

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 181**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

G01J 3/44 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2009 PCT/BR2009/000317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010 WO10069017**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2009 E 09832743 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2376897**

54 Título: **Método para el diagnóstico de tensiones y enfermedades en plantas superiores**

30 Prioridad:

15.12.2008 BR PI0805608

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2020

73 Titular/es:

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA
AGROPECUÁRIA EMBRAPA (100.0%)
Parque Estação Biológica - PqEB - S/N
Edifício Sede Asa Norte - Plano Piloto
70770-901 Brasília - DF, BR**

72 Inventor/es:

**MILORI, DÉBORA MARCONDES BASTOS
PEREIRA;
NETO, LADISLAU MARTIN;
FERREIRA, EDNALDO JOSÉ;
ZAGHI, ANA FLÁVIA y
VENÂNCIO, ANDRÉ LEONARDO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 746 181 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico de tensiones y enfermedades en plantas superiores

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con un método para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Greening en cítricos, en donde el diagnóstico se realiza a partir de la hoja utilizando un aparato basado en espectrometría de fluorescencia que contiene software para el tratamiento y clasificación de los datos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Brasil, desde el comienzo de los años 90, permanece como el principal productor mundial de naranja, siendo responsable del 80% del comercio internacional de zumo de naranja concentrado y congelado. Para obtener esta producción, estimada en 900 millones de dólares USA, se gastan aproximadamente 410 millones de dólares USA de inversión, lo que conduce a aproximadamente 1500 millones de dólares USA en transacciones relacionadas con el mercado de productos cítricos, tales como zumos y fruta fresca (FNP Consultoria & Comércio, 2008. Disponible en <http://www.fnp.com.br/agricultura/citros/prod_area_laranja.php> Acceso el 23 de Septiembre de 2008). El segundo mayor productor son los Estados Unidos, seguido por Méjico, China y España. España y los Estados Unidos son los principales exportadores de fruta fresca, lo que corresponde, respectivamente, al 38 y al 18% de las exportaciones mundiales (BOTEON, M.; VIDAL, A. J. Citricultura no Brasil e na Flórida. Citricultura Atual, n. 23, p. 3, 2001).

20 El estado de São Paulo (Brasil) tiene alrededor de 34,2 millones de plantas en desarrollo y 163,5 millones de plantas de cítricos en producción, reflejando más del 80% de la producción nacional de frutas cítricas. Actualmente, es responsable del 97% de las exportaciones Brasileñas, siendo el gran núcleo dinámico del complejo del cítrico Brasileño. Este mercado es responsable de aproximadamente 1500 millones de dólares USA de divisas para el país, estado y ciudades y da empleo a 400.000 personas. El parque de cítricos de São Paulo junto con una región en Minas Gerais conocida como "Triângulo Mineiro" presenta 198 millones de árboles. La cosecha de naranjas se realiza durante todo el año debido a la composición de las variedades tales como "Hamlin", "Lima", "Pêra", "Seleta", "Bahia", "Natal", "Valência" y "Folha Murcha". Entre estas, algunas son apropiadas para la producción de zumo, tales como la "Pêra", la cual representa un 38% del total de los árboles, seguida por "Valência", "Natal" y "Hamlin", con respectivamente 17, 25 y 7% (BARROS, M. H. C.; BOTEON, M. . O Brasil é o único país que produz o ano inteiro. Hortifrutí Brasil, v. 3, p. 21, 2002.).

35 Con el avance de la tecnología en el campo, las plantas empezaron a ser multiplicadas mediante injertos, lo cual proporcionó grandes ventajas en relación con la precocidad y uniformidad de los huertos. Sin embargo, al mismo tiempo esto redujo la variabilidad, haciendo al cultivo un blanco constante para varias plagas y enfermedades que, cuando se enfrentan a condiciones favorables para su desarrollo, son capaces de provocar daño irreversible. Los costes fitosanitarios, junto con los fertilizantes, son mayores del 60% del coste de producción. La calidad y la cantidad de las frutas cítricas se ven frecuentemente amenazadas debido al daño que dejan en las plantas, el cual, dependiendo de la intensidad del ataque, pueden hacerlo improductivo o conducir a su erradicación.

40 A mediados del año 2004 se informó de una nueva enfermedad en las huertas de São Paulo. Una enfermedad devastadora sin cura originaria de Asia y África. La Huanglongbing (HLB), también conocida como Greening, es actualmente la enfermedad más temida entre los productores de naranja debido al hecho de que no posee cura o tratamiento, dado que tiene una elevada tasa de diseminación y afecta a todas las variedades comerciales de naranjas. La solución más eficiente hasta este momento para minimizar las pérdidas es la erradicación de las plantas en cuanto se confirma un diagnóstico positivo para la enfermedad.

45 La enfermedad de Greening tiene como agente causante una bacteria que vive en el floema de la planta anfitriona, que se conoce como *Candidatus Liberibacter*. Existe tres tipos de bacterias relacionadas con Greening, *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Candidatus Liberibacter americanus*, siendo esta última el principal agente causante en el estado de São Paulo. Los síntomas del Greening son visualmente los mismos, con independencia de dónde aparece la enfermedad. Inicialmente, los síntomas aparecen en las ramas, los cuales son evidentes debido a la coloración amarilla que contrasta con la coloración verde de las hojas de las ramas no afectadas. Las hojas presentan coloración amarilla pálida, con sectores verdes, produciendo puntos irregulares y asimétricos (moteadas). La fruta se deforma y se vuelve asimétrica. La parte blanca de la piel, en algunos casos, presenta un grosor mayor del normal. También se producen la reducción del tamaño de la fruta y una caída intensa.

50 Debido a la no existencia de una cura, la enfermedad de Greening es, actualmente, la enfermedad más temida en el cultivo de cítricos. Ya fue responsable de la erradicación de más de 2 millones de árboles de cítricos y la gran mayoría de ellos estaban en la temporada de mayor productividad.

