



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA AGRÍCOLA**



TESE

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO
DE PRODUTOS AGRÍCOLAS**

**PROCESSAMENTO DE IMAGENS HIPERESPECTRAIS PARA
DIFERENCIAÇÃO DOS AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE E
RAMULOSE DO ALGODOEIRO**

PRISCILA SIMONE RIBEIRO AIRES

Campina Grande, Paraíba

Junho, 2016

**PROCESSAMENTO DE IMAGENS HIPERESPECTRAIS PARA
DIFERENCIAÇÃO DOS AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE E
RAMULOSE DO ALGODOEIRO**

PRISCILA SIMONE RIBEIRO AIRES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas

ORIENTADORES: Dr. Everaldo Paulo de Medeiros (EMBRAPA ALGODÃO)

Dra. Josivanda Palmeira Gomes (UFCG)

Campina Grande, Paraíba

Junho, 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA AGRÍCOLA



PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA TESE DA DOUTORANDA

PRISCILA SIMONE RIBEIRO AIRES

**PROCESSAMENTO DE IMAGENS HIPERESPECTRAIS PARA
DIFERENCIAÇÃO DOS AGENTES CAUSAIS DA ANTRACNOSE E
RAMULOSE DO ALGODOEIRO**

BANCA EXAMINADORA

PARECER

Profa. Dra. Josivanda Palmeira Gomes

Orientadora

Dr. Everaldo Paulo de Medeiros

Orientador

Dr. Alderi Emídio de Araújo

Examinador

Dr. Acacio Figueiredo Neto

Examinador

Dra. Marcia Rejane de Queiroz Albuquerque Azevedo

Examinadora

Dra. Líbia de S. Conrado Oliveira

Examinadora

Junho, 2016

Dedicatória

Com Carinho,

Ao meu Salvador Jesus Cristo, que sempre esteve comigo em todos os momentos. A graça d'Ele me basta. Ao meu amado esposo Thiago que é sem dúvida a melhor companhia. Aos melhores presentes que uma mulher poderia ganhar: meus filhos, Matheus e Daniel. Agradeço todos os dias por ter sido agraciada por Deus por tamanha benção, vocês são minha principal inspiração e motivação.

Dedico.

Agradecimentos

*A Deus, Todo Poderoso, Meu Porto-Seguro, Obrigada Deus!
Foi o Teu amor e a Tua força a minha maior motivação para a
concretização deste trabalho;*

*Ao meu Pai João, minha Mãe Sandra e meu irmão Igor, por
todo amor e carinho;*

*À Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) pela
oportunidade de cursar este doutorado;*

*À Embrapa Algodão por ter me dado a oportunidade de
desenvolver este trabalho, bem como pelo apoio financeiro que foi
essencial para a conclusão desta pesquisa;*

*À CAPES, que durante quatro anos, fielmente, me apoiou
para que esta pesquisa fosse concluída com êxito;*

*A todos os professores da Universidade Federal de Campina
Grande que me instruíram; onde obtive conhecimentos que foram
valiosíssimos;*

*À Profa. Dra. Josivanda Palmeira, que sempre paciente,
esteve de prontidão para comigo. Grata por ter me aceitado como
orientanda;*

Ao Dr. Everaldo Paulo de Medeiros, que me concedeu a grande oportunidade de realizar esta pesquisa, com ensinamentos essenciais para tornar-me uma boa profissional. Agradeço seus conselhos e sua amizade, que levarei por toda vida;

Ao pesquisador Wirton Macedo Coutinho, por sua dedicação, conhecimentos e pelo seu grande incentivo que foi essencial para a realização desta pesquisa;

À minha colega de laboratório Lane, pela grande ajuda nos experimentos;

Aos meus companheiros da Embrapa, Edjane, Chicão, Joabson e Welma, que de forma direta ou indireta me ajudaram na conclusão desta pesquisa.

Aos queridos pesquisadores, Alderi Emídio, Marcia Rejane, Acacio Neto e Líbia Conrado, por terem, gentilmente, aceitado o convite para participarem de minha defesa.

Ao meu esposo Thiago, por ter tido paciência comigo nas horas difíceis, por ter me auxiliado nos momentos em que eu mais precisei e por seu amor e companhia incondicional.

A todos vocês meu afeto e gratidão.

*“O êxito da vida não se mede pelo
caminho que você conquistou, mas sim
pelas dificuldades que superou no
caminho.” (Abraham Lincoln)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. A cultura do Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	18
3.2. Ramulose e Antracnose	20
3.3. Identificação de Microrganismos (<i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>).....	23
3.4 Identificação de Fungos Utilizando Biologia Molecular.....	25
3.5 Hiperespectroscopia de imagem no infravermelho próximo e suas aplicações	27
3.6 Análise Multivariada Espectral	31
3.7 Métodos Multivariados.....	33
3.7.1 Reconhecimento de Padrões	33
3.7.1.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	33
3.7.2.1 SIMCA	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Local de realização do experimento	37
4.2. Origem dos fungos	37
4.3. Isolados e cultivo em meio de cultura	37
4.4. Teste de patogenicidade	42
4.5. Técnicas moleculares (extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento).....	43
4.5.1. Microrganismos e condições de cultivo	43
4.5.2. Extração de DNA.....	43
4.5.3. Diagnóstico molecular de CG e CGC	43
4.6. Imagem hiperespectral no NIR.....	44
4.7. Métodos de análise multivariada	46
4.7.1. Análise de componentes principais (PCA).....	46
4.7.2. Análise de APS-LDA e SIMCA.....	46
4.7.3. Técnica DEQ ou boxplot	47

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Teste de patogenicidade	48
5.2. Imagem hiperespectral no NIR.....	50
5.3. Diagnóstico molecular de CG e CGC.....	57
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	70
APÊNDICE – A: Fotos com Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de Antracnose nas folhas causada pelo <i>Colletotrichum gossypii</i>	71
APÊNDICE – B: Fotos com Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de Ramulose nas folhas e haste <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	73
APÊNDICE – C: Fotos com detalhes do <i>Colletotrichum gossypii</i> na placa de Petri.....	75
APÊNDICE – D: Fotos com detalhes do <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> na placa de Petri.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Algodão Branco.....	18
Figura 2. Distribuição de Algodão no Brasil (área em ha).....	19
Figura 3. Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de Ramulose nas folhas e haste (A) e Antracnose nas folhas (B).....	21
Figura 4. (a) Desdobramento do hipercubo e (b) Redobramento do hipercubo.....	28
Figura 5. Demonstração que cada pixel possui um espectro completo.....	28
Figura 6. Primeira e segunda PCs no espaço tridimensional das variáveis.....	33
Figura 7. Placa de Petri com gotículas de água na tampa.....	40
Figura 8. Placa de Petri aberta com moléculas de água na superfície do fungo.....	41
Figura 9. A) Câmara incubadora (BOD). B) Placa de Petri invertida contendo o <i>Colletotrichum</i>	41
Figura 10. Espectrômetro sisuChema SWIR - Specim®.....	44
Figura 11. (A) Scanner do Espectrômetro sisuChema SWIR - Specim® ; (B) bandeja do equipamento.....	45
Figura 12. HSI-NIR de cinco isolados de CG e cinco isolados de CGC.....	46
Figura 13. Sintomas típicos de ramulose e antracnose em plantas de algodoeiro inoculadas durante o teste de patogenicidade. A-B. Mancha estrela e lesões foliares causadas por <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> . C-D. Morte do meristema apical e paralisação do crescimento da planta. E. Ramos e entrenós curtos com redução do porte da planta. F-G. Lesões foliares de antracnose causadas por <i>C. gossypii</i>	49
Figura 14. Mapa dos scores gerado pela PCA em função da distribuição espacial dos pixels em uma imagem hiperespectral (com 256 canais) sem nenhum pré-processamento.....	51
Figura 15. Projeção dos scores em nível de pixels para duas amostras de cada classe analisada.....	52
Figura 16. Espectros médio HSI-NIR total (a) e cortado (b) na parte inicial das amostras CG 37 e CGC 39.....	53
Figura 17. Gráfico dos scores de PC1 x PC2 nos espectros médios HSI-NIR inicial dos isolados dos fungos CG e CGC com variância total explicada de 99,77%.....	53
Figura 18. Espectros médios HSI-NIR de 995 a 1381 nm do isolado de CG (CNPA 0037) e as sete variáveis espectrais selecionadas pelo algoritmo SPA representadas na ordem em que foram escolhidas com a numeração de 1 a 7.....	54
Figura 19. Gráfico dos quartis entre os cinco isolados de CG e 46 isolados de CGC obtido das sete variáveis selecionadas pelo SPA.....	56
Figura 20. Diagnóstico molecular diferencial por meio de amplificação via PCR da região IGS de diferentes isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> (CG) e <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> (CGC). M representa o marcador molecular 1kb plus (Fermentas - SM1331) e B controle negativo.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

UFCG - Universidade Federal de Campina Grande

CTRN - Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

CG – *Colletotrichum gossypii*

CGC - *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

DAE – Dias após emergência

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

NIR – Espectrometria de Infravermelho Próximo

PCR – Principal Components Regression

PLS – Partial Least Squares

PCA – Principal Components of Analysis

PC_s – Componentes principais

SIMCA – Soft Independent Modelling of Class Analogy

RESUMO

Esse trabalho descreve um novo método para diferenciação de forma precisa e rápida dos fungos *C. gossypii* (CG) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC) crescidos em meio de cultura utilizando imagens hiperespectrais NIR e análise multivariada de reconhecimento de padrões. Foram empregados 5 isolados de CG e 46 de CGC. Os diferentes isolados de CG e CGC foram cultivados em meio Czapek-agar com 12 h de fotoperíodo durante 15 dias. As medidas espectrais foram realizadas entre 1000 a 2500 nm, com 256 bandas, com uma câmera de alta performance com lente de 50 mm. Os modelos de reconhecimento de padrão foram desenvolvidos com as estratégias de APS-LDA e SIMCA. As amostras foram separadas usando o algoritmo de seleção de amostras em três conjuntos com o número de amostras: 3, 1 e 1 para CG e 20, 8, 18 para CGC, totalizando 23 (Teste), 9 (Validação) e 19 (Predição) que somam 51 amostras dos fungos CG e CGC. Os resultados de predição evidenciaram um erro tipo II para o conjunto CG no modelo SIMCA. Enquanto com o APS-LDA não ocorreram erros de classificação. No conjunto CGC com um número de 18 amostras de predição não foram verificados erros do tipo I e II empregando as estratégias do APS-LDA e SIMCA. Uma validação paralela dos resultados obtidos com APS-LDA foi realizada com análise de BoxPlot com as variáveis selecionadas pelo APS. Os resultados foram concordantes sem evidência de outliers. Portanto, um novo procedimento HSI e APS-LDA para diferenciação dos agentes etiológicos CG e CGG é proposto com as vantagens de maior capacidade analítica com múltiplas análises e menor custo observando-se grandes números de amostras, rapidez e facilidade de implementação.

Palavras-chave: Taxonomia de fungos, microrganismos, hiperespectroscopia, análise multivariada

ABSTRACT

This work describes a new method for identification and classification as the precise and rapid *C. gossypii* (CG) and *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC) grown in culture medium using hyperspectral NIR images and multivariate pattern recognition. Five isolates were employees of CG and 46 of CGC. The different isolates of CG and CGC were cultured in Czapek agar with 12 h photoperiod for 15 days. The spectral measurements were performed between 1000 and 2500nm, with 256 bands with a high-performance camera with a 50 mm lens. The pattern recognition models were developed APS LDA and SIMCA strategies. The samples were separated using the sample selection algorithm in three sets the number of samples: 3, 1 and 1 for CG and 20, 8, 18 to CGC, totaling 23 (Test), 9 (Validation) and 19 (PREDICTION) totaling 51 samples of CG and CGC fungi. The prediction results showed a type II error for the CG set in the SIMCA model. As with the APS-LDA there were misclassifications. CGC conjunction with a number of 18 prediction samples were not observed errors of type I and II using the strategies APS-LDA and SIMCA. A parallel validation of the results obtained with APS-LDA was performed with BoxPlot analysis with the variables selected by the APS. The results were consistent with no evidence of outliers. Therefore, a new procedure HSI and APS-LDA for identification and classification of etiológicos agents CG and CGG is proposed with the advantages of greater analytical capacity with multiple analyzes, lower cost observing large numbers of samples, speed and ease of implementation.

Keywords: classification, fungi taxonomic, microorganisms, hyperspectroscopy, multivariate analysis

1.INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é a mais importante fibra têxtil natural em todo o mundo e a sexta maior fonte mundial de óleo vegetal, com grande importância na economia de muitos países, dos quais 150 produzem ou consomem cerca de 20 milhões de toneladas anuais de algodão em pluma (ULLOA et al., 2010). Estima-se que desde o plantio até a comercialização dos produtos feitos com a fibra, a cadeia mundial movimentada cerca de US\$ 12 bilhões por ano e emprega, em média, 350 milhões de pessoas (ABRAPA, 2016).

A qualidade da semente do algodão é um dos importantes fatores que condicionam o sucesso da cultura no campo. O controle de sua qualidade envolve tanto ações governamentais quanto do setor privado. Outro fator importante que condiciona e que deve ser destacado, em qualquer cultura, é a incidência de pragas e doenças (REAY-JONES et al. 2009; SORIA et al., 2010).

As sementes, além de serem um veículo de informações genéticas responsáveis por levar características agronômicas ao campo são, também, consideradas o principal veículo de disseminação de grande número de patógenos considerados de risco dentro ou entre países, como é o caso dos fungos *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, agentes etiológicos da antracnose e ramulose, respectivamente, do algodão (WEIR et al., 2012).

A antracnose e a ramulose do algodoeiro são doenças distintas causadas por patógenos com características morfológicas idênticas (BAILEY et al., 1996). O agente causal da ramulose causa a morte do meristema apical da planta, paralisando o seu crescimento e estimulando a brotação de gemas laterais, com ramos e entrenós curtos e contorcidos, o que reduz o seu porte. Essa doença foi primeiro descrita no Brasil em 1937, e seu agente etiológico, descrito como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (COSTA et al., 1939), foi considerado como uma forma mais agressiva de *Colletotrichum gossypii*, agente causal da antracnose, inicialmente descrito nos Estados Unidos, e que causa tombamentos e morte de plântulas, além de lesões em folhas e frutos.

Durante muito tempo houve a dúvida se a antracnose e a ramulose do algodoeiro eram causadas por dois patógenos distintos. A diferenciação desses patógenos, por meio

de marcadores moleculares, foi sugerida por Silva-Mann et al. (2005); no entanto, de acordo com Hyde et al. (2009), não existem relatos consistentes de caracteres morfológicos e mesmo moleculares, que permitam diferenciar essas variantes. Essa controvérsia foi recentemente elucidada por Salustiano et al. (2014), que constataram por meio de análise filogenética a distinção entre os agentes causais da ramulose e da antracnose, inclusive colocando o agente causal da ramulose como uma linha filogenética dentro do complexo de espécies de *C. gloesporioides*.

Ambos os patógenos, *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* são transmitidos à planta adulta de algodoeiro por sementes (BARROCAS et al., 2014); entretanto, apenas *C. gossypii* var. *cephalosporioides* tem importância quarentenária no Brasil, sendo o padrão de tolerância sugerido pela autoridade fitossanitária brasileira de 0% na amostra aleatória de 600 sementes submetida à análise em um lote de tamanho máximo de 25.000 kg (BRASIL, 2009).

A identificação correta de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* por métodos tradicionais não é uma tarefa fácil, mesmo para profissionais experientes. Tanaka et al. (1996) recomendam a separação desses fungos desenvolvidos sobre sementes com base no hábito de crescimento de ambos sobre raízes e sobre a superfície das sementes, o que em termos práticos é subjetivo e com resultados pouco confiáveis (PRIHASTUTI et al., 2009).

Técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso na diferenciação de espécies complexas em vários gêneros de fungos de importância econômica, dentre os quais *Colletotrichum* (CAI et al., 2011; WEIR et al., 2012), inclusive com o desenvolvimento de protocolos para diferenciação dos agentes causais da ramulose e antracnose do algodoeiro (SALUSTIANO et al., 2014), no entanto, essas técnicas são laboriosas e têm alto custo.

Devido à importância quarentenária da ramulose no Brasil, é salutar o desenvolvimento de métodos rápidos, baratos e eficientes que permitam a distinção dos agentes etiológicos da antracnose e da ramulose do algodoeiro. A utilização de imagens hiperspectrais associadas a técnicas de reconhecimento padrão e de classificação podem ser uma alternativa para identificação rápida e acurada desses patógenos. Essas técnicas têm sido empregadas com sucesso na detecção e quantificação de micotoxinas produzidas por fungos filamentosos em grãos (SIRISOMBOON et al., 2013) e na identificação e/ou classificação de fungos fitopatogênicos associados a diferentes espécies vegetais (SINGH et al., 2012).

