



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

HANNA IBIAPINA DE JESUS

**IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var.
cephalosporioides EM SEMENTES DE ALGODEIRO USANDO IMAGENS
HIPERESPECTRAIS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

**AREIA
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

HANNA IBIAPINA DE JESUS

**IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var.
cephalosporioides EM SEMENTES DE ALGODOEIRO USANDO IMAGENS
HIPERESPECTRAIS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Agronomia.

Orientadores: Dr^a. Riselane de Lucena Alcantara Bruno
Dr. Everaldo Paulo de Medeiros

**AREIA
2019**

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

J58i Jesus, Hanna Ibiapina de.

Identificação de *Colletotrichum gossypii* e
Colletotrichum gossypii var. *cephalosporioides* em
sementes de algodoeiro usando imagens hiperespectrais
no infravermelho próximo / Hanna Ibiapina de Jesus. -
Areia, 2019.
55 f. : il.

Orientação: Riselane de Lucena Alcântara Bruno.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Antracnose. 2. HSI-NIR. 3. Ramulose. I. Bruno,
Riselane de Lucena Alcântara. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

HANNA IBIAPINA DE JESUS

IDENTIFICAÇÃO DE *Colletotrichum gossypii* E *Colletotrichum gossypii* var.
cephalosporioides EM SEMENTES DE ALGODOEIRO USANDO IMAGENS
HIPERESPECTRAIS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Aprovada em: 16/12/2019

Comissão Examinadora:

Riselane de Lucena Alcântara Bruno
Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – UFPB
Presidente – Orientadora

Everaldo Paulo de Medeiros
Dr. Everaldo Paulo de Medeiros – CNPA EMBRAPA
Orientador

Dr. Alderi Emídio de Araújo
Dr. Alderi Emídio de Araújo – CNPA EMBRAPA
Examinador Externo

Luciana Cordeiro do Nascimento
Dr. Luciana Cordeiro do Nascimento – UFPB
Examinadora interna

*Aos meus pais, Aecio e Marilene, que me inspiraram
e sempre me incentivaram na busca por
conhecimento.*

*Ao meu esposo, Jordão, que com muito amor e
companheirismo me acompanhou nesta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, pela saúde e pelo fortalecimento diário que me faz enfrentar cada desafio com otimismo e fé.

Aos meus pais, Aécio e Marilene, e minha irmã, Alana, pelo apoio e amor incondicional. Ao meu esposo Jordão pela paciência e compreensão nos momentos difíceis, e por todo o apoio durante essa fase de transição em nossas vidas.

À Dra. Riselane de Lucena Alcantara Bruno pela orientação e por todas as conversas e ensinamentos durante estes quase dois anos, que foram essenciais ao meu crescimento profissional.

Ao meu coorientador, Dr. Everaldo Paulo de Medeiros, pela confiança depositada em mim e por toda a disponibilidade e motivação transmitida que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) da Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade, e à Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo apoio técnico e financeiro para a execução da pesquisa.

Ao pesquisador Wirton Macedo Coutinho pela disponibilidade e prontidão ao longo da realização deste trabalho.

Às equipes dos laboratórios de Tecnologia Química e Fitopatologia da Embrapa Algodão, a quem quero agradecer em especial à Joabson Borges, Edijane dos Anjos e Jacilane Fernandes pela cooperação e apoio técnico.

Aos membros da banca, Dr. Alderi Emídio e Dra. Luciana Cordeiro, pela disponibilidade e prontidão em participar desta defesa.

Aos amigos do PPGA que me acolheram na Paraíba durante estes quase dois anos; e aqueles amigos que, mesmo longe, se fazem presentes em minha vida.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, deixo o meu agradecimento!

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 A cultura do algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	13
3.2 Ramulose e antracnose do algodoeiro	14
3.3 Identificação de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em sementes	17
3.4 Imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e suas aplicações	18
3.5 Análise Multivariada de Imagem	21
3.5.1 Pré-processamento de imagens hiperespectrais.....	22
3.5.2 Análise de Componentes Principais (PCA).....	23
3.5.3 PLS-DA	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
MANUSCRITO: HSI-NIR na identificação de <i>Colletotrichum gossypii</i> e <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em sementes de algodoeiro	35
RESUMO.....	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Local de realização do experimento	37
2.2 Isolados fúngicos	37
2.3 Inoculação das sementes de algodoeiro.....	38
2.4 Teste de sanidade	39
2.5 Aquisição das imagens hiperespectrais.....	39

2.6 Análise multivariada.....	40
2.6.1 Análise de componentes principais (PCA)	40
2.6.2 Análise PLS-DA	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4. CONCLUSÃO.....	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE A– Mapas de previsão das amostras de validação externa	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Algodoeiro com sintomas de ramulose causada pelo fungo <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> . A. Mancha estrela; B. Lesão inicial com enrugamento da superfície da folha; C. Morte do meristema apical; D-E. Desenvolvimento anormal de brotos laterais e envassouramento da planta.....	15
Figura 2. Algodoeiro com sintomas de antracnose nas folhas, causada pelo fungo <i>C. gossypii</i> . A. Lesões iniciais na superfície das folhas; B. Enrugamento na borda das folhas.....	16
Figura 3. Matriz de dados de imagens em escala de cinza (A), em RGB (B) e hiperespectrais (C).....	19
Figura 4. Estrutura tridimensional de um hipercubo e demonstração do seu desdobramento	20
Figura 5. Esquema de construção de um modelo PLS-DA	25

MANUSCRITO: HSI-NIR na identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro

Figura 1. Análise de componentes principais (PCA) para investigar a variabilidade dentro das espécies fúngicas <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> . Amostras contaminadas com isolados de <i>C. gossypii</i> (A); Amostras contaminadas com isolados de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> (B)	42
Figura 2. Espectros completos (A) e espectro médio por isolado (B) de esporulações de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em sementes de algodoeiro.....	43
Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) para investigar diferenças entre as espécies <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em sementes de algodoeiro	44

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO: HSI-NIR na identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro

Tabela 1. Isolados de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> utilizados na inoculação das sementes de algodoeiro para identificação das espécies fúngicas a partir de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo	38
Tabela 2. Taxa de classificação por pixels do conjunto de validação do modelo PLS-DA	45
Tabela 3. Resultado da classificação por pixels das amostras do conjunto externo de validação com modelo PLS-DA	45

JESUS, H. I. **Identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro usando imagens hiperespectrais no infravermelho próximo.** Areia -PB, 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

O Brasil tem se consolidado no mercado internacional como um dos principais produtores e exportadores mundiais de fibra de algodão. Apesar do bom desempenho do setor, problemas fitossanitários, em particular, se configuraram como um grande entrave, em que um dos principais meios de dispersão de patógenos ocorre por sementes contaminadas. Problemas metodológicos na detecção e diferenciação das espécies fúngicas *Colletotrichum gossypii* (CG) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC) em sementes de algodoeiro têm sido objeto de pesquisas, pois a similaridade das estruturas morfológicas das espécies, geram resultados ambíguos que contribuem para a comercialização de sementes contaminadas. Neste contexto, objetivou-se com este estudo desenvolver uma metodologia para classificação de CG e CGC em sementes de algodoeiro, utilizando imagens hiperespectrais no infravermelho próximo (HSI-NIR), associadas à análise multivariada de dados. Para tanto, sementes de algodoeiro da cultivar BRS 286 foram contaminadas com 5 isolados de CG e 15 isolados de CGC e submetidas ao teste de sanidade, por meio do método *Blotter test*. Após o período de incubação foram adquiridas imagens hiperespectrais das sementes. Os espectros na faixa de 1000 a 2500 nm foram pré-processados com derivativa Savitzky-Golay de primeira ordem. Uma análise exploratória do conjunto de dados foi executada utilizando uma PCA, realizando-se, posteriormente, a classificação das amostras a partir do desenvolvimento de um modelo PLS-DA, o qual obteve 86,5% de acerto na classe CG e 81,6% de acerto na classe CGC. Na predição de amostras externas, o percentual de acerto foi variável entre amostras e, possivelmente, tem relação com a variabilidade das espécies. A performance do modelo PLS-DA indica que o método permite a identificação de CG e CGC, entretanto, amostras com alta taxa de erro nas classificações devem ser incluídas no conjunto de calibração, e ajustes na construção do modelo são necessários para aperfeiçoar a identificação das espécies fúngicas em sementes de algodoeiro.

Palavras-chave: antracnose, HSI-NIR, ramulose

JESUS, H. I. Identification of *Colletotrichum gossypii* and *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton seeds using hyperspectral imaging near infrared. Areia -PB, 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba.

ABSTRACT

Brazil is consolidating itself in the international market as one of the world's leading cotton fiber producers and exporters. Despite the good performance, phytosanitary problems, in particular, are a major obstacle, in which one of the main sources of pathogens dispersions are contaminated seeds. Methodological problems in detection and differentiation of the fungal species *Colletotrichum gossypii* (CG) and *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC) in cotton seeds have been subject for researches, because the species morphological structures similarity causes ambiguous results that contributes for commercialization of infected seeds. In this context, this study was aimed to develop a methodology for the classification of CG and CGC in cotton seeds, using hyperspectral imaging near infrared (HSI-NIR) in association with data multivariate analysis. Therefore, cotton seeds of BRS 286 cultivar were contaminated with 5 CG isolates and 15 CGC isolates, and were submitted to seed health testing, using the Blotter test method. After the incubation period, hyperspectral images of the seeds were taken. The spectra in the range between 1000 to 2500 nm were pre-processed with Savitzky-Golay first-order derivative. An exploratory data analysis was executed using a PCA, posteriorly, samples classification was made by the development of a PLS-DA model, which correctly predicted 86.5% of CG class and 81.6% of CGC class. In external samples' prediction, the correct prediction percentage was variable between samples and, possibly, it is related to species variability. The PLS-DA model performance indicates that this method allows CG and CGC identification, however, samples with high rate of misclassification should be included in calibration set, and model construction adjustments are necessary for improvement of the fungal species classification in cotton seeds.

Keywords: Anthracnose, HSI-NIR, ramulosis

1. INTRODUÇÃO

O algodão é uma das principais commodities mundiais. O produto do cultivo do algodoeiro é a fibra, sendo essa a principal matéria-prima da indústria têxtil no mundo; enquanto o seu subproduto, o caroço, é utilizado para extração de óleo, torta e farelo (KOUSER et al., 2015). Apesar do cultivo encontrar-se difundido em mais de 60 países, a produção mundial de algodão está concentrada, principalmente, nos Estados Unidos, China, Índia, Paquistão e Brasil. O Brasil é o quinto maior produtor, com uma área de 1,61 milhão de hectares na safra 2018/2019, que visa atender principalmente a demanda por fibras da indústria têxtil interna e dos países asiáticos. Recentemente, após recorde de exportação de 1,5 milhão de toneladas registrado na safra 2018/2019, o país atingiu ainda um novo patamar no mercado internacional, tornando-se o segundo maior exportador mundial de pluma, atrás apenas dos Estados Unidos (CONAB, 2019).

Considerando a importância socioeconômica da cultura, a produção e controle da qualidade de sementes do algodoeiro são cruciais para garantir o seu bom estabelecimento. Nesse aspecto, padrões de qualidade com abrangência nacional são propostos a fim de assegurar a pureza genética e as qualidades física, fisiológica e sanitária das sementes comercializadas. Problemas fitossanitários se configuram como um grande entrave no cenário agrícola nacional, em que a semente surge como um dos principais meios de dispersão de patógenos; a exemplo dos agentes causais da ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) e da antracnose (*Colletotrichum gossypii*), que são disseminados no campo a partir de sementes infectadas e podem colocar em risco o êxito da atividade agrícola (SILVA-MANN et al., 2005; BRUNETTA; BRUNETTA; FREIRE, 2007).

Em relação às doenças, sabe-se que o agente causal da ramulose, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, causa a morte do meristema apical do algodoeiro e induz o brotamento lateral anormal nos ramos afetados (KIRKPATRICK; ROTHROCK, 2001); enquanto *C. gossypii*, agente etiológico da antracnose, causa tombamento e morte de plântulas de algodoeiro, além de lesões nas hastes, folhas e capulhos (SOUTHWORTH, 1891). Apesar de se tratar de patologias distintas, os agentes etiológicos da ramulose e da antracnose do algodoeiro foram descritos como morfologicamente idênticos por Bailey et al. (1996). Entretanto, Costa e Fraga Júnior (1939) consideraram *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, inicialmente, uma forma mais agressiva de *C. gossypii*. Posteriormente, tal hipótese foi contestada por Salustiano et al. (2014) por meio de análise filogenética, ao destacarem os agentes causais da ramulose e antracnose do algodoeiro como patógenos distintos, sendo,

inclusive, sugerida a inserção desses fungos no complexo de espécies pertencentes à *Colletotrichum gloeosporioides*.

Diferente da antracnose do algodoeiro, que atualmente é considerada uma doença secundária, a ramulose é uma das principais doenças da cultura no país, cuja ocorrência também foi registrada no Paraguai, Venezuela e Colômbia (COSTA; FRAGA JÚNIOR, 1937; MATHIESON; MANGANO, 1985; MALAGUTTI, 1955; MORENO-MORAN; BURBANO-FIGUEROA, 2016). Por representar elevado risco econômico à cultura do algodoeiro, a ramulose tem importância quarentenária, não sendo admitida a presença do patógeno da doença em lotes de sementes comerciais, conforme estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2009).

Testes de sanidade são rotineiramente utilizados para a detecção de patógenos em sementes de algodoeiro. No entanto, são testes baseados em características morfológicas e fisiológicas e, portanto, não possibilitam uma identificação confiável de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, podendo contribuir para a comercialização de sementes contaminadas, bem como a condenação de lotes de sementes sadias. Por outro lado, a utilização de técnicas moleculares tem se mostrado bastante promissora na diferenciação de diversos fungos patogênicos, incluindo as espécies *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (SILVA-MANN et al., 2002; 2005; AIRES et al., 2018), entretanto, são técnicas complexas, lentas e de custo elevado. Com isso, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos de detecção que preencham os requisitos de maior precisão, rapidez e baixo custo.