60 En particular, el cultivo de cítricos del estado de São Paulo presenta algunas características peculiares que conducen a una elevada vulnerabilidad del cultivo a la aparición de epidemias de enfermedades conocidas tales como la enfermedad de Decaimiento ("Decline"), y de nuevas enfermedades, tales como la Muerte Súbita de los

Cítricos (CSD, del inglés Citrus Sudden Death) y la enfermedad de Greening, provocando importantes consecuencias para la sostenibilidad del negocio agrícola:

- 5 1) Los huertos de cítricos del estado de São Paulo ocupan un área casi continua de aproximadamente 615.300 ha (FNP. Citrus. AGRIANUAL 2003: anuário da agricultura brasileira. FNP consultoria & agroinformativos, São Paulo, p.295-314, 2003.), sin grandes variaciones de relieve o barreras físicas y con alto tráfico de personas entre ellas.
- 10 2) Las plantas de cítrico son perennes y, por lo tanto, están expuestas a lo largo de todo el año y durante varios años al ataque de plagas y enfermedades. Además de eso, durante una gran parte del año se puede observar la emisión de nuevos brotes, lo que confiere una continuidad de tejido susceptible y de inóculo entre las temporadas de cultivo;
- 15 3) Los huertos del estado de São Paulo presenta una variabilidad genética muy pequeña. Sólo cuatro variedades de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck): 'Pêra-Rio', 'Natal', 'Valência' y 'Hamlin', propagadas vegetativamente mediante injertos, representan el 92% del cultivo de cítricos Brasileño. El portainjerto utilizado en aproximadamente el 85% de los árboles es la lima 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) debido a su rusticidad, vigor conferido a la copa y resistencia a la deficiencia hídrica del norte y el noroeste del estado.

En la actualidad, existen algunos métodos de diagnóstico para la enfermedad de Greening. El diagnóstico más habitual se realiza mediante la inspección visual de hojas que presentan los síntomas de la enfermedad. El control de la enfermedad de Greening en el estado de São Paulo y en el "Triângulo Mineiro" se ha conseguido mediante inspecciones visuales periódicas realizadas por técnicos de la Fundecitrus o personas formadas por ellos. Este método tiene como características una alta proporción de subjetividad y un alto porcentaje de error, además del hecho de que la enfermedad sólo se diagnostica después de la expresión de los síntomas, esto es, después de un largo periodo de fase asintomática del árbol (aproximadamente 8 meses). Durante la fase asintomática de la enfermedad, el árbol infectado es una fuente invisible de diseminación de la enfermedad que conduce a un retraso muy grande en la erradicación del árbol. Sin embargo, después de la visualización de los síntomas, el desarraigado es la única forma actual de control de la enfermedad.

30 Marcassa LG et al.: "Fluorescence spectroscopy applied to orange trees", LASER PHYSICS, NAUKA/INTERPERIODICA, MO, vol. 16, no. 5, 1 de Mayo de 2006 (2006-05-01), páginas 884-888, XP019414056, ISSN: 1555-6611, DOI: 10.1134/S1054660X06050215 está relacionada con la espectroscopía de fluorescencia para investigar procesos biológicos en naranjos utilizando como fuente de excitación un láser de descarga multimodal de gas HeCd de 442-nm y de 15-mW y un láser YAG de Nd³⁺ de 532-nm y 10-mW.

35 PAULK BUAH-BASSUAH et al.: "A portable fibre-probe ultraviolet light emitting diode (LED)-induced fluorescence detection system", MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY, IOP, BRISTOL, GB, vol. 19, no. 2, 1 de Febrero de 2008 (2008-02-01), página 25601, XP020129408, ISSN: 0957-0233 está relacionada con un sistema de detección por fluorescencia sonda de fibras portátil que comprende un diodo emisor de luz ultravioleta (UV LED) de alta potencia y de onda continua que emite a 365 nm como fuente de excitación, una sonda de fibras bifurcada con una configuración de fibras de seis-alrededor-de-uno para iluminar y leer de un gran área objetivo (~3,6 mm²) y un espectrómetro acoplado a un PC integrado.

45 El documento US 2005/098713 A1 está relacionado con un aparato para valorar el estado de la planta utilizando propiedades biofísicas y bioquímicas de la planta detectadas de manera remota mediante la invención permitiendo de este modo monitorización, eliminación o tratamiento selectivos de plantas individuales.

50 PYDIPATI R ET AL: "Identification of citrus disease using color texture features and discriminan analysis", COMPUTERS AND ELECTRONICS IN AGRICULTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 52, no. 1-2, 1 de Junio de 2006 (2006-06-01), páginas 49-59, XP024956935, ISSN: 0168-1699, DOI: 10.1016/J.COMPAG.2006.01.004 está relacionado con el uso de un método de co-ocurrencia de color para determinar si los rasgos de tonalidad, saturación, e intensidad de color basados en la textura en conjunto con algoritmos de clasificación estadística se podrían utilizar para identificar hojas de cítricos enfermas y normales en condiciones de laboratorio.

55 Madhulika Sagaram et al.: "The Utility of Chlorophyll Fluorescence Parameters as Indicator Tools for Citrus Greening", HortScience, 1 de Julio de 2008 (2008-07-01), página 1130, XP55402429, está relacionado con la verificación de la utilidad de herramientas de medida de la función de la hoja para detección temprana de Huanglongbing (HLB) en genotipos de cítricos utilizando hojas sintomáticas positivas para HLB, hojas asintomáticas y hojas negativas para HLB.