As técnicas hiperspectrais se baseiam na identificação de ligações químicas em uma molécula e na obtenção de espectros de uma gama de compostos sem a utilização de reagentes e com a preservação da constituição da amostra analisada. A hiperspectroscopia de imagem no infravermelho próximo (HSI-NIR), utilizada neste estudo, por exemplo, é uma imagem de camadas múltiplas, em que cada camada é um único comprimento de onda espectral, o qual é utilizado para detectar características em função das "impressões digitais", devido às ligações químicas específicas em diferentes materiais (LORENTE et al., 2012). Portanto, essas múltiplas camadas espectrais de uma imagem geram informações de alta complexidade (DONEUS et al., 2014), que associadas a métodos de análises multivariadas para reconhecimento de padrão e de classificação podem ser úteis em estudos de identificação/separação de fungos como aqueles com características morfológicas idênticas e de difícil diferenciação por métodos tradicionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as possibilidades de uso da hiperespectroscopia de imagem no infravermelho próximo (HSI-NIR) suportado por modelos de classificação de Algoritmo das Projeções Sucessivas – Análise Discriminante Linear (APS-LDA) e Soft Independent Modelling of Class Analogies (SIMCA) na identificação/separação dos agentes causais da antracnose e ramulose desenvolvidos sobre meio de cultura.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar possíveis diferenças entre as duas espécies e avaliar o uso de marcadores moleculares para diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*;
- ✓ Processar imagens hiperespectrais NIR de isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em condições controladas de armazenamento utilizando técnicas de análise multivariada;
- ✓ Através dos modelos de classificação, identificar e separar os agentes causadores da antracnose e ramulose.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

O algodão é considerado uma das principais culturas agrícolas no Brasil e no mundo, exercendo grande importância em termos produtivos, econômicos e sociais, por meio da pluma ou fibra que é o seu produto principal (Figura1). Dentre as fibras têxteis, naturais ou artificiais, a pluma de algodoeiro é a mais importante pela multiplicidade e qualidade de aplicação (FREIRE, 2011).



Figura1. Algodão Branco

Fonte: Embrapa Algodão

O algodoeiro é uma cultura de grande expressão econômica para o Brasil, estando em 2015 dentre os grãos de maiores produtividades, junto com o milho e o arroz. A produtividade de grãos do algodão na safra 2014/2015 chegou a 1,54 toneladas. Estima-se que na safra de 2015/2016 esse valor subirá para 1,69 toneladas (CONAB, 2016). Estes valores demonstram a importância da cultura para o país, pela sua participação expressiva no contexto socioeconômico, gerando divisas pela exportação e como atividade que emprega um crescente número de mão de obra nas diferentes etapas de seu cultivo e distribuição final aos consumidores (Figura 2).

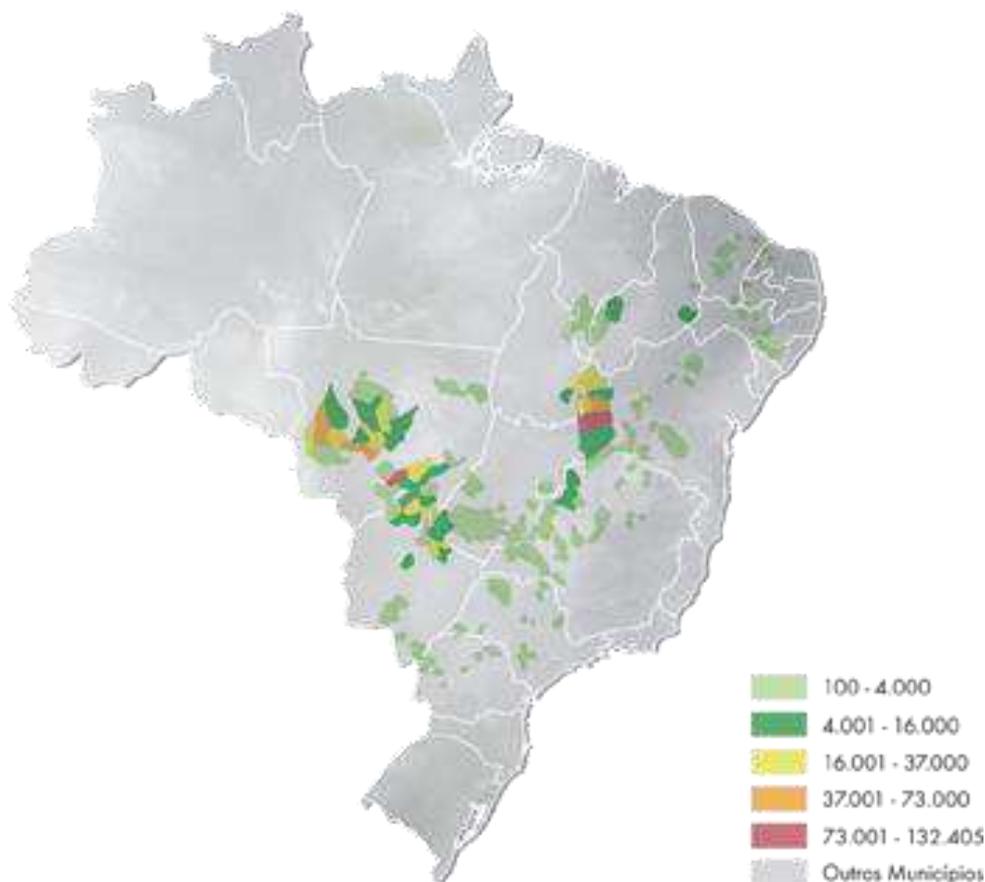


Figura 2. Distribuição de Algodão no Brasil (área em ha)

Fonte: CONAB (2016)

A cultura do algodão está entre as mais importantes do mundo. Todos os anos, uma média de 35 milhões de hectares de algodão é plantada. A demanda mundial tem aumentado gradativamente desde a década de 1950, com o crescimento médio anual de 2%. O comércio mundial do algodão movimentava anualmente cerca de US\$ 12 bilhões e envolve mais de 350 milhões de pessoas em sua produção, desde as fazendas até a logística, o descaroçamento, o processamento e a embalagem (ABRAPA, 2016).

O Brasil é um dos detentores da maior variabilidade existente em espécies de algodoeiro tetraploides, o conhecimento a respeito desta variabilidade é pequeno e, em boa parte, desatualizado, com o agravante de que estudos apontam que tal variabilidade está sendo paulatinamente depauperada devido a fatores agrícolas, socioculturais, econômicos, ambientais e fitossanitários (BARROSO, 2006).

Por isso, esse cenário de expectativa crescente de produção agrícola poderá não se concretizar em decorrência desses problemas, em particular os fitossanitários, que os produtores brasileiros vêm enfrentando ultimamente. Uma das questões que tem atormentado os produtores agrícolas é a ocorrência de *Colletotrichum gossypii* (CG) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC), causadores da ramulose e antracnose (SUASSUNA e COUTINHO, 2011).

3.2 Ramulose e antracnose

A antracnose e a ramulose do algodoeiro são doenças distintas causadas por patógenos com características morfológicas idênticas (Figura 3). O agente causal da ramulose causa a morte do meristema apical da planta de algodoeiro, paralisando o seu crescimento e estimulando a brotação de gemas laterais, com ramos e entrenós curtos e contorcidos, o que reduz o seu porte. Essa doença foi primeiro relatada no Brasil em 1937, e seu agente etiológico descrito como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (ABRAHÃO e COSTA, 1949; SUASSUNA e COUTINHO, 2011), foi considerado como uma forma mais agressiva de *Colletotrichum gossypii*, agente causal da antracnose, inicialmente descrito nos Estados Unidos, e que causa tombamento e morte de plântulas, além de lesões em folhas e maçãs (MEHTA et al., 2005).

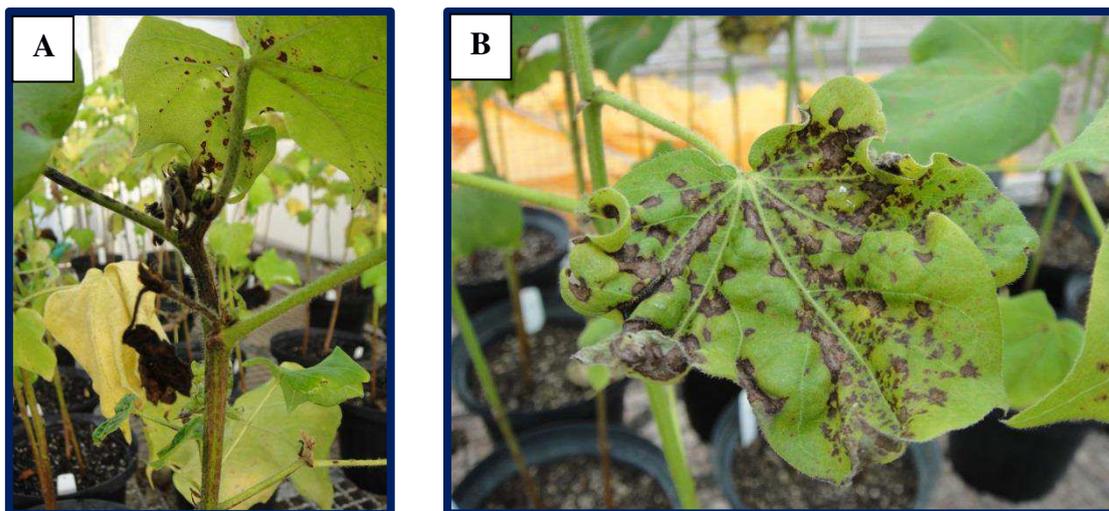


Figura 3. Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de Ramulose nas folhas e haste (A) e Antracnose nas folhas (B)

Fonte: Priscila Simone

O agente causal da ramulose apresenta como principal modo à longa distância de disseminação as sementes, mas, outra via de disseminação é pelo solo contaminado. Por qualquer uma delas, o inóculo primário, encontrando ambiente favorável e hospedeiro suscetível estabelece focos iniciais de infecção. Estes, com o progresso da doença, darão origem a focos secundários que podem levar geralmente a um quadro epidemiológico (ARAÚJO et al., 2012).

O patógeno *C. gossypii*, causador da antracnose, pode ocorrer em qualquer parte do algodoeiro, podendo ser altamente prejudicial para os frutos. As plântulas do algodão quando infectadas, apresentam lesões deprimidas nas raízes e no colo e tem coloração pardo-avermelhadas a pardo-escuras, o que resulta em tombamento (KAMEI et al., 2014).

Durante muito tempo persistiu a dúvida se a antracnose e a ramulose do algodoeiro eram causadas por dois patógenos distintos. A diferenciação desses patógenos por meio de marcadores moleculares foi sugerida por Silva-Mann et al. (2005); no entanto, de acordo com Hyde et al. (2009) não existem relatos consistentes de caracteres morfológicos e mesmo moleculares que permitam diferenciar essas espécies. Essa controvérsia foi recentemente elucidada por Salustiano et al. (2014), que constataram por meio de análises filogenéticas a distinção entre os agentes causais da ramulose e da antracnose, inclusive colocando o agente causal da ramulose como uma linha filogenética dentro do complexo de espécies de *C. gloesporioides*.

Ambos os patógenos, *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, são transmitidos à planta adulta de algodoeiro por sementes ; entretanto, apenas *C. gossypii* var. *cephalosporioides* tem importância quarentenária no Brasil, sendo o padrão de tolerância sugerido pela autoridade fitossanitária brasileira de 0% na amostra aleatória de 600 sementes submetida à análise em um lote de tamanho máximo de 25.000 kg (BRASIL, 2009).

A identificação correta de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* por métodos tradicionais não é uma tarefa fácil, mesmo para profissionais experientes. Tanaka et al. (1996) recomendam a separação desses fungos desenvolvidos sobre sementes com base no hábito de crescimento de ambos sobre raízes e sobre a superfície das sementes, o que em termos práticos é subjetivo e com resultados pouco confiáveis.

Técnicas moleculares têm sido realizadas com sucesso na diferenciação de espécies complexas em vários gêneros de fungos de importância patogênica, dentre os quais *Colletotrichum* (WEIR et al., 2012), inclusive com o desenvolvimento de protocolos para diferenciação dos agentes causais da ramulose e antracnose do algodoeiro (SALUSTIANO et al., 2014); no entanto, essas técnicas são laboriosas e têm alto custo.

Devido a importância quarentenária da ramulose no Brasil, é salutar o desenvolvimento de métodos rápidos, baratos e eficientes que permitam a distinção dos agentes etiológicos da antracnose e da ramulose do algodoeiro. A utilização de imagens hiperspectrais associada a técnicas de reconhecimento padrão e de classificação podem ser uma alternativa para identificação rápida e acurada desses patógenos. Essas técnicas têm sido empregadas com sucesso na detecção e quantificação de micotoxinas produzidas por fungos filamentosos em grãos (SIRISOMBOON et al., 2013) e na identificação e/ou classificação de fungos fitopatogênicos associados a diferentes espécies vegetais (SINGH et al., 2012).

3.3 Identificação de microrganismos (*C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*)

Para esclarecer algum fato que envolva os microrganismos responsáveis pela antracnose e ramulose, é necessário identificá-los ou pelo menos classificá-los. Em relação à identificação de espécies de *Colletotrichum* as dificuldades encontradas estão relacionadas à grande diversidade fenotípica dos isolados fúngicos, a influência dos fatores do ambiente na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias de morfologia das colônias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (BONETT et al., 2010).

Em princípio, as técnicas para a classificação e identificação de microrganismos devem seguir alguns aspectos gerais, tais como: capacidade de identificação universal; ter um baixo custo de operação; apresentar um rápido processo de transferência de informações; e propiciar o compartilhamento das informações através de bancos de dados que devem ser acessíveis e passíveis de atualizações regularmente e possibilitar a identificação de diferentes fontes (ASSIS et al., 2011).

Uma variedade de procedimentos laboratoriais satisfaz as condições mencionadas acima e pode ser utilizada na classificação taxonômica e na identificação de bactérias e/ou fungos. Em laboratórios, estes métodos englobam a análise morfológica das colônias, coloração de Gram, exame microscópico e vários testes bioquímicos e fisiológicos, sejam eles manuais ou automatizados. No entanto, como tais testes bioquímicos dependem de processos metabólicos do microrganismo, o crescimento bacteriano e longos períodos de incubação são necessários e acabam sendo limitantes na liberação dos resultados. Além disso, muitas vezes estes resultados podem ser inconclusivos (SAUER e KLIEM, 2010).

Em análises de rotina, métodos de identificação de microrganismos são baseados na assimilação e reações de fermentação de carboidratos e morfologia. Entretanto, embora aplicados largamente, esses testes apresentem várias limitações, pois consomem tempo e para algumas espécies consideradas próximas, não são tão acurado. Dessa forma, a combinação de vários métodos é necessária para alcançar a identificação correta entre as espécies (SANTOS et al., 2012).

Geralmente os sistemas rotineiros de identificação de microrganismos são baseados em suas características fenotípicas. Na identificação, leva-se em conta o perfil morfológico, enzimático, fisiológico e bioquímico, a escolha de um deles, ou de mais de um, é determinada pelo nível de identificação requerida, número total de amostras examinadas e recursos disponíveis no laboratório (SPOLIDORIO et al., 2011). Entretanto, esses métodos convencionais apresentam limitações, uma vez que não são capazes de identificar claramente certas espécies, podendo muitas vezes ocorrerem resultados falsos negativos e falsos positivos.

Além disso, as técnicas tradicionais são trabalhosas já que, vários testes, um complementando o outro, devem ser realizados para identificação final das espécies (YUCESYOY et al., 2005). Outro fator limitante na identificação é o custo que envolve certos métodos, que embora possam ser mais rápidos acabam não sendo utilizados devido à falta dos mesmos em certos laboratórios. Essa questão é de alta relevância nos casos de reconhecimento em grande escala.

Em adição a tais métodos, ainda pode-se utilizar ferramentas de biologia molecular como a amplificação de determinados genes por PCR (reação em cadeia da polimerase), ensaios imunológicos como ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), API (Analytical Profile Index), sequenciamento do RNA ribossomal da subunidade 16S e marcadores fenotípicos. Porém, estas últimas técnicas são relativamente complicadas, laboriosas e de custo elevado (NEPPELENBROEK et al., 2006).

A biologia molecular tem se mostrado uma ferramenta promissora no campo microbiológico, quando aplicada em casos que a metodologia convencional de identificação, discriminação e caracterização microbiana apresentam resultados inapropriados. Embora seja possível obter resultados rápidos com esses métodos, estudos empregando as técnicas moleculares têm apontado desvantagens nessas abordagens. As principais são em relação ao custo dos materiais empregados como, por exemplo, dos *primers*, a complexidade na interpretação dos dados, bem como a complexidade metodológica dos procedimentos e a necessidade de pessoas preparadas e experientes na manipulação e realização dos testes (XU et al., 2002).

Aliado a biologia molecular, os métodos mais comumente utilizados em laboratórios de patologia de sementes para análises de rotina e detecção de fungos fitopatogênicos são: inspeção visual das sementes, exame da suspensão de lavagem das sementes, incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (“blotter test”) e plaqueamento em meio sólido, BDA ou MEA (BRASIL, 2009).

Estes métodos, apesar de padronizados em laboratórios de patologia de sementes como testes de rotina, são limitados quando existe a necessidade de uma diagnose específica em nível de espécie, subespécie ou variedade (BARROCAS et al., 2014). Somando-se a isso, a carência de recursos humanos com treinamento adequado para detecção e identificação de *gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes, são fatores que facilitam a introdução e disseminação deste fitopatógeno no ambiente. No Brasil, existem poucos laboratórios de sanidade de sementes que possuem equipamentos adequados e pessoas treinadas para a identificação de fungos em nível intraespecífico.