Além dos métodos morfológicos e moleculares, várias técnicas não destrutivas, como visão computacional, espectroscopia, imagem hiperespectral e raio X têm sido utilizadas na análise de sementes (RAHMAN; CHO, 2016). Dentre estas, a tecnologia de imagem hiperespectral de infravermelho próximo (HSI-NIR) surge como uma excelente alternativa na identificação de patógenos em sementes com maior rapidez e menor custo, quando comparada com métodos baseados em DNA (GOWEN et al., 2015). A técnica se baseia na identificação de ligações químicas a partir das suas vibrações moleculares, e na obtenção de espectros de uma série de compostos, na forma de uma imagem digitalizada em diferentes camadas ou camadas múltiplas, formando uma estrutura tridimensional de um cubo, com informações espaciais no plano x e y, enquanto o eixo z corresponde à camada associada ao único comprimento de onda espectral (LORENTE et al., 2012; WU; SUN, 2013). Uma imagem hiperespectral gera informações com alta complexidade, e o seu tratamento requer o uso de métodos de análise multivariados para reconhecimento padrão e classificação, que podem ser

determinantes na detecção de características específicas dentro de uma amostra, permitindo a sua identificação ou separação (QIN, 2010).

Na agricultura, tecnologias utilizando imagens hiperespectrais estão sendo empregadas com êxito na detecção e quantificação de micotoxinas em diversos produtos agrícolas, assim como na constatação de doenças fúngicas em espécies como milho e trigo (MOSHOU et al., 2011; TAO et al., 2018; WU; XIE; XU, 2018; FEMENIAS et al., 2019). Além disso, Aires et al. (2018) combinando a tecnologia HSI-NIR com estratégias de tratamento de dados obtiveram sucesso na identificação e separação de isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* crescidos em meio de cultura. Neste contexto, a técnica HSI-NIR possibilita a sua aplicação para a diferenciação de fungos com características morfológicas similares em sementes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia para classificação de sementes contaminadas com as espécies fúngicas *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, utilizando imagens hiperespectrais no infravermelho próximo (HSI-NIR).

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar características espectrais que permitam a diferenciação interespecífica dos patógenos *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.
- Estabelecer um método rápido e preciso na detecção de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes individuais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das espécies cultivadas mais antigas e está entre as culturas de fibra de maior importância no mundo. Mesmo com o crescimento das fibras sintéticas, o algodão é a fibra natural mais utilizada na indústria têxtil e ainda tem um amplo

espaço no mercado das *commodities* agrícolas (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Além disso, o caroço do algodão é fonte de energia, fibra e proteína de qualidade. O óleo extraído representa uma alternativa importante para a produção de biodiesel e, na ausência do gossipol, também serve como matéria-prima na indústria alimentícia; enquanto os resíduos da extração do óleo, como a torta e farelo, são aproveitados na alimentação animal (ALVES et al., 2008).

Atualmente, estima-se que a produção de pluma de algodão no mundo seja de aproximadamente 26 milhões de toneladas (USDA, 2019). O Brasil destaca-se nas posições de quinto maior produtor e segundo maior exportador mundial, e foi responsável pela produção, na safra 2018/2019, de cerca de 2,66 milhões de toneladas de pluma, um crescimento de 32,6% em relação ao produzido na safra anterior. Neste cenário, as regiões Centro-Oeste e Nordeste concentram juntas mais de 90% da produção nacional (CONAB, 2019).

Com um mercado internacional promissor e o aumento expressivo em área plantada, os produtores demandam cada vez mais por tecnologias e insumos de qualidade que possam garantir a aceitação do produto frente ao mercado. Logo, a qualidade da semente é um dos mais importantes fatores atrelados ao sistema de produção, pois além de ser responsável por transmitir as características agronômicas ao campo, a semente é o principal meio de propagação de diversos patógenos considerados de riscos dentro do país ou entre países produtores, como é o caso do agente etiológico da ramulose do algodoeiro, o fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (ARAUJO et al., 2009).

3.2 Ramulose e antracnose do algodoeiro

A ramulose do algodoeiro, causada pelo fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, é uma doença com ocorrência restrita à América do Sul. A mesma foi descrita pela primeira vez no Brasil por Costa e Fraga Júnior em 1937 e, atualmente, está presente nas principais regiões produtoras de algodão do país, contudo, sem causar danos significativos à cultura*. A doença afeta as plantas em qualquer fase de desenvolvimento, sendo os sintomas observados principalmente em tecidos jovens. Inicialmente, há a formação de manchas necróticas circulares nas folhas jovens que se desenvolvem, formando perfurações nas lâminas foliares (mancha estrela). O desenvolvimento desigual dos tecidos foliares causa o enrugamento da superfície. Em estágios avançados da doença, o fungo atinge também o meristema apical da planta, paralisando o crescimento do ramo afetado e causando a sua necrose, o que induz o

* Comunicação pessoal de Wirton Macedo Coutinho, em 30 de outubro de 2019.

desenvolvimento anormal de brotos laterais. Como resultado, há o envassouramento da planta, com encurtamento dos entrenós e redução do seu crescimento (Figura 1); além disso, o gasto de energia para o crescimento vegetativo, em resposta ao desenvolvimento sucessivo de brotos laterais, acaba por exaurir completamente a planta para finalidade de frutificação (CIA; SALGADO, 1997; ARAUJO; SUASSUNA, 2003; SALUSTIANO et al., 2014).

Figura 1. Algodoeiro com sintomas de ramulose causada pelo fungo *C. gossypii var. cephalosporioides*. **A.** Mancha estrela; **B.** Lesão inicial com enrugamento da superfície da folha; **C.** Morte do meristema apical; **D-E.** Desenvolvimento anormal de brotos laterais e envassouramento da planta

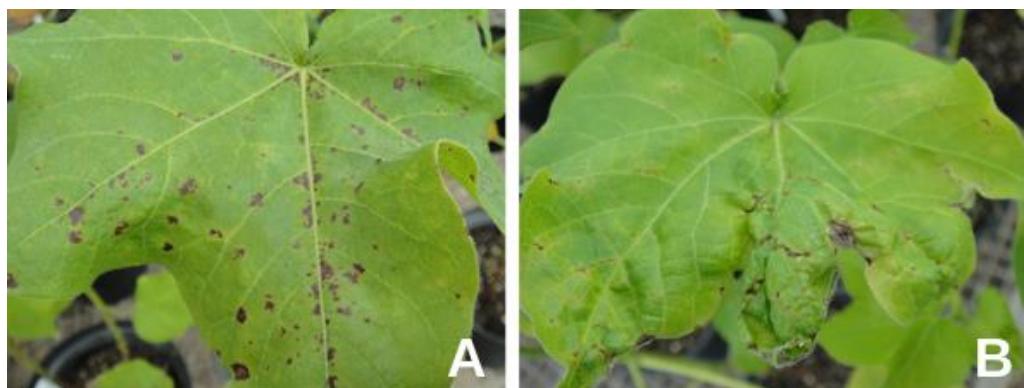


Fotos: Wirton Macedo Coutinho

A antracnose em plantas de algodoeiro, por sua vez, foi descrita pela primeira vez em 1891 nos Estados Unidos, e hoje está disseminada em todas as áreas produtoras de algodão no mundo (ATKINSON, 1891; SOUTHWORTH, 1891). A doença é causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii*, com sintomas que podem ocorrer em qualquer parte da planta, desde a sua fase inicial até a fase adulta. Nos primeiros 35 dias de estabelecimento da cultura, *C. gossypii* pode causar lesões de coloração pardo-avermelhadas a pardo-escuras nas raízes e no colo de plântulas de algodoeiro, com consequente tombamento e morte das mesmas; já na fase adulta dessas plantas, *C. gossypii* pode causar lesões necróticas nas folhas e nos capulhos. No

Brasil, *C. gossypii* ocorre no final do ciclo vegetativo do algodoeiro, com importância secundária para essa cultura (Figura 2) (KIRKPATRICK; ROTHROCK, 2001; SILVA-MANN et al., 2005).

Figura 2. Algodoeiro com sintomas de antracnose nas folhas, causada pelo fungo *C. gossypii*. **A.** Lesões iniciais na superfície das folhas; **B.** Enrugamento na borda das folhas



Fotos: Wirton Macedo Coutinho

Tanto *C. gossypii* quanto *C. gossypii* var. *cephalosporioides* são transmitidos da semente à planta adulta do algodoeiro. Durante muito tempo, acreditou-se que *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* tratavam-se da mesma espécie (COSTA; FRAGA JÚNIOR., 1939). A utilização de métodos moleculares para separar essas duas espécies foi inicialmente proposta por Silva-Mann et al. (2002; 2005); no entanto, de acordo com Hyde et al. (2009) não existem caracteres morfológicos ou moleculares consistentes para diferenciá-los. Posteriormente, Salustiano et al. (2014) elucidaram, por meio de análises filogenéticas, que a ramulose e a antracnose do algodoeiro são causadas por patógenos distintos, porém intimamente relacionados. Segundo esses autores, *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* são membros pertencentes ao complexo de espécies *C. gloesporioides*, reconhecido pelas dificuldades em torno da sistemática do grupo, devido às características morfológicas pouco variáveis entre as espécies, o que torna os limites de separação ambíguos (CAI et al., 2009; WEIR, et al., 2012).

No contexto da patologia de sementes, ainda que ambos os patógenos estejam relacionados com doenças que afetam a cultura do algodoeiro, a espécie *C. gossypii* var. *cephalosporioides* reúne maior atenção em virtude do impacto que ocasiona na produção. Desse modo, a similaridade das estruturas de ambos os fungos, que acaba por não permitir a sua

identificação em sementes por métodos convencionais, tem sido objeto de pesquisas sobre a sua identificação inequívoca (AIRES et al., 2018).

3.3 Identificação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes

A avaliação da sanidade das sementes é um importante componente nos programas de controle de qualidade, destinados a garantir um desempenho satisfatório da cultura no campo. Para tanto, o método empregado na análise deve assegurar informações confiáveis sobre a qualidade sanitária da semente destinada à semeadura e/ou aos serviços de quarentena (MUNIZ et al., 2004; HENNING, 2005). De modo geral, as técnicas para detecção e classificação de microrganismos devem, antes de tudo, permitir a identificação do patógeno de interesse, de forma precisa, sendo também, importante preencher alguns requisitos, como facilidade de operação, rapidez na disponibilidade dos resultados e custos dentro de limites aceitáveis (TAYLOR, et al., 2001).

Diversos procedimentos laboratoriais atendem às exigências necessárias e podem ser utilizados para a classificação taxonômica ou identificação de microrganismos em sementes. Os testes de sanidade são baseados em métodos descritos pela International Seed Testing Association (ISTA), e utilizam procedimentos variados a partir da análise de colônias, exames microscópicos, bem como testes bioquímicos e fisiológicos (ISTA, 1981). Em sua maioria, os métodos empregados nas análises de rotina laboratoriais utilizam a incubação de sementes para estimular a produção de estruturas típicas de cada fungo sobre as mesmas ou ao seu redor, de modo que a identificação da espécie seja possível por meio de observações das características morfológicas e fisiológicas destes microrganismos (NEERGAARD, 1979; KHARE, 1996).

Por outro lado, ainda que os métodos recomendados para análise sanitária de sementes sejam comumente empregados, pode-se dizer que o seu nível de especialização ainda é deficiente na detecção de um grande número de espécies de patógenos, sobretudo ao considerar a diferenciação entre patógenos com características muito próximas, como é o caso das espécies do complexo *Colletotrichum* em sementes de algodoeiro (SILVA-MANN et al., 2002; 2005).

Na avaliação sanitária de sementes de algodoeiro, o principal método empregado em análises de rotina é o do papel de filtro ou *blotter test*, que se baseia na observação das estruturas fúngicas crescidas sobre as sementes, seguida da sua identificação morfológica ou ainda da observação de sintomas nas plântulas (NEERGAARD, 1979; BRASIL, 1992). Contudo, na identificação das espécies *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro, as estruturas fúngicas, como formato e dimensões de conídios e coloração da

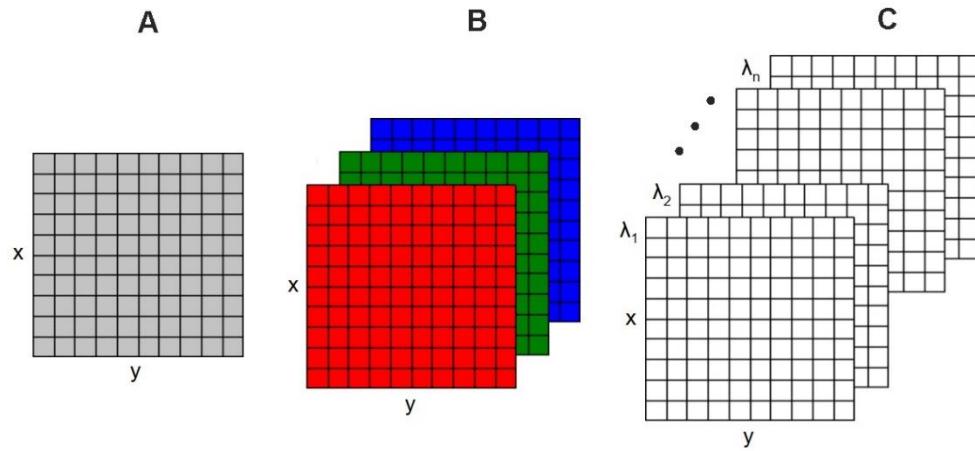
colônia, são muito variáveis, o que dificulta o reconhecimento de características particulares a cada uma das espécies (CARVALHO; VIEIRA; MACHADO, 1997; ROCA, et al., 2004). Com a ineficiência dos métodos tradicionais, a diferenciação entre os agentes causais da ramulose e antracnose do algodoeiro baseou-se principalmente no uso de marcadores moleculares, os quais têm demonstrado alta sensibilidade na distinção entre os fungos. Entretanto, são técnicas relativamente complicadas, laboriosas e de custo elevado, que podem inviabilizar o teste de sanidade economicamente (SILVA-MANN et al., 2002; SALUSTIANO, et al., 2014; AIRES et al., 2018).