60 El documento JP2006267092-A describía un kit de detección para la enfermedad de Greening en etapas tempranas, basado en el reconocimiento del descenso en las concentraciones de manganeso y de hierro en los tejidos del árbol infectado. El procedimiento de detección incluye la obtención de un extracto soluble en agua de material de la planta que contiene un sistema tampón, seguido por análisis de espectrofotometría de absorción. La determinación de la enfermedad, sin embargo, es inespecífica, dado que las bajas concentraciones de manganeso y de hierro en una planta pueden ser debidas a varias causas fisiológicas, incluida la deficiencia de estos minerales en la nutrición de la

planta. De una manera análoga, el documento JP2004264101-A reivindica la detección de la enfermedad de Greening en extractos de plantas por medio del análisis de la concentración de almidón a través de la reacción del yodo, presentando de esta manera, la misma desventaja en la inespecificidad fisiológica de la deficiencia.

- 5 Un método descrito en el documento WO2007021485-A2 promete la detección de bacterias que provocan Greening, entre la detección de varios otros patógenos y contaminantes químicos procedentes de plantas y animales, utilizando el Efecto Raman de dispersión de radiación polarizada aplicada. Sin embargo, la detección está condicionada a muestras acuosas que son sometidas a un complejo tratamiento que incluye secado sobre superficie metálica coloidal, seguido por contacto con membrana de ultra filtración.
- 10 El Apta Citrus, afiliado al Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), es el único centro del estado de São Paulo que proporciona informes técnicos para el diagnóstico de la enfermedad de Greening. Este informe está basado en una técnica llamada PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual consiste en el análisis genético de las hojas en busca del ADN de las bacterias que provocan el Greening. Sin embargo, la detección del ADN de las bacterias sólo es posible en hojas sintomáticas (moteadas), e incluso entonces, puede fallar en un 10% de los casos. Para el diagnóstico en hojas asintomáticas (sin signos visibles de la enfermedad), el IAC utiliza una variación más compleja de la técnica llamada PCR en tiempo real, cuya sensibilidad es al menos 1000 veces mayor que la técnica convencional.
- 15 Sin embargo, en función de su complejidad, la PCR en tiempo real no se ha utilizado en exámenes rutinarios, sólo para trabajo científico. Aunque la técnica PCR es muy eficiente, es cara y laboriosa (BOVÉ, J. M. History, etiology, field identification, transmission, and world distribution of Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Huanglongbing Greening International Workshop, v. 1, p. 1, 2006). El coste del análisis de cada muestra, utilizando la PCR convencional, es de alrededor de 25,00 dólares USA y un informe puede tardar alrededor de 20 días. El uso de PCR a gran escala es económicamente inviable; además del hecho de que produce un mapeado de infestación que está muy retrasado temporalmente. Por otro lado, el documento CN1824802-A reivindica la detección de los árboles asintomáticos en sólo 3 h después del muestreo, pero está restringido a la detección provocada por la bacteria *Candidatus Liberobacter asiaticum* Jagoueix y al cítrico del tipo mandarina.
- 20 Es en este momento en el que la fluorescencia se convierte en un dispositivo relativamente simple y eficiente que puede marcar la diferencia. La fluorescencia es una técnica que permite la detección de alteraciones químicas que se producen en las hojas de plantas afectadas por Greening o por otras enfermedades antes de la percepción de sus manifestaciones visuales.
- 25 En el documento BR200201249-A, la autofluorescencia de las hojas, frutos y ramas permite la detección del cancro de los cítricos en cítricos asintomáticos, después de la exposición a fuentes de luz con corta longitud de onda. Sin embargo, la técnica está limitada a la detección de esta enfermedad, provocada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
- 30 Esta invención desarrollada en la Embrapa Instrumentação Agropecuária tiene como objetivo proteger una nueva metodología y un nuevo aparato de diagnóstico para diagnosticar tensiones y enfermedades en plantas superiores, como por ejemplo la enfermedad de Greening de los cítricos. Un trabajo realizado anteriormente en el Laboratorio de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação Agropecuária LOLEIA (documento PI 05059757-7), demostró la posibilidad de distinción de hojas sanas de enfermas, y también, de distinción de enfermedades (CSD y Decaimiento) a través de la ratio del máximo del espectro de emisión de fluorescencia utilizando espectrómetros comerciales. La idea básica de la metodología propuesta fue la siguiente: cuando una planta alcanza el desequilibrio, provocado por tensión o por enfermedad, se producen cambios en su metabolismo que conducen a una alteración de la composición química de sus órganos. Este cambio químico conduce a un cambio en las propiedades físicas, tales como, por ejemplo, reflectancia y fluorescencia de las hojas. Basándose en esta hipótesis, se desarrolló un estudio de laboratorio utilizando aparatos comerciales, relacionado con la emisión de fluorescencia de las hojas de hojas de cítricos sanas y enfermas. La posibilidad de distinción de árboles sanos, árboles con Decaimiento o CSD se observó a través de la ratio de los picos de emisión de fluorescencia, método descrito en el documento PI 05059757-7.
- 35 En la solicitud de patente PI 05059757-7, la idea de un módulo portátil que realiza mediciones espectroscópicas en hojas estaba protegida para el diagnóstico de muerte súbita de los cítricos con excitación utilizando bombilla, led o láser en el rango de 420 a 480 nm. En 2006, el LOLEIA desarrolló un sistema que utilizaba espectroscopía de fluorescencia inducida por láser (LIFS), similar al propuesto en el documento PI 05059757-7, con una sonda construida con fibras ópticas y sistema de detección constituido por un conjunto de fotodiodos calibrados que permite la obtención del espectro de emisión de la hoja de una manera extremadamente rápida (~ 1s) y excitación con láser a 470 nm. Con este nuevo sistema, resultó posible analizar un gran volumen de muestras en tiempo reducido. En esa época, la enfermedad de Greening ya estaba considerada la enfermedad más grave del sector cítrico Brasileño, y, por lo tanto, el LOLEIA inició investigación para evaluar la posibilidad de diagnóstico de Greening utilizando espectroscopía de fluorescencia. Con los resultados preliminares, se pudo observar que la mejor distinción para la enfermedad de Greening se observó con otro láser con excitación de 561 nm de longitud de onda. Con el

módulo portátil reformulado, se realizó un estudio exigente para evaluar la posibilidad del diagnóstico de Greening a través de las hojas. A partir de este estudio, se generó como resultado una nueva metodología de diagnóstico de enfermedad diferente a la de la solicitud de patente PI 05059757-7 (para CSD). Aunque la metodología actual utiliza un aparato similar protegido para la CSD, con diferente longitud de onda de excitación, el sistema en su conjunto es totalmente diferente y las principales diferencias se analizarán a continuación.