Ao utilizar métodos rotineiros de patologia de sementes *gossypii* var. *cephalosporioides* pode ser confundido com *gossypii*, agente causal da antracnose, já que ambos são transmitidos via sementes e sua distinção morfológica é extremamente difícil e inconsistente (MEHTA e METHA, 2010).

Neste contexto, a taxonomia do Reino Fungi é extremamente complexa, tendo em vista a metodologia clássica atualmente utilizada para a classificação de espécies, que utiliza características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para a classificação de um indivíduo em espécie. Além disso, utilizando estruturas reprodutivas, têm sido classificadas espécies sexuais e assexuais, muitas vezes não representando as relações filogenéticas entre diferentes grupos (ASSIS, 2011).

Em virtude disso, a utilização da análise espectroscópica e hiperespectroscópica para o estudo da diversidade dos fungos tem crescido substancialmente, permitindo a caracterização de isolados clínicos e ambientais de diferentes espécies de fungos. O desenvolvimento de novas técnicas de classificação, em particular hiperespectroscópicas, 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 Identificação de fungos utilizando biologia molecular

A utilização de técnicas moleculares pode ser bastante promissora para solucionar os problemas metodológicos na detecção e diferenciação de patógenos. Na área de biologia molecular, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com objetivo de estudar taxonomia, variabilidade genética e detecção de fungos fitopatogênicos, empregando-se

PCR, RAPD e RFLP, bem como os métodos imunológicos e enzimáticos (ALESSIO et al., 2013).

Dentre as técnicas acima mencionadas, a técnica PCR é considerada a mais adequada para a diagnose devido à sua especificidade. Essa técnica revolucionou a biologia molecular, e associada a outras técnicas, ainda é promissora para a diagnose de patógenos em geral.

Para a PCR, os iniciadores são desenhados para anelar em regiões específicas do DNA do organismo alvo, reproduzindo assim milhões de cópias de uma determinada região e o DNA amplificado pode ser observado por meio de eletroforese. O uso de técnicas moleculares que exploram as variações na sequência de nucleotídeos no gene que codifica o DNA ribossomal (DNAr) e os espaços intergênicos, fez com que ocorresse, na última década, progresso no estudo da ecologia de fungos (ANDERSON e PARKIN, 2007).

A região ITS tem sido a mais utilizada para as análises moleculares do gênero *Colletotrichum*, porém existem preocupações quanto à sua utilização, devido à baixa resolução que o gene tem oferecido para diferenciação das espécies. Isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* não foram separados em dois grupos distintos com a aplicação de algumas técnicas moleculares baseadas na região ITS (CAI et al., 2011).

Mehta e Mehta (2010) avaliaram a variabilidade genética da região ITS DNAr entre *gossypii* e *gossypii* var. *cephalosporioides* através das técnicas moleculares RAPD, ERIC- e REP-PCR e PCR-RFLP. Com a técnica de RAPD foram utilizados oito iniciadores randômicos, os quais revelaram dois grupos distintos, o primeiro sendo formado por 94% dos isolados de sementes e o segundo por 95% dos isolados de folhas. Na análise ERIC- e REP-PCR, os resultados foram semelhantes aos de RAPD. Quanto aos resultados de PCR da região ITS, foi obtido um perfil de bandas semelhantes para todos os isolados, não sendo possível a diferenciação entre as variedades.

Em virtude dessa problemática, muitos desafios ainda existem para a detecção de patógenos via testes moleculares. O uso das ferramentas moleculares representa um grande avanço na diagnose de patógenos transmitidos por sementes, por exemplo. A detecção precisa e rápida de fungos e de outros microrganismos patogênicos em plantas cultivadas através da biologia molecular é de extrema relevância, porém em virtude de ser uma técnica laboriosa e com custo elevado, ainda há muitas limitações. Nesse contexto, o uso de ferramentas espectroscópicas e hiperespectroscópicas de caráter não

destrutivo para a identificação, quantificação e separação de patógenos, vem sendo aplicada com mais frequência.

3.5 Hiperespectroscopia de imagem no infravermelho próximo e suas aplicações

A partir da metade do século XX, o desenvolvimento de novos dispositivos elétricos e eletrônicos permitiu a obtenção de imagens digitais. Com os recentes avanços tecnológicos, foi possível adquirir não só imagens em escalas de cinza e RGB (RGB: Red, Green, Blue), mas também realizar a aquisição das chamadas Imagens Hiperespectrais.

Estas imagens, além de possuírem informações espaciais, também contêm informações a respeito da composição química, apresentando 18 espectros ou canais espectrais para cada pixel da imagem. Desta forma, têm-se informações locais sobre a composição, bem como sobre a distribuição dos componentes na amostra. Quando desdobradas em uma matriz de dados, essas imagens podem ser submetidas a técnicas quimiométricas adequadas (GELADI et al., 2007).

Imagem hiperespectral é uma tecnologia relativamente nova que vem se mostrando promissora em diferentes aplicações em diversas áreas. Apresenta vantagens como permitir avaliar a distribuição de componentes ou propriedades, permitir selecionar áreas de interesse para posterior análise, além da rapidez e natureza não destrutiva. Quando se compara a imagem hiperespectral com a obtenção de espectros pela espectroscopia clássica, a espectroscopia de imagem (ULRICI et al., 2013), como também é chamada, mostra-se muito inovadora e vantajosa, pois fornece simultaneamente informação espacial e espectral a uma dada amostra (LEIVA-VALENZUELA et al., 2014; PIQUERAS et al., 2014; SERRANTI et al., 2011).

As imagens hiperespectrais podem ser definidas como estruturas tridimensionais (hipercubos) formadas por três dimensões: duas espaciais ($x - y$) e uma referente ao comprimento de onda (λ) (BURGER e GOWEN, 2011; GOWEN et al., 2011).

Os hipercubos possuem muitos dados, estes quando tratados matematicamente, podem fornecer muitas informações de interesse sobre a amostra (WU e SUN, 2013). O tratamento dos dados dos hipercubos é realizado a partir da aplicação de métodos multivariados. Para isso, o hipercubo deve passar por um desdobramento (Figura 4), ou

seja, passar de três dimensões (x, y, λ) para duas dimensões $\{(x \times y), \lambda\}$ (FERRARI et al., 2013).

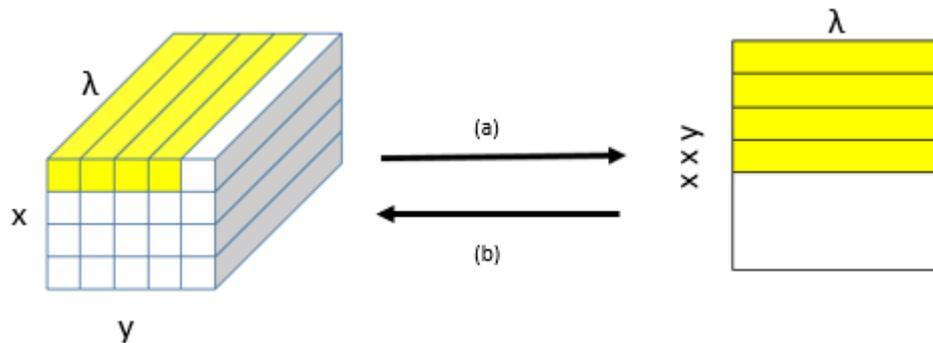


Figura 4. Estrutura tridimensional de um hiper-cubo (Imagens hiperespectrais) (a)

Desdobramento do hiper-cubo e (b) Redobramento do hiper-cubo

Fonte: Adaptada de De Juan et al. (2005)

Após o processo de desdobramento do hiper-cubo, o número total de pixels será $x \times y$, sendo esta a primeira dimensão das duas dimensões 2D e a segunda sendo o comprimento de onda (DE JUAN et al., 2005). Destaca-se também que no processo de desdobramento, a informação original não é alterada, uma vez que os pixels podem ser analisados como amostras individuais, pois cada pixel representa um espectro (CARNEIRO e POPPI, 2014; KUCHERYAVSKIY, 2013), como mostra a Figura 5.

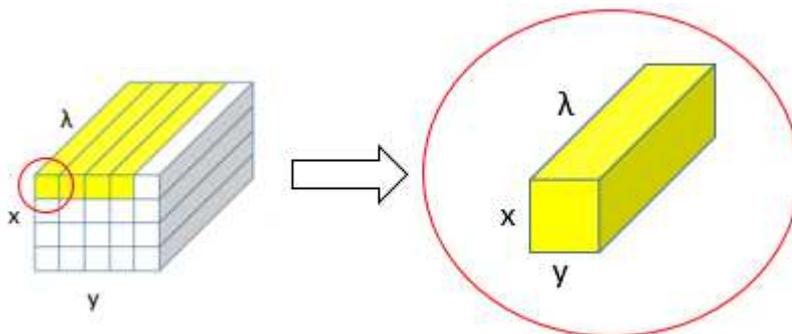


Figura 5. Demonstração que cada pixel do desdobramento do hiper-cubo possui um espectro completo

Fonte: Caetano (2015)

O uso de imagens hiperespectrais possui uma vasta aplicação em diversas áreas de conhecimento. Na área de fármacos, pode ser utilizada para analisar a uniformidade da distribuição de diversos comprimidos comerciais (CRUZ et al., 2011). Na indústria

alimentícia, pode ser utilizada para controle de qualidade, como a detecção de fungos toxigênicos usando imagens hiperspectrais em grãos (YAO et al., 2008). Na área médica, podem ser utilizadas juntamente com técnicas específicas de análise para avaliar imagens, como imagens Raman para o estudo de cálculo renal (PIQUERAS et al., 2011).

Na área das ciências forenses, a imagem hiperespectral pode ser utilizada na identificação de impressões digitais (TAHTOUH et al., 2011), detecção de componentes de explosivos (RUXTON et al., 2012), e de manchas de sangue em locais de crime (SCHULER et al., 2012).

Durante a década de 70, as técnicas de imagens hiperespectrais na região do NIR (HI-NIR: Near Infrared – Hyperspectral Images) eram aplicadas a análises de sensoriamento remoto, e, apenas a partir dos anos 90, essas técnicas começaram a ser utilizadas na área de alimentos (BELLON-MAUREL, 2009). Atualmente, uma grande variedade de trabalhos é apresentada na literatura com aplicações das técnicas de HINIR para a avaliação de produtos farmacêuticos (PRATS-MONTALBÁN et al., 2012).

O milho, uma das principais fontes de alimentação humana, animal e também matéria-prima importante para produzir o álcool como combustível, também é submetido à infecção por fungos toxicogênicos não só no campo, durante a colheita, mas também em instalações de armazenamento. Para isso, foi avaliada em sua pesquisa a viabilidade de detecção da aflatoxina B1 em grãos de milho inoculados com *Aspergillus flavus* por meio da hiperespectroscopia de imagem no infravermelho próximo. Através de cálculos quimiométricos, eles analisaram que os comprimentos de onda de 1729 nm e 2344 nm foram identificados para indicar exclusivamente AFB1, demonstrando, que a técnica de imagem hiperespectral pode ser usada para detectar a aflatoxina em grãos de milho, inoculadas artificialmente, no campo (WANG et al., 2015).

Singh et al. (2012) examinaram várias técnicas não invasivas a fim de substituir ferramentas manuais para análise de fungos. Contudo, muitos destes métodos não são capazes de detectar níveis baixos de infecção em que as mudanças fisiológicas claras não são perceptíveis. Porém, Wang et al. (2014) analisaram que comprimentos de onda entre 1000 e 2500 nm podem ser usados para detectar Aflatoxina B1 em concentrações tão baixas como 10 ppb, se aplicados diretamente sobre as superfícies do milho, por exemplo, e alguns comprimentos de onda chave, tais como 1729 nm e 2344 nm.

Yao et al. (2008) utilizou um sistema de imagem hiperespectral de mesa, oVNIR-100E, para aquisição de dados espectrais e espaciais, com a finalidade da viabilidade do uso de dados de imagens espectrais para a classificação de espécies fúngicas. Utilizou-se um total de cinco espécies de fungos e constataram que as cinco são altamente separáveis, com a precisão da classificação de 97,7%.

Para a detecção de patógenos, Shah e Khan (2014) utilizaram duas técnicas: imagem hiperespectroscópica e imagens de raio-x. A precisão de classificação foi de 80 a 100% em várias combinações de pragas e grãos. Os hipercubos foram analisados através da aplicação de técnicas quimiométricas, tais como análise de componentes principais (PCA) para fins de exploração, pelos mínimos quadrados parciais e análise discriminante (PLS-DA) para a classificação de três tipos de trigo e intervalo PLS-DA (iPLS-DA) para a seleção de um conjunto reduzido de intervalos de comprimento de onda efetivo. O estudo demonstrou que os resultados da boa classificação foram obtidos quando o intervalo inteiro de comprimento de onda investigados foi considerado, e também quando apenas três de 121 pequenos intervalos de comprimento de onda foram explorados (1209-1230, 1489-1510 e 1601-1622 nm).

Williams et al. (2009) fizeram a classificação de dureza do milho, utilizando imagens hiperespectrais no infravermelho próximo com análise multivariada e análise de imagem para distinguir entre grãos de milho duro, intermediário e macio de linhagem. Os dados foram obtidos utilizando uma Câmera MatrixNIR com uma faixa espectral de 960-1662nm e a faixa espectral utilizada no infravermelho foi de 1000nm a 2498nm (pelo SisuChema SWIR). A reprodutibilidade dos resultados obtidos com os diferentes conjuntos de dados indica que o método proposto apresentou potencial real para usos futuros de classificação.

Yao et al. (2008) utilizou imagens hiperespectrais (visível e infravermelho próximo) para diferenciar fungos de diferentes espécies. Os resultados indicaram que todos os cinco fungos analisados foram altamente separáveis com a precisão da classificação de 97,7%. Além disso, todos os cinco fungos puderam ser classificados usando apenas três faixas estreitas: 743 nm, 458 nm e 541 nm.

Kong et al. (2013) exploraram a viabilidade de identificação de variedades de sementes de arroz usando imagens hiperespectrais e análise de dados multivariadas. Os autores concluíram que a técnica de imagens hiperespectrais na identificação de cultivares é uma técnica de classificação bastante eficaz.

Sistemas de imagens hiperespectrais estão começando a ser usados como uma ferramenta científica para a avaliação da qualidade alimentar. Portanto, trabalhos recentes têm-se centrados no desenvolvimento de novos sistemas baseados nesta técnica. Lorente et al. (2012) descreveram em seu artigo obras recentes que utilizam imagens hiperespectrais para a inspeção de frutas e legumes, explicando as diferentes tecnologias disponíveis para adquirir as imagens, a sua utilização para a inspeção não destrutiva e características externas desses produtos.

3.6 Análise multivariada espectral

Quando estamos trabalhando com imagens no infravermelho, cujos espectros são similares (como duas canetas esferográficas, por exemplo), é necessário empregar técnicas quimiométricas com a finalidade de extrair informações relevantes que podem ser visualmente imperceptíveis. Assim, técnicas de redução de dimensionalidade, segmentação, análise exploratória, resolução, compressão, entre outras se fazem necessárias, e envolve a extração de informações relevantes, oriundas de dados químicos obtidos através de um determinado número de amostras, utilizando para isso, ferramentas matemáticas e estatísticas (KUMAR et al., 2014; DOMINGO et al., 2014).

A análise multivariada de dados possui várias linhas de atuação, entre elas, podemos citar as mais usuais que são: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada (DE BARROS NETO et al., 2006).

O uso de dados multivariados é capaz de reduzir a quantidade de ruído, melhorando a precisão e fornecendo a capacidade de determinação simultânea de muitas propriedades de uma amostra através de um único sinal multivariado (KUMAR et al., 2014). Diante dessas vantagens, a calibração multivariada tornou-se uma ferramenta indispensável para a determinação quantitativa em química analítica. Na literatura são reportados diversos métodos usados para a construção de modelos de calibração multivariada, em que muitos deles essencialmente diferem pela obtenção da inversa generalizada para estimar os coeficientes de regressão.

Segundo Breitz et al. (2014), o planejamento e otimização de experimentos consiste em estabelecer e conduzir o menor número de experimentos necessários para extrair o máximo de informação dos dados coletados de modo a avaliar e/ou otimizar um produto ou processo.

Já, o reconhecimento de padrões é utilizado visando a obtenção de modelos matemáticos que sejam capazes de reconhecer ou classificar amostras (IQBAL et al., 2014). Esta técnica pode ser: supervisionada ou não supervisionada. A escolha de qual deve ser utilizada irá depender das informações disponíveis e do objetivo pretendido (GREDILLA et al., 2013). Nas técnicas supervisionadas deve existir um conhecimento prévio sobre a identidade das amostras, para que seja possível a classificação (YI et al., 2013). Já nas técnicas não supervisionadas não é exigido o conhecimento prévio sobre a identidade das amostras. Os métodos supervisionado e não supervisionado que serão explanados nesta tese são a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais e a Análise por Componentes Principais.

O uso dos métodos espectroscópicos em análise quantitativa geralmente está associado ao uso de ferramentas quimiométricas. Modelos de calibração por PLS (Partial Least-Square Regression - regressão por mínimos quadrados parciais) são os mais utilizados e estão intimamente relacionados a outros modelos de calibração multivariada tais como o MLR (Multiple Linear Regression) e o PCR (Principal Components Regression). A calibração multivariada é o processo de construção de um modelo que visa a previsão de características ou propriedades de interesse de amostras desconhecidas (BEEBE, 1998). O modelo construído irá relacionar, em geral, os espectros das amostras com a propriedade de interesse, que pode ser de origem química, física ou biológica (GELADI, 2003).