Diante dos problemas metodológicos na detecção e diferenciação das espécies *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de métodos e aplicações de técnicas eficazes para uso nos laboratórios de patologia de sementes como testes de rotina. O desenvolvimento de técnicas no campo da análise espectral têm crescido substancialmente e surge como uma possibilidade dentro da patologia de sementes, pois poderá permitir a organização de um banco de dados com o(s) perfil(s) de cada espécie identificada, possibilitando a posterior identificação de isolados com base neste banco de dados (SINGH et al., 2012).

3.4 Imagens hiperespectrais no infravermelho próximo e suas aplicações

Imagens digitais são representações espaciais, onde o menor elemento espacial formador de uma imagem é o pixel (para imagens com duas dimensões espaciais) ou o voxel (para imagens com três dimensões espaciais). Cada pequena porção da imagem está determinada por coordenadas espaciais (x e y, para os pixels e x, y e z, para os voxels), além de uma dimensão adicional associada a cada pixel individualmente. Quando a imagem está representada na escala de cinza, tem-se uma matriz de dados bidimensional e cada pixel está associado a um único valor de intensidade na escala de cinza; enquanto que para as imagens RGB (formadas a partir dos canais das cores vermelha, verde e azul) tem-se uma matriz de dados tridimensional, e cada pixel terá três valores de intensidade, um para cada canal. Nas imagens multiespectrais e hiperespectrais, cada pixel contém um espectro específico dessa região, de modo que a quantidade de valores associados a cada pixel irá depender da quantidade de canais espectrais (Figura 3); em geral, considera-se que as imagens hiperespectrais são aquelas que apresentam mais de 100 canais de espectros (DE JUAN et al., 2005; PRATS-MONTALBÁN et al., 2011).

Figura 3. Matriz de dados de imagens em escala de cinza (A), em RGB (B) e hiperespectrais (C)



Fonte: da autora

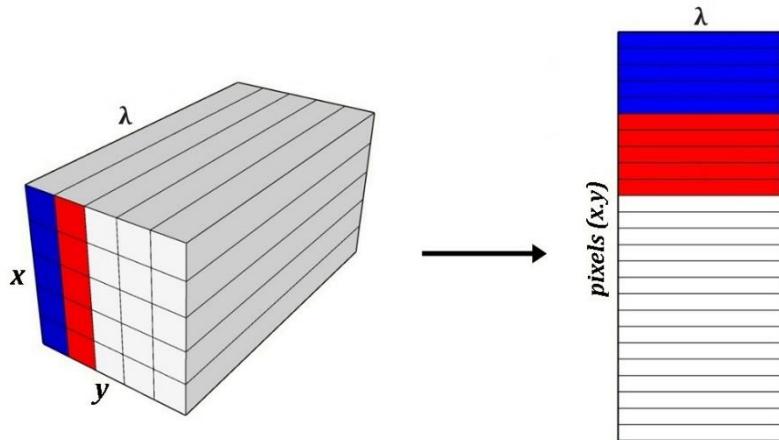
As informações espectrais armazenadas nessas imagens podem ser obtidas a partir de diversas técnicas analíticas, sendo as técnicas de Raman e de Infravermelho, geralmente, as mais informativas. Câmeras de imagens na região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*) são capazes de adquirir imagens digitais de alta resolução. A espectroscopia na região NIR é o tipo de espectroscopia vibracional que corresponde à faixa de comprimentos de onda de 750 – 2500 nm. Nessa região, são observadas principalmente vibrações de ligações de –CH, –OH, –SH e –NH (ROGGO et al., 2007).

As imagens hiperespectrais podem ser definidas como estruturas tridimensionais (hipercubos) formadas por um plano espacial (x - y) e uma dimensão referente ao comprimento de onda (λ) (BURGER; GOWEN, 2011a). Logo, o hipercubo de uma HSI-NIR compreende centenas de espectros distribuídos por toda a área mensurada, comportando-se como uma impressão digital, que pode ser usada para caracterizar cada pixel individualmente. Desse modo, é possível obter-se informações locais sobre a composição, bem como sobre a distribuição dos componentes de uma dada amostra, já que regiões com propriedades espectrais semelhantes apresentam composição química semelhante (BURGER; GELADI, 2005).

Para ser analisada, a imagem hiperespectral precisa passar por um processo de desdobramento do hipercubo, resultando em uma complexa matriz de dados de duas dimensões, no qual as linhas correspondem aos espectros relacionados aos diferentes pixels, conforme representado na Figura 4 (DE JUAN et al., 2005). Após o desdobramento, é fundamental que a matriz de dados seja submetida a técnicas quimiométricas adequadas para facilitar a visualização de informações seletivas e de maior importância na análise. As metodologias

utilizadas neste campo são denominadas análise multivariada de imagem, e incluem métodos aplicados em conjuntos de dados multi ou hiperespectrais, adaptados para utilização em imagens. Além disso, técnicas de pré-processamento podem ser aplicadas para corrigir ou minimizar problemas decorrentes da aquisição de imagens (GOWEN, et al., 2007; GRAHN; GELADI, 2007).

Figura 4. Estrutura tridimensional de um hipercubo e demonstração do seu desdobramento



Fonte: da autora

A espectroscopia de imagem hiperespectral foi introduzida na década de 70 e, inicialmente, suas aplicações eram limitadas ao sensoriamento remoto (GOETZ et al., 1985). Apenas a partir dos anos 90, a espectroscopia de imagem hiperespectral começou a ser aplicada em diversas áreas de conhecimento, como pesquisas farmacêuticas, controle de qualidade de alimentos, ciência forense, agricultura e medicina (AMIGO et al., 2008; LORENTE et al., 2012; FERNÁNDEZ DE LA OSSA, et al., 2014; LU; FEI, 2014).

Sistemas de imagens hiperespectrais ou, mais especificamente, a tecnologia de imagem hiperespectral de infravermelho próximo, promete tornar-se uma das técnicas mais poderosas no fornecimento de informações espectrais de alta qualidade em superfícies. Claramente, a natureza não-destrutiva, robusta e flexível da imagem hiperespectral traz grandes perspectivas em torno da tecnologia para as mais diversas finalidades (DALE et al., 2013; AMIGO et al., 2015).

Na agricultura, as aplicações da espectroscopia de imagens hiperespectrais são vastas, incluindo o uso de sistemas de satélites para o mapeamento de áreas, com resultados significativos obtidos a partir do monitoramento do crescimento vegetal e estimativas do

potencial fotossintético de espécies agrícolas (BROGE; LEBLANC, 2001; TEKE et al., 2013). Sistemas de imagens hiperespectrais em drones ou em base terrestre no campo também são utilizados com sucesso para estimar produtividade, estresse hídrico, atributos bioquímicos e no monitoramento de plantas daninhas e doenças em áreas agrícolas (RASCHER, 2007; PENGRA; JOHNSTON; LOVELAND, 2007; YANG, 2009). Além disso, em escala de laboratório, o uso dessa tecnologia é bastante promissor para a automação de procedimentos de diagnósticos rápidos, com necessidades de preservação da constituição da amostra. Sistemas HSI-NIR têm sido utilizados para diversos fins qualitativos, desde a análise de componentes específicos em produtos agrícolas, monitoramento de qualidade e a detecção de doenças e injúrias em frutos e vegetais (WANG; ELMASRY, 2010; GÓMEZ-SANCHIS et al., 2012); além de diversas aplicações quantitativas, tais como a determinação de índices bioquímicos como parâmetros de qualidade, e a quantificação ou detecção de contaminantes químicos, microbianos ou biológicos em produtos agrícolas (GOWEN et al., 2007; DEL FIORE et al., 2010; JIANG et al., 2015).

3.5 Análise Multivariada de Imagem

A Análise Multivariada de Imagem surgiu no final dos anos 1980 como uma adaptação da análise multivariada clássica para lidar com imagens com mais de uma medida por pixel (GELADI, 1989). Ao contrário das técnicas utilizadas até então, que estudavam as imagens como um todo, a análise multivariada de imagem permite que os pixels sejam analisados como amostras individuais. Com as imagens multiespectrais e hiperespectrais, essa nova abordagem traz informações relacionadas a cada pixel da imagem, tornando-a de fundamental importância. Além de fornecer novas percepções sobre as informações espaciais e espectrais de determinada amostra, a análise multivariada de imagem tem se constituído em uma forte ferramenta de classificação, segmentação, previsão, além de outras finalidades. Logo, dependendo do objetivo da análise, diferentes procedimentos podem ser aplicados (PRATS-MONTALBÁN et al., 2011; AMIGO et al., 2015).

De modo geral, a análise de imagens hiperespectrais busca correlacionar as características individuais da amostra estudada com propriedades espectrais de interesse. Para tal, há duas etapas principais na análise do hipercubo: 1. O pré-processamento, a fim de eliminar artefatos indesejáveis para a análise da imagem, tais como pixels anômalos, comprimentos de onda ruidosos ou áreas da amostra que são indesejadas e, 2. O processamento do hipercubo, que está

ligado diretamente à aplicação de modelos multivariados para a análise dos dados (AMIGO, et al., 2013).

3.5.1 Pré-processamento de imagens hiperespectrais

Com a geração de uma grande quantidade de dados a partir de uma imagem espectral, o uso da análise multivariada de imagem tornou-se indispensável. Entretanto, tratando-se de uma medida espectroscópica, é comum a ocorrência de perturbações relacionadas à captura de medidas, como um alto nível de ruído, variações de linha de base ou a existência de pixels com espectros anômalos (pixel morto ou *outlier*). Desse modo, é fundamental submeter os espectros a determinadas técnicas de pré-processamento antes da análise propriamente dita, a fim de evitar ou minimizar a influência de fenômenos indesejados, bem como destacar diferenças relevantes para posterior análise (DE JUAN et al., 2009; SACRÉ et al., 2014; AMIGO et al., 2015). Existem diversas técnicas disponíveis para o pré-processamento de espectros. A escolha do método ou combinação de métodos requer cuidado e depende das diferentes propriedades dos dados e dos objetivos da análise, sendo possível empregar técnicas utilizadas na análise multivariada clássica. Normalmente, diferentes pré-processamentos são testados e os seus resultados comparados, para garantir uma análise correta e resultados robustos (VIDAL; AMIGO, 2012; ENGEL et al., 2013).

Para remover a influência do ruído instrumental no espectro normalmente são empregados métodos de suavização, em que o algoritmo baseado no filtro Savitzky-Golay é um dos mais utilizados. Nele, faz-se um alisamento por todo o espectro a partir de um polinômio ajustado a uma janela ou intervalo de pontos simétrico do espectro, e o valor do ponto central dessa janela é substituído pelo valor do polinômio ajustado. A janela se move e o valor do polinômio é calculado no novo centro; esse processo se repete por todas as janelas para promover o alisamento do espectro completo. É fundamental encontrar a melhor combinação de parâmetros para otimizar o filtro Savitzky-Golay, especialmente o tamanho da janela. Com janelas muito pequenas a remoção do ruído é menor e com janelas muito grandes, apesar do decréscimo do ruído, existe o risco de perda de informações espetrais importantes que podem estar presentes em bandas estreitas (VIDAL; AMIGO, 2012; AMIGO et al., 2015).

Além do ruído instrumental, os diferentes artefatos que um espectro pode apresentar dependem do tipo da radiação utilizada. O espectro do NIR normalmente é afetado pelo espalhamento de luz, podendo haver um deslocamento constante da linha de base. Esse desvio pode ser corrigido por métodos como variação normal padrão (SNV, do inglês *standard normal*

variate), correção do espalhamento multiplicativo (MSC, do inglês *multiplicative scatter correction*) e derivadas sobre os dados espectrais. O SNV é um método que subtrai o espectro médio de cada variável espectral e, subsequentemente, divide esse valor pelo desvio padrão do espectro, isto é, a constante de dispersão estimada. Alternativamente, a técnica MSC visa estimar o coeficiente que descreve a dispersão a partir de uma regressão de cada espectro em um espectro de referência, que normalmente é o espectro médio ou mediano. Normalmente, os pré-processamentos MSC e SNV fornecem resultados similares (FEARN et al., 2009; ENGEL et al., 2013). Transformações derivativas também podem ser utilizadas para correção espectral. A primeira derivada remove efeitos constantes sobre a linha de base, enquanto a segunda derivada remove, além dos efeitos constantes, tendências lineares. A derivação por Savitzky-Golay, que também inclui uma etapa de suavização, é comumente empregada para fins de correção de linha de base e para aumentar diferenças entre espectros que podem ser úteis para fins qualitativos (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009; SACRÉ et al., 2014).

Uma etapa muito importante de pré-processamento e que, normalmente, é aplicada ao banco de dados é a seleção da região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*). A seleção da ROI pode ser muito favorável para remover espectros indesejados de background ou manter apenas uma parte específica da amostra que contenha informações de relevância para a análise. A seleção de uma parte específica da imagem pode ser feita manualmente, a partir de histogramas ou através de valores limites na imagem dos escores da PCA (SACRÉ et al., 2014; VIDAL; AMIGO, 2012). Além disso, muitas vezes um espectro NIR completo pode conter dados redundantes e repetitivos, sendo comum a seleção de comprimentos de onda para uma boa performance da análise (XIAOBO et al., 2010).