En la invención, los ratios de los picos no se utilizan como en el documento PI 05059757-7. Se desarrolló un software para recoger los espectros de fluorescencia y para realizar un tratamiento estadístico de ellos (Figuras 1 y 2) a fin de evaluar de la manera más exigente todo el espectro de emisión para obtener una cantidad mayor de información que permita un diagnóstico más preciso de las enfermedades.

Después de ser tratados mediante el método estadístico de Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés Principal Component Analysis), se definieron claramente las aglomeraciones en gráficos tridimensionales de los primeros componentes principales como se muestra en la Figura 3.

Ya que el sistema se volvió muy sensible, también se distinguió la variedad de la copa y del portainjerto, razón por la cual se elaboró otra solicitud de patente con este tema, el "Método e Equipamento para Certificação de Mudas de Citros" (Método y Equipo para Certificación de Plántulas de Cítricos). De esta forma, para cada combinación de copa y portainjerto, se realizó un proceso de calibración del sistema. Para cada combinación de copa y portainjerto, se utilizó un conjunto de muestras que contenían hojas sanas y enfermas para proporcionar información al sistema de espectros típicos de cada clase de muestras. En general, se evaluaron las siguientes clases: muestras sanas, muestras enfermas que presentaban Greening en la fase sintomática, muestras enfermas que presentaban Greening en la fase asintomática, con CSD y con Decaimiento.

Utilizando herramientas de aprendizaje automático, se desarrolló otro software de tal manera que la base de datos de calibración se utilizó de una manera en que el sistema podía ser capaz de medir una hoja totalmente desconocida y clasificar el estado del árbol como sano o enfermo, y, si se clasificaba como enfermo, identificar la enfermedad. En el caso de la enfermedad de Greening, fue posible identificar la enfermedad en la fase sintomática así como en la fase asintomática. Este resultado muestra el gran potencial de la técnica para permitir la realización de diagnóstico temprano de la enfermedad.

En la patente de CSD, el análisis por espectroscopía sólo se realizó después de la obtención de un mapa del huerto a través de imágenes de fluorescencia, el cual realizó una distinción de árboles sanos de enfermos. En la patente actual, el diagnóstico se realiza utilizando sólo la espectroscopía de fluorescencia.

Por lo tanto, a diferencia de la patente PI 05059757-7, el aparato tal como estaba protegido *per se* no es capaz de realizar un diagnóstico automático. El sistema completo necesita el software de adquisición y tratamiento estadístico de los datos, base de datos de calibración y software de clasificación. De esta manera, en esta descripción, se describe el sistema completo compuesto por el aparato para realización de medidas de espectroscopía de fluorescencia, el software de adquisición y tratamiento estadístico de los datos, base de datos y software de clasificación para la realización del diagnóstico de Greening a través de las hojas de cítricos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención muestra que tensiones y enfermedades en plantas superiores, tales como Greening, por ejemplo, el principal problema actual del cultivo Brasileño de cítricos, se pueden detectar de una manera rápida, precisa, temprana y económicamente viable por medio de espectroscopía de fluorescencia realizada directamente en las hojas y otras partes de la planta, junto con la creación de una base de datos y modelos de predicción o discriminación estadística, matemática y/o computacional de aprendizaje automático, contribuyendo, de esta manera, al control de enfermedades.

La invención está definida por el método de la reivindicación 1.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1 – Impresión de pantalla del software de adquisición.

Figura 2 – Impresión de pantalla del software para el tratamiento de datos.

Figura 3 – Gráfica de los tres primeros componentes principales generados a partir de los espectros de emisión de fluorescencia capturados por el sistema portátil desarrollado por LOLEIA para árboles de naranja dulce ("Pêra") en portainjerto (38) de "Sunky" sano, con Greening sintomático (39) y asintomáticos para Greening (40).

Figura 4 – Impresión de pantalla del software de clasificación resaltando la ventana de clasificación (41).

Figura 5 – Aparato para el diagnóstico de la enfermedad de Greening.

Figura 6 – Espectros de emisión típicos de hojas de naranja Hamlin con portainjertos de lima "Cravo" obtenidos en el sistema portátil de espectroscopía de fluorescencia inducida por láser (LIFS) desarrollado y construido en LOLEIA.

Figura 7 – gráficas de PCA generadas a través de los espectros de hojas del árbol de naranja Hamlin con portainjertos de lima “Cravo” sanas y enfermas con AG, SG, CSD y Decaimiento en la estación lluviosa. Todos los espectros se obtuvieron en el sistema portátil de espectroscopía de fluorescencia inducida por láser (LIFS) desarrollado y construido en LOLEIA.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION
 En primer lugar, para desarrollar el método propuesto en esta invención, se realizó caracterización espectroscópica de las hojas y los pigmentos fotosintéticos extraídos de las hojas para observar las diferencias espectrales entre un material sano y uno enfermo, utilizando un espectrómetro de fluorescencia convencional.

