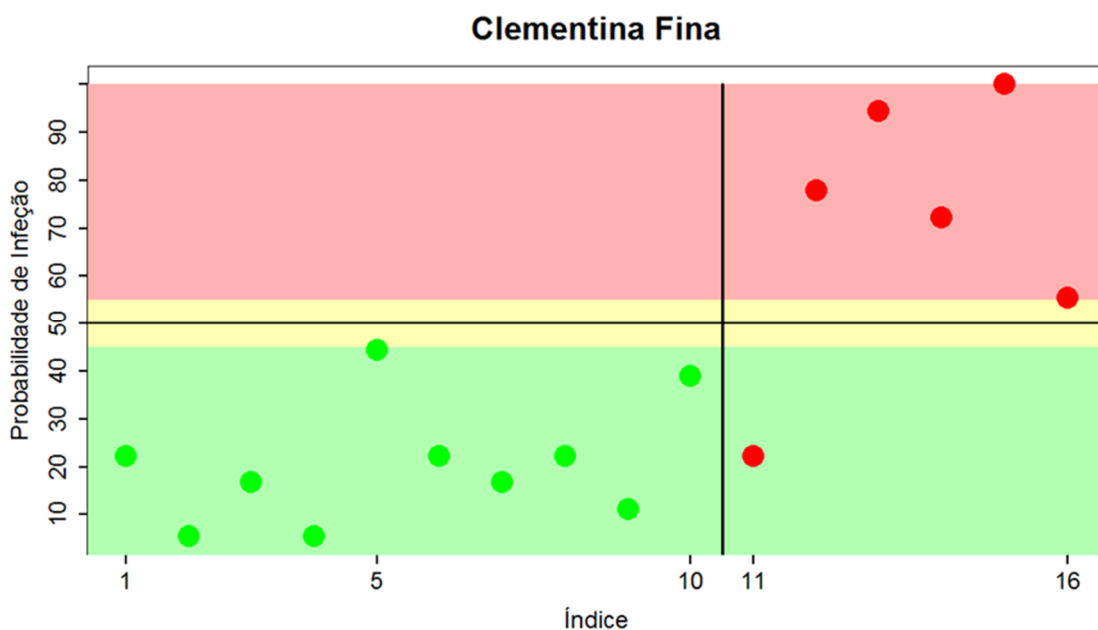


Figura 3.45: Probabilidade de infeção de cada uma das folhas analisadas das Clementinas 'Fina' quando aplicado o MSC a seguir ao SG ($l=121$, $d=2$, $p=2$) aos espectros de refletância NIR. Os pontos a verde correspondem às folhas controlo e os vermelhos às infetadas.

Os métodos espectroscópicos demonstram assim ser capazes de distinguir entre folhas saudáveis e folhas infetadas, apresentado um enorme potencial no diagnóstico do CTV T318A nas variedades de citrinos estudadas.

4 Conclusões

Neste trabalho determinou-se quais as plantas *Citrus clementina* hort. ex Tanaka cv. Fina e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia late se encontravam infetadas com o CTV T318A. Pelo método de IC/RT-PCR foi detetada a presença de vírus em quatro das dezasseis plantas analisadas (uma clementina 'Fina' e três 'Valencia late'). O real-time PCR por ser um método mais sensível permitiu classificar mais duas plantas como infetadas, perfazendo um total de três plantas infetadas por cada variedade. Confirmou-se através da amplificação de um gene de referência que todas as amostras apresentavam uma quantidade aproximada de cDNA, o que possibilitou a realização de uma quantificação relativa por real-time PCR. Esta quantificação relativa permitiu determinar quais das plantas tinham um título viral mais elevado e que corresponderam precisamente àquelas que foram inicialmente dadas como infetadas por IC/RT-PCR.

Esta tese demonstrou que os métodos óticos baseados na espectroscopia visível e NIR, ainda antes da redução do volume de dados, conseguem detetar diferenças entre os espectros das folhas controlo e das infetadas assintomáticas *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia late e *Citrus clementina* hort. ex Tanaka cv. Fina. Verificou-se no entanto que estas diferenças não se refletem nos espectros de maneira igual e que não existe uma consistência de separação nos vários dias de medição. O fato de não se observar uma nítida separação em todos os dias de medição resulta muito provavelmente de fatores intrínsecos associados ao desenvolvimento da árvore e da interferência de fatores ambientais como a temperatura que influenciam o comportamento das folhas e conseqüentemente os espectros. Nesta análise inicial, observou-se também que o padrão de separação obtido não correspondeu sempre ao descrito na literatura. É importante salientar que a maioria dos trabalhos publicados onde são utilizadas estas técnicas espectroscópicas, o fazem numa perspetiva de deteção remota para separação de plantas controlo de plantas infetadas sintomáticas. O objetivo deste trabalho não era a deteção remota mas sim o diagnóstico precoce do CTV em plantas infetadas sem quaisquer sintomas visíveis, o que acarreta uma dificuldade acrescida.

Ao combinar os métodos óticos com técnicas de análise multivariada como o PCA, verificou-se uma grande melhoria nos resultados sobretudo nas 'Valencia late'. A redução do elevado volume de dados e a sua compactação em componentes principais que retêm o essencial da variabilidade dos dados permitiu uma separação consistente, independentemente do pré-tratamento aplicado aos dados. O nível de separação insatisfatório obtido sempre nos mesmos dias de medição corresponde precisamente aos dias em que a humidade relativa atingiu valores mais baixos. Esta variabilidade poderá ter-se sobreposto à presença do vírus, afetando a separação das amostras. Quanto à aplicação do PCA aos valores de fluorescência, verificou-se neste caso que os dados não retêm qualquer informação acerca da presença do vírus, sendo a sua variabilidade necessariamente explicada pelos fatores externos e intrínsecos. Foi por estas razões que o PCA aplicado à fluorescência em conjunto com os dados dos espectros apresenta uma capacidade de separação inferior àquela que foi conseguida usando apenas os espectros de Vis/NIR. Os dados da espectroscopia mostram assim ser capazes de suplantar com maior sucesso os fatores de variabilidade externos do que a fluorescência.

