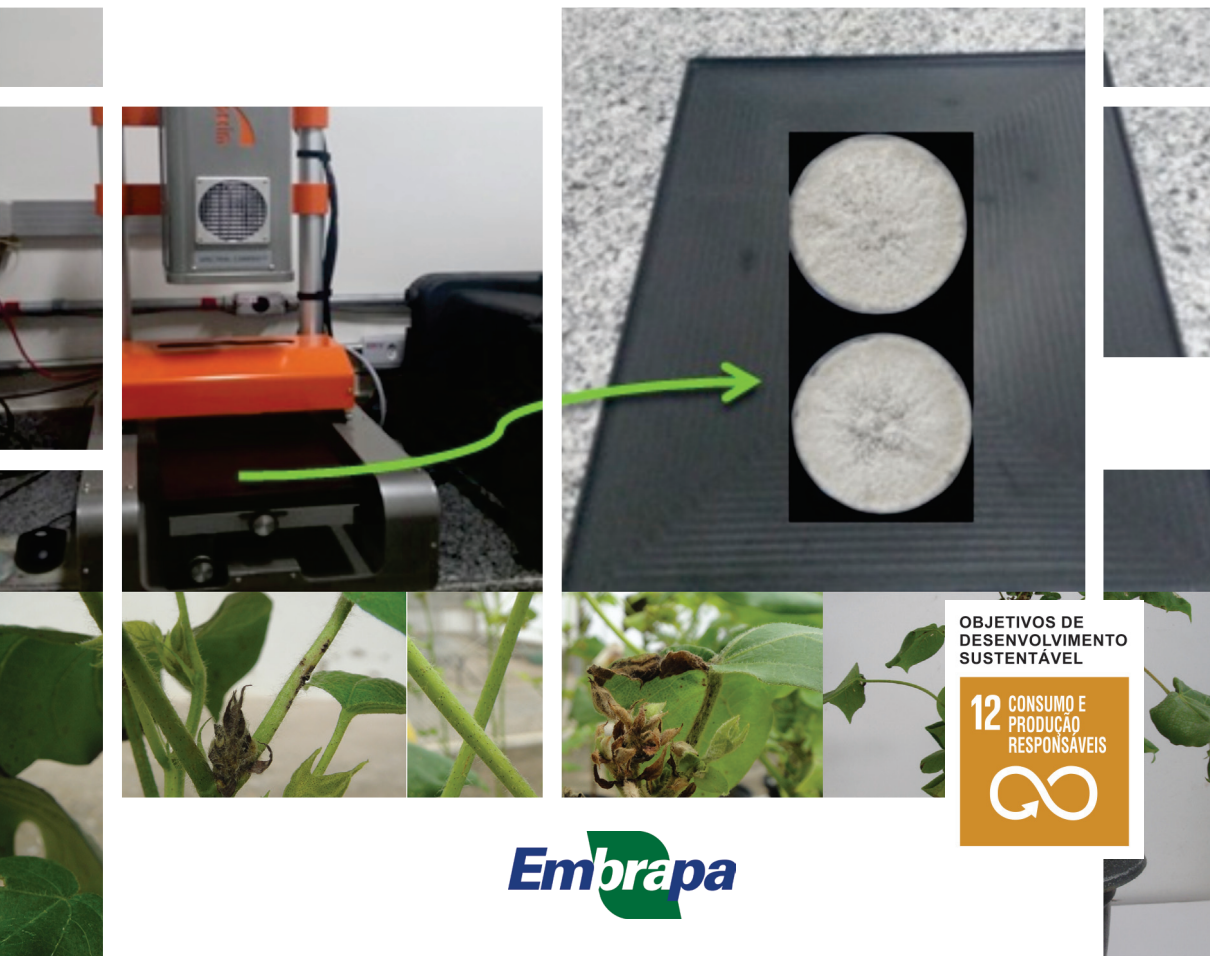


## Método para identificação dos agentes causais da ramulose e antracnose em algodoeiro pela tecnologia de imagens químicas



OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

**12** CONSUMO E  
PRODUÇÃO  
RESPONSÁVEIS





**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Algodão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
103**

**Método para identificação dos agentes causais  
da ramulose e antracnose em algodoeiro  
pela tecnologia de imagens químicas**

*Everaldo Paulo de Medeiros  
Priscila Simone Ribeiro Aires  
Francisco Fernandes Gambarra Neto  
Hanna Ibiapina de Jesus  
Wilton Macedo Coutinho  
Alderí Emídio de Araújo  
Gilvan Ferreira da Silva  
Josivanda Palmeira Gomes*

**Embrapa Algodão  
Campina Grande, PB  
2020**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Algodão**  
Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário  
CEP 58428-095, Campina Grande, PB  
Fone: (83) 3182 4300  
Fax: (83) 3182 4367  
www.embrapa.br/algodao  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente  
*João Henrique Zonta*

Secretário-Executivo  
*Valdinei Sofiatti*

Membros  
*Alderí Emídio de Araújo, Ana Luíza Dias  
Coelho Borin, José da Cunha Medeiros,  
Marcia Barreto de Medeiros Nóbrega, João  
Luis da Silva Filho, Liziane Maria de Lima,  
Sidnei Douglas Cavalieri*

Supervisão editorial  
*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Revisão de texto  
*Ivanilda Cardoso da Silva*

Normalização bibliográfica  
Orlane da Silva Maia (CRB-3/915)

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Foto da capa  
*Wirton Macedo Coutinho*

**1ª edição**  
Formato PDF digitalizado: 2020

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Algodão

---

Método para identificação dos agentes causais da ramulose e antracnose em  
algodoeiro pela tecnologia de imagens químicas / Everaldo Paulo de  
Medeiros ... [et al.]. – Campina Grande, PB : Embrapa Algodão, 2020.  
23 p. : il. color. ; 16 cm x 22 cm. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /  
Embrapa Algodão, ISSN 0103-0841 ; 103)

1. Algodão. 2. Fungo. 3. Espectroscopia. I. Medeiros, Everaldo Paulo de.  
II. Aires, Priscila Simone Ribeiro. III. Gambarra Neto, Francisco Fernandes.  
IV. Jesus, Hanna Ibiapina de. V. Coutinho, Wirton Macedo. VI. Araújo, Alderí  
Emídio de. VII. Silva, Gilvan Ferreira da. VIII. Gomes, Josivanda Palmeira.  
IX. Embrapa Algodão. X. Série.

CDD 633.5197

## Sumário

---

Resumo .....	7
Abstract .....	9
Introdução.....	11
Material e Métodos .....	14
Resultados e Discussão .....	17
Conclusões.....	20
Agradecimentos.....	20
Referências .....	20



# Método para identificação dos agentes causais da ramulose e antracnose em algodoeiro pela tecnologia de imagens químicas

Everaldo Paulo de Medeiros<sup>1</sup>

Priscila Simone Ribeiro Aires<sup>2</sup>

Francisco Fernandes Gambarra Neto<sup>3</sup>

Hanna Ibiapina de Jesus<sup>4</sup>

Wirton Macedo Coutinho<sup>5</sup>

Alderí Emídio de Araújo<sup>6</sup>

Gilvan Ferreira da Silva<sup>7</sup>

Josivanda Palmeira Gomes<sup>8</sup>

**Resumo** – Um novo método foi desenvolvido para diferenciação de forma precisa e rápida dos fungos que causam a antracnose (*Colletotrichum gossypii* - CG) e ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides – CGC) em algodoeiro, crescidos em meio de cultura e utilizando os conceitos da Tecnologia de Imagens Químicas (TIQ) na região do Infravermelho Próximo (NIR). Foram empregados cinco isolados de CG e 46 de CGC. Os diferentes isolados de CG e CGC foram cultivados em meio Czapek-agar com 12h de fotoperíodo durante 15 dias. As medidas espectrais foram realizadas entre 1000 nm a 2500 nm usando uma lente de 50 mm. Nessa região espectral foi realizada a atribuição de grupos químicos específicos característicos de CG e CGC. Um modelo de reconhecimento de padrão foi desenvolvido a partir do Algoritmo das Projeções Sucessivas combinando a Análise Discriminante Linear (APS-LDA). As amostras foram separadas usando o algoritmo de seleção de amostras