10 Después de este estudio, se realizaron alteraciones en un aparato desarrollado para el diagnóstico de CSD (PI 05059757-7) para hacer posible el diagnóstico de Greening. Sin embargo, modificaciones restringidas a alteraciones ópticas en el aparato no fueron suficientes.

15 En la Figura 5, se muestra una representación esquemática del nuevo sistema desarrollado, objeto de la presente invención. 42- hoja de cítrico a analizar; 43- sonda; 44- cable óptico; 45- adaptador de fibra óptica; 46- filtro regulable; 47- fibras ópticas de excitación; 48- láser de diodo; 49- fibra óptica de emisión; 50- miniespectrómetro; 51- ordenador portátil; 52- tratamiento de señal/datos; 53- base de datos; 54- software de clasificación; 55- informe; en el añadido se muestra (56) el perfil lateral de la sonda, que contiene las siguientes partes: 57- fibras ópticas de excitación; y 58- fibra óptica de emisión.

20 Se desarrolló una nueva metodología para el diagnóstico de Greening que es también objeto de la presente invención. La metodología está compuesta de tres pasos:

25 1- Construcción de una base de datos – Inicialmente, el sistema requiere una base de datos con información de posibles espectros de emisión de fluorescencia de una hoja a partir de una combinación dada de copa y portainjerto. Para conseguir eso, se recogen al menos 150 hojas procedentes de árboles sanos, 150 hojas de árboles enfermos sintomáticos y 150 hojas de árboles enfermos asintomáticos. Los espectros de estas 450 hojas son capturados por el aparato de la presente solicitud de patente, cuya patente se solicita, y se tratan mediante métodos estadísticos a través de un software también desarrollado especialmente para este aparato.

35 El programa desarrollado para la recogida de los datos permite el ajuste de varios parámetros de adquisición (Figura 1), entre los cuales está el tiempo de integración (en ms), que es el intervalo de tiempo en el cual el miniespectrómetro recoge luz antes de enviar al programa la información acerca del espectro (1). También permite modificar el número de recogidas que el programa realiza para componer, a través del cálculo de la media, un único espectro (2); el cual es un procedimiento útil en la reducción de ruido. Todavía existe el ajuste boxcar (3), que controla la intensidad del suavizado del espectro aplicado por el programa.

40 Otra clase de elementos ajustables en la pantalla principal está relacionada con la visualización de los espectros recogidos. Es posible determinar los límites de longitud de onda inferior y superior mostrados en la pantalla, en nm (4), así como los límites de intensidad (5), en unidades arbitrarias. También es posible visualizar uno o más espectros recogidos, así como eliminarlos de la pantalla más tarde (6). En este caso, los espectros se muestran en colores diferentes, y el usuario tiene la opción de aceptar o deshabilitar un subtítulo generado automáticamente (7).

45 En caso de presencia de más de un espectro en la pantalla, es necesario que el usuario especifique cuál de ellos se debe guardar en la base de datos (8). Sin embargo, para guardar un espectro, es necesario proporcionar la descripción de él, por ejemplo la naturaleza de la excitación que genera (9) y de la muestra analizada. Los datos obligatorios acerca de la muestra son: las variedades de portainjerto (10) y las variedades de copa (11), la enfermedad que está infectando a la planta (12) y el lugar de origen de ella (13). El conjunto de opciones para cada uno de los casos se puede editar haciendo clic en el botón derecho de los respectivos campos.

50 También hay datos acerca de la muestra que deben ser rellenados por el propio usuario: el número de la parcela (14), de la calle (15), del número (16), que identifican a la planta y la fecha de la recogida de la muestra (18). El número de la hoja (17) es atribuido automáticamente por el programa, para evitar confusión en caso de existencia de más de una muestra procedente de la misma planta. La fecha de adquisición del espectro (19) también se registra automáticamente. El programa todavía permite el registro de observaciones adicionales que el usuario puede necesitar hacer acerca de la muestra en cuestión (20).

60 A través de la pantalla de adquisición el usuario también puede iniciar o interrumpir la visualización instantánea de los datos en la pantalla (21), acceder a la configuración del miniespectrómetro (22) y, por último, guardar en la base de datos el espectro seleccionado en ese momento, junto con la información insertada en los respectivos campos (23).