O facto de a separação dos grupos por PCA ser possível apenas em alguns dias sugeriu a implementação de um método que pudesse ser sensível ao padrão de evolução dos espectros ao longo do tempo. Para isso adaptou-se o método do desdobramento praticado em análise de *N-way* PCA, sendo que no neste trabalho cada folha do tensor corresponde a um dia de medição. Este método, a que chamámos "PCA ao longo do tempo, pode compensar a variabilidade dominante induzida por outros fatores que se sobrepõem à presença do vírus nas plantas e conduziu a uma separação perfeita entre os grupos controle e infetado no plano das componentes principais. Este resultado sugere que é possível detetar plantas infetadas seguindo a sua evolução espectral ao longo do tempo, mas não através de medidas pontuais.

Por outro lado, e numa perspetiva de validação, usou-se o algoritmo kNN, adaptado também a uma análise ao longo do tempo e confirmou-se que é possível separar com sucesso as folhas controlo das infetadas usando os espectros medidos com uma taxa de sucesso superior a 90%.

O objetivo principal desta tese que era a elaboração de um protocolo de diagnóstico não invasivo da infecção por CTV em citrinos, baseado em métodos óticos, foi assim cumprido e validado em grande parte, tendo-se demonstrado que estes métodos têm grande potencial para revolucionar o diagnóstico e controlo do CTV. A espectroscopia na região do visível e NIR apresenta várias vantagens quando comparada com as técnicas geralmente usadas para a deteção do CTV (PCR e ELISA), tais como a rapidez e o relativo baixo custo. Além disto os métodos óticos não são destrutivos, não estão sujeitos a contaminações nem limitados às épocas do ano em que o título viral tende a ser mais elevado. Tudo isto possibilita o uso dos métodos óticos nas análises de rotina para deteção do CTV numa fase inicial de infecção. Contudo, para confirmar a viabilidade da aplicação destes métodos óticos seria importante prosseguir com este estudo utilizando um número maior de plantas, incluindo outras variedades, e acompanhá-las durante mais tempo. As condições da estufa também deveriam ser melhoradas com o intuito de minimizar a variabilidade das condições ambientais e assegurar a satisfação de todas as necessidades das plantas, como por exemplo uma boa luminosidade e temperatura constante. Este estudo pode ainda ser alargado a outras regiões do espectro eletromagnético e a outros agentes patogénicos. Por fim, é importante realçar que este tipo de estudo pode servir de base a aplicações futuras em que a deteção de agentes patogénicos nas plantas por métodos óticos será baseada em aplicações móveis.

5 Referências bibliográficas

- Abbott, J.A., 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 207–225.
- Ache, P., Bauer, H., Kollist, H., Al-Rasheid, K.A.S., Lautner, S., Hartung, W., Hedrich, R., 2010. Stomatal action directly feeds back on leaf turgor: New insights into the regulation of the plant water status from non-invasive pressure probe measurements. *Plant J.* 62, 1072–1082.
- Adkar-Purushothama, C.R., Maheshwar, P.K., Sano, T., Janardhana, G.R., 2011. A sensitive and reliable RT-nested PCR assay for detection of *citrus tristeza virus* from naturally infected Citrus plants. *Curr. Microbiol.* 62, 1455–1459.
- Ananthkrishnan, G., Venkataprasanna, T., Roy, A., Brlansky, R.H., 2010. Characterization of the mixture of genotypes of a *Citrus tristeza virus* isolate by reverse transcription-quantitative real-time PCR. *J. Virol. Methods* 164, 75–82.
- Arridge, S.R., Cope, M., Delpy, D.T., 1992. The theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue: temporal and frequency analysis. *Phys. Med. Biol.* 37, 1531–1560.
- Atta, S., Zhou, C., Zhou, Y., Cao, M., Wang, X., 2012. Distribution and Research Advances of *Citrus tristeza virus*. *J. Integr. Agric.* 11, 346–358.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M., Varki, A., Janssen, K., 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Ayllón, M.A., López, C., Navas-Castillo, J., Mawassi, M., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., 1999. New defective RNAs from *citrus tristeza virus*: Evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. *J. Gen. Virol.* 80, 817–821.
- Baker, N.R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55, 1607–1621.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., 1979a. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* 25, 93–168.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F., Loebenstein, G., 1979b. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69, 190–194.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R.F., 1989. The Continuous Challenge of *Citrus tristeza virus* Control. *Annu. Rev. Physiol.* 27, 291–316.

- Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., Fromm, J., Hartung, W., Al-Rasheid, K.A.S., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kneitz, S., Lachmann, N., Mendel, R.R., Bittner, F., Hetherington, A.M., Hedrich, R., 2013. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr. Biol.* 23, 53–57.
- Bechar, A., Mizrach, A., Barreiro, P., Landahl, S., 2005. Determination of mealiness in apples using ultrasonic measurements. *Biosyst. Eng.* 91, 329–334.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J., Cambra, M., 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 120, 177–188.
- Bimboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Boisdé, G., Harmer, A., 1996. *Chemical and Biochemical Sensing with Optical Fibers and Waveguides*. Artech House, Inc.
- Bordignon, R., Filho, H.P.M., Muller, G.W., Siqueira, W.J., 2003. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta-enxertos. *Bragantia* 62, 345–355.
- Bornman, J.F., Vogelmann, T.C., 1991. Effect of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fibre optics. *J. Exp. Bot.* 42, 547–554.
- Bravo, C., Moshou, D., West, J., McCartney, A., Ramon, H., 2003. Early disease detection in wheat fields using spectral reflectance. *Biosyst. Eng.* 84, 137–145.
- Brlansky, R., 2006. Stem pitting *citrus tristeza*. *Citrus Ind.* 1.
- Buschmann, C., 2007. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynth. Res.* 92, 261–271.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martínez, M.C., De Mendoza, A.H., López, A., Navarro, L., 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Res.* 71, 85–95.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A., Colomer, M., 2000b. Routine Detection of *Citrus tristeza virus* by Direct Immunoprinting-ELISA Method Using Specific Monoclonal and Recombinant Antibodies. Em: Fourteenth IOCV Conference. pp. 34–41.
- Cambra, M., Moreno, P., Navarro, L., 1979. Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-sandwich. *An. del Inst. Nac. Investig. Agrar. Ser. Prot. Veg.* 12, 115–125.