Em sistemas químicos a concentração de uma ou mais espécies pode ser estimada a partir da medida das propriedades deste sistema, tal como a absorção de radiação eletromagnética que apresenta uma relação linear entre o espectro e a concentração da amostra, conhecida como Lei de Beer-Lambert, que matematicamente pode ser descrita como:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} b C$$

Onde A_{λ} corresponde ao valor da absorbância em um número de onda específico, ϵ_{λ} corresponde à absorvidade molar do material nesse número de onda, b é o caminho óptico e C a concentração da amostra.

3.7 Métodos Multivariados

3.7.1 Reconhecimento de padrões

3.7.1.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é uma técnica de reconhecimento de padrões não-supervisionado, cujo princípio é manipular matematicamente um conjunto de dados de natureza multivariada, objetivando a redução da dimensionalidade das variáveis e representação das variações existentes na forma de componentes principais (PCs) (Figura 6) (HUANG et al., 2015).

As PCs são as representações dos novos eixos formados a partir da combinação linear das variáveis originais e nelas estão contidas as informações mais relevantes dos dados. Elas são sempre ortogonais (perpendiculares) umas às outras, e sucessivas PCs descrevem quantidades decrescentes da variância explicada dos dados. Em geral, poucas PCs são necessárias para que toda ou a maior parte da variância dos dados seja explicada (BORRÁS et al., 2014).

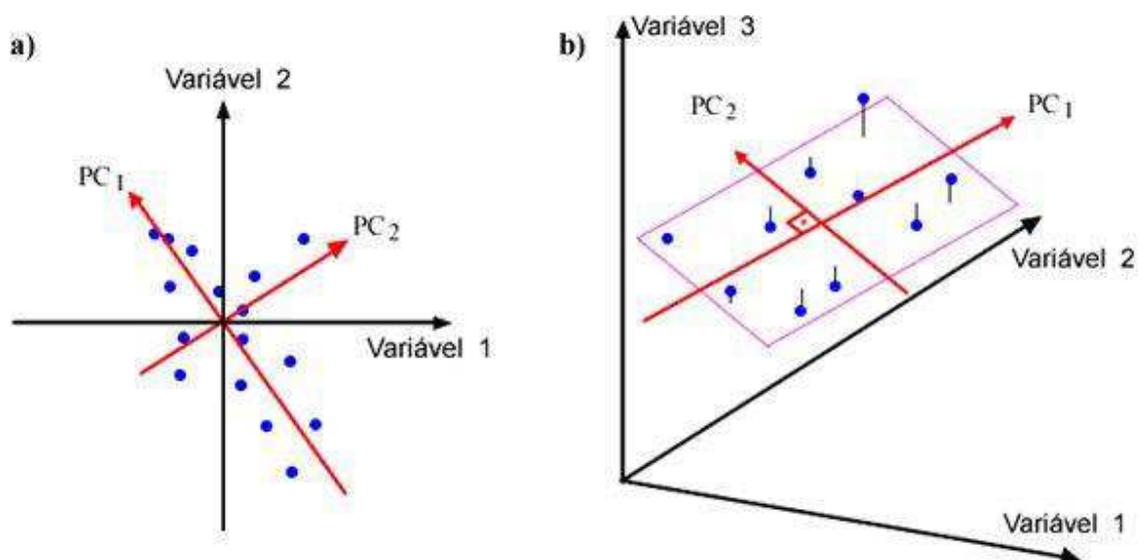


Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) - Primeira e segunda PCs no espaço tridimensional das variáveis

O método da PCA é representado pela Equação:

$$X = TP^T + E$$

Na PCA ocorre à decomposição da matriz X em um produto de duas matrizes, a matriz dos escores (T) e a matriz dos pesos (P), somada com a matriz de erros (E) (DE SOUZA e POPPI, 2012). Os escores representam as coordenadas das amostras (ou pixels, no caso de imagens) no espaço das PC's, enquanto que os pesos (loadings) representam a relevância das variáveis originais em cada PC.

A Análise de Componentes Principais (PCA: Principal Component Analysis) se apresenta como uma ferramenta muito comum e eficaz na redução de dimensionalidade, mantendo as informações mais relevantes do conjunto de dados (BEEBE et al., 1998).

A aplicação da PCA em imagens hiperespectrais é de grande utilidade para a extração de informações a respeito de características importantes da amostra, uma vez que é possível comprimir os dados, preservando informações fundamentais, e interpretar a correlação entre as variáveis utilizadas e a estrutura da amostra. Assim, a PCA pode ser utilizada como um instrumento para seleção de características da imagem (PRATS-MONTALBÁN et al., 2011).

PCA é uma técnica bastante utilizada como base para outras técnicas quimiométricas multivariadas como, por exemplo, o SIMCA, que é uma técnica de reconhecimento de padrão supervisionado.

3.7.2.1 SIMCA

A modelagem independente flexível por analogia de classe (SIMCA, do inglês Soft Independent Modelling of Class Analogy) é a principal técnica para o desenvolvimento de modelos supervisionados que modela a localização das classes no espaço multidimensional pelo cálculo de PCs separadamente para cada categoria. Nesse sistema, uma amostra desconhecida pode ser classificada como pertencente a uma, a mais de uma ou a nenhuma das categorias predefinidas (BRERETON, 2003). Uma classe é modelada a partir do número de PCs selecionados por validação cruzada.

O sistema SIMCA apresenta duas grandes vantagens em comparação a outros métodos de reconhecimento de padrões (HERRERO LATORRE et al., 2013). Cada classe de dados é modelada separadamente do resto das classes, o que evita a influência de uma sobre as outras no processo de definição das classes. Além disso, SIMCA é capaz de detectar outliers, o que significa que a técnica é capaz de identificar amostras que não pertençam a quaisquer das classes determinadas. Assim como os outros procedimentos supervisionados de reconhecimento de padrões, a SIMCA consiste dos seguintes passos (BERRUETA et al., 2007):

(i) Seleção de um conjunto de treinamento, de validação e de teste, que consistem de objetos de associação de classes conhecidas para as quais as variáveis são medidas;

(ii) Seleção das variáveis, para eliminar aquelas que correspondam a ruído ou que não tenham poder discriminante;

(iii) Construção de um modelo utilizando o conjunto de treinamento, gerando categorias que agrupam as variáveis medidas;

(iv) Validação do modelo utilizando um conjunto independente de amostras, para avaliar a consistência da classificação.

O número de PCs em cada classe não deve ser muito alto, pois há risco de se modelar baseado em ruído ou em dados aleatórios, e nem deve ser muito baixo, pois se pode deixar de incluir variação suficiente, diminuindo o poder explanatório do conjunto de dados (BERRUETA et al., 2007).

Também é possível a construção de modelo SIMCA contendo uma só classe, assim as amostras podem ser classificadas como pertencentes à classe predefinida ou como não pertencente a qualquer classe. O método é validado por estabelecimento de um conjunto de amostras de validação que seja independente do conjunto de amostras de treinamento que foi utilizado para construir o modelo. O conjunto de amostras para validação deve ser previamente conhecido para que se verifique a fidelidade de sua classificação. Se não houver amostras independentes suficientes para validação externa do modelo, uma validação cruzada interna pode ser realizada. Para este tipo de validação interna, o próprio conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos: treinamento e validação (ALMEIDA et al., 2013).

A validação cruzada interna é realizada pela segmentação do conjunto de dados. Um dos segmentos é deixado de fora e um modelo é construído com o restante dos segmentos, o conjunto de treinamento. Este modelo é então validado com o segmento

externo, o conjunto de validação. O procedimento é repetido tantas vezes quantas forem os segmentos deixados de fora e, para cada modelo, este conjunto externo é utilizado para validação. Ao longo do processo teremos, portanto, diversos conjuntos de treinamento e de validação. Assim, ao final da validação cruzada, haverá não apenas um modelo, mas um grupo de modelos que descrevem o conjunto de dados (ENKILDE et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi desenvolvido na Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola (UAEA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no Laboratório de Fitopatologia e no Laboratório Avançado de Tecnologia Química (LATECQ), da Embrapa Algodão, em Campina Grande, Paraíba.

4.2 Origem dos fungos

Neste estudo foram utilizados 5 isolados de *Colletotrichum gossypii* (CG) e 46 isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC), oriundos da Coleção de Trabalho de Culturas de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão.

4.3 Isolados e cultivo em meio de cultura

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 de algodão nos Estados de Goiás e Mato Grosso (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* usados neste estudo

Espécie	CNPA	Hospedeiro/substrato	Origem
<i>C. gossypii</i>	0037	Algodão - semente	Acreúna- GO
<i>C. gossypii</i>	0095	Algodão - semente	MT
<i>C. gossypii</i>	0109	Algodão - semente	MT
<i>C. gossypii</i>	457-1	Algodão - semente	MT
<i>C. gossypii</i>	457-2	Algodão - semente	MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0038	Algodão - folha	Rondonópolis - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0039	Algodão - folha	Mineiros - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0040	Algodão - folha	Pedra Preta - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0041	Algodão - folha	Pedra Preta - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0043	Algodão - folha	Novo São Joaquim - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0044	Algodão - folha	Pedra Preta - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0045	Algodão - folha	Pedra Preta - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0046	Algodão - folha	Pedra Preta - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0048	Algodão - folha	Rondonópolis - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0049	Algodão - folha	Rondonópolis - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0051	Algodão - folha	Sapezal - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0052	Algodão - folha	Primavera do Leste - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0053	Algodão - folha	Santa Helena de Goiás - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0056	Algodão - folha	Alto Taquari - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0057	Algodão - folha	Mineiros - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0059	Algodão - folha	Mineiros - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0061	Algodão - folha	Primavera do Leste - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0062	Algodão - folha	Mineiros - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0063	Algodão - folha	Mineiros - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0067	Algodão - folha	Chapadão do Céu - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0069	Algodão - folha	Pedra Preta - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0070	Algodão - folha	Itiquira - MT

<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0071	Algodão - folha	Itiquira - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0072	Algodão - folha	Primavera do leste - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0074	Algodão - folha	Itiquira - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0075	Algodão - folha	Itiquira - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0078	Algodão - folha	Primavera do Leste - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0079	Algodão - folha	Primavera do Leste - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0082	Algodão - folha	Chapadão do Céu - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0083	Algodão - folha	Itiquira - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0084	Algodão - folha	Pedra Preta - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0086	Algodão - folha	Novo São Joaquim - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0104	Algodão - folha	Santa Helena de Goiás - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0105	Algodão - folha	Santa Helena de Goiás - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0107	Algodão - folha	Santa Helena de Goiás - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0113	Algodão - folha	Campo Verde - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0116	Algodão - folha	Campo Verde - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0117	Algodão - folha	Campo Verde - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0121	Algodão - folha	Campo Verde - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0123	Algodão - folha	Santa Helena de Goiás – GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0124	Algodão - folha	Santa Helena de Goiás - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0127	Algodão - folha	Cachoeira Dourada - GO
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0132	Algodão - folha	Alto Taquari - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0133	Algodão - folha	Alto Taquari - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0134	Algodão - folha	Alto Taquari - MT
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	0135	Algodão - folha	Itiquira - MT

Para obtenção das imagens hiperspectrais, os diferentes isolados avaliados foram crescidos em placas plásticas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio de cultura Czapeck-ágar. Os diferentes isolados testados foram incubados durante 15 dias em câmara de crescimento tipo B.O.D, com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Com a finalidade de conseguirmos uma metodologia eficaz no período de incubação as placas, contendo os fungos, foram colocadas na B.O.D na horizontal. Após o período de dois dias, começou-se a observar que a tampa da placa de Petri apresentava gotículas de água (Figura 7).



Figura 7. Placa de Petri contendo o fungo *Colletotrichum gossypii* com gotículas de água na tampa

Mesmo após ser verificado que a placa estava com gotículas de água em sua superfície, decidiu-se fazer a leitura no Spectrometro. Como é possível observar na Figura 8, o fungo absorveu parte da água e em virtude disso, a leitura ficou comprometida. Esse fenômeno interferiu nos resultados, pois sobressaíam os espectros que continham as moléculas de água.



Figura 8. Placa de Petri aberta com água na superfície do fungo *Colletotrichum gossypii*

Após o uso dessa técnica, verificou-se que o procedimento mais adequado seria inverter a placa, pois dessa forma, toda a umidade iria para a tampa e não cairia na placa, como pode ser observado na Figura 9.

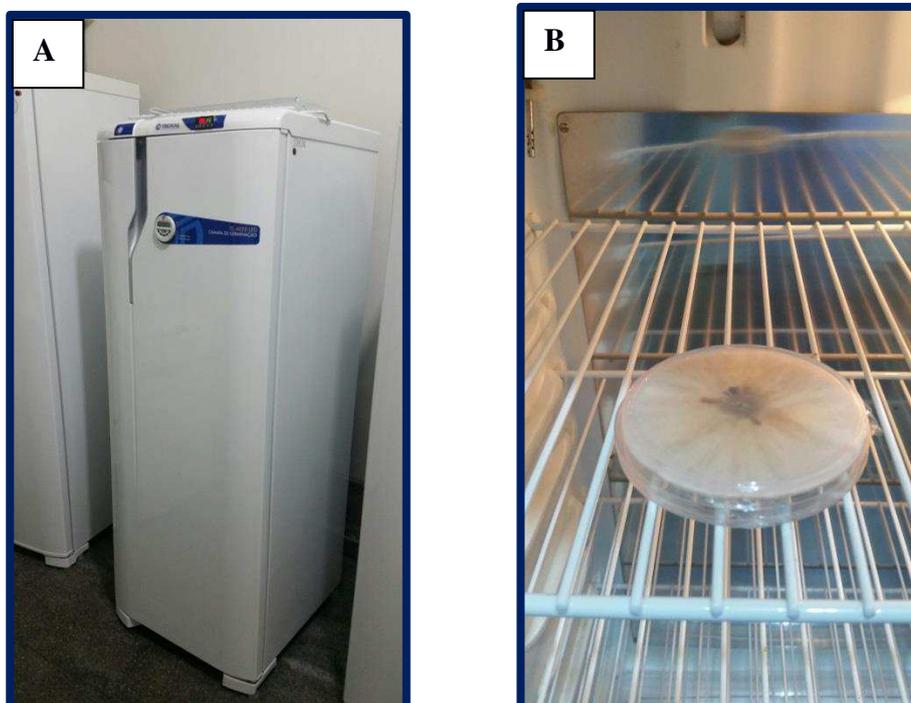


Figura 9. A) Câmara incubadora (BOD). B) Placa de Petri invertida contendo o *Colletotrichum gossypii*

4.4 Testes de Patogenicidade

A capacidade dos isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* causarem doenças em plantas de algodoeiro foi testada neste estudo. Foram avaliados três isolados de *C. gossypii* (CNPA 0735, CNPA 0736 e CNPA 0738) e cinco isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CNPA 0060, CNPA 0080, CNPA 0094, CNPA 0117 e CNPA 0123). Cada isolado foi crescido em placas de Petri contendo meio BDA (Batata – Dextrose – Ágar) em câmara de crescimento tipo B.O.D com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 10 dias para estimular a esporulação dos patógenos. Na preparação da suspensão de inóculo, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa. Os conídios foram liberados das colônias fúngicas, com o auxílio de alça de Drigalski, e a suspensão resultante filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada. A suspensão de conídios foi ajustada para 1×10^5 esporos por mL, utilizando-se hemacitômetro.

Plantas de algodoeiro da cultivar BRS Cedro, reconhecidamente suscetível a ambos os patógenos, foram crescidas em vasos plásticos de 5 litros (duas plantas por vaso), contendo uma mistura de turfa e vermiculita (3:1), e mantidas em casa-de-vegetação com controle de temperatura (25 ± 5 °C) e umidade (80%) durante 40 dias. As plantas foram inoculadas aos 36 DAE (Dias Após a Emergência), pulverizando-se a suspensão de conídios dos patógenos, previamente preparadas, com um pulverizador pressurizado a ar, sobre as plantas até o ponto de escorrimento. O tratamento controle consistiu de plantas pulverizadas apenas com água destilada esterilizada. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições arranjadas em blocos ao acaso.

4.5 Técnicas moleculares (extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento)

4.5.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os isolados foram mantidos em meio para crescimento rápido (2 g de Peptona, 10 g de Dextrose, 1,5 g de Caseína, 2 g de Extrato de Levedura e 16 g de ágar para 1 L de H₂O). A obtenção de massa micelial para extração de DNA os isolados foram crescidos em frascos de 250 mL com 50 mL de meio descrito acima sob agitação de 150rpm por aproximadamente 3 dias a 25 ° C.

4.5.2 Extração de DNA

O DNA total dos isolados monospóricos (Tabela 1) foi extraído seguindo procedimentos de extração por CTAB (Doyle e Doyle, 1990) de micélio macerado em nitrogênio líquido. A quantificação do DNA extraído foi feita por meio do espectrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e em gel de agarose 0,8% para análise da quantidade e qualidade das amostras. As amostras foram diluídas para uma concentração de 50 ng μ L⁻¹.