- 5 El análisis de los datos almacenados (Figura 2) se debe identificar mediante un nombre elegido por el usuario (24). Este también debe seleccionar el rango de espectros a utilizar en el análisis (25) y especificar el número de separadores decimales a tener en cuenta (26). Existe también la opción de elegir el valor límite de la desviación estándar asociada a cada longitud de onda, las variables cuya desviación estándar es menor que este límite son ignoradas, para evitar la aparición de división por cero (27). Otro problema se evita mediante el establecimiento de una diferencia mínima entre dos longitudes de onda como requisito para que el programa las considere como variables distintas (28). Esto impide que cualquier diferencia mínima ocasional de redondeo del valor de longitud de onda realizado por el programa produzca como resultado error en el análisis. Existe también un campo disponible (29) para que el usuario registre las observaciones acerca del análisis en cuestión.
- 10 Es posible seleccionar los espectros que se visualizan en la pantalla (31), elegir distinguirlos o no, mediante el empleo de diferentes colores (33), excluir del análisis los espectros seleccionados (32) o exportarlos en un formato que es compatible con otros programas (37).
- 15 Los procedimientos de análisis disponibles son el cálculo del cociente entre las intensidades de los puntos máximo y mínimo y el PCA. En el primer caso, el usuario puede elegir los límites de los dos intervalos, en los cuales se calculará el punto máximo (o mínimo) que se utilizará para la determinación del índice (30), y puede también visualizar gráficamente el resultado (35). En el segundo caso, el usuario debe elegir tres componentes principales (34) para visualizar las tres gráficas dimensionales que las contienen (37).
- 20 De esta manera, se obtiene una gráfica tridimensional (Figura 3) con aglomeraciones que separan las diferentes clases de árboles (sanos (38), sintomáticos (40) y asintomáticos (39)) y una base de datos con información característica de cada clase de muestra.
- 25 2 – Software de clasificación – Utilizando herramientas de aprendizaje automático o estadística y la base de datos, se desarrolla un modelo de clasificación.
En la Figura 4, se indica (41) la ventana en la que se muestra el diagnóstico de la hoja. La clasificación es prácticamente instantánea para el espectro que se acaba de guardar y el diagnóstico se proporciona de acuerdo con los criterios de un clasificador generado previamente. Junto con el resultado, la pantalla muestra una estimación del grado de confianza del diagnóstico realizado (41). El usuario tiene la opción de cambiar, en cualquier momento, el clasificador que se está utilizando por otro que esté disponible en la base de datos del programa.
- 30 3 – Evaluación del huerto – Se recogen al menos 3 hojas de cada árbol del huerto. Los árboles están georreferenciados para permitir la construcción del mapa de infestación. Se mide el espectro de emisión de las hojas y se obtiene el informe para cada árbol mediante la prevalencia del diagnóstico resultante de las hojas recogidas. De esta manera, cada árbol georreferenciado tiene un informe y es posible construir un mapa de infestación.
- 35 En experimentos realizados con el nuevo aparato y la nueva metodología en una parcela de 1000 árboles de naranja "Pêra" en portainjertos de lima "Cravo" se obtuvo un índice de resultados correctos mayor del 80%, incluso en árboles asintomáticos.
- 40 EJEMPLO
En la gráfica de la Figura 6, se presentan unos espectros típicos obtenidos en el sistema portátil con láser a 561nm para Hamlin en portainjertos de lima "Cravo". Este conjunto de muestras presenta plantas sanas (59), con Decaimiento (60), con Muerte Súbita de los Cítricos (61), con Greening asintomático (62) y con Greening sintomático (63).
- 45 Se realizaron análisis PCA con los datos de todo el conjunto de hojas recogidas para una mejor separación de enfermedades, como se muestra en la Figura 7, que contiene el mismo tipo de muestras: sanas (64), con CSD (65), con Decaimiento (66), con Greening asintomático (67) y con Greening sintomático (68).
- 50 A partir de este conjunto de datos, se construyó un software cuyo modelo de clasificación es capaz de realizar el diagnóstico de hojas de Hamlin en portainjertos de lima "Cravo" con una precisión por encima del 80%.
- 55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnóstico de la enfermedad de Greening en plantas de cítricos superiores de un huerto con un aparato que comprende una fuente de excitación (48), un cable óptico de excitación (47), un filtro óptico ajustable (46), un adaptador de fibra óptica (45), un cable óptico mixto (44), una sonda (43), un cable óptico de emisión (49), un miniespectrómetro (50) y un microordenador (51) equipado con un software de adquisición y tratamiento de datos (52), y un software de clasificación, consistente en los siguientes pasos:
- 10 a) Construir una base de datos de espectros, recogiendo un espectro de emisión de al menos 150 hojas de árboles enfermos sintomáticos, 150 hojas de árboles enfermos asintomáticos, y 150 hojas de árboles sanos, y tratar los espectros utilizando métodos estadísticos, preferiblemente un Análisis de Componentes Principales (PCA) por medio del software de adquisición y tratamiento de datos (52);
- 15 b) Calibrar el software de clasificación (54) y desplegar un modelo de clasificación, basado en la base de datos de espectros y utilizando herramientas de aprendizaje automático o estadística;
- c) Recoger al menos 3 hojas de árboles georreferenciados del huerto a analizar;
- d) Detectar y medir un espectro de emisión de fluorescencia de todas las hojas recogidas en (c) para generar espectros;
- 20 e) Analizar los espectros generados en (d) utilizando el software de clasificación (54) y proporcionar un resultado de diagnóstico para cada espectro;
- f) Generar un informe para cada árbol basado en prevalencia de los resultados del diagnóstico de las hojas recogidas obtenidos en (e); y
- 25 g) Basándose en las coordenadas de georreferencia de cada árbol georreferenciado y en el informe para cada árbol, construir un mapa del estado de salud del huerto en donde la longitud de onda utilizada para el diagnóstico de las enfermedades de Greening es de alrededor 561 nm.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método sirve para el diagnóstico de la enfermedad de Greening en cítricos con diferentes combinaciones de copa y portainjertos.
- 30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la señal es difractada y detectada por un miniespectrómetro (50).
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el método utiliza un software de clasificación dedicado (54).
- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual las variaciones en los espectros de fluorescencia reflejan el resultado de alteraciones en la composición química de los constituyentes de las plantas.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual los constituyentes son fluorescentes.
- 40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual los constituyentes fluorescentes son pigmentos fotosintéticos de la planta.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual los constituyentes fluorescentes son, principalmente, clorofila *a* y *b*, y algunos pigmentos accesorios, tales como carotenoides y xantófilos.
- 45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual las hojas emiten fluorescencia bajo longitud de onda de entre 600 y 800 nm.