- Castle, W.S., 2010. A Career Perspective on Citrus Rootstocks, Their Development, and Commercialization. *HortScience* 45, 11–15.
- Cavaco, A.M., Antunes, M.D., Marques da Silva, J., Guerra, R., 2010. A preliminary approach to the prediction of 'Rocha' pear skin pigments by Vis/NIR reflectance spectroscopy. *Acta Hortic.* 858, 373–377.
- Cavaco, A.M., Antunes, M.D., Silva, J.M., Guerra, R., 2009a. Preliminary results on the non-invasive diagnosis of superficial scald in 'Rocha'pear by fluorescence imaging. Em: Proceedings of 1st International Workshop on Computer Image Analysis in Agriculture Products and Processes Potsdam. Postdam, Germany, pp. 27–28.
- Cavaco, A.M., Bernardes da Silva, A., Arrabaça, M.C., 2003. Effects of long-term chilling on growth and photosynthesis of the C4 gramineae *Paspalum dilatatum*. *Physiol. Plant.* 119, 87–96.
- Cavaco, A.M., Guerra, R., Marques da Silva, J., Antunes, D., 2008. Comparison of two different integration sphere configurations for 'Rocha' pear determination of firmness and soluble solids by Vis/NIR spectroscopy. Em: Proceedings of The 4th IASME/WSEAS International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development (EEESD'08). pp. 526–531.
- Cavaco, A.M., Pinto, P., Antunes, M.D., Silva, J.M. da, Guerra, R., 2009b. «Rocha» pear firmness predicted by a Vis/NIR segmented model. *Postharvest Biol. Technol.* 51, 311–319.
- Cayuela, J.A., 2008. Vis/NIR soluble solids prediction in intact oranges (*Citrus sinensis* L.) cv. Valencia Late by reflectance. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 75–80.
- Cen, H., He, Y., 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 72–83.
- Cen, H., He, Y., Huang, M., 2007. Combination and comparison of multivariate analysis for the identification of orange varieties using visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Eur Food Res Technol* 225, 699–705.
- Černi, S., Ruščić, J., Nolasco, G., Gatin, Ž., Krajačić, M., Škorić, D., 2008. Stem pitting and seedling yellows symptoms of *Citrus tristeza virus* infection may be determined by minor sequence variants. *Virus Genes* 36, 241–249.
- Chaerle, L., Van Der Straeten, D., 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5, 495–501.
- Chappelle, E.W., Wood, F.M., Wayne Newcomb, W., McMurtrey, J.E., 1985. Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types. *Appl. Opt.* 24, 74–80.

- Che, X., Mawassi, M., Bar-Joseph, M., 2002. A novel class of large and infectious defective RNAs of *Citrus tristeza virus*. *Virology* 298, 133–145.
- Cherif, J., Derbel, N., Nakkach, M., Jemal, H. von B.F., Lakhdar, Z. Ben, 2010. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 101, 332–339.
- Chiu, Y.-C., Hsu, W.-C., Chang, Y.-C., 2015. Detecting cabbage seedling diseases by using chlorophyll fluorescence. *Eng. Agric. Environ. Food* 8, 95–1000.
- Costa, A.S., Grant, T.J., 1951. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector aphus citricidus. *Phytopathology* 41, 105–113.
- Cottin, R., 2002. *Citrus of the World: A citrus directory*. Version 2. SRA INRA-C EGID-Citrus Network, France.
- Darwin, F., 1898. Observations on Stomata. *Proc. R. Soc. London* 63, 413–417.
- Dawson, W.O., Garnsey, S.M., Tatineni, S., Folimonova, S.Y., Harper, S.J., Gowda, S., 2013. *Citrus tristeza virus*-host interactions. *Front. Microbiol.* 4, 1–10.
- DeEll, J.R., Toivonen, P.M.A., 2003. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Springer US.
- Deering, D.W., 1989. Field measurements of bidirectional reflectance. Em: Theory and applications of optical remote sensing. John Wiley & Sons, New York, pp. 14–65.
- Delalieux, S., Somers, B., Verstraeten, W.W., Aardt, J.A.N. van, Keulemans, W., Coppin, P., 2009. *International Journal of Remote Sensing*. *Int. J. Remote Sens.* 30, 1887–1912.
- Delalieux, S., van Aardt, J., Keulemans, W., Schrevens, E., Coppin, P., 2007. Detection of biotic stress (*Venturia inaequalis*) in apple trees using hyperspectral data: Non-parametric statistical approaches and physiological implications. *Eur. J. Agron.* 27, 130–143.
- Di Pinto, A., Terio, V., Di Pinto, P., Colao, V., Tantillo, G., 2012. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 494–498.
- Dickson, R.C., Johnson, M.M., Flock, R.A., Laird, E.F., 1956. Flying aphid populations in Southern California citrus groves and their relation to the transmission of the tristeza virus. *Phytopathology* 46, 204–210.
- Dobrowski, S.Z., Pushnik, J.C., Zarco-Tejada, P.J., Ustin, S.L., 2005. Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. *Remote Sens. Environ.* 97, 403–414.

- Dolja, V. V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T., 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* 117, 38–51.
- Domingo, E., Escarmis, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S.F., Quer, J., Novella, I.S., Holland, J.J., 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* 10, 859–864.
- Economos, C., Clay, W.D., 1999. Nutritional and health benefits of citrus fruits. *Food Nutr Agric* 24, 11–18.
- Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1996. The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza* virus particles. *Phytopathology* 86, 1331–1335.
- Fisher Scientific, 2015. Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use - 75-20,000 bp [WWW Document]. URL <https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-o-generuler-1-kb-plus-dna-ladder-ready-to-use-75-20-00-75-20000bp-0-1-g-l/fersm1343> (acedido 9.9.15).
- Folimonova, S.Y., 2013. Developing an understanding of cross-protection by *Citrus tristeza virus*. *Front. Microbiol.* 4, 1–9.
- Folimonova, S.Y., Folimonov, A.S., Tatineni, S., Dawson, W.O., 2008. *Citrus tristeza virus*: survival at the edge of the movement continuum. *J. Virol.* 82, 6546–6556.
- Fourty, T., Baret, F., Jacquemoud, S., Schmuck, G., Verdebout, J., 1996. Leaf optical properties with explicit description of its biochemical composition: Direct and inverse problems. *Remote Sens. Environ.* 56, 104–117.
- Fraser, L., 1952. Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agr. Gaz. NS Wales* 63, 125–131.
- Frost, H.B., 1968. Seed production: development of gametes and embryos. Em: W. Reuther, L.D., Batchelor, L.D., Webber, H.J. (Eds.), *The Citrus Industry*, Vol. II. Berkley: Division of Agricultural Sciences, University of California, pp. 292–334.
- Fu, X., Ying, Y., Lu, H., Xu, H., 2007. Comparison of diffuse reflectance and transmission mode of visible-near infrared spectroscopy for detecting brown heart of pear. *J. Food Eng.* 83, 317–323.
- Galipienso, L., Navarro, L., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Moreno, P., Guerri, J., 2000. Host range and symptomatology of a graft-transmissible pathogencausing bud union crease of citrus on trifoliolate rootstocks. *Plant Pathol.* 49, 308–314.
- Gal-On, A., Shibolet, Y.M., 2006. Cross-protection. Em: Loebenstein, G., Carr, J.P. (Eds.), *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Springer Netherlands, pp. 261–288.