4.5.3 Diagnóstico molecular de CG e CGC

Para diagnóstico molecular diferencial entre CG e CGC foi utilizada a região IGS (Intergenic Spacer) do rDNA. Um fragmento de 3.3 kb de CG e outro de 2.7 Kb de CGC foram completamente sequenciados e os gaps entre CG e CGC foram localizados para desenho de um set de primers que permitissem o diagnóstico molecular via PCR.

Os primers IGS detect F2-5'GAAAAGTAAGTACCCCGAA3' e IGS detect R- TGGCGGCGGTGAGTCGGGGTGC amplificam um fragmento de 432 pb para CG e 148 pb em CGC. As reações de PCR foram realizadas em volume de 20 μ L utilizando 50 ng de DNA total; tampão 1X com 2 mM de MgCl₂; dNTPs 0,4 mM; Taq DNA Polimerase 1U e 0,2 μ M de cada primer. As condições para amplificação foram de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento dos primers a 65°C por 15 segundos, síntese 72 °C por 30 segundos. Finalizados os ciclos foi realizada uma extensão de 72°C por 10 minutos.

4.6 Imagem hiperespectral no NIR

A obtenção das HSI-NIR dos isolados de CG e CGC foram adquiridas por meio do espectrômetro sisuChema SWIR - Specim®, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland. As condições utilizadas foram: faixa de varredura de 5 cm por linha, lente de 50 mm, resolução espectral de 10 nm; o número de pixels espacial foi de 320/s, resolução espacial de 150 μm e a faixa espectral utilizada foi de 1000 a 2500 nm, com 256 bandas, uma câmera de alta performance e o software ChemaDAQ. (Figura 10).



Figura 10. Espectrômetro sisuChema SWIR - Specim®, responsável pela obtenção das imagens hiperespectrais

A altura entre a lente e a amostra foi definida em 31 cm, a velocidade do transportador foi fixada em 30mm/s para assegurar a mesma forma espacial do isolado 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 amostras de CG e CGC foram colocadas em cima da bandeja do equipamento (Figura 11).

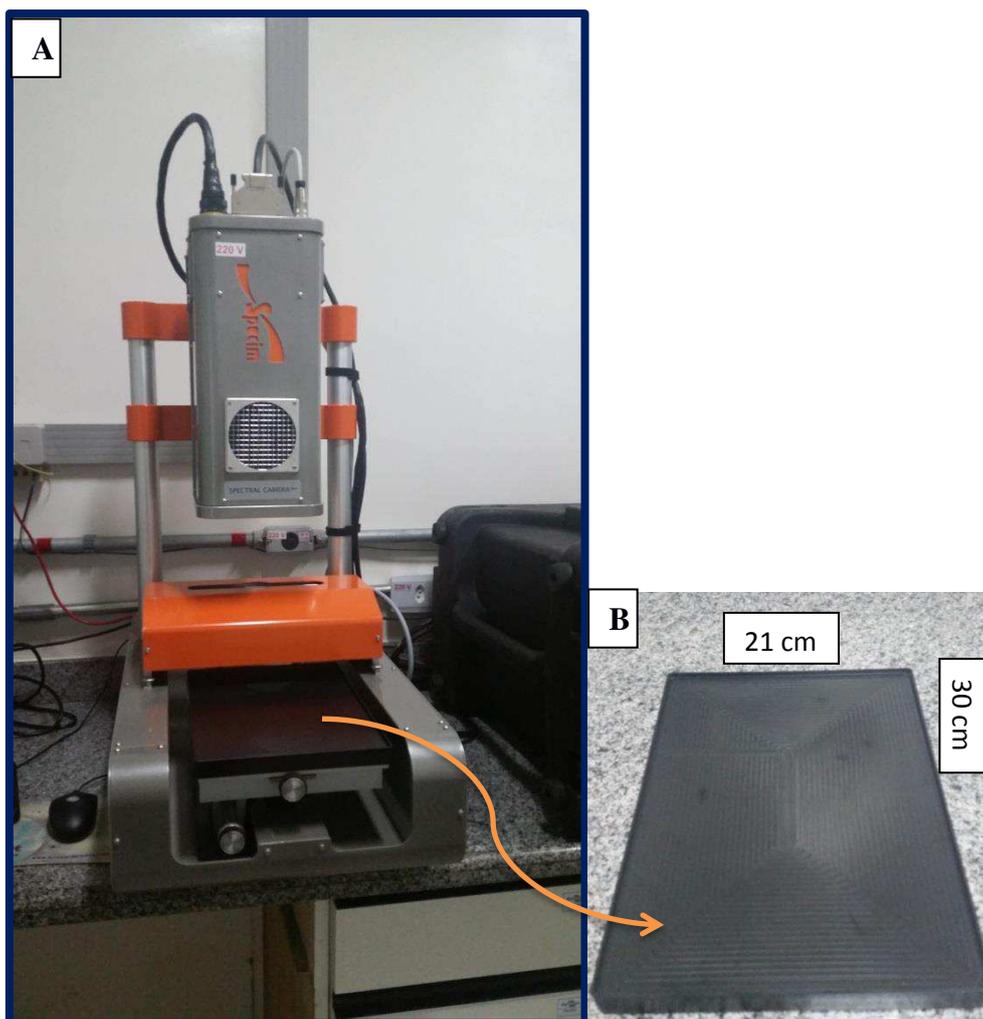


Figura 11. (A) Scanner do espectrômetro sisuChema SWIR - Specim® ; (B) bandeja do equipamento

Os isolados foram medidos em uma linha de varredura contemplando quatro unidades com leituras simultâneas de duas a duas. A aquisição das HSI inclui a digitalização da matriz linear pelo detector ao longo do eixo Y e o movimento do isolado sobre o eixo X, e os espectros NIR no eixo Z da amostra. Assim, um dado hipercubo 3D que representava as HSI continha a informação da imagem espacial e espectral (NIR) que poderá ser utilizada para identificar os patógenos CG e CGC (Figura 12).

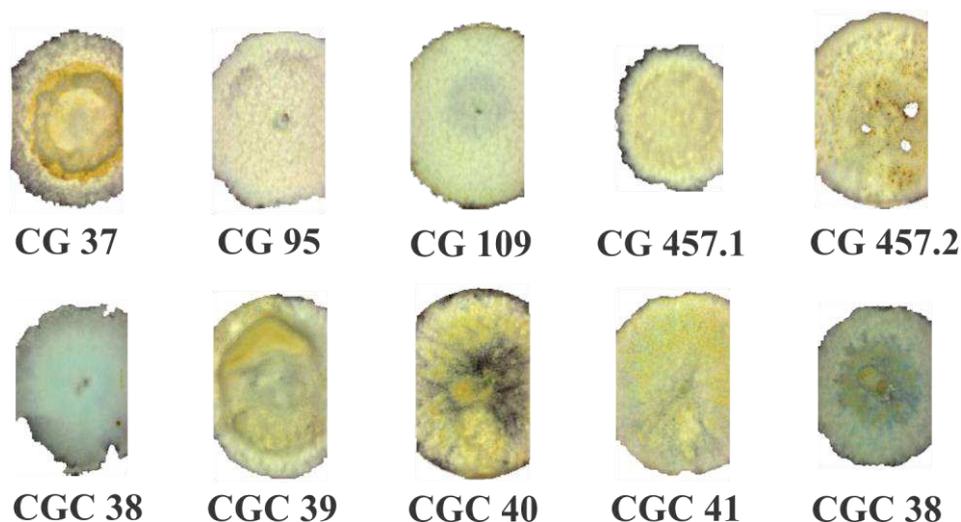


Figura 12. Imagens hiperespectrais no infravermelho próximo de cinco isolados de *Colletotrichum gossypii* e de cinco isolados de *Colletotrichum var. cephalosporioides*

Os HSI-NIR foram salvos em formato bruto e o pré-processamento dos dados foi realizado a partir das médias de cada amostra de HSI-NIR, nas quais os dados foram centrados na média dos espectros NIR e suavização por Savitzky Golay com uma janela de 2 pontos antes e 2 pontos depois do ponto central com um polinômio de segunda ordem.

4.7 Métodos de análise multivariada

4.7.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

O conjunto de dados HSI-NIR médio dos 51 isolados de CG e CGC foi analisado com uma PCA. Os espectros médios de cada isolado foram retirados selecionando toda uma imagem do isolado, e, escolhendo-se o quadro em que estariam dispostos os espectros, adicionando-se a média da seleção empregando o software UnBio Evince versão 2.6.0; em seguida, realizou-se uma PCA no ambiente do software The Unscrambler X.3.

4.7.2 Análise de APS-LDA e SIMCA

O APS-LDA precisa de três matrizes espectrais chamadas de treinamento, validação e predição. Esses conjuntos foram construídos empregando-se o algoritmo KS

([32]) o qual separou as amostras oriundas dos isolados de CG em 3, 1 e 1 e 20, 8, 18 para CGC, totalizando 23 (Treinamento, 9 (Validação) e 19 (Predição) que somaram os 51 isolados fúngicos de CG e CGC. Foi atribuído um índice de classe para os isolados avaliados chamados de Group_Train, Group_Test e Group_Pred. Este índice para os isolados da classe CG foi atribuído o número 1 e para os isolados CGC foi indicado o número 2. N1 e N2 representaram os números de variáveis de mínimo (1) e máximo (20) que o APS-LDA selecionaria, respectivamente.

A resposta do APS-LDA fornece o número de erros dos conjuntos de teste e de previsão, bem como o custo obtido pelo conjunto teste com o número ótimo de variáveis. Para saber qual foi a amostra em que houve erro e em qual classe ela foi incluída, aplica-se o conjunto de previsão ao algoritmo multilda.m com as variáveis (l) selecionadas pelo SPA, por exemplo: `[class,errors] = multilda(Pred(:,l),Train(:,l),Group_Train,Group_Pred)`.

Realizou-se ainda uma PCA para cada grupo de isolados de CG e CGC para um modelo SIMCA. As amostras foram validadas empregando-se a rotina de full cross-validation ficando para o conjunto de treinamento/ validação cruzada 4 e 28 amostras, e para o conjunto de previsão 1 e 18 amostras dos conjuntos dos isolados de CG e CGC, respectivamente.

4.7. 3. Técnica DEQ ou boxplot

As variáveis escolhidas pelo APS nos dados HSI-NIR foram selecionadas e colocadas no Microsoft Excell® para aplicar os dois métodos DEQ para os cinco isolados de CG e os 46 isolados de CGC. Os valores dos limites inferior (LL) e limite superior (UL), equações 3 e 4, representam as intensidades dos outliers.

$$LL = q(0,25) - 1,5 (q(0,75) - q(0,25)) \quad (\text{equação 3})$$

$$UL = q(0,75) + 1,5 (q(0,75) - q(0,25)) \quad (\text{equação 4})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes de patogenicidade

Todos os isolados de CG e CGC testados induziram sintomas, respectivamente, de antracnose e de ramulose nas plantas de algodoeiro inoculadas aos 36 DAE (Figura 13). As plantas inoculadas com CGC apresentaram sintomas iniciais de ramulose, ou seja, lesões foliares em forma de estrela - mancha estrela (Figuras 13A e 13B), entre uma e duas semanas após a inoculação do fungo; entre 20 e 30 dias, os sintomas evoluíram para morte do meristema apical (Figura 13C) e paralisação do crescimento da planta e brotação de gemas laterais (Figura 13D), com ramos e entrenós curtos e contorcidos, reduzindo o porte da planta (Figura 13E). As plantas inoculadas com CG exibiram sintomas de antracnose, ou seja, lesões escuras ao longo das nervuras das folhas entre 20 e 30 dias após a inoculação do patógeno (Figura 13D). Os sintomas nas plantas inoculadas com os isolados de CG se restringiram a apenas lesões foliares. Os tratamentos controle, ou seja, as plantas inoculadas com água destilada esterilizada não exibiram sintomas de doenças.

Estudar o progresso da doença, a partir da fonte de inóculo, possibilita conhecer a dinâmica da interação entre o patógeno e o hospedeiro, contribuindo assim para o manejo adequado da doença e o consequente aumento da produtividade da cultura. Além disso, o resultado dessas observações pode auxiliar no estabelecimento de padrões de tolerância para patógenos associados às sementes (SINGH et al., 2012).

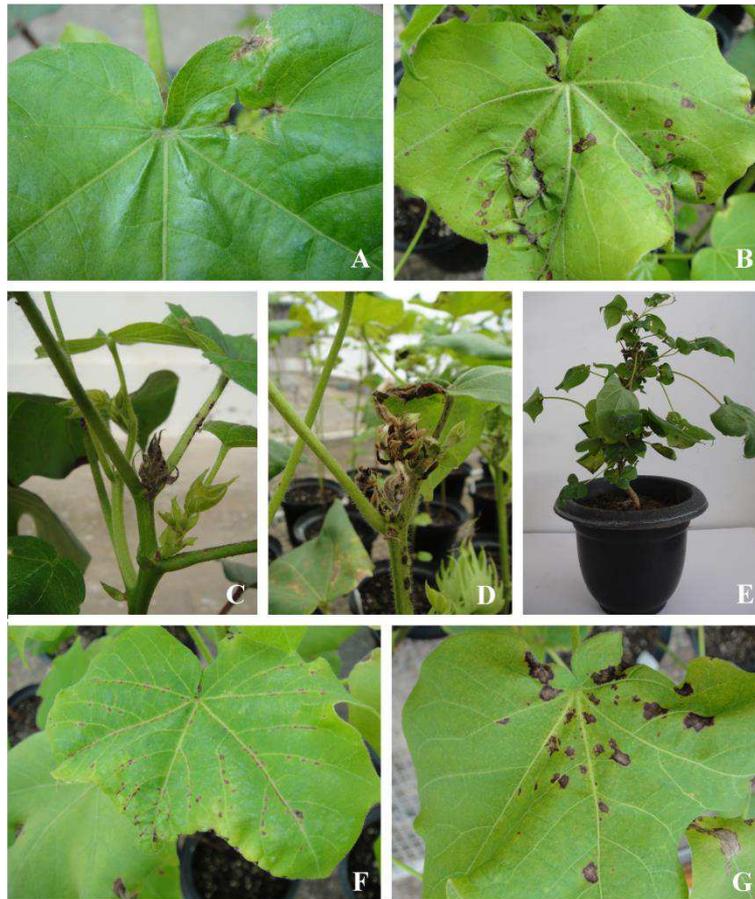


Figura 13. Sintomas típicos de antracnose e ramulose em plantas de algodoeiro inoculadas durante o teste de patogenicidade. **A-B.** Mancha estrela e lesões foliares causadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **C-D.** Morte do meristema apical e paralisação do crescimento da planta. **E.** Ramos e entrenós curtos com redução do porte da planta. **F-G.** Lesões foliares de antracnose causadas por *C. gossypii*.

De acordo com Araújo (2012), patógenos associados às sementes podem reduzir a germinação e o vigor, além de contribuir para a deterioração de sementes durante o período de armazenamento. Sementes infectadas podem introduzir patógenos em novas áreas, bem como aumentar o inóculo em lavouras já estabelecidas. Se o inóculo primário, transportado via semente, encontrar ambiente favorável e o hospedeiro for suscetível, focos iniciais de infecção podem ser estabelecidos. A partir daí poderá ocorrer o progresso da doença no espaço e no tempo, a partir do inóculo secundário produzido nas lesões.

Os sintomas da Ramulose, provocados pelo fungo CGC, aparecem primeiramente nas folhas jovens, tanto na haste principal como nas laterais, na forma de

manchas necróticas, mais ou menos circulares quando situadas no limbo entre as nervuras, e alongadas quando no sentido longitudinal. O tecido necrosado tende a cair, formando perfurações. As lesões, principalmente das nervuras, acarretam o desenvolvimento desigual dos tecidos foliares, ocasionando o enrugamento da superfície do limbo. O fungo afeta o meristema apical provocando sua necrose, o que estimula o desenvolvimento dos brotos laterais que se transformam em “ramos extranumerários”, conferindo à planta um aspecto de superbrotamento ou envassouramento. Os internódios, via de regra, apresentam intumescimento e as plantas doentes ficam com porte reduzido (ARAÚJO et al., 2012).

5.2 Imagem hiperespectral no NIR

As imagens hiperespectrais NIR obtidas para as classes dos agentes etiológicos da ramulose e antracnose podem ser visualizadas na Figura 14. Nesta imagem observa-se a estrutura morfológica das colônias dos fungos representada conforme sua distribuição espacial em relação a sua composição química agrupada em unidades de pixels. Cada pixel de tamanho de $150 \mu\text{m}^2$ é a unidade mínima contendo um espectro NIR com 256 variáveis ou comprimento de onda (ou ainda canais).

Um espectro médio para cada amostra das classes dos agentes etiológicos da ramulose e antracnose foi obtido para construção dos modelos de reconhecimento de padrões. A imagem HSI foi processada realizando-se uma seleção com o máximo de área amostrada a qual representa cerca de 100.000 pixel ou espectros na faixa 1000 a 2500.

Na Figura 15, pode-se evidenciar a distribuição dos pixels no nível da PC1 e PC2 em relação às classes em conjunto. Nesta figura, observam-se duas amostras por classe avaliada. Pode-se verificar também que mesmo separando-se bem cada classe e conseqüentemente cada amostra, próximo ao score 0, verificou-se sobreposição das amostras. O motivo pelo qual isso ocorre provavelmente seja por se tratar de fungos da mesma espécie e estes possuírem composições semelhantes.