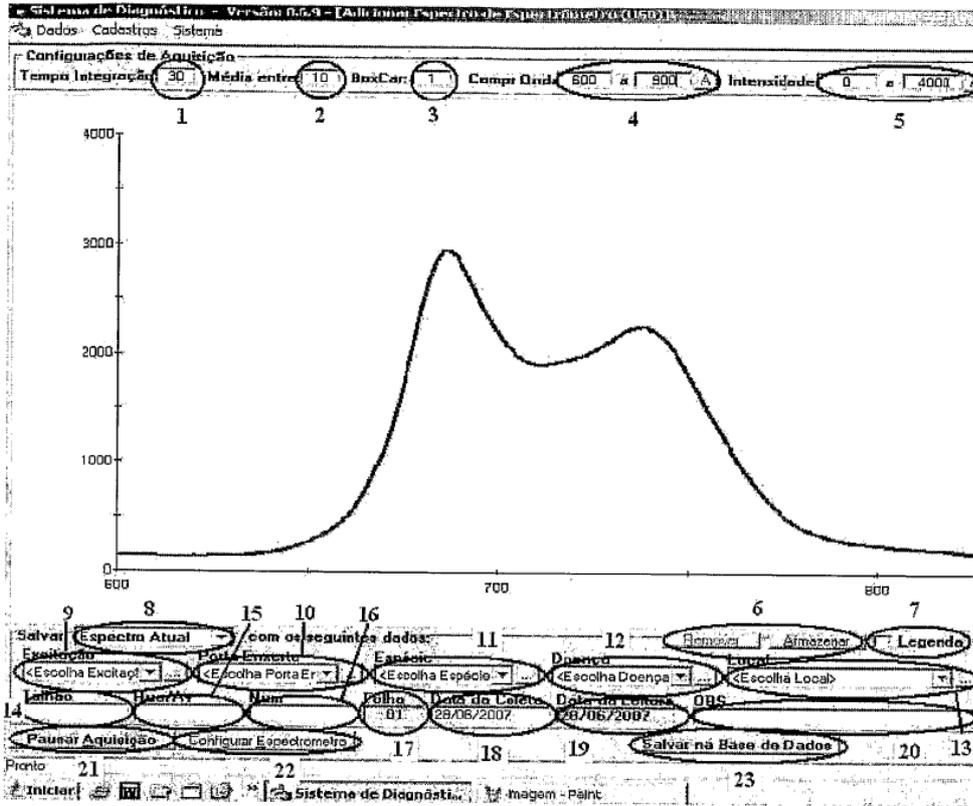


Fig. 1

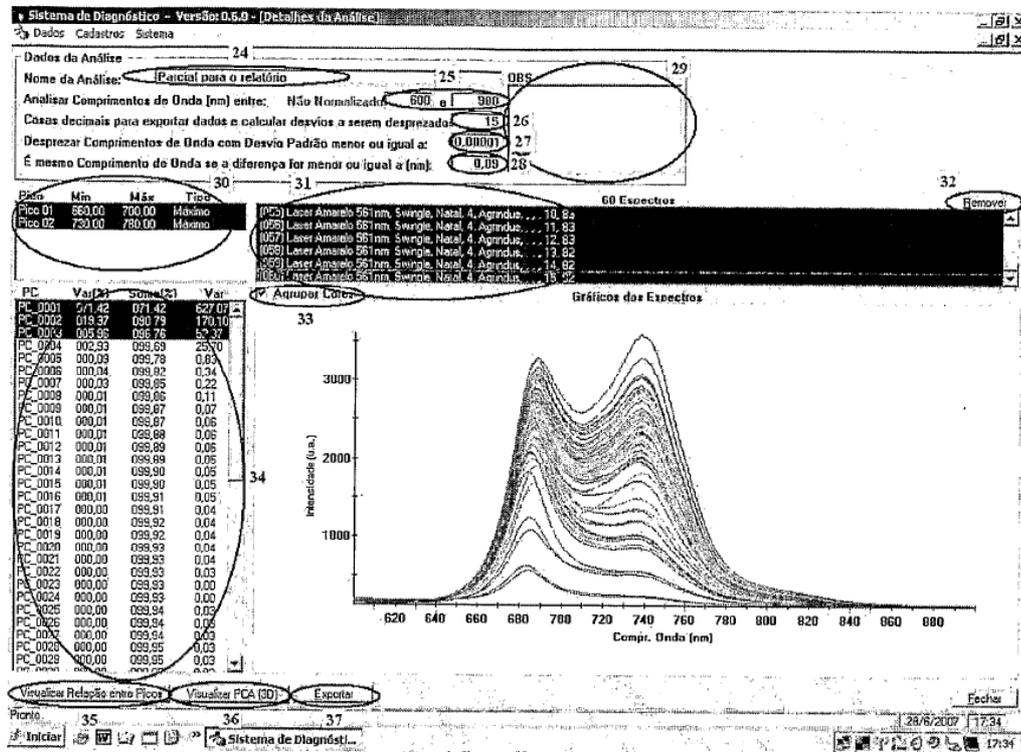


Fig. 2

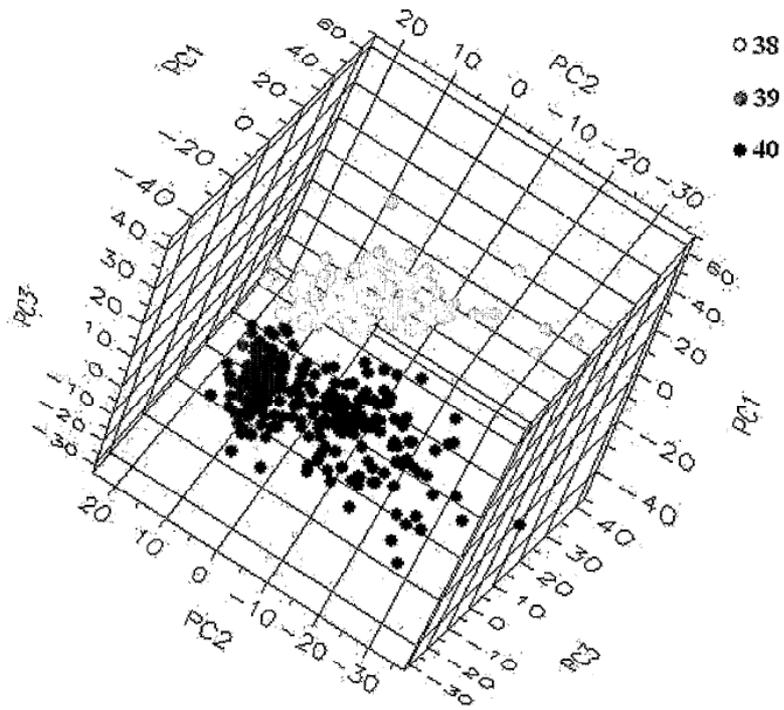


Fig. 3