- Gardé, I., Antunes, M.D., Marques da Silva, J., Guerra, R., Cavaco, A.M., 2012. Chlorophyll a fluorescence: a fast and low-cost tool to detect superficial scald in 'Rocha' pear (*Pyrus communis* L. 'Rocha')? *Acta Hortic.* 934, 159–166.
- Garnsey, S.M., Cambra, M., 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Em: Martelli, G.P. (Ed.), *Graft transmissible diseases of grapevines*. FAO, Distribution and Sales Secion, pp. 169–192.
- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Hilf, M.E., Lee, R.F., Hartung, J.S., 2005. Biological characterization of an international collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. Em: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, pp. 75–93.
- Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Yokomi, R.K., 1998. Control strategies for *citrus tristeza virus*. Em: Hadidi, A., Khetarapl, R., Koganezawa, H. (Eds.), *Plant Virus Disease Control*. APS Press, pp. 639–658.
- Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., Roistacher, C.N., Civerolo, E.L., Lee, R.F., Yokomi, R.K., Bar-Joseph, M., 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica* 19, 151–157.
- Gómez, A.H., He, Y., Pereira, A.G., 2006. Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* 77, 313–319.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C.L., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., Dawson, W.O., 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274, 246–254.
- Graeff, S., Claupein, W., 2007. Identification and discrimination of water stress in wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) by means of reflectance measurements. *Irrig. Sci.* 26, 61–70.
- Greensil, C.V., Newman, D.S., 1999. An investigation into the determination of the maturity of pawpaws (*Carica papaya*) from NIR transmission spectra. *J. Near Infrared Spectrosc.* 7, 109–116.
- Guerra, R., Gardé, I. V., Antunes, M.D., da Silva, J.M., Antunes, R., Cavaco, A.M., 2012. A possibility for non-invasive diagnosis of superficial scald in «Rocha» pear based on chlorophyll a fluorescence, colorimetry, and the relation between α -farnesene and conjugated trienols. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 134, 127–138.
- Guidi, L., Mori, S., Degl'Innocenti, E., Pecchia, S., 2007. Effects of ozone exposure or fungal pathogen on white lupin leaves as determined by imaging of chlorophyll a fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 851–857.

- Guo, D.P., Guo, Y.P., Zhao, J.P., Liu, H., Peng, Y., Wang, Q.M., Chen, J.S., Rao, G.Z., 2005. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Sci.* 168, 57–63.
- Halbert, S.E., Genc, H., Çevik, B., Brown, L.G., Rosales, I.M., Manjunath, K.L., 2004. Distribution and characterization of *Citrus tristeza virus* in South Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Dis.* 88, 935–941.
- Harper, S.J., 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Front. Microbiol.* 4, 1–18.
- Henrion, R., 1994. N-way principal component analysis theory, algorithms and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 25, 1–23.
- Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., 1984. Transmission of *citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. Em: Garnsey, S.M., Timmer, L.W., Dodds, J.A. (Eds.), *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, pp. 23–27.
- Hilf, M.E., Garnsey, S.M., 2000. Characterization and classification of *citrus tristeza virus* isolates by amplification of multiple molecular markers. Em: *Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, pp. 18–27.
- Hilf, M.E., Karasev, A. V, Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L., Garnsey, S.M., 1995. Characterization of *citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208, 576–582.
- Huang, Z., Rundell, P.A., Guan, X., Powell, C.A., 2004. Detection and Isolate Differentiation of *Citrus tristeza virus* in Infected Field Trees Based on Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis.* 88, 625–629.
- Hull, R., 2002. *Plant Virology*. Academic Press.
- Hung, T.H., Wu, M.L., Su, H.J., 2000. A Rapid Method Based on the One-step Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique for Detection of Different Strains of *Citrus tristeza virus*. *J. Phytopathol.* 148, 469–475.
- Il'yasov, S.G., Krasnikov, V.V., 1991. *Physical Principals of Infrared Irradiation of Foodstuffs*. Hemisphere Pub. Corp.
- Ilharco, F.A., Sousa-Silva, C.R., Alvarez-Alvarez, A., 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and Continental Portugal (Homoptera, Aphidoidea). *Agron. Lusit.* 51, 19–21.
- Instituto Nacional de Estatística, 2014. *Estatísticas Agrícolas 2013*. INE, I.P, Lisboa.