3.5.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Conforme destacado anteriormente, um problema relacionado ao tratamento de imagens que carregam informações espectrais é a quantidade massiva de dados gerados a partir de uma única imagem. Neste contexto, a análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal components analysis*) é o principal método utilizado para reduzir a dimensionalidade da matriz de dados conservando as informações relevantes. A PCA permite a extração de informações sobre as principais fontes de variabilidade na amostra e a visualização da distribuição espacial dos elementos em uma única imagem, sendo elementar na análise de imagem antes da aplicação de qualquer outro modelo multivariado (AMIGO; MARTÍ; GOWEN, 2013; JOLLIFFE;

CADIMA, 2016). A PCA decompõe a matriz original em um modelo bilinear, que segue a Equação 1.

$$X = T \cdot P + E \quad (1)$$

Nesse novo modelo, a matriz T (escores) indica as coordenadas dos pixels no novo sistema de eixos; a matriz P (pesos ou *loadings*) representa a importância de cada variável na variância dos dados; e a matriz E refere-se aos erros associados ao modelo. O objetivo é expressar as principais informações contidas nas variáveis originais em um número menor de variáveis, que são denominadas componentes principais (PCs, do inglês *Principal Components*) (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; BORRÀS et al., 2014).

As PCs são as representações dos novos eixos, formados a partir de combinações lineares das variáveis originais, e descrevem as principais fontes de variação nos dados. Depois da aplicação da PCA, é possível obter uma imagem de escores para cada componente principal, por meio da qual se identifica a contribuição individual para cada componente do hipercubo original. As PCs são ortogonais umas às outras, e classificadas de tal forma que as primeiras retêm a maior parte da variação presente em todas as variáveis originais (AMIGO; MARTÍ; GOWEN, 2013; CHEVALLIER et al., 2006). Desse modo, as novas imagens irão preservar as informações de maior relevância na amostra e a dimensionalidade do conjunto de dados será consideravelmente menor, pois são necessárias poucas componentes para explicar toda ou a maior parte da variância dos dados (DE JUAN et al., 2009).

3.5.3 PLS-DA

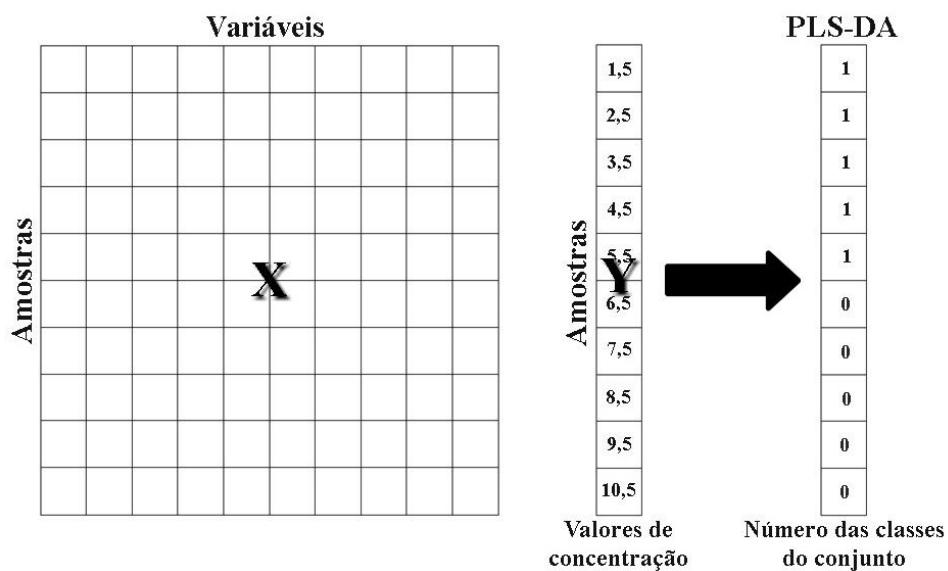
No que diz respeito à análise de imagens, os métodos de segmentação são bastante utilizados, pois permitem a separação de regiões da imagem a partir de uma seleção de pixels similares. Essas semelhanças devem estar associadas às características a serem avaliadas, já que pixels com espectros similares possuem composições químicas ou propriedades biológicas similares. Na prática, a segmentação de imagens organiza pixels em classes. Para isso, os principais objetivos das técnicas consistem em identificar a localização espacial das diferentes classes na imagem e compreender as propriedades das mesmas (PIQUERAS et al., 2011).

Existem diversos métodos de segmentação de imagens, variando na forma de realizar a classificação dos pixels e/ou nos conhecimentos utilizados na implementação do processo. Os

métodos de segmentação podem ser classificados em não-supervisionados, quando a informação prévia dos possíveis grupos ou clusters não está disponível; ou supervisionados, onde o conhecimento prévio sobre os grupos esperados é usado ativamente na construção do modelo. Uma técnica quimiométrica supervisionada frequentemente empregada com fins classificatórios é a Análise Discriminante por Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*) (PRATS-MONTALBÁN et al., 2011; PIQUERAS et al., 2011).

No método de PLS-DA um conjunto de espectros representativos para o estudo em questão é selecionado pelo usuário e denominado como conjunto de calibração, sendo então utilizado para criar modelos de regressão PLS representando as classes no conjunto ou características associadas. O modelo de regressão relaciona variáveis independentes (matriz **X**, que corresponde aos dados espectrais) a um vetor **Y** contendo as classes do conjunto de treinamento, codificadas como números inteiros. Por exemplo, um (1) se a amostra de treinamento pertence a uma determinada classe de interesse, e zero (0) se a amostra pertence a uma classe diferente (Figura 5).

Figura 5. Esquema de construção de um modelo PLS-DA



Fonte: da autora

Desse modo, quando uma amostra desconhecida com determinado perfil espectral é projetada no modelo PLS-DA construído, é possível prever o valor de **Y** dessa amostra no modelo, e assim determinar a classe em que ela será classificada. Este valor deve, necessariamente, estar próximo dos valores usados para codificar as classes (nesse caso, 0 ou

1). É necessário que um valor de corte entre 0 e 1 seja estabelecido, assim, uma amostra com valor de predição acima do valor de corte é atribuída à classe 1, ou caso contrário, é atribuída à classe 0. O método usa o número apropriado de variáveis latentes (ou fatores); que são combinações lineares das variáveis selecionadas inicialmente que maximizam a discriminação entre os grupos (BURGER; GOWEN, 2011b; BORRÁS et al., 2014).

Os eventuais resultados de classificação a partir de um modelo PLS-DA podem ser pseudo-imagens da amostra estudada, no qual cada grupo predito é representado por uma cor simbólica.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, P. S. et al. Near infrared hyperspectral images and pattern recognition techniques used to identify etiological agents of cotton anthracnose and ramulosis. **Journal of Spectral imaging**, v. 7, p. 1-17, 2018.
- ALVES, L. R. A.; BARROS, G. S. C.; BACCHI, M. R. P. Produção e exportação de algodão: efeitos de choques de oferta e de demanda. **Revista Brasileira de Economia**, v. 62, n. 4, p. 381-405, 2008.
- AMIGO, J. M.; BABAMORADI, H.; ELCOROARISTIZABAL, S. Hyperspectral image analysis. A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 896, p. 34-51, 2015.
- AMIGO, J. M. et al. Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 696-713, 2008.
- AMIGO, J. M.; MARTÍ, I.; GOWEN, A. Hyperspectral imaging and chemometrics: a perfect combination for the analysis of food structure, composition and quality. In: MARINI, F. (Ed.). **Data handling in science and technology**. Elsevier, 2013. Cap. 9, p. 343-370.
- ARAÚJO, A. E. D. et al. Efeito de diferentes níveis de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, em plantas de algodão no campo e sua incidência nas sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 310-315, 2009.
- ARAUJO, J. E.; SUASSUNA, N. D. Guia de identificação e controle das principais doenças do algodoeiro no Estado de Goiás. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.
- ATKINSON, G. F. Anthracnose of cotton. **The Journal of Mycology**, p. 173-184, 1891.
- BAILEY, J. A. et al. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, v. 86, n. 10, p. 1076-1083, 1996.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. 1 ed. New York: Wiley & Sons, 1998, 348 p.

BORRÀS, E. et al. Fast and robust discrimination of almonds (*Prunus amygdalus*) with respect to their bitterness by using near infrared and partial least squares-discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 153, p. 15-19, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BROGE, N. H.; LEBLANC, E. Comparing prediction power and stability of broadband and hyperspectral vegetation indices for estimation of green leaf area index and canopy chlorophyll density. **Remote Sensing of Environment**, v. 76, n. 2, p. 156-172, 2001.

BRUNETTA, E.; BRUNETTA, P. S. F.; FREIRE, E. C. Produção de sementes de Algodão. In: FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Abrapa, 2007. Cap. 9, p. 319-343.

BUAINAIN, A. M; BATALHA, M. O. Cadeia produtiva do algodão. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Série Agronegócios**, Brasília, v. 4, 2007.

BURGER, J.; GOWEN, A. Data handling in hyperspectral image analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 108, p. 13-22, 2011a.

BURGER, J. E.; GOWEN, A. A. The interplay of chemometrics and hyperspectral chemical imaging. In: **2011 3rd Workshop on Hyperspectral Image and Signal Processing: Evolution in Remote Sensing (WHISPERS)**. Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2011b.

BURGER, J.; GELADI, P. Hyperspectral NIR image regression part I: calibration and correction. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, v. 19, n. 5-7, p. 355-363, 2005.

CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CARVALHO, D.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Uso de isoenzimas para diferenciação de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* isolados de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p. 315-319, 1997.

CHEVALLIER, S. et al. Application of PLS-DA in multivariate image analysis. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, v. 20, n. 5, p. 221-229, 2006.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. **Fundação MT/Embrapa**, 1997.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos 2018/2019**. v. 6, n. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3042-fechamento-da-safra-2018-2019-aponta-producao-recorde-de-graos-estimada-em-242-1-milhoes-de-t>> Acessado em 25 out. 2019.

COSTA, A. S.; FRAGA JÚNIOR, C. G. Sobre a natureza da ramulose ou superbrotamento do algodoeiro. **Jornal de Agronomia**, v. 2, n. 4, p. 151-160, 1939.

COSTA, A. S.; FRAGA JÚNIOR, C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, v. 7, p. 249-259, 1937.

DALE, L. M. et al. Hyperspectral imaging applications in agriculture and agro-food product quality and safety control: a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 48, n. 2, p. 142-159, 2013.

DE JUAN, A. et al. Chemometric tools for image analysis. **Infrared and Raman Spectroscopic Imaging**, v. 1, p. 65-106, 2009.

DE JUAN, A. et al. Local rank analysis for exploratory spectroscopic image analysis. Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.77, p. 64-74, 2005.

DEL FIORE, A. et al. Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 64-71, 2010.

ENGEL, J. et al. Breaking with trends in pre-processing? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 96-106, 2013.

FEARN, T. et al. On the geometry of SNV and MSC. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 96, n. 1, p. 22-26, 2009.

FEMENIAS, A. et al. Use of hyperspectral imaging as a tool for *Fusarium* and deoxynivalenol risk management in cereals: A review. **Food Control**, v. 108, p. 1-12, 2019.

FERNÁNDEZ DE LA OSSA, M. A. F.; AMIGO, J. M.; GARCÍA-RUIZ, C. Detection of residues from explosive manipulation by near infrared hyperspectral imaging: A promising forensic tool. **Forensic Science International**, v. 242, p. 228-235, 2014.

GELADI, P. Analysis of Multi-Way Data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 7, p. 11–30, 1989.

GOETZ, A. F. et al. Imaging spectrometry for earth remote sensing. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1147-1153, 1985.

GÓMEZ-SANCHIS, J. et al. Detecting rottenness caused by *Penicillium* genus fungi in citrus fruits using machine learning techniques. **Expert Systems with Applications**, v. 39, n. 1, p. 780-785, 2012.

GOWEN, A. A. et al. Hyperspectral imaging - an emerging process analytical tool for food quality and safety control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 12, p. 590-598, 2007.

GOWEN, A. A. et al. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. **Talanta**, v. 137, p. 43-54, 2015.

GRAHN, H. F; GELADI, P (Ed.). **Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2007. 397p.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. 2 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52 p. (Embrapa Soja. Documentos, 264).

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

ISTA - International Seed Testing Association. **Handbook on seed testing**. Zurich: Working sheets, Section 2, 1981.

JIANG, W. et al. Detection of starch content in potato based on hyperspectral imaging technique. **International Journal of Signal Processing, Image Processing and Pattern Recognition**, v. 8, p. 49-58, 2015.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 374, n. 20150202, p. 1-16, 2016.

KHARE, M. N. 1996. Methods to test seeds for associated fungi. **Indian Phytopathology**, v. 49, n. 4, p. 319-328, 1996.

KIRKPATRICK, T. L.; ROTHROCK, C. S. Compendium of cotton diseases. 2 ed. **American Phytopathological Society**, 2001. 77 p.

KOUSER, S.; MAHMOOD, K.; ANWAR, F. Variations in physicochemical attributes of seed oil among different varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 2, p. 723-729, 2015.

LORENTE, D. et al. Recent advances and applications of hyperspectral imaging for fruit and vegetable quality assessment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p. 1121-1142, 2012.

LU, G.; FEI, B. Medical hyperspectral imaging: a review. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, n. 1, 2014.

MALAGUTTI, G. La escobilla del algodón en Venezuela. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 5, n. 2, p. 73-86, 1955.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n 47, de 26 de fevereiro de 2009**. Disponível em: <<https://apps.agr.br/portaria-no-47-de-26-de-fevereiro-de-2009/>> Acesso em 21 jun. 2019.

MATHIESON, J. T.; MANGANO, V. Ramulose, a new cotton disease in Paraguay caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 11, n. 1/2, p.115-118, 1985

MORENO-MORAN, M.; BURBANO-FIGUEROA, O. Dynamics of cotton ramulosis epidemics caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in Colombia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, n. 2, p. 443-454, 2017.

MOSHOU, D. et al. Intelligent multi-sensor system for the detection and treatment of fungal diseases in arable crops. **Biosystems Engineering**, v. 108, n. 4, p. 311-321, 2011.