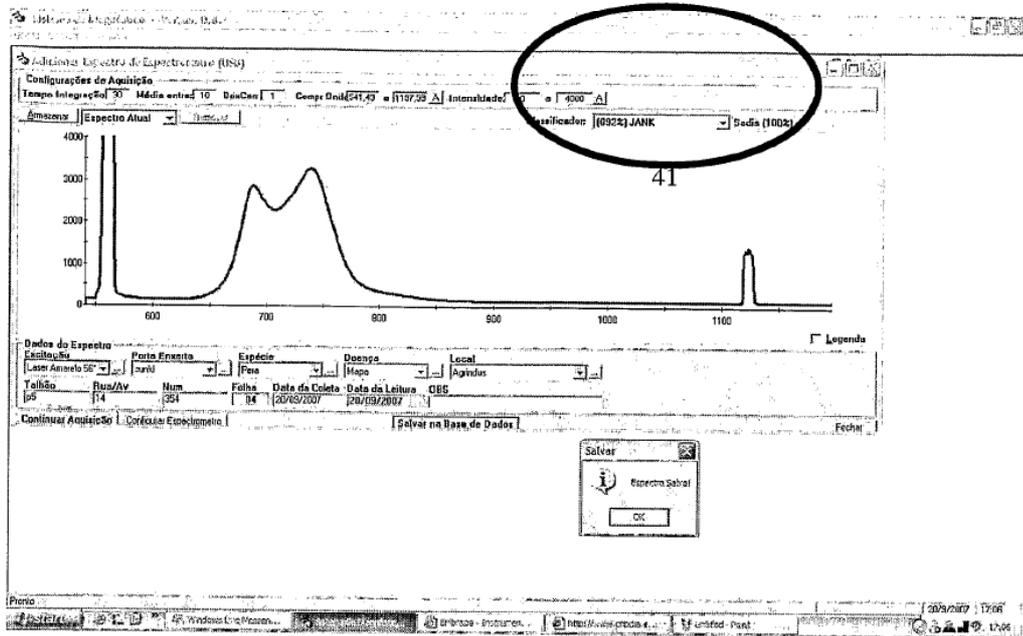


Fig. 4

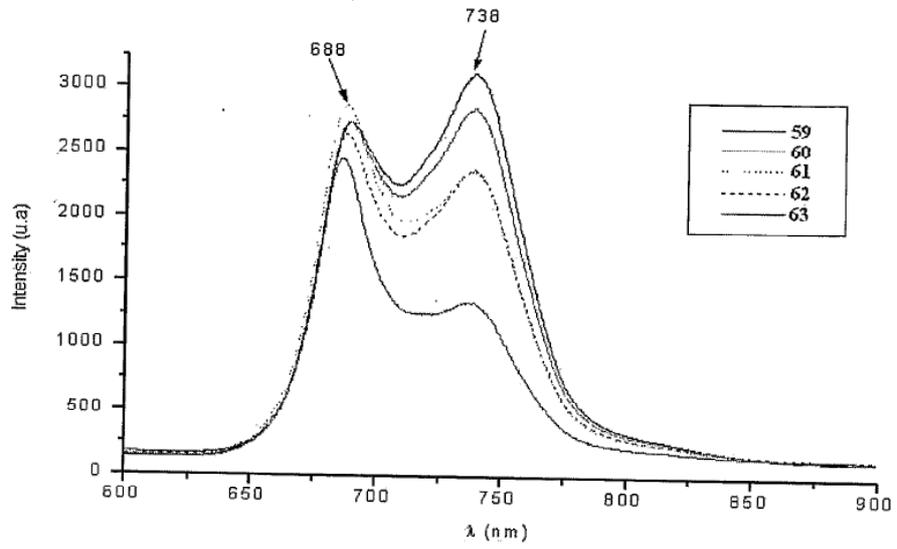


Fig. 6

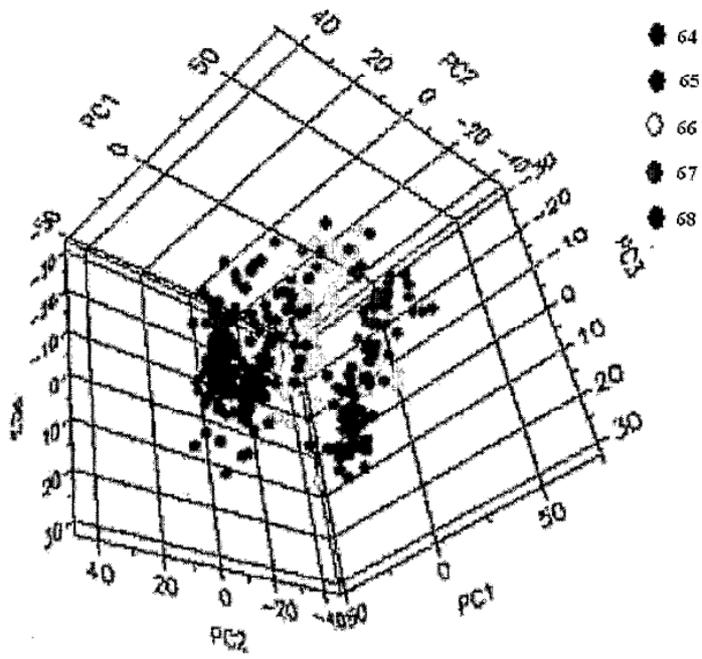


Fig. 7