- Jabbar, M.A., Deekshatulu, B.L., Chandra, P., 2013. Classification of Heart Disease Using K- Nearest Neighbor and Genetic Algorithm. *Procedia Technol.* 10, 85–94.
- Janka, E., Körner, O., Rosenqvist, E., Ottosen, C.O., 2013. High temperature stress monitoring and detection using chlorophyll a fluorescence and infrared thermography in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Physiol. Biochem.* 67, 87–94.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., Dawson, W.O., 1995. Complete Sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA Genome. *Virology* 208, 511–520.
- Kawano, S., Fujiwara, T., Iwamoto, M., 1993. Nondestructive determination of sugar content in Satsuma mandarin using. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 62, 465–470.
- Kocheva, K., Lambrev, P., Georgiev, G., Goltsev, V., Karabaliev, M., 2004. Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. *Bioelectrochemistry* 63, 121–124.
- Kokkinos, C.D., Clark, C.A., 2006. Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Sweetpotato Viruses. *Plant Dis.* 90, 783–788.
- Korkmaz, S., Cevik, B., Onder, S., Koc, K., Bozan, O., 2008. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) from Satsuma Owari mandarins (*Citrus unshiu*) by direct tissue blot immunoassay (DTBIA), DAS-ELISA, and biological indexing. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 36, 239–246.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313–349.
- Lacirignola, C., D'Onghia, M., 2009. The Mediterranean citriculture: productions and perspectives. Em: D'Onghia, M., Djelouah, K., Roistacher, N. (Eds.), *Citrus tristeza virus* and *Toxoptera citricidus*: a serious threat to the Mediterranean citrus industry. CIHEAM, pp. 13–17.
- Ladanyia, M.S., 2008. Nutritive and medicinal value of Citrus fruits. Em: *Citrus Fruit: biology, technology and evaluation*. Academic Press, pp. 501–514.
- Larsolle, A., Hamid Muhammed, H., 2007. Measuring crop status using multivariate analysis of hyperspectral field reflectance with application to disease severity and plant density. *Precis. Agric.* 8, 37–47.
- Lawrence, R., 2003. Early detection of Douglas-Fir beetle infestation with subcanopy resolution hyperspectral imagery. *West. J. Appl. For.* 18, 202–206.
- Lee, R.F., Bar-Joseph, M., 2000. Tristeza. Em: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H. (Eds.), *Compendium of Citrus Diseases*. American Phytopathological Society St. Paul, MN, pp. 61–63.

- Lee, R.F., Keremane, M.L., 2013. Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Front. Microbiol.* 4, 1–11.
- Lee, R.F., Niblett, C.L., Der-, Rick, K.S., 1992. Mild strain cross protection against severe strains of *Citrus tristeza virus* in Florida. In: Proceedings of the First International Seminar on Citriculture in Pakistan. Faisalabad, Pakistan:University of Agriculture, pp. 400–405.
- Li, W., Hartung, J.S., Levy, L., 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. *J. Microbiol. Methods* 66, 104–115.
- Li, X., He, Y., Fang, H., 2007. Non-destructive discrimination of Chinese bayberry varieties using Vis/NIR spectroscopy. *J. Food Eng.* 81, 357–363.
- Lichtenthaler, H.K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F., Miehe, J.A., 1996. Detection of Vegetation Stress Via a New High Resolution Fluorescence Imaging System. *J. Plant Physiol.* 148, 599–612.
- Lichtenthaler, H.K., Wenzel, O., Buschmann, C., Gitelson, A., 1998. Plant stress detection by reflectance and fluorescence. *Ann. New York Acad. Sci.* 271–285.
- Liew, O.W., Chong, P.C.J., Li, B., Asundi, A.K., 2008. Signature optical cues: Emerging technologies for monitoring plant health. *Sensors* 8, 3205–3239.
- Lin, Y., Rundell, P.A., Xie, L., Powell, C.A., 2000. In Situ Immunoassay for Detection of *Citrus tristeza virus*. *Plant Dis.* 84, 937–940.
- Liu, Y., Heying, E., Tanumihardjo, S.A., 2012. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 530–545.
- Liu, Y., Sun, X., Ouyang, A., 2010. Nondestructive measurement of soluble solid content of navel orange fruit by visible-NIR spectrometric technique with PLSR and PCA-BPNN. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 602–607.
- Loconsole, G., Saponari, M., Savino, V., 2010. Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. *Eur. J. Plant Pathol.* 128, 251–259.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., Flores, R., 2000. The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* 269, 462–470.
- López, M.M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorrís, M.T., Llop, P., Plenyálver, R., Cambra, M., Penyalver, R., Cambra, M., 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int. Microbiol.* 6, 233–243.

- Lorente, D., Escandell-Montero, P., Cubero, S., Gómez-Sanchis, J., Blasco, J., 2015. Visible–NIR reflectance spectroscopy and manifold learning methods applied to the detection of fungal infections on citrus fruit. *J. Food Eng.* 163, 17–24.
- Lundmark, M., Cavaco, A.M., Trevanion, S., Hurry, V., 2006. Carbon partitioning and export in transgenic *Arabidopsis thaliana* with altered capacity for sucrose synthesis grown at low temperature: A role for metabolite transporters. *Plant, Cell Environ.* 29, 1703–1714.
- Maas, S.J., Dunlap, J.R., 1989. Reflectance, Transmittance, and Absorptance of Light by Normal, Etiolated, and Albino Corn Leaves. *Agron. J.* 81, 105–110.
- Marcassa, L.G., Gasparoto, M.C.G., Belasque, J., Lins, E.C., Dias Nunes, F., Bagnato, V.S., 2006. Fluorescence spectroscopy applied to orange trees. *Laser Phys.* 16, 884–888.
- Marroquín, C., Olmos, A., Gorris, M.T., Bertolini, E., Martínez, M.C., Carbonell, E.A., Hermoso De Mendoza, A., Cambra, M., 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Em: Virus Research*. pp. 101–108.
- Masoni, A., Ercoli, L., Mariotti, M., 1996. Spectral properties of leaves deficient in iron, sulphur, magnesium and manganese. *Agron. J.* 88, 937–943.
- Mathews, D.M., Riley, K., Dodds, J.A., 1997. Comparison of Detection Methods for *Citrus tristeza virus* in Field Trees During Months of Nonoptimal Titer. *Plant Dis.* 81, 525–529.
- Matloff, N., 2011. *The art of R programming: A tour of statistical software design*. No Starch Press.
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Hilf, M.E., Ashoulin, L., Karasev, A. V, Gafny, R., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., 1995. Multiple species of defective RNAs in plants infected with *citrus tristeza virus*. *Virology* 214, 264–268.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.
- McClellan, A.P.D., 1957. Tristeza virus of citrus: Evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis. Report.* 41, 821.
- McClellan, A.P.D., 1960. Seedling-yellows in South African citrus trees. *South African J. Agric. Sci.* 3, 259–279.
- McClellan, A.P.D., 1975. Tristeza virus complex: its transmission by aphid *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* 7, 109–113.
- McGlone, V.A., Abe, H., Kawano, S., 1997. Kiwifruit firmness by near infrared light scattering. *J. Near Infrared Spectrosc.* 5, 83–90.