PCA Model - Contour 2D (T) DataSet (Multi image import)

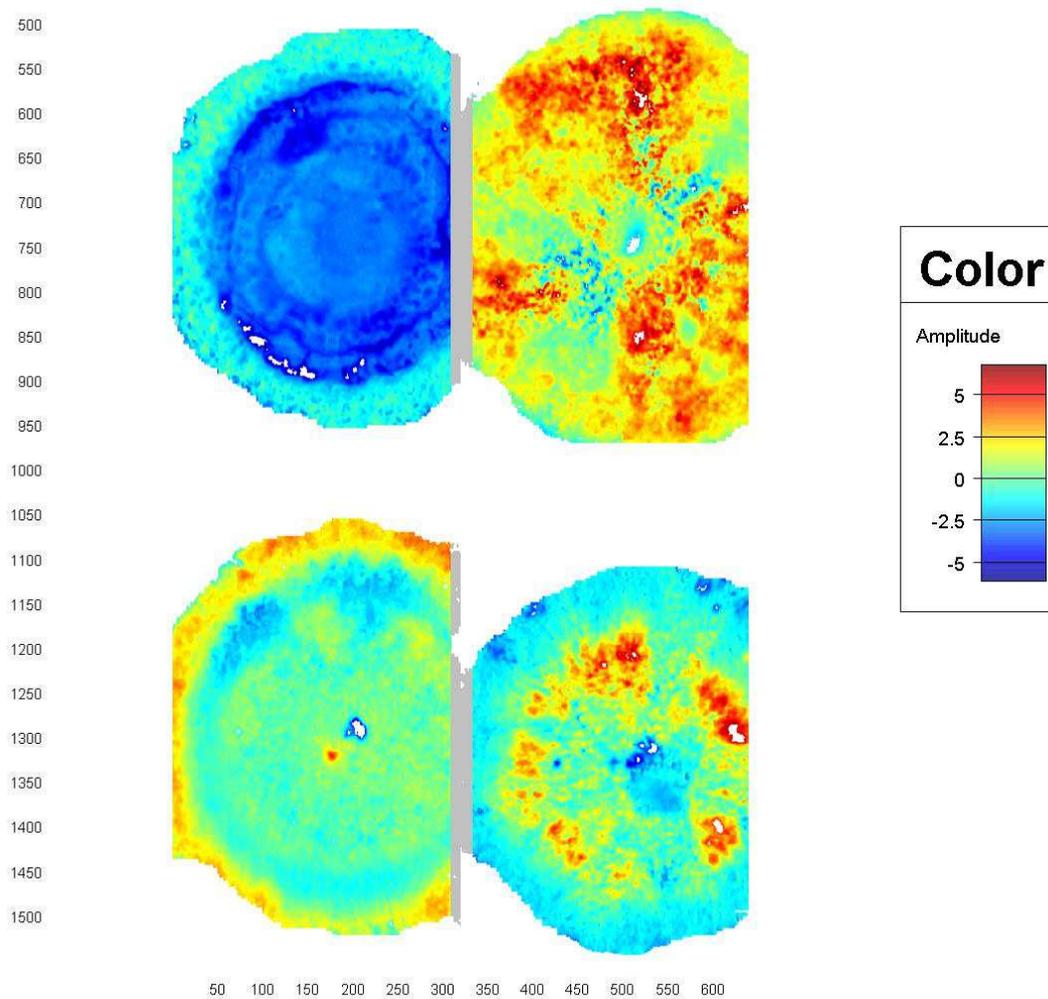


Figura 14. Mapa dos scores, dos fungos *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, gerado pela PCA em função da distribuição espacial dos pixels em uma imagem hiperespectral (com 256 canais) sem nenhum pré-processamento.

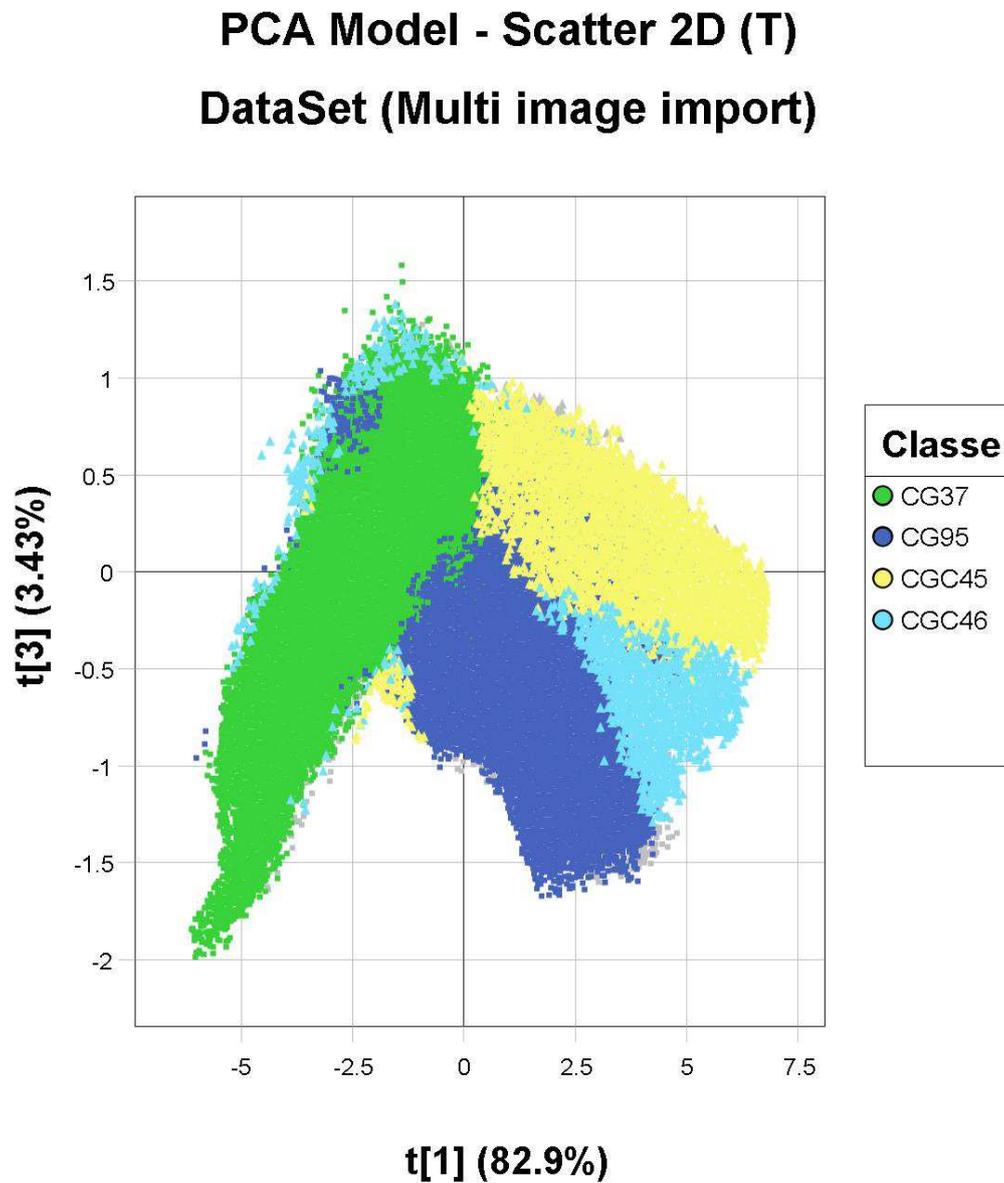


Figura 15. Projeção dos scores em nível de pixels para duas amostras de cada classe analisada de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Como a presença de água é evidente, conforme observado na Figura 14 e nos espectros referentes às absorções de 1400 e 1900 e, portanto, essa não é uma característica própria dos fungos, usou-se a região espectral de 995 a 1381 nm nos escores da PCA em função da diferença média observada entre as classes e que dessa possuem alinhamento com os componentes químicos desta matriz (Figura 16).

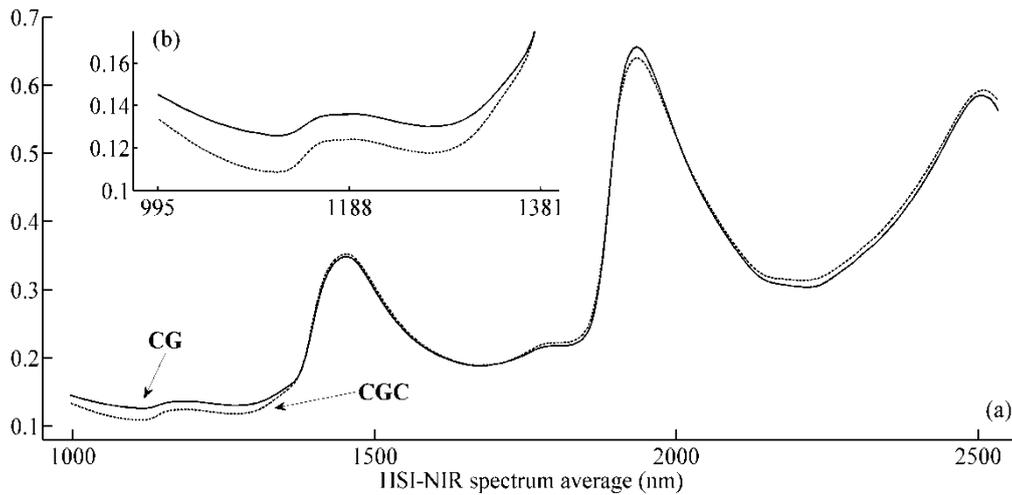


Figura 16. Espectros médio Imagens Hiperespectrais (NIR) total (a) e cortado (b) na parte inicial das amostras *Colletotrichum gossypii* 37 e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* 39

Na figura 17, é possível observar através do gráfico dos scores que as amostras dos isolados fúngicos de CG ficaram localizados nos scores negativos no extremo da PC1, enquanto que os isolados de CGC ficaram ao longo da PC1 no sentido dos scores positivos, com uma variância explicada igual a 97,06 % e PC2 igual a 2,71 %. A variância total explicada dos fungos foi de 99,77 %, mesmo havendo uma certa sobreposição entre as amostras dos isolados de CG e CGC.

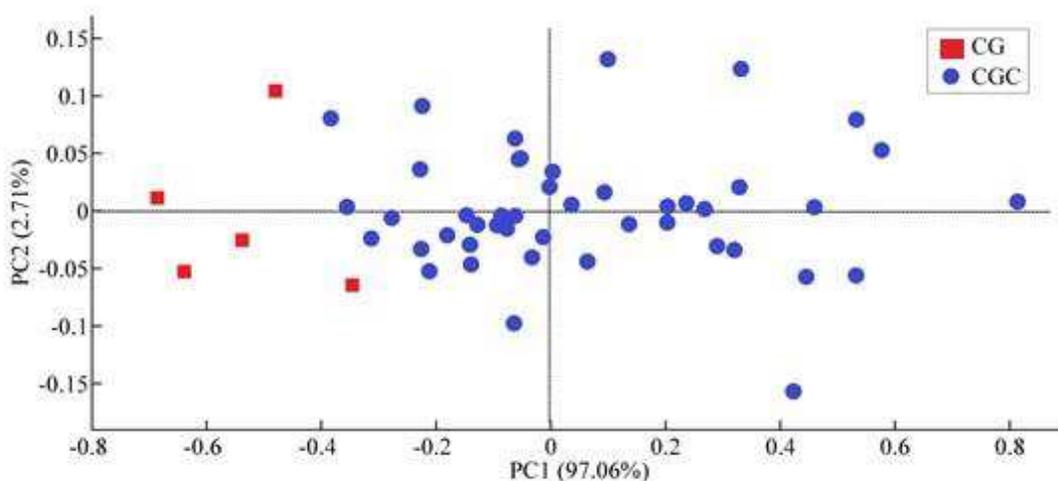


Figura17. Gráfico dos scores de PC1 x PC2 nos espectros médios de imagens hiperespectrais (NIR) dos isolados dos fungos *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* com variância total explicada de 99,77%

Observando essas diferenças de espectros, que se mostraram eficientes no modelo PCA, atribuiu-se o modelo SIMCA para avaliar essa diferença (Tabela 2).

Entre as 62 variáveis espectrais do HSI-NIR (995 a 1381 nm) que foram analisadas pela PCA, sete variáveis foram escolhidas pelo algoritmo SPA que são: 43, 62, 1, 15, 28, 5 e 57, que corresponderam às variáveis espectrais 1261, 1381, 995, 1083, 1166, 1020 e 1350 nm (Figura 18). Elas representaram os grupamentos químicos de 2° sobretom de CH com o final do grupo CH em 1261 nm, 1° sobretom de OH com as combinações de 1° sobretom de CH, abrangendo as regiões de CH₃, CH₂, segundo sobreton ArOH em 1381 nm, 2° sobretom de CH com o grupo ArCH em 1083 nm e com os grupamentos CH₃ e CH₂ em 1166 nm, 2° sobretom de NH com o grupo RNH₂ em 1020 nm e início do 1° sobretom de OH com a combinação do 1° sobretom de CH em 1350 nm.

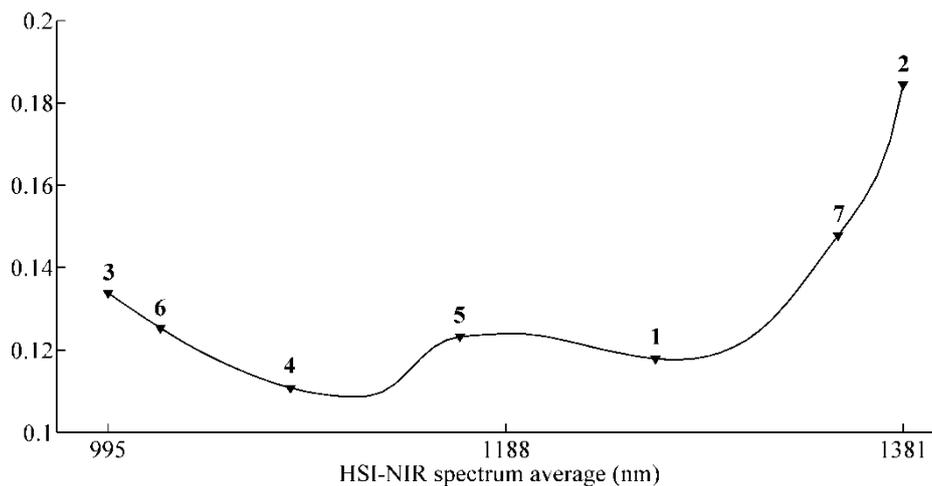


Figura 18. Espectros médios HSI-NIR de 995 a 1381 nm do isolado de CG (CNPA 0037) e as sete variáveis espectrais selecionadas pelo algoritmo SPA representadas na ordem em que foram escolhidas com a numeração de 1 a 7.

Um modelo SPA-LDA construído com sete variáveis espectrais NIR tem o menor custo obtido no conjunto de validação de 0.24 e o erro de classificação no conjunto de validação igual a 0, e erro do conjunto de predição também igual a 0 (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação com os modelos SIMCA e o SPA-LDA das amostras dos fungos CG (1) e CGC (2). Isolado	Matriz Y	Modelo SPA-LDA
CG (CNPA 0738)	1	1
CGC (CNPA 0039)	2	2
CGC (CNPA 0041)	2	2
CGC (CNPA 0044)	2	2
CGC (CNPA 0045)	2	2
CGC (CNPA 0046)	2	2
CGC (CNPA 0051)	2	2
CGC (CNPA 0052)	2	2
CGC (CNPA 0056)	2	2
CGC (CNPA 0062)	2	2
CGC (CNPA 0067)	2	2
CGC (CNPA 0074)	2	2
CGC (CNPA 0082)	2	2
CGC (CNPA 0083)	2	2
CGC (CNPA 0086)	2	2
CGC (CNPA 0113)	2	2
CGC (CNPA 0116)	2	2
CGC (CNPA 0121)	2	2
CGC (CNPA 0124)	2	2

*O APS selecionou 7 variáveis dos espectros médios HSI-NIR.

A quantidade de isolados de CG foi muito pequena quando comparada a quantidade de isolados de CGC. No entanto, utilizou-se um DEQ que serve para autenticar os cálculos feitos pelo algoritmo APS-LDA. As intensidades dos sete espectros selecionados para as cinco amostras de CG e 46 amostras de CGC deram 35 e 322 unidades, respectivamente, e foi calculado o mínimo, 1º quartil, mediana, 3º quartil e máximo (Figura 19).