MUNIZ, M. F. B.; GONÇALVES, N.; GARCIA, D. C.; KULCZYNSKI, S. M. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 144-149, 2004.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. Londres: Macmillan Press, 1979. 1191 p.

PENGRA, B. W.; JOHNSTON, C. A.; LOVELAND, T. R. Mapping an invasive plant, *Phragmites australis*, in coastal wetlands using the EO-1 Hyperion hyperspectral sensor. **Remote Sensing of Environment**, v. 108, n. 1, p. 74-81, 2007.

PIQUERAS, S. et al. Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, n. 1-2, p. 182-192, 2011.

PRATS-MONTALBÁN, J. M.; DE JUAN, A.; FERRER, A. Multivariate image analysis: a review with applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 107, n. 1, p. 1-23, 2011.

QIN, J. Hyperspectral imaging instruments. In: SUN, D. **Hyperspectral imaging for food quality analysis and control**. 2010. Cap. 5, p. 129-172.

RAHMAN, A.; CHO, B. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v. 26, n. 4, p. 285-305, 2016.

RASCHER, U. et al. Monitoring spatio-temporal dynamics of photosynthesis with a portable hyperspectral imaging system. **Photogrammetric Engineering & Remote Sensing**, v. 73, n. 1, p. 45-56, 2007.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

ROCA, M. M. G. et al. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 16-20, 2004.

ROGGO, Y. et al. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 3, p. 683-700, 2007.

SACRÉ, P. Y. et al. Data processing of vibrational chemical imaging for pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 123-140, 2014.

SALUSTIANO, M. E. et al. The etiological agent of cotton ramulosis represents a single phylogenetic lineage within the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 357-367, 2014.

SILVA-MANN, R. et al. AFLP markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 169-172, 2005.

SILVA-MANN, R. et al. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2002.

SINGH, C. B. et al. Fungal damage detection in wheat using short-wave near-infrared hyperspectral and digital colour imaging. **International Journal of Food Properties**, v. 15, n. 1, p. 11-24, 2012.

SOUTHWORTH, E. A. Anthracnose of cotton. **Journal of Mycology**, Washington, v. 6, n.1, p. 100-105, 1891.

TAO, F. et al. Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 65-81, 2018.

TAYLOR, E. et al. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 75-81, 2001.

TEKE, M. et al. A short survey of hyperspectral remote sensing applications in agriculture. In: **2013 6th International Conference on Recent Advances in Space Technologies (RAST)**. IEEE, 2013. p. 171-176.

USDA – United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Cotton: World Markets and Trade Reports.** October 2019. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/cotton-world-markets-and-trade>> Acessado em 30 out. 2019.

VIDAL, M.; AMIGO, J. M. Pre-processing of hyperspectral images. Essential steps before image analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 117, p. 138-148, 2012.

WU, D.; SUN, D. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review- Part I: Fundamentals. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 1-14, 2013.

WU, Q.; XIE, L.; XU, H. Determination of toxigenic fungi and aflatoxins in nuts and dried fruits using imaging and spectroscopic techniques. **Food chemistry**, v. 252, p. 228-242, 2018.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115-180, 2012.

WANG, N.; ELMASRY, G. Bruise detection of apples using hyperspectral imaging. In: SUN, D. (Ed.). **Hyperspectral imaging for food quality analysis and control**. Academic Press, 2010. Cap. 9, p. 295-320.

XIAOBO, Z. et al. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 667, n. 1-2, p. 14-32, 2010.

YANG, C. Airborne hyperspectral imagery for mapping crop yield variability. **Geography Compass**, v. 3, n. 5, p. 1717-1731, 2009.

MANUSCRITO

HSI-NIR na identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro

RESUMO

As sementes são o principal meio de disseminação e transmissão dos patógenos *Colletotrichum gossypii* (CG) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC), agentes causais, respectivamente, da antracnose e ramulose do algodoeiro. Esses fungos possuem características morfológicas similares, o que limita a identificação dessas duas espécies a partir do teste de sanidade de sementes realizado rotineiramente em laboratórios. Neste contexto, este estudo propõe o desenvolvimento de uma metodologia para a identificação de CG e CGC em sementes de algodoeiro, utilizando imagens hiperespectrais de infravermelho próximo (HSI-NIR) associadas à análise quimiométrica de dados. Sementes de algodoeiro da cultivar BRS 286 foram inoculadas com 5 isolados de CG e 15 isolados de CGC e submetidas ao teste de sanidade, por meio do método *Blotter test*, antes da aquisição das imagens hiperespectrais. Os dados espectrais foram pré-processados e uma análise exploratória foi executada utilizando uma PCA. Posteriormente, realizou-se a classificação das amostras a partir do desenvolvimento de um modelo PLS-DA, o qual obteve 86,5% de acerto na classe CG e 81,6% de acerto na classe CGC. Na predição de amostras externas, o percentual de acerto foi variável entre amostras e, possivelmente, tem relação com a variabilidade das espécies. A performance do modelo PLS-DA indica que o método permite a identificação de CG e CGC, entretanto, amostras com alta taxa de erro nas classificações devem ser incluídas no conjunto de calibração, e ajustes na construção do modelo são necessários para aperfeiçoar a identificação das espécies fúngicas em sementes de algodoeiro.

Palavras-chave: Antracnose, ramulose, patologia de sementes

ABSTRACT

Seeds are the main source for dissemination and transmission of *Colletotrichum gossypii* (CG) and *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC) pathogens, causal agents, of cotton anthracnose and ramulosis, respectively. These fungal species have similar

morphological characteristics, which limits species identification by seed health testing commonly used in laboratories. In this context, this study proposes the development of a methodology for CG and CGC identification in cotton seeds, using hyperspectral imaging near infrared (HIS-NIR) in association with data multivariate analysis. Cotton seeds of BRS 286 cultivar were inoculated with 5 CG isolates and 15 CGC isolates, and were submitted to seed health testing, using the Blotter test method, before hyperspectral imaging acquisition. The spectral data were pre-processed, and an exploratory analysis was executed using a PCA. Posteriorly, samples classification was made by the development of a PLS-DA model, which correctly predicted 86.5% of CG class and 81.6% of CGC class. In external samples' prediction, the correct prediction percentage was variable between samples and, possibly, it is related to species variability. The PLS-DA model performance indicates that this method allows CG and CGC identification, however, samples with high rate of misclassification should be included in calibration set, and model construction adjustments are necessary for improvement of the fungal species identification in cotton seeds.

Keywords: Anthracnose, ramulosis, seed pathology

1. INTRODUÇÃO

O algodão é uma das principais commodities mundiais e movimenta, anualmente, cerca de US\$ 12 bilhões (ABRAPA, 2019). Além da sua fibra, que se tornou a principal matéria-prima da indústria têxtil no mundo, o óleo e outros subprodutos extraídos das sementes também são aproveitados para diversos fins.

O cenário da cotonicultura brasileira frente ao mercado mundial tem sido promissor e, nos últimos anos, posicionou o Brasil como o quinto maior produtor e segundo maior exportador mundial de algodão (CONAB, 2019). Considerando a importância socioeconômica da cotonicultura para o Brasil, bem como o potencial de crescimento da atividade no país, a qualidade da semente é um dos mais importantes fatores atrelados ao sistema de produção. Além de ser responsável por transmitir as características agronômicas ao campo, as sementes são o principal meio de disseminação de diversos patógenos que ameaçam a cultura, dentre os quais estão os agentes etiológicos da ramulose e da antracnose do algodoeiro (ARAÚJO et al., 2009; BRUNETTA; BRUNETTA; FREIRE, 2007).

O agente etiológico da ramulose, identificado como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC), causa a formação de manchas necróticas e perfurações nas lâminas

foliares; em estágios avançados da doença, há a morte do meristema apical do algodoeiro e o brotamento lateral anormal nos ramos afetados. A antracnose, por sua vez, é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* (CG) e possui importância secundária para a cultura do algodoeiro no país, com sintomas de tombamento e morte de plântulas, além de lesões nas hastes, folhas e capulhos (KIRKPATRICK; ROTHROCK, 2001). Durante muito tempo, acreditou-se que CG e CGC se tratavam da mesma espécie, pois, apesar de estarem relacionados com doenças fúngicas distintas, possuem características morfológicas similares. Por consequência da semelhança entre os patógenos, a separação das espécies, tradicionalmente baseada em características morfológicas, torna-se ineficiente (BAILEY et al., 1996; MENEZES, 2006).

A tecnologia de imagem hiperespectral de infravermelho próximo (HSI-NIR) é uma ferramenta analítica com ampla capacidade para a verificação e quantificação de compostos em sistemas biológicos, o que têm impulsionado a aplicação da tecnologia nas mais diversas áreas de pesquisas (DALE et al., 2013). Em tecnologia de sementes, sistemas HSI-NIR estão sendo empregados com êxito na constatação de doenças fúngicas, assim como na detecção e quantificação de micotoxinas em cereais (FERNÁNDEZ-IBAÑEZ et al., 2009; TEKLE et al., 2015; TAO et al., 2018; FEMENIAS et al., 2019). Logo, a tecnologia HSI-NIR surge como uma possibilidade na identificação rápida e precisa dos patógenos CG e CGC em sementes de algodoeiro.

Neste contexto, o trabalho propõe desenvolver uma metodologia para identificar as espécies fúngicas CG e CGC em sementes de algodoeiro, utilizando a tecnologia HSI-NIR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Fitopatologia e Laboratório de Tecnologia Química (LATECQ) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Unidade Embrapa Algodão, no município de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil.

2.2 Isolados fúngicos

Neste estudo, foram utilizados cinco (5) isolados de CG e 15 isolados de CGC, oriundos da Coleção de Trabalho de Culturas de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão,

e previamente classificados como CG ou CGC, por diagnóstico molecular, via PCR (AIRES et al., 2018). Todos os isolados foram preservados pelo método de Castellani e foram coletados de plantas de algodoeiro com sintomas típicos de antracnose ou ramulose em diferentes regiões produtoras nos Estados de Goiás e Mato Grosso (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizados na inoculação das sementes de algodoeiro para identificação das espécies fúngicas a partir de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo

Espécie	CNPA	Hospedeiro/substrato	Origem
<i>C. gossypii</i>	0037	Algodoeiro – semente	Acreúna – GO
<i>C. gossypii</i>	0735	Algodoeiro – semente	Sapezal – MT
<i>C. gossypii</i>	0736	Algodoeiro – semente	Sapezal – MT
<i>C. gossypii</i>	0737	Algodoeiro – semente	Sapezal – MT
<i>C. gossypii</i>	0738	Algodoeiro – semente	Sapezal – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0040	Algodoeiro – folha	Pedra Preta – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0044	Algodoeiro – folha	Pedra Preta – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0050	Algodoeiro – folha	Pedra Preta – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0060	Algodoeiro – folha	Campo Verde – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0065	Algodoeiro – folha	Primavera do Leste – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0067	Algodoeiro – folha	Chapadão do Céu – GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0080	Algodoeiro – folha	Primavera do Leste - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0081	Algodoeiro – folha	Novo São Joaquim – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0086	Algodoeiro – folha	Novo São Joaquim - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0087	Algodoeiro – folha	Campo Verde – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0116	Algodoeiro – folha	Campo Verde – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0121	Algodoeiro – folha	Campo Verde – MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0124	Algodoeiro – folha	Santa Helena de Goiás – GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0126	Algodoeiro – folha	Cachoeira Dourada – GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0132	Algodoeiro - folha	Alto Taquari – MT

2.3 Inoculação das sementes de algodoeiro

Neste estudo foram utilizadas sementes de algodoeiro da cultivar BRS 286, safra 2017/2018 (Tabela 1). Para a inoculação das sementes utilizou-se a técnica de restrição hídrica (MACHADO et al., 2007), a qual se baseia no ajuste do potencial osmótico do meio de cultura, através da adição de restritores em solução, e na inoculação dos fungos por meio do contato direto desses com as sementes, maximizando o tempo de contato sem que haja germinação das mesmas.

Os isolados fúngicos testados foram crescidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio de cultura BDA (Batata – Dextrose – Ágar) ajustado osmoticamente

para -1,0 MPa, por meio da adição de manitol (40,44 g/L), em câmara BOD ajustada para 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante 10 dias. O potencial osmótico do meio de BDA modificado foi calculado por meio da fórmula de Van't Hoff (SALISBURY; ROSS, 1992). No cálculo do potencial osmótico do meio de cultura BDA, foi levado em consideração o potencial osmótico inicial desse meio de cultura, que é de -0,35 MPa (SOMMERS et al., 1970; WEARING, BURGERSS, 1979).

As sementes utilizadas para inoculação dos fungos foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% (v/v), e, depois de secas à temperatura ambiente, distribuídas nas placas de Petri sobre os isolados fúngicos crescidos. Após a distribuição das sementes sobre os fungos crescidos sobre o meio de cultura modificado osmoticamente, as mesmas foram incubadas em câmara BOD ajustada a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias, que foi o tempo necessário à inoculação/contaminação por contato dos fungos, sem que houvesse germinação, segundo descrito por Machado et al. (2007). Após esse procedimento, as sementes inoculadas/contaminadas foram desinfestadas novamente com hipoclorito de sódio a 0,5%, e postas para secar à temperatura ambiente, antes de serem submetidas ao teste de sanidade.

2.4 Teste de sanidade

O teste de sanidade foi realizado por meio do método de incubação em papel de filtro (*blotter test*) modificado osmoticamente. As sementes foram distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (25 sementes/placa de Petri), contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em uma solução osmótica, previamente esterilizada, de manitol (67,23 g/L) com potencial osmótico de -1,0 MPa, calculado por meio da fórmula de Van't Hoff (SALISBURY; ROSS, 1992). Prévio a obtenção das imagens hiperespectrais, as sementes foram incubadas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, e fotoperíodo produzido por lâmpadas fluorescentes brancas de 12 horas, durante sete dias.