- Mehta, P., Brlansky, R.H., Gowda, S., Yokomi, R.K., 1997. Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Detection of *Citrus tristeza virus* in Aphids. *Plant Dis.* 81, 1066–1069.
- Melik-Sarcisov, O.S., Tsogin, L.N., Venedictov, P.S., 1987. Photosynthetic apparatus in potato plants infected or free of potato X virus. *Plant Physiol.* 34, 380–395.
- Miller, J.N., Miller, J.C., 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6.^a ed. Pearson Education Limited.
- Ministério da Agricultura do desenvolvimento Rural e das Pescas, 2007. Citrinos. Ministério da Agricultura, do desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Miyamoto, K., Yoshinobu, K., 1995. Non-destructive determination of sugar content in satsuma mandarin fruit by near infrared transmittance spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* 3, 227–238.
- Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Peña, L., 2008. *Citrus tristeza virus*: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.* 9, 251–268.
- Morera, M.N., 1997. Reseña bibliográfica sobre la enfermedad tristeza de los cítricos. I- Antecedentes históricos, distribución mundial, agente causal y propiedades, rango de hospederos, sintomatología y clasificación de especies y variedades por su susceptibilidad. *Levante Agric.* 3^o trimest, 227–240.
- Muniz, F.R., Souza, A., Harakava, R., Assis, F. de, Filho, A.M., Stach-Machado, D.R., Rezende, J.A.M., Febres, V.J., Moore, G.A., Mendes, B.M.J., 2014. Reaction of transgenic *Citrus sinensis* plants to *Citrus tristeza virus* infection by *Toxoptera citricida*. *Eur. J. Plant Pathol.* 139, 151–159.
- Nagy, P.D., Simon, A.E., 1997. New Insights into the Mechanisms of RNA Recombination. *Virology* 235, 1–9.
- Nagy, S., 1980. Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. *J. Agric. Food Chem.* 28, 8–18.
- Naranjo, J.C.P., Arango, J.S., Pulgarín, G.A., Ospina, E.M., Villadiego, O.S.R., 2014. Espectroscopía NIR como Técnica Exploratoria Rápida para Detección de Amarillamiento en Hojas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. Zembra). *Rev. Fac. Nac. Agron.* 67, 7163–7168.
- Narayanasamy, P., 2011. *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Viral and Viroid Pathogens*. Springer Science & Business Media.
- Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J.F., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Medina, A., Zaragoza, S., 2002. The Citrus Variety Improvement program in Spain in the period 1975–2001. *Em: Duran-Vila, N., Milne, R.G., da*

- Graça, J.V. (Eds.), Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, pp. 306–316.
- Niblett, C.L., Genc, H., Cevik, B., Halbert, S., Brown, L., Nolasco, G., Bonacalza, B., Manjunath, K.L., Febres, V.J., Pappu, H.R., Lee, R.F., 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res.* 71, 97–106.
- Nicolaï, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I., Lammertyn, J., 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 46, 99–118.
- Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V., Ponz, F., 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods* 45, 201–218.
- Nolasco, G., Santos, C., Silva, G., Fonseca, F., 2009. Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for *citrus tristeza virus* based on the coat protein gene. *J. Virol. Methods* 155, 97–108.
- Nolasco, G., Sequeira, Z., Soares, C., Mansinho, A., Bailey, A.M., Niblett, C.L., 2002. Asymmetric PCR ELISA: increased sensitivity and reduced costs for the detection of plant viruses. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 293–298.
- NZYTECH, 2015. NZYDNA Ladder III [WWW Document]. URL <https://www.nzytech.com/products-services/dna-markers/mb044/> (acedido 9.11.15).
- Oceanoptics, 2015. Oceanoptics.com [WWW Document]. URL <http://oceanoptics.com/> (acedido 9.2.15).
- Olmos, A., Bertolini, E., Cambra, M., 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *J. Virol. Methods* 106, 51–59.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Terrada, E., 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Res.* 27, 1564–1564.
- Olmos, A., Esteban, O., Bertolini, E., Cambra, M., 2003. Nested RT-PCR in a single closed tube. Em: Barlett, J., Stirling, D. (Eds.), *Methods in Molecular Biology* vol 226. Humana Press, Ottawa, pp. 156–161.
- Osman, F., Emir-Hodzic, Kwon, S.-J., Wang, J., Vidalakis, G., 2015. Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection of *Citrus tristeza virus*, *Citrus psorosis virus*, and *Citrus leaf blotch virus*. *J. Virol. Methods*.
- Pathak, K.B., Nagy, P.D., 2009. Defective interfering RNAs: Foes of viruses and friends of virologists. *Viruses*.

- Pedrós, R., Moya, I., Goulas, Y., Jacquemoud, S., 2008. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 498–502.
- Peñuelas, J., Isla, R., Filella, I., Araus, J.L., 1997. Visible and near-infrared reflectance assessment of salinity effects on barley. *Crop Sci.* 37, 198–202.
- Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., Lee, R., 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 80, 224–228.
- Polder, G., van der Heijden, G.W.A.M., van Doorn, J., Clevers, J.G.P.W., van der Schoor, R., Baltissen, A.H.M.C., 2010. Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulips using optical sensors. *Precis. Agric.* 11, 397–412.
- Polischuk, V.P., Shadchina, T.M., Kompanetz, T.I., Budzanivskaya, I.G., Boyko, a. L., Sozinov, a. a., 1997. Changes in reflectance spectrum characteristic of nicotiana debneyi plant under the influence of viral infection. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 31, 115–119.
- Raccah, B., Loebenstein, G., Bar-Joseph, M., 1976. Transmission of *citrus tristeza virus* by melon aphid. *Phytopathology* 66, 1102–1104.
- Riedell, W.E., Blackmer, T.M., 1999. Leaf reflectance spectra of cereal aphid-damaged wheat. *Em: Crop Science*. pp. 1835–1840.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A.M., Cattivelli, L., 2001. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breed.* 120, 389–396.
- Roberts, P.D., 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 80, 1283–1288.
- Robinson, J.W., 1974. *Principios de analisis instrumental*. Editorial Acribia.
- Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., Yokomi, R.K., 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis.* 79, 437–445.
- Rodríguez-Moreno, L., Pineda, M., Soukupová, J., Macho, A.P., Beuzón, C.R., Barón, M., Ramos, C., 2008. Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynth. Res.* 96, 27–35.
- Roistacher, C., Moreno, P., 1991. The worldwide threat from destructive isolates of *citrus tristeza virus*. A review. *Em: Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. (Eds.), Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside CA: IOCV, pp. 7–19.