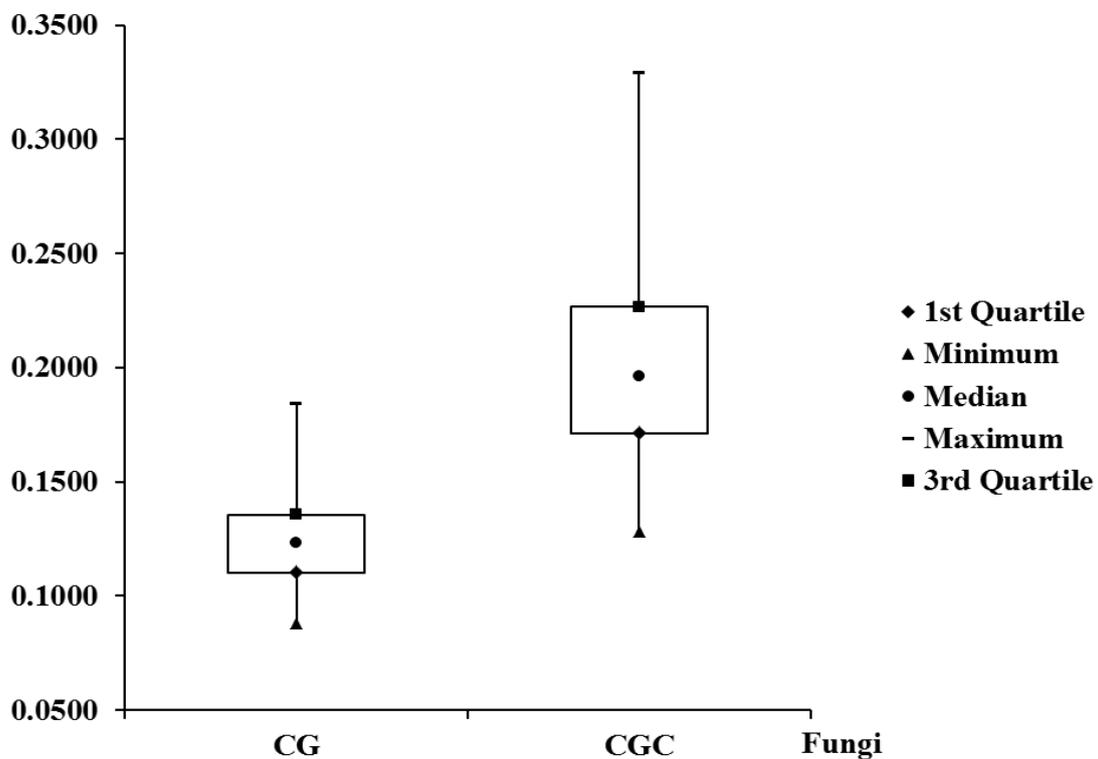


Figura 19. Gráfico dos quartis entre os cinco isolados de *Colletotrichum gossypii* e 46 isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioidese* obtido das sete variáveis selecionadas pelo SPA.

O método com a HSI-NIR e os algoritmos SIMCA e SPA-LDA que tratam matematicamente os dados hiperespectrais são confiáveis e de precisão. Os resultados obtidos com o modelo SIMCA não evidenciaram erros do tipo I. Os resultados dos isolados de CG e CGC não apresentaram significância estatística (α) ao nível de 5% dos dados totais, e forneceram 1 erro do tipo II, quando a análise estatística dos dados dos

isolados de CGC não conseguiu rejeitar a hipótese do fungo CG. Isso deve ter ocorrido em função de que CGC é uma variação interespecífica de CG em estudo.

As amplitudes dos sinais obtidos nas sete variáveis escolhidas pelo SPA apresentaram diferenças entre os 1st e 3rd quartis, sendo 0,11 e 0,13 para os isolados de CG e de 0,17 e 0,23 para os isolados de CGC, respectivamente, contendo os 50% das variáveis espectrais diferentes entre os isolados de CG e CGC (Figura 16) o que promoveu uma perfeita separação pelo método LDA.

Os valores de mínimo e máximo das intensidades dos espectros dos isolados de CG foram 0,09 e 0,18 e dos isolados de CGC foram 0,13 e 0,33, e os valores adjacentes aos LL e UL de 0,70 e 0,20 para CG, e de 0,09 e 0,37 para os CGC, de modo que não existiram valores possíveis de outliers. Dessa forma, os valores adjacentes foram simplesmente os pontos dos dados de máximo e mínimo, o que corrobora com a autenticidade do modelo APS-LDA para os HSI-NIR dos fungos.

A região de 995 a 1381 nm favoreceu as características de absorção dos grupos de aminoácidos, enzimas e proteínas que estão diretamente ligadas às expressões bioquímicas com relação a estruturas de composição genética, ou seja, os grupamentos CH₃, CH₂, CH, ArCH, OH, ArOH e NH que fornecem uma intensidade do HSI-NIR, que aliado ao algoritmo APS-LDA resultaram em uma separação de 100% entre as duas classes de fungos CG e CGC, tal qual a técnica genética PCR, no entanto, consumindo menos tempo e material analítico, genético sem destruir a amostra analisada.

5.3 Diagnóstico molecular de CG e CGC

Com o resultado do teste de PCR, que permite replicação *in vitro*, de forma rápida, do ácido desoxirribonucleico (ADN), através de uma quantidade mínima de material genético pode-se amplificar em poucas horas, desta forma, detectando os marcadores genéticos dos fungos CG e CGC em classes distintas (Figura 20). O problema dessa técnica é que algumas técnicas imunológicas e enzimáticas apresentam limitações quanto a sua confiabilidade e precisão. As reações de amplificação com DNAs genômicos extraídos das amostras dos fungos do algodão foram realizadas seguindo-se o protocolo descrito no item 4.5.4.

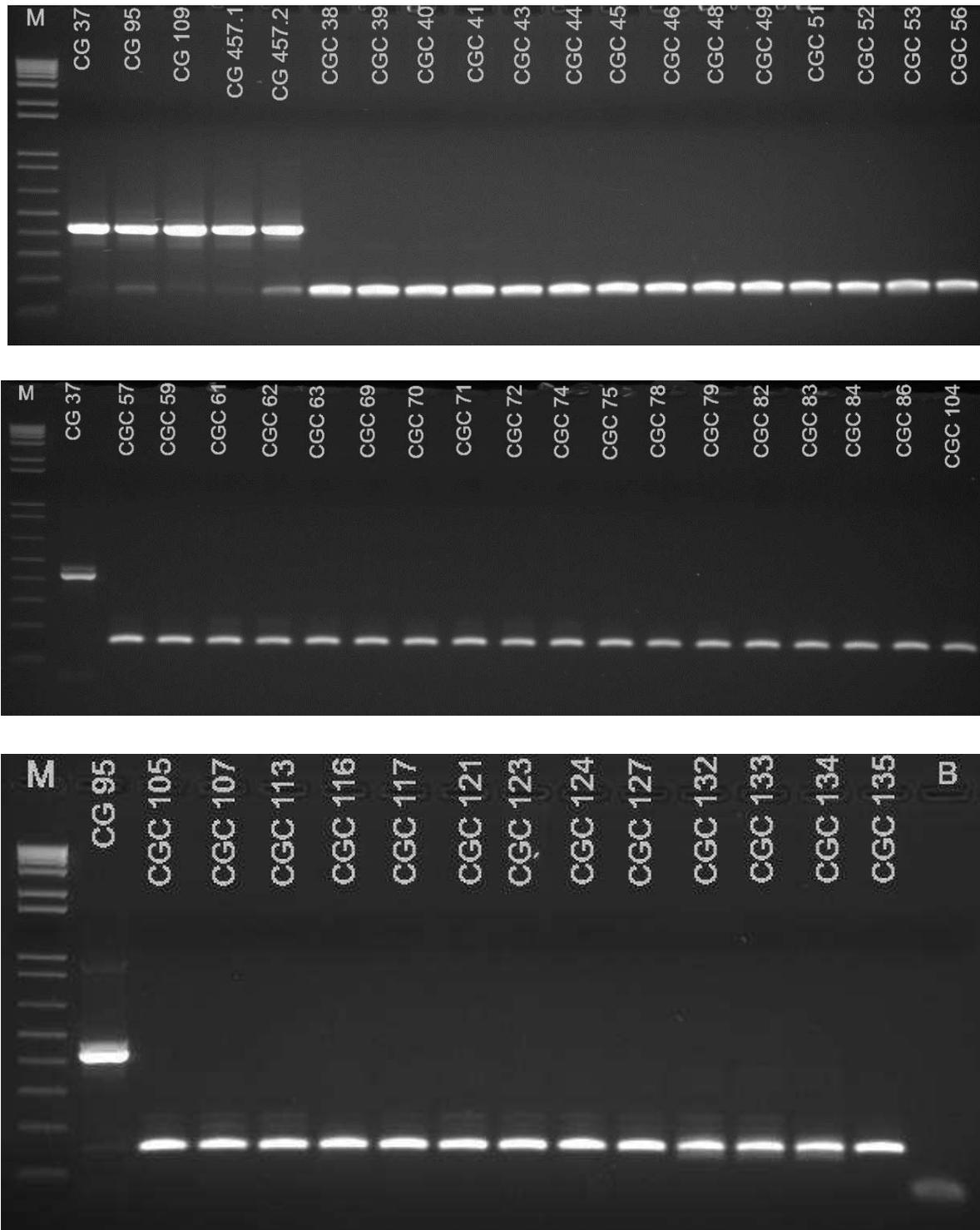


Figura 20. Diagnóstico molecular diferencial por meio de amplificação via PCR da região IGS de diferentes isolados *Colletotrichum gossypii* (CG) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC). **M** representa o marcador molecular 1kb plus (Fermentas - SM1331) e **B** controle negativo.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvida uma nova estratégia analítica empregando-se imagens hiperespectrais NIR e estratégias de tratamento de dados com seleção de variáveis com APS, construção de modelos de classificação LDA e SIMCA em amostras de duas classes de fungos patogênicos do algodoeiro. Nesse estudo e proposta, não se constatou erros do tipo I ou II ao nível de 95% de confiança na classificação dos fungos CG e CGC a partir da seleção de sete variáveis espectrais com APS no modelo LDA. Com o SIMCA contatou-se apenas um erro tipo II em que uma amostra de predição CG foi classificada nas duas classes CG e CGC. Em procedimento de avaliação de desempenho essa será uma amostra a qual exige ser investigada por uma técnica de biologia molecular em nível de DNA.

A combinação das técnicas de imagens hiperespectrais NIR com APS-LDA e SIMCA foi eficiente para identificação e classificação dos fungos CG e CGC de forma rápida com múltiplas amostras, automatizada, não destrutiva, com nível de simplicidade inferior, quando comparada com técnicas de biologia molecular.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, J.; COSTA, A. S. Instruções para o reconhecimento da ramulose do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.15, p.59-60, 1949.

ABRAPA. Associação Brasileira dos produtores de Algodão. **Relatório de Gestão**, Biênio 2011/2012. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/biblioteca/Paginas/biblioteca-institucional.aspx>. Acessado em 05 de junho de 2016.

ALESSIO, V. M.; HOFFMANN, H. P.; CARNEIRO, M. S. Método rápido para extração de DNA de *Puccinia kuehnii*. **Summa phytopathol.** [online]. V.39, n.3, p.198-200, 2013.

ALMEIDA, M. R.; CORREA, D. N.; ROCHA, W. F. C.; SCAFI, F. J. O.; POPPI, R. J. Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation. **Microchemical Journal**, v.109, p.170–177, 2013.

ANDERSON, I. C.; PARKIN, P. I. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. **Journal of Microbiological Methods**, v.68, n.2, p.248-253, 2007.

ARAÚJO, D. V.; ZAMBENEDETTI, G. B.; DALLACORTI, R.; AZEVEDO, V. H. Progresso da ramulose em campo a partir de sementes de algodoeiro inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, v.37, p.204-209, 2012.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.9, n.2, p.344-355, 2011.

BAILEY, J. A.; NASH, C.; MORGAN, L.W.; O'CONNELL, R. J.; TEBEEST, D. O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the *Malvaceae*, **Phytopathology**, v.86, p.1076-1083, 1996.

BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; ALVES, M. C.; CORREA, C. L. Desempenho de sementes de algodão submetidas à deficiência hídrica e presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Bioscience Journal** (Online), v.30, p.421-428, 2014.

BARROSO, P. A. V. Mapeamento da distribuição geográfica das espécies de *Gossypium* que ocorrem no Brasil, com vistas à conservação dos parentes silvestres do algodoeiro (*G. Hirsutum* L.). In: CORADIN, L. (Coord.). Parentes silvestres das espécies de plantas cultivadas. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 2 p

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A Practical Guide**. New York: Wiley, 1998.

BERRUETA, L.; ALONSO-SALCES, R.; HEBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography**, v.1158, n.1-2, p.196-214, 2007.

BONETT, L. P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R. G. A.; AQUINO, T. F. de.; BERNARDI-WENZELS, J. Caracterização morfocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloesporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.6, n.3, 2010.

BORRÁS, E.; AMIGO, J. M.; VAN DEN BERG, F.; BOQUÉ, R.; BUSTO, O. 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, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p

BREITKREITZ, M. C.; DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições

experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, n.3, p. 564-573, 2014.

BRERETON, R. G. Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. Chichester: John Wiley. **Journal of Chemometrics**, 2003. 489p

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

CAI, L.; UDAYANGA, D.; MANAMGODA, D. S.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; MCKENZIE, E. H. C.; GUO, L. D.; LIU, X. Z.; BAHKALI, A.; HYDE, K. D. The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. **Tropical plant pathology**, v.36, p.205–213, 2011.

CARNEIRO, R. L.; POPPI, R. J. Infrared imaging spectroscopy and chemometric tools for in situ analysis of an imiquimod pharmaceutical preparation presented as cream. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.118, p.215–220, 2014.

CONAB. (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos 2015/2016** – Brasília, 2016.

COSTA, A.S.; FRAGA-JÚNIOR, C.G. Sobre a natureza da ramulose ou superbrotamento do algodoeiro. **Journal Agronomy**, v.2, p.151-160, 1939.

CRUZ, J.; BLANCO, M. Content uniformity studies in tablets by NIR-CI. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.56, n.2, p.408–412, 2011.

DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1401-1406, 2006.

DE JUAN, A.; MAEDER, M.; HANCEWICZ, T.; TAULER, R. 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.

DOMINGO, E.; TIRELLI, A. A.; NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C.; PINTO, S. M. Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analysis: A review. **Food Research International**, v.60, p.131-139, 2014.

- DONEUS, M.; VERHOEVEN, G.; ATZBERGER, C.; WESS, M.; RUŠ, M. New ways to extract archaeological information from hyperspectral pixels. **Journal of Archaeological Science**, v.52, p.84–96, 2014.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n.1, p.13-15, 1990.
- ENSKILDE, K.; JACOBSEN, S.; SØNDERGAARD, I. Multivariate data analysis of proteome data. **Methods in Molecular Biology**, v.355, p.195- 210, 2007.
- FERRARI, C.; FOCA, G.; ULRICI, A. Handling large datasets of hyperspectral images: Reducing data size without loss of useful information. **Analytica Chimica Acta**, v.802, p.29-39, 2013.
- FREIRE, E. C. História do algodão no Cerrado. In: Freire, E. C. (Ed.). Algodão no Cerrado do Brasil, Brasília, p.23-61. 2011.
- GELADI, P. Review Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B**, v.58, p.767–782, 2003.
- GELADI, P.; GRAHN, H. F. Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis, 2007. 20p
- GOWEN, A. A.; MARINI, F.; ESQUERRE, C.; O'DONNELL, C. L.; DOWNEY, G.; BURGER, J. Time series hyperspectral chemical imaging data: Challenges, solutions and applications. **Analytica Chimica Acta**, v.705, p.272–282, 2011.
- GREDILLA, A.; DE VALL EJUELO, S. F-O; AMIGO, J. M.; DE DIEGO, A.; MADARIAGA, J. M. Unsupervised pattern-recognition techniques to investigate metal pollution in estuaries. **Trends in Analytical Chemistry**, v.46, p.59-69, 2013.
- HERRERO LATORRE, C.; GARCIA, J. B.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. P. Chemometric Classification of Potatoes with Protected Designation of Origin According to Their Producing Area and Variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.35, p.8444-8451, 2013.

HUANG, X.; YUAN, T.; LIANG, M.; DU, M.; XIA, S.; DITTMAR, R. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. **European Urology**, v.67, p.33–41, 2015.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOS, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, v.39, p.147-182, 2009.

IQBAL, A.; SUN, D-W.; ALLEN, P. Review An overview on principle, techniques and application of hyperspectral imaging with special reference to ham quality evaluation and control. **Food Control**, v.46, p.242-254, 2014.

KAMEI, S. H.; COSTA, J. F. O.; BRITO NETTO, M. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.209-216, 2014.

KONG, W.; ZHANG, C.; LIU, F.; NIE, P.; HE, Y. Rice seed cultivar identification using near-infrared hyperspectral imaging and multivariate data analysis, **Sensor**, v.13, p.8916–8927, 2013.

KUCHERYAVSKIY, S. A new approach for discrimination of objects on hyperspectral images. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.120, p.126–135, 2013.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Review Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v.123, p.186–199, 2014.

LEIVA-VALENZUELA, G. A.; LU, R.; AGUILERA, J. M. Assessment of internal quality of blueberries using hyperspectral transmittance and reflectance images with whole spectra or selected wavelengths. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.24, p.2-13, 2014.