2.5 Aquisição das imagens hiperespectrais

As imagens hiperespectrais das sementes contendo o crescimento micelial dos isolados de CG e CGC foram adquiridas por meio do espectrômetro sisuChema SWIR - Specim® (Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland), com o software ChemaDaq, versão 3.621.992.6-R. Para

a captura das imagens utilizou-se uma lente de ampliação de 50 mm ($0,156\text{mm} = 156\text{ }\mu\text{s}$), com resolução espectral de 10 nm a uma exposição de 1,6 ms; os espectros foram adquiridos em linha, com largura de varredura de 5 cm por linha. A faixa espectral utilizada foi de 1000 a 2500 nm, com 256 bandas de comprimento de onda. A altura entre a lente e a amostra foi definida em 31 cm, a velocidade do transportador foi fixada em 30 mm/s para assegurar a mesma forma espacial das sementes na imagem, e o tempo de exposição foi ajustado em 3.000 μs para garantir uma intensidade de luz adequada.

Para a realização das medidas, as placas de Petri contendo 25 sementes inoculadas com isolados fúngicos das espécies CG e CGC foram colocadas abertas sobre o suporte de amostras do espectrômetro. As placas foram medidas em uma linha de varredura contemplando $\frac{1}{2}$ placa, desse modo, foram adquiridas 2 imagens por placa de Petri.

A aquisição das imagens hiperespectrais inclui a digitalização da matriz linear pelo detector ao longo do eixo Y, o movimento da placa de Petri sobre o eixo X, e os espectros NIR no eixo Z da amostra. Assim, um dado hipercubo 3D representando as imagens hiperespectrais contém a informação da imagem espacial e espectral (NIR), que será utilizada para identificar as espécies CG e CGC em sementes de algodão. As HSI-NIR obtidas foram salvas em formato bruto e, posteriormente, analisadas por estatística multivariada.

2.6 Análise multivariada

O pré-processamento dos espectros e a análise multivariada das imagens hiperespectrais foram realizados a partir do programa computacional Evince 2.7.0 (UmBio).

2.6.1 Análise de componentes principais (PCA)

Uma análise exploratória do conjunto de dados hiperespectrais para os 5 isolados de CG e 15 isolados de CGC associados às sementes foi inicialmente executada utilizando uma PCA. Os pixels referentes às sementes exibiram um padrão de coloração distinto no gráfico de escores do Contour 2D, o que permitiu a remoção manual dos pixels correspondentes ao plano de fundo, deixando nas imagens apenas os pixels das amostras.

Para redução de ruído e dos efeitos de linhas de base, realizou-se o pré-processamento dos espectros com derivativa Savitzky-Golay de primeira ordem, suavização com janela de 5 pontos antes e 5 pontos depois do ponto central e polinômio de segunda ordem. Em seguida, os espectros e os gráficos dos escores da PCA foram usados para análise exploratória.

2.6.2 Análise PLS-DA

A identificação da presença de CG e CGC nas sementes foi realizada a partir do desenvolvimento de um modelo baseado na Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) utilizando os espectros pré-processados.

A análise PLS-DA contou com dois conjuntos de matrizes espetrais, denominados conjuntos de calibração e validação, em que 50% dos pixels de cada semente fizeram parte do conjunto de calibração, e 50% dos pixels restantes fizeram parte do conjunto de validação. Para a composição dos conjuntos foram utilizadas 10 imagens hiperespectrais, sendo 5 imagens de amostras contaminadas com CG (isolados 0037, 0735 e 0737) e 5 imagens de amostras contaminadas com CGC (isolados 0040, 0060, 0080, 0086). A seleção dos isolados se deu a partir da análise exploratória da PCA, pela qual foram selecionados indivíduos representativos em cada classe para compor o modelo PLS-DA.

As amostras eram compostas por sementes com nível de crescimento fúngico alto (corpos de frutificação dos fungos recobrindo a superfície da semente) e baixo (pouco ou nenhum crescimento micelial visível sobre a superfície da semente); no entanto, a partir da análise do perfil espectral das amostras, ficou evidente a influência da matriz (semente) nos espectros das amostras em que a presença dos fungos não era visível. Desse modo, no modelo PLS-DA foram mantidas apenas as sementes com um alto nível de crescimento dos fungos, a fim de se obter características espetrais próprias destes microrganismos.

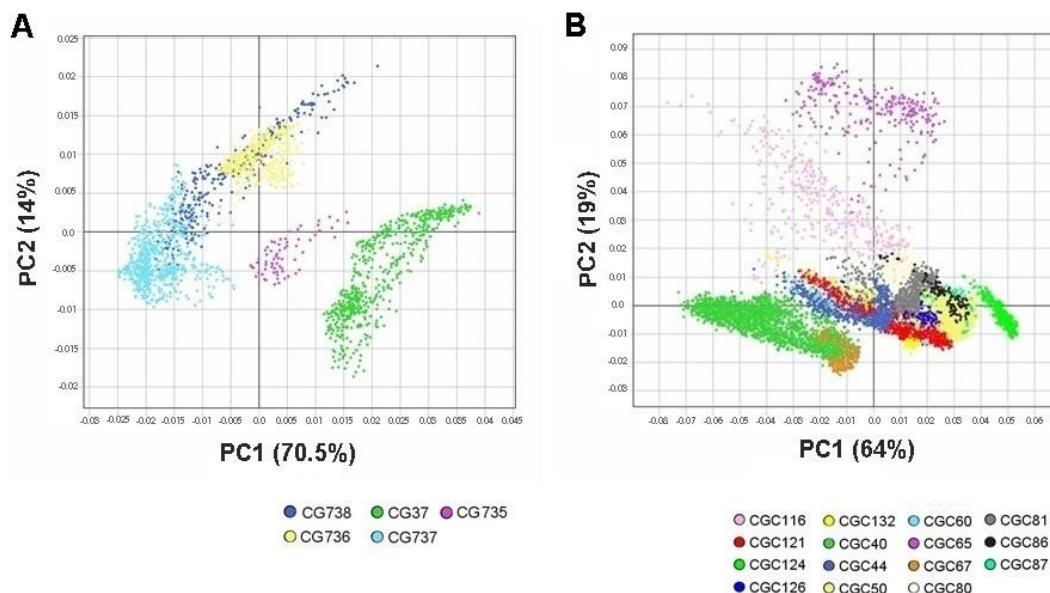
O desempenho do modelo PLS-DA foi verificado pela precisão da classificação do conjunto de validação. Posteriormente, o modelo foi utilizado na predição de um conjunto externo, constituído de 25 amostras (10 imagens de amostras contaminadas com isolados CG e 15 imagens de amostras contaminadas com isolados CGC); onde cada pixel correspondente à área das sementes foi classificado individualmente em CG ou CGC, o que gerou mapas de previsão coloridos de acordo com sua classe equivalente. Os mapas de previsão e a porcentagem de pixels classificados corretamente em cada amostra foram usados como indicativos da exatidão do modelo PLS-DA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para conhecer a variabilidade dentro das espécies, realizou-se, inicialmente, um estudo exploratório com a PCA aplicada a cada classe separadamente. Na Figura 1, amostras

representativas dos isolados de CG e CGC associados às sementes estão representadas na PC1 e PC2, conforme sua distribuição espacial em unidades de pixels, com variância total de 84,5% para a PCA de CG, e 83% para a PCA de CGC. Para melhor reconhecimento, os escores foram coloridos de acordo com os referentes isolados.

Figura 1. Análise de componentes principais (PCA) para investigar a variabilidade dentro das espécies fúngicas *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporiooides*. Amostras contaminadas com isolados de *C. gossypii* (A); Amostras contaminadas com isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporiooides* (B)



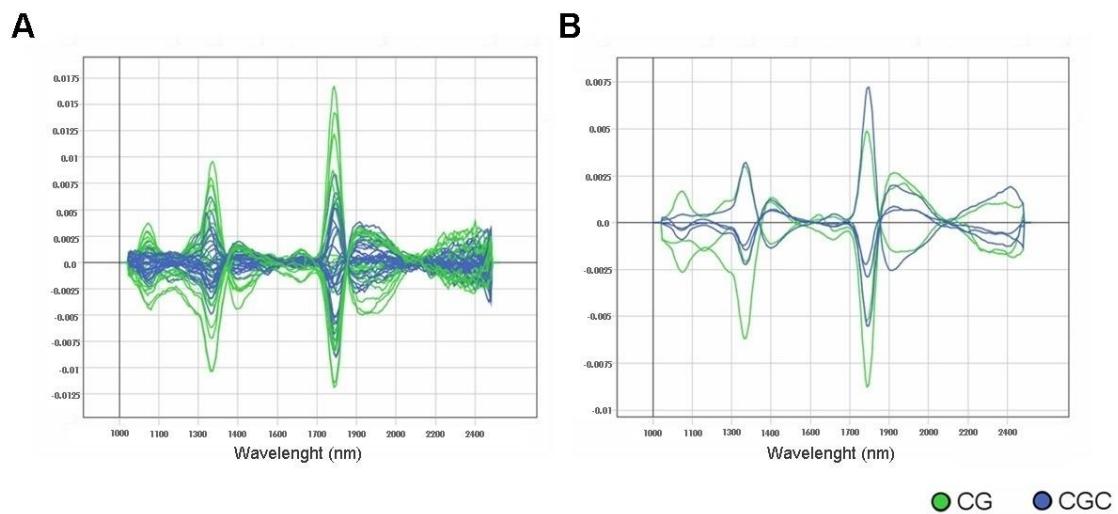
Analizando-se os escores dos componentes em ambas as classes, observa-se que os diferentes isolados tendem a formar agrupamentos distintos, baseado em sua informação espectral. Os isolados CG 0738, CGC 0116 e CGC 0065, por sua vez, apresentaram uma distribuição espacial dispersa e uma menor tendência de agrupamento dos pixels na PCA, que pode ser justificado pelo baixo nível de crescimento dos respectivos isolados nas amostras obtidas no presente estudo, o que, claramente, resultou na interferência espectral da semente de algodoeiro nos espectros dos fungos.

Na PCA do grupo CG (Figura 1 A), verifica-se uma maior tendência de separação dos isolados e um pequeno distanciamento das amostras CG 0037 e CG 0735 em relação às demais amostras da classe; enquanto a PCA do grupo CGC (Figura 1 B) revelou um menor distanciamento entre os isolados da classe e sobreposição de algumas amostras, de modo que, com exceção de CGC 0116 e CGC 0065, as demais amostras encontram-se distribuídas ao longo da PC1. Observando a conformação dos isolados dentro de cada classe, pode-se inferir

que na classe CG há uma maior variação das características entre os indivíduos, enquanto a classe CGC revela maior homogeneidade. É importante destacar a hipótese de que o processo evolutivo da espécie CGC teria se dado a partir dos isolados da espécie CG, o que justificaria a base genética mais restrita da espécie (SILVA-MANN et al., 2005).

Tendo-se observado a organização dos indivíduos de cada classe, isolados representativos das espécies CG e CGC foram selecionados para compor uma nova PCA e, posteriormente, o modelo PLS-DA. Na Figura 2 estão apresentados, respectivamente, os espectros completos (A) e o espectro médio de cada isolado (B) de CG e CGC associados às sementes.

Figura 2. Espectros completos (A) e espectro médio por isolado (B) de esporulações de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro



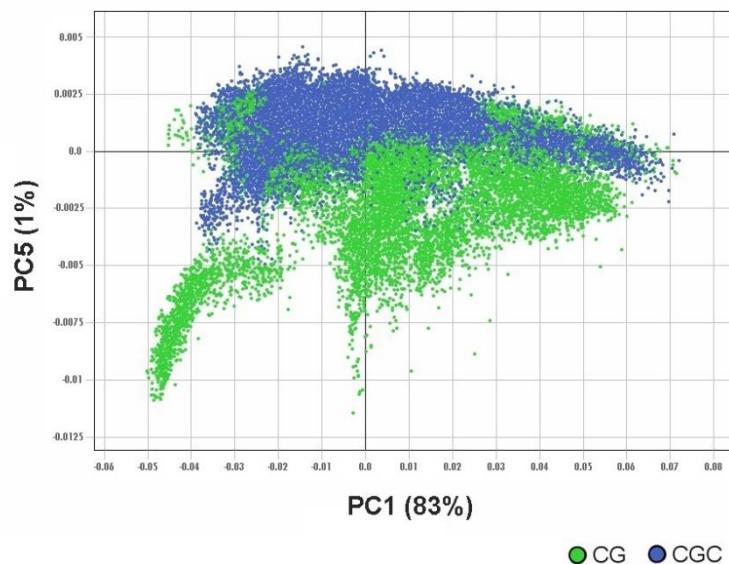
Analizando-se os espectros médios, percebe-se que, apesar de se tratar de espécies distintas, as diferenças entre as classes são pouco evidentes, havendo uma grande semelhança entre o perfil de alguns isolados CG e CGC, o que demonstra a presença de características inerentes à variabilidade das classes. Em contrapartida, na região entre 1150 a 1200 nm, correspondente ao grupamento químico de 2º sobretom de CH, é possível identificar uma sutil diferença entre os espectros de CG e CGC, o que, provavelmente, têm relação com as particularidades de cada classe quanto à absorção de compostos primários de extrema importância, a exemplo de aminoácidos, enzimas e proteínas, favoráveis nessa região espectral.

Observando-se os espectros completos, é possível identificar diferenças na conformação de cada classe, com espectros mais constantes na classe CGC (azul) e alguns picos de absorbância positivos e negativos; enquanto na classe CG (verde) há uma menor constância e os picos de absorbância são mais acentuados por toda a região espectral. Na região entre 1700

a 1900 nm observa-se um pico de absorbância em ambas classes, o qual está relacionado com vibrações de moléculas de água nessa região espectral e, possivelmente, não é uma característica própria dos fungos, mas sim uma característica da absorção de água pelas sementes.

A análise exploratória realizada por PCA foi empregada para examinar as diferenças qualitativas entre as espécies fúngicas. Na Figura 3, amostras contaminadas com isolados de CG e de CGC estão representadas na PC1 e PC5, conforme sua distribuição espacial em unidades de pixels.

Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) para investigar diferenças entre as espécies *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporiooides* em sementes de algodoeiro



A variação total dos dados nas componentes foi de 84%, sendo a maior parte da informação contida na primeira componente (83%). A distribuição dos escores nas componentes revela diferenças no agrupamento entre as classes de fungos, com uma tendência de separação das classes analisadas, sugerindo que as informações espectrais das amostras podem ser favoráveis na discriminação das espécies. É possível observar que as amostras da classe CGC estão distribuídas na parte superior do gráfico, enquanto as amostras da classe CG encontram-se distribuídas ao longo da PC1; contudo, é notável a sobreposição de pixels nos extremos das componentes, indicando a existência de características comuns às duas classes. Dessa forma, por se tratar de espécies com composições químicas muito semelhantes, fica evidente a alta correlação, como foi sugerido anteriormente na análise do perfil espectral.

Na Tabela 2 estão descritos os resultados da classificação no conjunto de validação do modelo PLS-DA. Constatou-se que houve 86,5% de acerto na classificação de CG e 81,6% de acerto na classificação de CGC, o que sugere a presença de propriedades espectrais distintas entre as espécies de fungos associadas às sementes. Entretanto, erros classificatórios foram verificados em ambas as classes do modelo e estão relacionados com as características comuns às espécies, conforme verificado pela sobreposição de pixels na análise exploratória por PCA.

Tabela 2. Taxa de classificação por pixels do conjunto de validação do modelo PLS-DA

Classes	Taxa de Classificação do modelo PLS-DA (%)	
	Correta	Incorreta
CG	86,5%	13,5%
CGC	81,6%	18,4%

Considerando a variabilidade entre isolados das espécies CG e CGC, utilizou-se o modelo PLS-DA para predição de um conjunto externo de validação, composto por 25 amostras com diferentes níveis de crescimento dos isolados de CG e de CGC sobre as sementes de algodoeiro. Na predição das imagens, cada pixel correspondente à área das sementes foi classificado individualmente, o que gerou mapas de previsão coloridos de acordo com sua classe equivalente, sendo elas: CG, CGC ou Não reconhecido. Os resultados em porcentagem da classificação das amostras com o modelo PLS-DA estão descritos na Tabela 3, e as imagens de previsão, coloridas de acordo com a classe equivalente, estão apresentadas no Apêndice A.

Tabela 3. Resultado da classificação por pixels das amostras do conjunto externo de validação com modelo PLS-DA

Amostras	Classe	Taxa de Classificação (%)
1 (CG 0037)	CG	67,8%
	CGC	26,1%
	Não reconhecido	6,07%
2 (CG 0037)	CG	59,8%
	CGC	31,8%
	Não reconhecido	8,33%
3 (CG 0735)	CG	32,4%
	CGC	13,3%
	Não reconhecido	54,3%
4 (CG 0735)	CG	54,1%
	CGC	17,9%
	Não reconhecido	28%
5 (CG 0736)	CG	66,1%
	CGC	20,4%
	Não reconhecido	13,5%
6 (CG 0736)	CG	58,4%
	CGC	30,7%
	Não reconhecido	10,9%

	CG	53,6%
7 (CG 0737)	CGC	20,9%
	Não reconhecido	25,5%
	CG	61,1%
8 (CG 0737)	CGC	24,7%
	Não reconhecido	14,2%
	CG	1,07%
9 (CG 0738)	CGC	34,1%
	Não reconhecido	64,8%
	CG	0,06%
10 (CG 0738)	CGC	7,2%
	Não reconhecido	92,7%
	CG	29%
11 (CGC 0040)	CGC	56,4%
	Não reconhecido	14,6%
	CG	8,29%
12 (CGC 0044)	CGC	75,6%
	Não reconhecido	16,1%
	CG	0%
13 (CGC 0050)	CGC	12,4%
	Não reconhecido	87,6%
	CG	7,6%
14 (CGC 0060)	CGC	60,4%
	Não reconhecido	32%
	CG	2,91%
15 (CGC 0065)	CGC	38,2%
	Não reconhecido	58,8%
	CG	42,6%
16 (CGC 0067)	CGC	53,8%
	Não reconhecido	3,6%
	CG	1,7%
17 (CGC 0080)	CGC	68,9%
	Não reconhecido	29,4%
	CG	57%
18 (CGC 0081)	CGC	34%
	Não reconhecido	9%
	CG	1,76%
19 (CGC 0086)	CGC	49%
	Não reconhecido	49,3%
	CG	0%
20 (CGC 0087)	CGC	12,4%
	Não reconhecido	87,6%
	CG	32,4%
21 (CGC 0116)	CGC	50,6%
	Não reconhecido	17%
	CG	4,85%
22 (CGC 0121)	CGC	46,4%
	Não reconhecido	48,8%
	CG	11%
23 (CGC 0124)	CGC	78,9%
	Não reconhecido	10,1%
	CG	12,6%
24 (GC 0126)	CGC	75,1%
	Não reconhecido	12,3%
	CG	12,5%
25 (CGC 0132)	CGC	67,3%
	Não reconhecido	20,3%

A partir das imagens de previsão das amostras (Apêndice A), é possível verificar que pixels não reconhecidos foram observados, principalmente, em regiões onde o desenvolvimento dos fungos não foi proeminente sobre a semente, com pouco ou nenhum crescimento vegetativo do patógeno visível; uma vez que, na construção do modelo PLS-DA, optou-se por utilizar apenas amostras características dos fungos. De modo geral, o crescimento sobre a semente foi muito variável entre os isolados; logo, amostras que apresentaram um baixo nível de crescimento dos fungos, como àquelas referente aos isolados CG 0738, CGC 0050 e CGC 0087, tiveram a maior parte dos pixels ($>80\%$) não reconhecidos. Por outro lado, em amostras com um alto nível de crescimento dos fungos, a taxa de classificação dos pixels em CG e CGC foi superior, permitindo uma melhor análise da precisão do modelo PLS-DA (Tabela 3).

Quanto aos resultados de classificação correta, o percentual de acerto foi variável entre amostras, o que possivelmente têm relação com a variabilidade dentro de cada espécie. Em 22 amostras preditas verificou-se maior porcentagem de pixels classificados corretamente, de acordo com a classe correspondente. Observando-se as taxas de erro nas previsões percebe-se que as amostras referentes aos isolados de CGC tiveram, em sua maioria, erro de previsão inferior ao erro observado no conjunto de validação do modelo (18,4%), o que sugere que as informações relevantes para a identificação da espécie CGC em sementes estão, em sua maior parte, presentes no modelo PLS-DA. Já na classe CG, apesar da menor quantidade de isolados, as taxas de erro na classificação das amostras foram superiores ao observado no conjunto de validação (13,5%), com exceção da Amostra 3 (CG 0735) que teve apenas 13,3% dos pixels classificados incorretamente. Possivelmente, a maior taxa de erro nas previsões de amostras CG seja resultado da alta variabilidade genética entre os indivíduos da espécie, conforme foi sugerido na análise exploratória utilizando a PCA.

Como pode ser visto na Tabela 3, 57% da amostra 18 (CGC 0081) foi classificada incorretamente em CG; do mesmo modo, nas amostras 9 e 10 (isolado CG 0738) as porcentagens de pixels classificados em CGC foram superiores, ainda que as amostras tenham baixo crescimento dos fungos sobre as sementes. Apesar da amostra 16 (CGC 0067) ter apresentado 53,8% de classificação correta, a alta porcentagem de pixels classificados em CG (42,6%) sugere suscetibilidade ao erro na classificação desse indivíduo que, possivelmente, dispõe de características muito próximas à espécie CG. A alta taxa de erro nas classificações das amostras indica a necessidade de incluir os referentes isolados no modelo PLS-DA, de forma a introduzir essa variabilidade e torná-lo mais robusto.

4. CONCLUSÃO

A performance do modelo PLS-DA nas predições indica que o método permite a identificação das espécies CG e CGC em sementes de algodoeiro, com capacidade para ser adaptado à rotina dos laboratórios de análise de sementes. O modelo apresentou sensibilidade em detectar características distintas entre as espécies fúngicas e obteve 86,5% de acerto na classificação de CG e 81,6% de acerto na classificação de CGC em sementes de algodoeiro.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dependendo do nível do crescimento fúngico sobre a semente, é possível ocorrer interferência na classificação dos pixels das amostras. Desse modo, a fim de se obter um alto nível de esporulação ou crescimento fúngico sobre as sementes, o que demonstrou ser variável entre os isolados, o aumento do período de incubação no teste de sanidade pode ser favorável.

Conforme observado a partir do estudo exploratório usando a PCA, os diferentes indivíduos dentro das espécies podem variar consideravelmente, sendo importante que as variações dentro de cada classe estejam presentes no modelo PLS-DA. Para aumentar a precisão do modelo, amostras características dos isolados que apresentaram alta taxa de erro nas classificações devem ser incluídas nos conjuntos de calibração.

A similaridade entre pixels característicos de CG e CGC nas amostras resulta em problemas relacionados à classificação por pixels, empregada no presente estudo. Em trabalhos futuros, a classificação por objetos, onde cada semente é identificada como um único objeto e classificada de modo individual, pode ser favorável na distinção das espécies CG em CGC em sementes de algodoeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAPA – Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Algodão no mundo. Disponível em: <<https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>> Acessado em: 03 out. 2019.

AIRES, P. S. et al. Near infrared hyperspectral images and pattern recognition techniques used to identify etiological agents of cotton anthracnose and ramulosis. **Journal of Spectral imaging**, v. 7, p. 1-17, 2018.

ARAÚJO, A. E. D. et al. Efeito de diferentes níveis de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, em plantas de algodão no campo e sua incidência nas sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 310-315, 2009.

BAILEY, J. A. et al. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, v. 86, n. 10, p. 1076-1083, 1996.

BRUNETTA, E.; BRUNETTA, P. S. F.; FREIRE, E. C. Produção de sementes de Algodão. In: FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Abrapa, 2007. Cap. 9, p. 319-343.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos 2018/2019**. v. 6, n. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3042-fechamento-da-safra-2018-2019-aponta-producao-recorde-de-graos-estimada-em-242-1-milhoes-de-t>> Acessado em 30 out. 2019.

DALE, L. M. et al. Hyperspectral imaging applications in agriculture and agro-food product quality and safety control: a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 48, n. 2, p. 142-159, 2013.

FEMENIAS, A. et al. Use of hyperspectral imaging as a tool for *Fusarium* and deoxynivalenol risk management in cereals: A review. **Food Control**, v. 108, p. 1-12, 2019.

FERNÁNDEZ-IBAÑEZ, V. et al. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 629-634, 2009.

KIRKPATRICK, T. L.; ROTHROCK, C. S. **Compendium of cotton diseases.** 2 ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2001.

MACHADO, A. Q. et al. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 408-414, 2007.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 3, p. 170-179, 2006.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology.** 4 ed. Belmont: Wadsworth, 1992, 682 p.

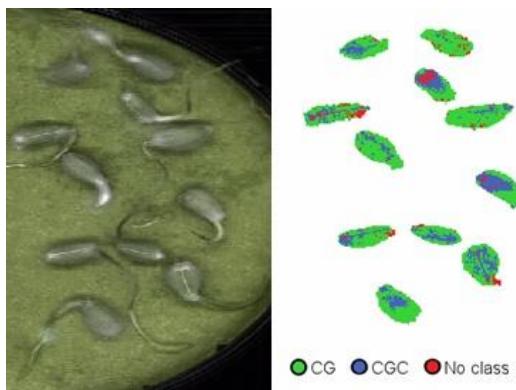
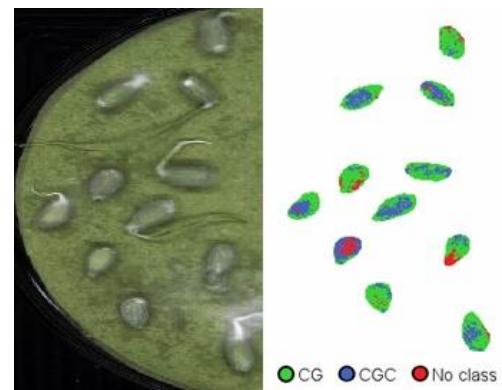
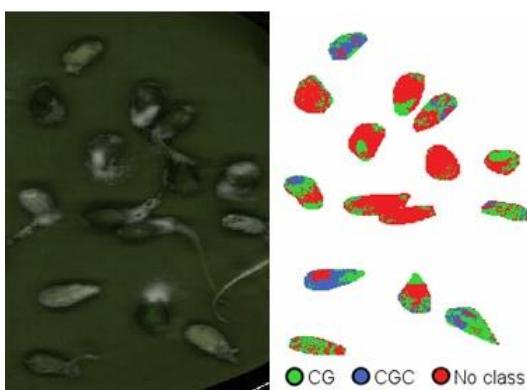
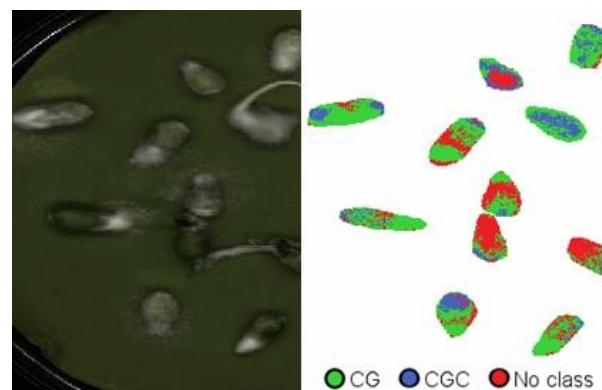
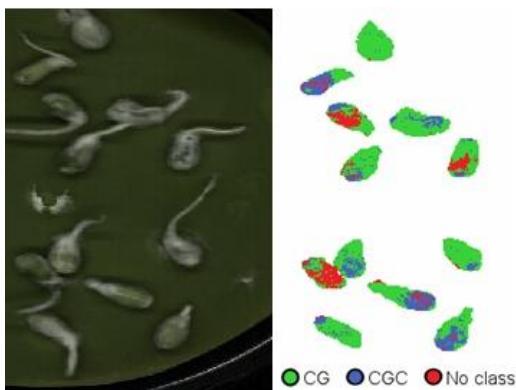
SILVA-MANN, R. et al. AFLP markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 169-172, 2005.