- Roistacher, C.N., 1981. A blueprint for disaster I: The history of seedling yellows disease. *Citrograph* 67, 4–24.
- Roistacher, C.N., Moreno, P., 1990. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus* - A review. Em: Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. (Eds.), *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside CA, pp. 7–19.
- Rolfe, S.A., Scholes, J.D., 2010. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma* 247, 163–175.
- Rosso, P.H., Pushnik, J.C., Lay, M., Ustin, S.L., 2005. Reflectance properties and physiological responses of *Salicornia virginica* to heavy metal and petroleum contamination. *Environ. Pollut.* 137, 241–252.
- Rotenberg, D., Thompson, T.S., German, T.L., Willis, D.K., 2006. Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *J. Virol. Methods* 138, 49–59.
- Rouseff, R.L., Nagy, S., 1994. Health and nutritional benefits of citrus fruit components. *Food Technol.* 48, 125–132.
- Roy, A., Fayad, A., Barthe, G., Brlansky, R.H., 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *J. Virol. Methods* 129, 47–55.
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambrós, S., 2007. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J. Virol. Methods* 145, 96–105.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R., Davis, C., 2010. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Comput. Electron. Agric.* 72, 1–13.
- Saponari, M., Loconsole, G., Liao, H.H., Jiang, B., Savino, V., Yokomi, R.K., 2013. Validation of high-throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. *J. Virol. Methods* 193, 478–486.
- Saponari, M., Manjunath, K., Yokomi, R.K., 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods* 147, 43–53.
- Sasaki, Y., Okamoto, T., Imou, K., Torii, T., 1998. Automatic diagnosis of plant disease— spectral reflectance of healthy and diseased leaves. *EurAgEng Pap. Nr. AgEng* 98, 6.
- Satyanarayana, T., Bar-Joseph, M., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, M.A., Gowda, S., Hilf, M.E., Moreno, P., Garnsey, S.M., Dawson, W.O.,

2001. Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology* 280, 87–96.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M. a, Dawson, W.O., 2004. Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 799–804.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindran, S., Dawson, W.O., 2002. The p23 protein of *citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J. Virol.* 76, 473–483.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Boyko, V.P., Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev, A. V, Dolja, V., Hilf, M.E., Lewandowski, D.J., Moreno, P., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7433–7438.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, M.A., Robertson, C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 2000. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278, 253–265.
- Schaare, P.N., Fraser, D.G., 2000. Comparison of reflectance, interactance and transmission modes of visible-near infrared spectroscopy for measuring internal properties of kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Postharvest Biol. Technol.* 20, 175–184.
- Schmilovitch, Z., Mizrach, A., Hoffman, A., Egozi, H., Fuchs, Y., 2000. Determination of mango physiological indices by near-infrared spectrometry. *Postharvest Biol. Technol.* 19, 245–252.
- Schreiber, U., Bilger, W., 1987. Functional Analysis in Mediterranean Ecosystems. Em: Tenhunen, J.D., Catarino, F.M., Lange, O.L., Oechel, W.C. (Eds.), *Plant Response to Stress*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 27–53.
- Schreiber, U., Bilger, W., 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *Prog. Bot.* 54, 151–173.
- Sekiya, M.E., Lawrence, S.D., McCaffery, M., Cline, K., 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol.* 72, 1013–1020.
- Shao, Y., He, Y., Gómez, A.H., Pereir, A.G., Qiu, Z., Zhang, Y., 2007. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato «Heatwave» (*Lycopersicum esculentum*) quality characteristics. *J. Food Eng.* 81, 672–678.

- Shipley, G.L., 2006. An introduction to real-time PCR. Em: Dorak, M.T. (Ed.), Real-time PCR. Taylor and Francis, pp. 1–37.
- Smith, K.L., Steven, M.D., Colls, J.J., 2004. Use of hyperspectral derivative ratios in the red-edge region to identify plant stress responses to gas leaks. *Remote Sens. Environ.* 92, 207–217.
- Smith, K.L., Steven, M.D., Colls, J.J., 2005. Plant spectral responses to gas leaks and other stresses. *Int. J. Remote Sens.* 26, 4067–4081.
- Soost, R.K., Cameron, J.W., 1975. Citrus. Em: Janick, J., Moore, J.N. (Eds.), *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, pp. 507–540.
- Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E.E., 1996. *Biology of horticultural crops- Biology of Citrus*. Cambridge University Press.
- StatSoft, 2015. k-Nearest Neighbors [WWW Document]. URL <http://www.statsoft.com/textbook/k-nearest-neighbors> (accedido 9.22.15).
- Steddom, K., Heidel, G., Jones, D., Rush, C.M., 2003. Remote detection of rhizomania in sugar beets. *Phytopathology* 93, 720–726.
- Stober, F., Lichtenthaler, H.K., 1993. Studies on the constancy of the blue and green fluorescence yield during the chlorophyll fluorescence induction kinetics (Kautsky effect). *Radiat. Environ. Biophys.* 32, 357–365.
- Sue, M.J., Yeap, S.K., Omar, A.R., Tan, S.W., 2014. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–6.
- Tatineni, S., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Bar-Joseph, M., Gowda, S., Dawson, W.O., 2008. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* 376, 297–307.
- Tatineni, S., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 2011. A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 17366–17371.
- Thomas, S.C., 2005. Increased leaf reflectance in tropical trees under elevated CO₂. *Glob. Chang. Biol.* 11, 197–202.
- Tomas, I., Naes, T., 1988. The effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 42, 1273–1284.
- Tsogin, L.N., Simonyan, G.G., Chetvericov, O.S., 1985. Effect of potato infection with X-virus on photosynthetic apparatus in the leaf. *Plant Physiol.* 32, 388–395.
- Ulloa, P.A., Guerra, R., Cavaco, A.M., Rosa da Costa, A.M., Figueira, A.C., Brigas, A.F., 2013. Determination of the botanical origin of honey by sensor