- LORENTE, D.; ALEIXOS, N.; GÓMEZ-SANCHIS, J.; CUBERO, S.; GARCÍA-NAVARRETE, O. L.; BLASCO, J. Recent advances and applications of hyperspectral imaging for fruit and vegetable quality assessment. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, p.1121–1142, 2012.
- MEHTA, Y. R.; MEHTA, A. Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.40-44, 2010.
- MEHTA, Y. R.; ZANDONÁ, C.; BIBANCO, K.; ALMEIDA, W. P.; TEIXEIRA, E. A.; CUNHA, H. C.; ERIVALDO, J. Resposta diferencial de cultivares comerciais do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.142-145, 2005.
- NEPPELENBROEK, K. H.; PAVARINA, A. C.; GOMES, M. N.; MACHADO, A. L.; VERGANI, C. E. Bond strength of hard chairside reline resins to a rapid polymerizing denture base resin before and after thermal cycling. **Journal of Applied Oral Science**, v.14, n.6, p.436-442, 2006.
- PIQUERAS, S.; DUPONCHEL, L.; TAULER, R.; DE JUAN, A. Monitoring polymorphic transformations by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis. *Analytica Chimica Acta*, v.819, p.15-25, 2014.
- PIQUERAS, S.; DUPONCHEL, L.; TAULER, R.; DE JUAN, A. Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution/alternating least squares. **Analytica chimica acta**, v.705, n.1-2, p.182–92, 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.
- PRATS-MONTALBÁN, J. M.; JEREZ-ROZO, J. I.; ROMANACH, R. J.; FERRER, A. MIA and NIR Chemical Imaging for pharmaceutical product characterization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.117, p.240–249, 2012.

- PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of Colletotrichum species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 89-109, 2009.
- REAY-JONES, F. P. F.; GREENE, J. K.; TOEWS, M. D.; REEVES, R. B. Sampling stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) for population estimation and pest management in southeastern cotton production. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p.2360-2370, 2009.
- RUXTON, K.; ROBERTSON, G.; MILLER, W.; MALCOLM, G. P. A.; MAKER, G. T. Mid-infrared hyperspectral imaging for the detection of explosive compounds. **Optics and Photonics for Counterterrorism, Crime Fighting, and Defence VIII**, v.8546, p.85460V-85460V-9, 2012.
- SALUSTIANO, M. E.; RONDON, M. N.; ABREU, L. M.; COSTA, S. S.; MACHADO, J. C.; PFENNING, L. H. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.357-367, 2014.
- SANTOS, P. M.; CARDOSO, M. A. G.; KHOURI, S.; PAULA JÚNIOR, A. R.; UEHARA, M.; SAKANE, K. K. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.28, n.4, p.398-409, 2012.
- SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Reviews**, v.8, p.74-82, 2010.
- SCHULER, R. L.; KISH, P. E.; PLESE, C. A. Preliminary observations on the ability of hyperspectral imaging to provide detection and visualization of bloodstain patterns on black fabrics. **Journal of forensic sciences**, v.57, n.6, p.1562-1569, 2012.
- SERRANTI, S.; GARGIULO, A.; BONIFAZI, G. Characterization of post-consumer polyolefin wastes by hyperspectral imaging for quality control in recycling processes. **Waste Management**, v.31, p.2217-2227, 2011.

SHAH, M. A.; KHAN, A. A. Imaging techniques for the detection of stored product pests. **Applied Entomology and Zoology** v.49, p.201-212, 2014.

SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C.; BERNARDINO-FILHO, J. R.; SALGADO, K. C. C.; STEVENS, M. R. A. FLP markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.169–172, 2005.

SINGH, C. B.; JAYAS, D. S.; PALIWAL, J.; WHITE, N. D. G. Fungal Damage Detection in Wheat Using Short-Wave Near-Infrared Hyperspectral and Digital Colour Imaging. **International Journal of Food Properties**, v.15:1, p.11-24, 2012.

SIRISOMBOON, C. D.; PUTTHANG, R.; SIRISOMBOON, P. Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. **Food Control**, v.33, p.207–214, 2013.

SORIA, M. F.; DEGRANDE, P. D.; PANIZZI, A. R. Maior incidência de percevejos fitófagos na cultura do algodão. **Cultivar: Grandes Culturas**, v.131, p.18-20, 2010.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v.35, p.223-229, 2012.

SPOLIDORIO, M. G.; TORRES, M. M.; CAMPOS, W. N.; MELO, A. L. T.; IGARASHI, M.; AMUDE, A. M. Molecular detection of *Hepatozoonm, canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, p.253-255, 2011.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado Brasileiro. 567 – 612p. In: *Algodão no Cerrado do Brasil/ Associação Brasileira dos Produtores de Algodão – ABRAPA*. 2 edição revisada e ampliada – Aparecida de Goiânia – GO: Mundial Gráfica, 2011. 1082p

- TAHTOUH, M.; SCOTT, S. A.; KALMAN, J. R.; REEDY, B. J. Four novel alkyl 2-cyanoacrylate monomers and their use in latent fingerprint detection by mid-infrared spectral imaging. **Forensic science international**, v.207, n.1-3, p.223–238, 2011.
- TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MACHADO, J. C. Growth habit of *Colletotrichum gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides* on cotton seeds, **Bragantia** v.55, p.95-104, 1996.
- ULLOA, M.; WANG, C.; ROBERTS, P. A. Gene action analysis by inheritance and QTL mapping of resistance to root-knot nematodes in cotton. **Plant Breeding**, 2010.
- ULRICI, A.; SERRANTI, S.; FERRARI, C.; CESARE, D.; FOCA, G.; BONIFAZI, G. Efficient chemometric strategies for PET–PLA discrimination in recycling plants using hyperspectral imaging. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.122, p.31-39, 2013.
- WANG, W.; HEITSCHMIDT, G. W.; NI, X.; WINDHAM, W. R.; HAWKINS, S.; CHU, X. Identification of aflatoxin B1 on maize kernel surfaces using hyperspectral imaging. **Food Control**, v.42, p.78 e 86, 2014.
- WANG, W.; LAWRENCE, K. C.; NI, X.; YOON, SEUNG-CHUL.; HEITSCHMIDT, G. W.; FELDNER, P. Near-infrared hyperspectral imaging for detecting Aflatoxin B1 of maize kernels. **Food Control**, v.51, p.347-355, 2015.
- WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, 115–180, 2012.
- WILLIAMS, P.; GELADI, P.; FOX, G.; MANLEY, M. Maize kernel hardness classification by near infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate data analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.653, p.121–130, 2009.
- 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 and Emerging Technologies** v.19, p.1–14, 2013.

XU, J.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E.; MCCLURG, R.; WALKER, M. J.; EVANS, J. Comparison of API20C with molecular identification of *Candida* ssp *Candida* ssp isolated from bloodstream infection. **Journal of Clinical Pathology**, v.55, p.774-777, 2002.

YAO, H.; HRUSKA, Z.; KINCAID, R.; BROWN, R.; CLEVELAND, T. Differentiation of toxigenic fungi using hyperspectral imagery. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v.2, n.3, p.215–224, 2008.

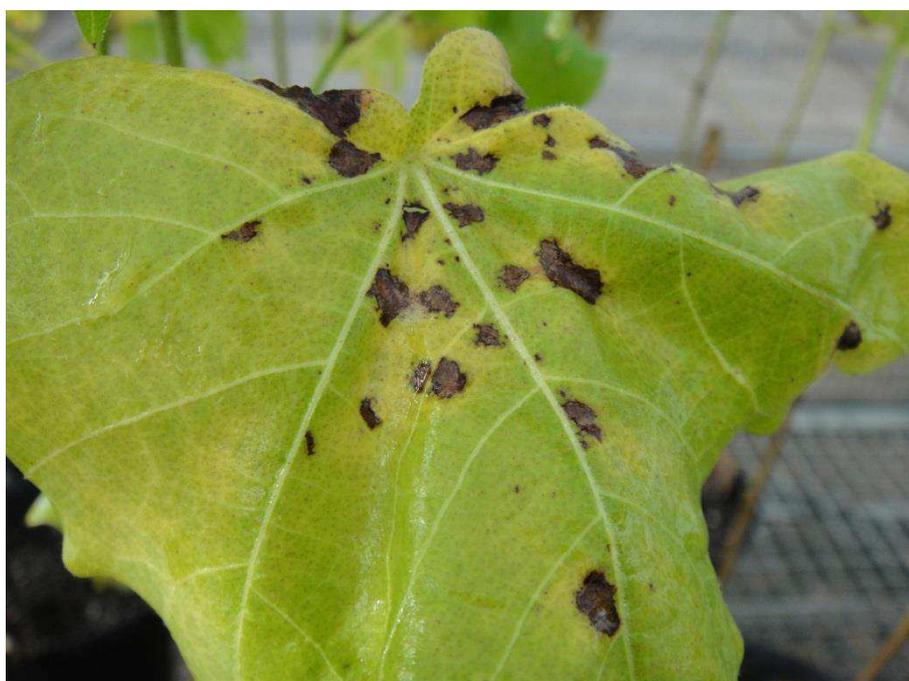
YI, W. S.; CUI, D. S.; LI, Z.; WU, L. L.; SHEN, A. G.; HU, J. M. Gastric cancer differentiation using Fourier transform near-infrared spectroscopy with unsupervised pattern recognition. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.101, p.127-131, 2013.

YUCESAY, M.; OZTEK, A. O.; MAROL, S. Comparison of three diferencial media for the presumptive identification of yeasts. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.245-247, 2005.

APÊNDICES

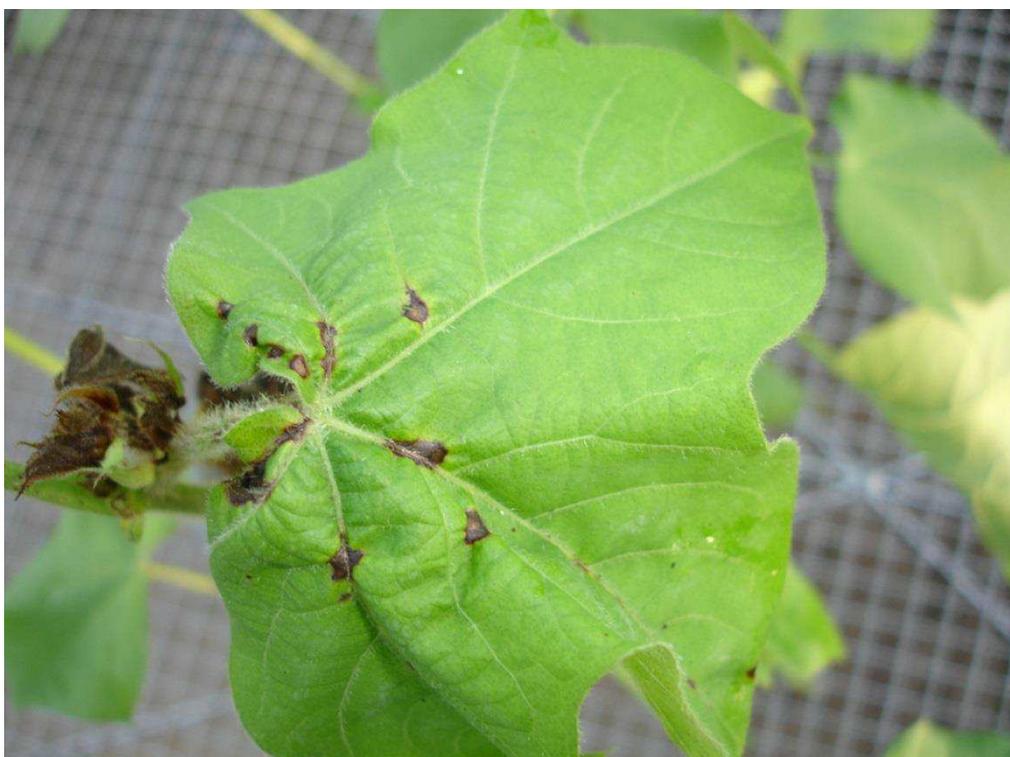
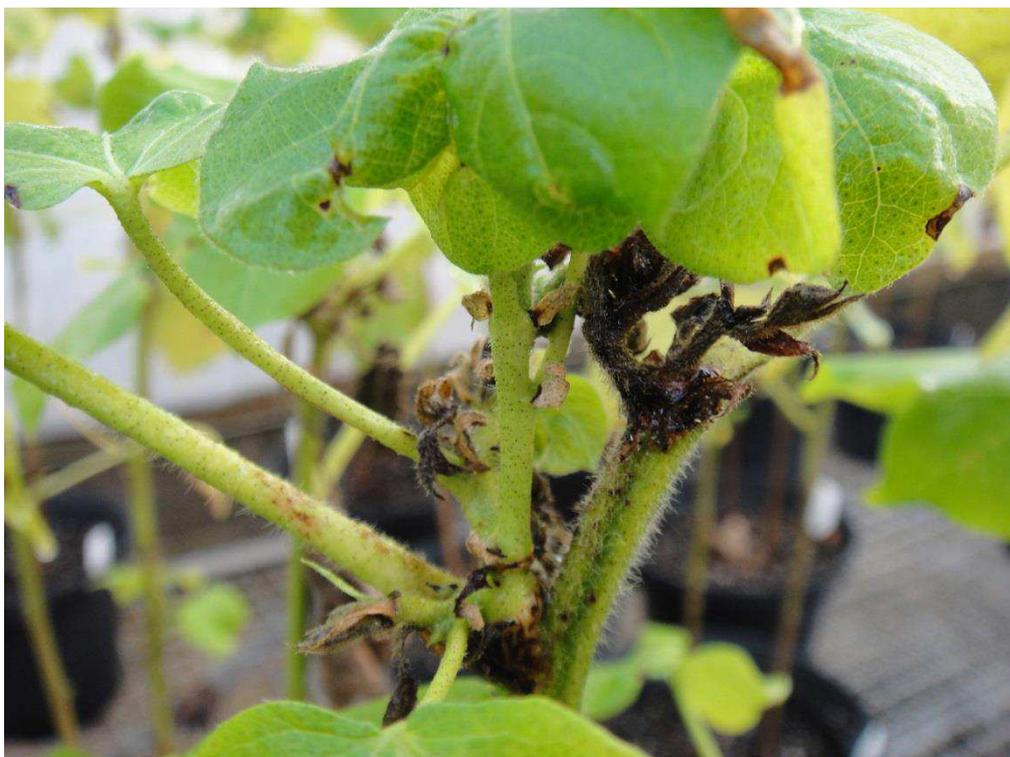
APÊNDICE – A: Fotos com Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de Antracnose nas folhas causada pelo *Colletotrichum gossypii*





APÊNDICE – B: Fotos com Detalhes da planta de algodão apresentando sintomas de Ramulose nas folhas e haste *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*





APÊNDICE – C: Fotos com detalhes do *Colletotrichum gossypii* na placa de Petri



(CNPA 457-1)



(CNPA 457-2)



(CNPA 0109)



(CNPA 0037)



(CNPA 0095)

APÊNDICE – D: Fotos com detalhes do *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* na placa de Petri



(CNPA 0038)



(CNPA 0039)



(CNPA 0043)



(CNPA 0044)



(CNPA 0040)



(CNPA 0041)



(CNPA 0045)



(CNPA 0046)



(CNPA 0048)



(CNPA 0049)



(CNPA 0051)



(CNPA 0052)



(CNPA 0053)



(CNPA 0056)



(CNPA 0057)



(CNPA 0059)



(CNPA 0061)



(CNPA 0062)



(CNPA 0063)



(CNPA 0067)



(CNPA 0070)



(CNPA 0071)



(CNPA 0072)



(CNPA 0074)



(CNPA 0075)



(CNPA 0078)



(CNPA 0079)



(CNPA 0082)



(CNPA 0083)



(CNPA 0084)



(CNPA 0086)



(CNPA 0104)



(CNPA 0105)



(CNPA 0116)



(CNPA 0117)



(CNPA 0107)



(CNPA 0113)



(CNPA 0121)



(CNPA 0123)



(CNPA 0124)



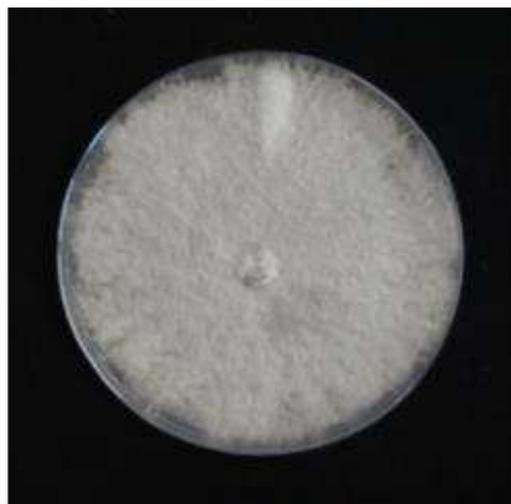
(CNPA 0133)



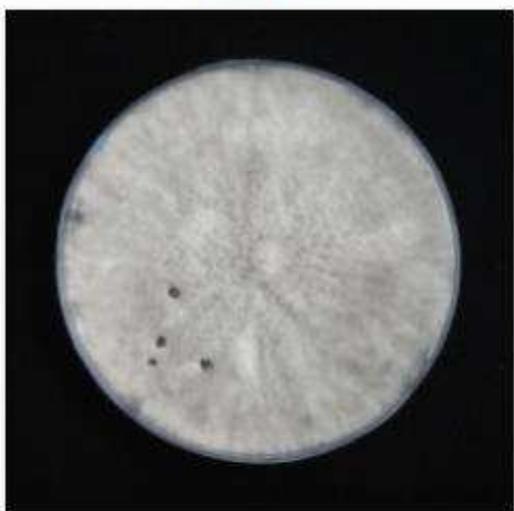
(CNPA 0134)



(CNPA 0127)



(CNPA 0132)



(CNPA 0135)