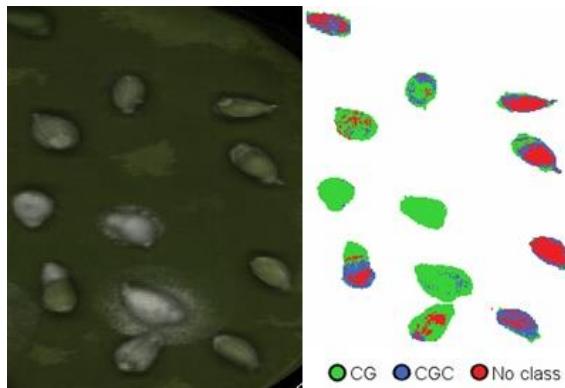
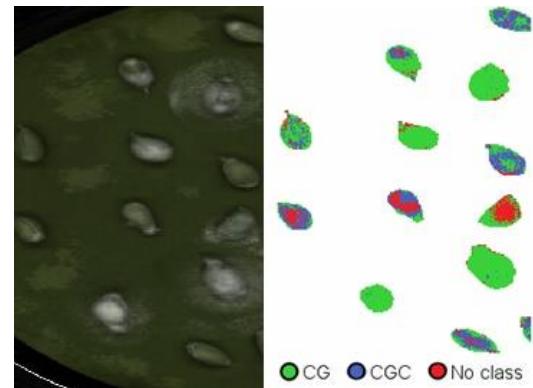
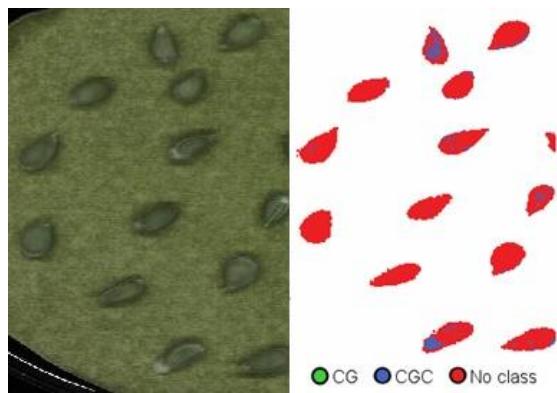
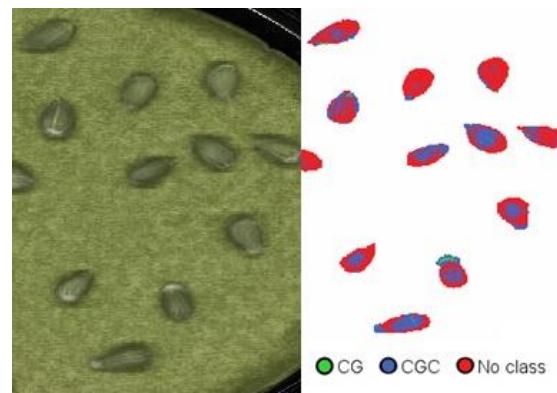
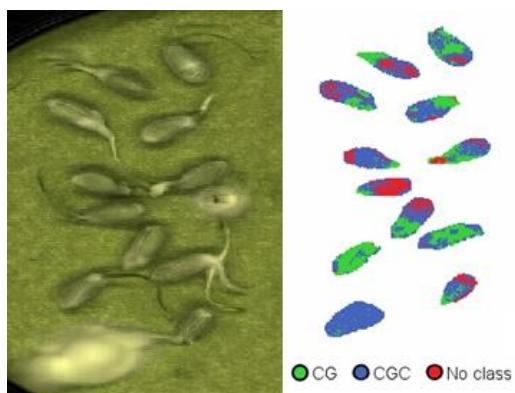
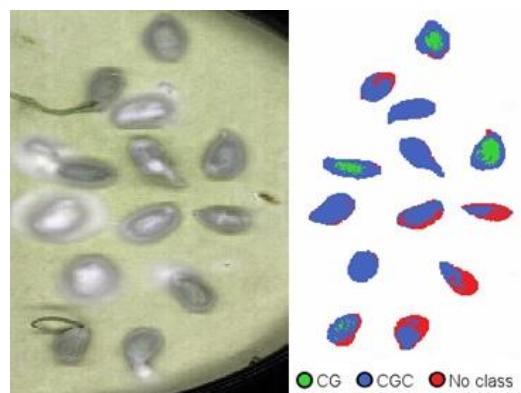
SOMMERS, L. et al. Water potential relations of three root-infecting Phytophthora species. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.932-934, 1970.

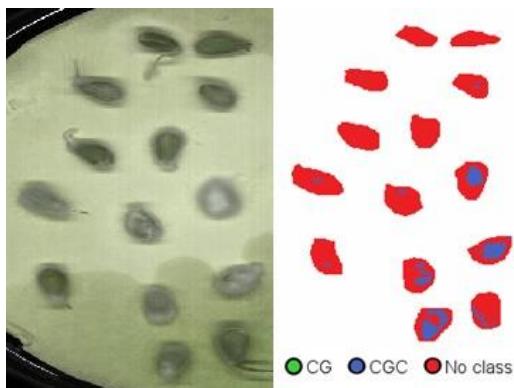
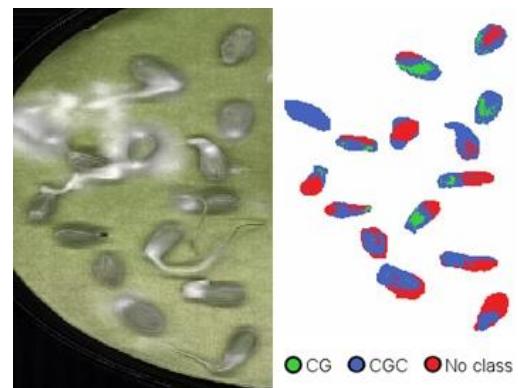
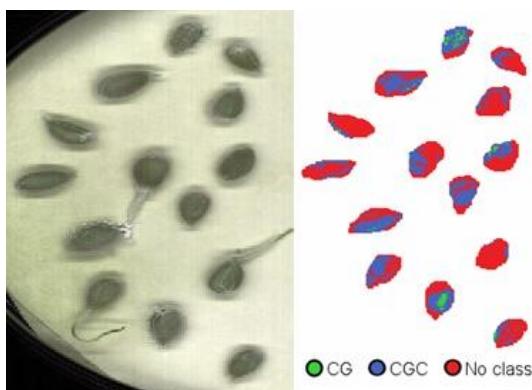
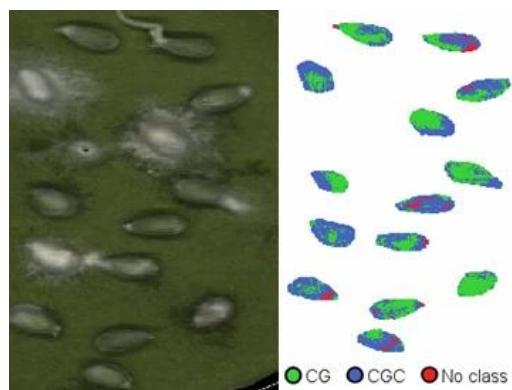
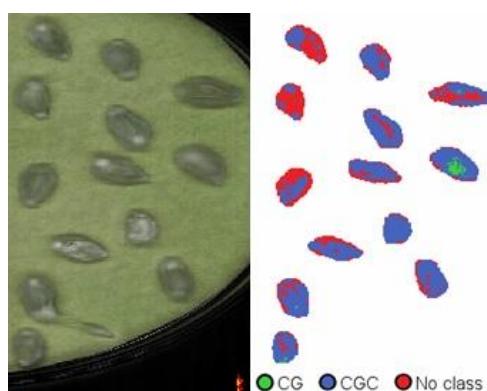
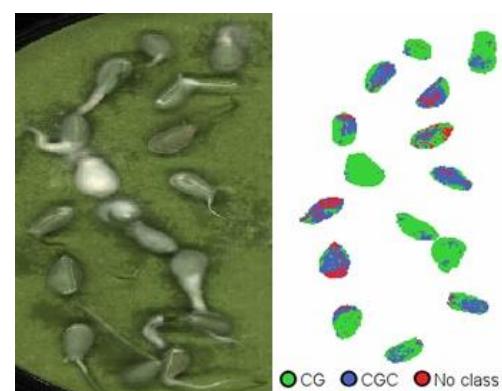
TAO, F. et al. Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 65-81, 2018.

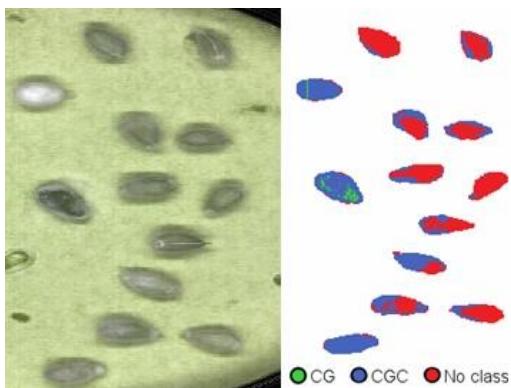
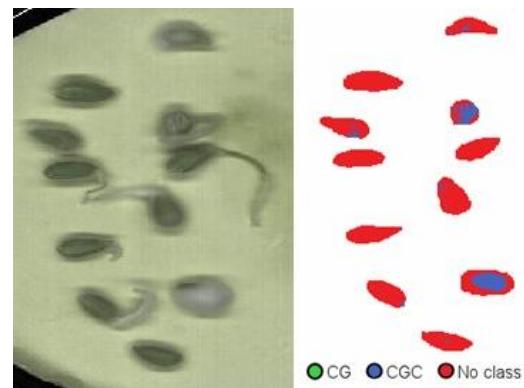
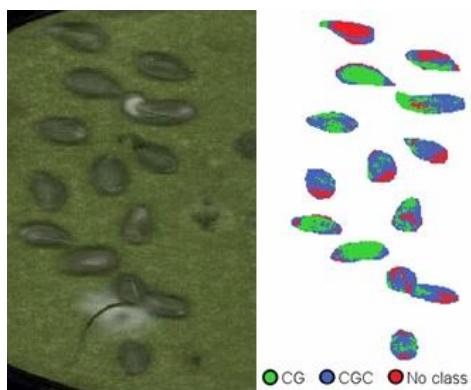
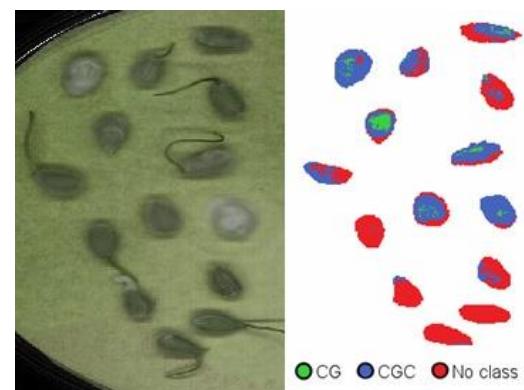
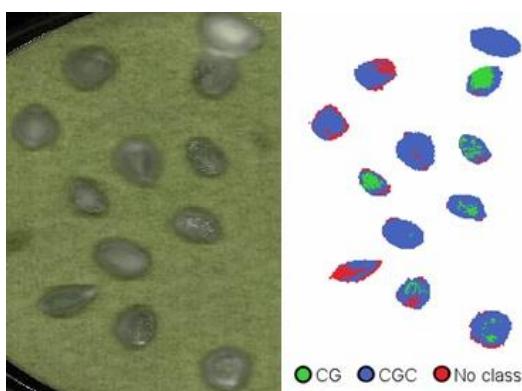
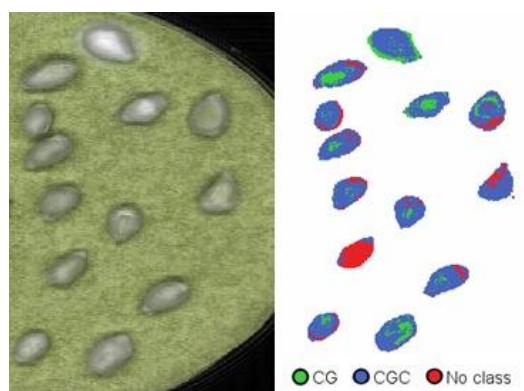
TEKLE, S. et al. Near-infrared hyperspectral imaging of *Fusarium*-damaged oats (*Avena sativa* L.). **Cereal Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 73-80, 2015.

WEARING, A. H.; BURGESS, L. W. Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* “graminearum”. **Soil Biology and Biochemistry**, v.11, n.6, p.661-667, 1979.

APÊNDICE A – Mapas de previsão das amostras de validação externa**Amostra 1 (CG 37)****Amostra 2 (CG 37)****Amostra 3 (CG 0735)****Amostra 4 (CG 0735)****Amostra 5 (CG 0736)****Amostra 6 (CG 0736)**

Amostra 7 (CG 0737)**Amostra 8 (CG 0737)****Amostra 9 (CG 0738)****Amostra 10 (CG 0738)****Amostra 11 (CGC 40)****Amostra 12 (CGC 44)**

Amostra 13 (CGC 50)**Amostra 14 (CGC 60)****Amostra 15 (CGC 65)****Amostra 16 (CGC 67)****Amostra 17 (CGC 80)****Amostra 18 (CGC 81)**

Amostra 19 (CGC 86)**Amostra 20 (CGC 87)****Amostra 21 (CGC 116)****Amostra 22 (CGC 121)****Amostra 23 (CGC 124)****Amostra 24 (CGC 126)**

Amostra 25 (CGC 132)