- fusion of impedance e-tongue and optical spectroscopy. *Comput. Electron. Agric.* 94, 1–11.
- United States Department of Agriculture, 2015. *Citrus: World Markets and Trade*.
- Van Rensburg, L., Krüger, G.H., Eggenberg, P., Strasser, R.J., 1996. Can screening criteria for drought resistance in *Nicotiana tabacum* L. be derived from the polyphasic rise of the chlorophyll a fluorescence transient (OJIP)? *South African J. Bot.* 62, 337–341.
- Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J.G., Román, C.P. de S., Sanz, A., 1985. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for *Citrus tristeza virus* and Their Use for Diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67, 91–96.
- Ventura, M., De Jager, A., De Putter, H., Roelofs, F.P. m m, 1998. Non-destructive determination of soluble solids in apple fruit by near infrared spectroscopy (NIRS). *Postharvest Biol. Technol.* 14, 21–27.
- Viggiani, G., 1988. Citrus pests in the Mediterranean Basin. Em: *Proceedings of the Sixth International Citrus Congress*. pp. 1067–1073.
- Wang, J., Nakano, K., Ohashi, S., 2011. Nondestructive evaluation of jujube quality by visible and near-infrared spectroscopy. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 1119–1125.
- Wehrens, R., 2011. *Chemometrics with R: multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences*. Springer Science & Business Media.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., Stead, D.E., 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2853–2858.
- West, J.S., Bravo, C., Oberti, R., Lemaire, D., Moshou, D., McCartney, H.A., 2003. The potential of optical canopy measurement for targeted control of field crop diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 593–614.
- Wikimedia Commons, 2009. Figure 2 The absorption spectrum of water [WWW Document]. URL https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/Figure_2_The_absorption_spectrum_of_water.jpg (acedido 9.29.15).
- Xia, J., Li, X., Li, P., Ma, Q., Ding, X., 2007. Application of wavelet transform in the prediction of navel orange vitamin C content by near-infrared spectroscopy. *Agric. Sci. China* 6, 1067–1073.
- Xie, L., Ying, Y., Ying, T., 2009. Classification of tomatoes with different genotypes by visible and short-wave near-infrared spectroscopy with least-squares support vector machines and other chemometrics. *J. Food Eng.* 94, 34–39.

- Yang, G., Mawassi, M., Gofman, R., Gafny, R., Bar-Joseph, M., 1997. Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective *Citrus tristeza virus* molecules. *J. Virol.* 71, 9800–9802.
- Yokomi, R.K., Garnsey, S.M., 1987. Transmission of *citrus tristeza virus* by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica* 19, 169–172.
- Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R.M., 1994. establishment of the brown citrus aphid (homoptera: aphididae) in centra america and the caribbean basin and transmission of *citrus tristeza virus*. *J. Econ. Entomol.* 87, 1078–1085.
- Yokomi, R.K., Saponari, M., Sieburth, P.J., 2010. Rapid Differentiation and Identification of Potential Severe Strains of *Citrus tristeza virus* by Real-Time Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction Assays. *Virology* 100, 319–327.
- Zaragoza, S., 2007. Aproximación a la historia de los cítricos. Origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo. Universidad Politécnica de Valencia.
- Zhao, D., Reddy, K.R., Kakani, V.G., Reddy, V.R., 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *Eur. J. Agron.* 22, 391–403.
- Zude, M., 2009. Optical Monitoring of Fresh and Processed Agricultural Crops. Group, CRC Press Taylor & Francis.

Anexos

Tabela 1: Composição dos tampões utilizados ao longo da tese.

TAMPÃO	COMPOSIÇÃO	pH
Tampão de Extração	137 mM de NaCl, 1,5 mM de KH_2PO_4 , 8,1 mM de Na_2HPO_4 , 2,7 mM de KCl, 3,1 mM de NaN_3 , 2% PVP (MW 24k) e 0,05% Tween 20	7,4
Tampão Carbonato	15 mM de Na_2CO_3 , 35 mM de NaHCO_3 e 3 mM de NaN_3	9,6
Tampão PBS-Tween	137 mM de NaCl, 1,5 mM de KH_2PO_4 , 8,1 mM de Na_2HPO_4 , 2,7 mM de KCl, 3,1 mM de NaN_3 e 0,05% Tween 20	-
TAE 1x	Tris-Base 40 mM; ácido acético glacial 19 mM; EDTA 1 mM,	8,3

**GeneRuler™ 1 kb Plus
DNA Ladder #SM1331/2/3**

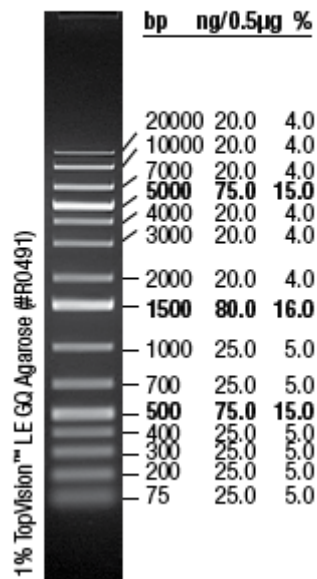


Figura 1: Marcador 1kb Plus DNA Ladder da Fermentas (EUA) (Fisher Scientific, 2015).

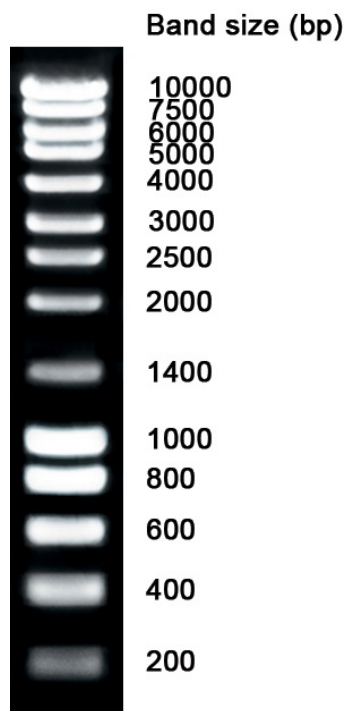


Figura 2: Marcador NZYDNA Ladder III da Nzytech (Portugal) (NZYTECH, 2015).