---

<sup>1</sup> D.Sc. em Química, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB

<sup>2</sup> D.Sc. em Engenharia Agrícola, Estudante de Doutorado da UFCG, Campina Grande, PB

<sup>3</sup> D.Sc. em Química, Pós-Doutorando, UFPB, Areia, PB.

<sup>4</sup> M.Sc. em Agronomia, Estudante de Doutorado da University of Georgia, U.S.A.

<sup>5</sup> M.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB

<sup>6</sup> D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB

<sup>7</sup> D.Sc. em Microbiologia, Pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM

<sup>8</sup> D.Sc. em Engenharia de alimentos, Professora da Universidade Federal de Campina Grande, PB

(Kennard-Stone) 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 de isolados de CG e CGC. O modelo APS-LDA com atribuição de variáveis a grupos químicos funcionais forneceu resultados concordantes com o método de PCR-DNA sem evidenciar erros ou de outliers. Portanto, um novo procedimento baseado no conceito de TIQ-NIR usando o APS-LDA para identificação dos fungos CG e CGG é proposto. O novo método TIQ-NIR-APS-LDA para classificação dos patógenos CG e CGC diferencia-se por sua maior velocidade analítica, simplicidade de execução, menor custo e natureza não destrutiva.

**Termos para indexação:** espectroscopia, imagens multiespectrais, classificação de fungos, algodão.



## Method for identification causal agents of ramulose and anthracnose in cotton by chemical imaging technology

**Abstract** – A new method was developed to quickly and accurately differentiate the cotton anthracnose fungus (*Colletotrichum gossypii* - CG) and cotton ramulose fungus (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* – CGC) grown on culture media and using Chemical Imaging Technology (CIT) in region of spectral Near Infrared (NIR). Five GC isolates and 46 CGC isolates were used. CG and CGC isolates were grown in Czapek agar medium at 25°C with 12h photoperiod for 15 days. Measurements of the CIT were performed from 1000 nm to 2500 nm using a 50mm lens. In this spectral region, specific chemical groups characteristic of CG and CGC were assigned. A pattern recognition model was developed using Successive Projections Algorithm - Analysis Discriminant Linear (SPA-LDA). The samples were separated using the sample selection algorithm (Kennard-Stone) in three sets with the number of samples: 3, 1 and 1 for CG and 20, 8, 18 for CGC, totaling 23 (test), 9 (validation) and 19 (prediction) that add up to 51 samples of CG and CGC isolates. The SPA-LDA model provided similar results when compared to reference method based in molecular markers. Therefore, a new CIT-NIR procedure using SPA-LDA for differentiation of CG and CGG isolates grown on culture media is proposed in this work. The proposed method is accurate as well as the method that uses molecular markers. The new CIT-NIR-SPA-LDA procedures for CG and CGC fungi classification are distinguished for their greater analytical speed, simplicity, lower cost and non-destructive nature.

**Index terms:** spectroscopy, multispectral imagens analysis, fungal classification, cotton.



## Introdução

---

Os fungos *Colletotrichum gossypii* (CG) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephasloporioides* (CGC) são morfológicamente idênticos e causam doenças distintas no algodoeiro. O CGC, agente causal da ramulose, causa a morte do meristema apical do algodoeiro e induz o brotamento lateral anormal nos ramos afetados, como pode ser visualizado nas Figuras 1A, 1B, 1C, 1D e 1E (Kirpatrick; Rothrock, 2001). Enquanto o CG, agente etiológico da antracnose, causa tombamento e morte de plântulas de algodoeiro, além de lesões nas hastes e folhas, conforme observa-se nas Figuras 1F e 1G (Southworth, 1891).

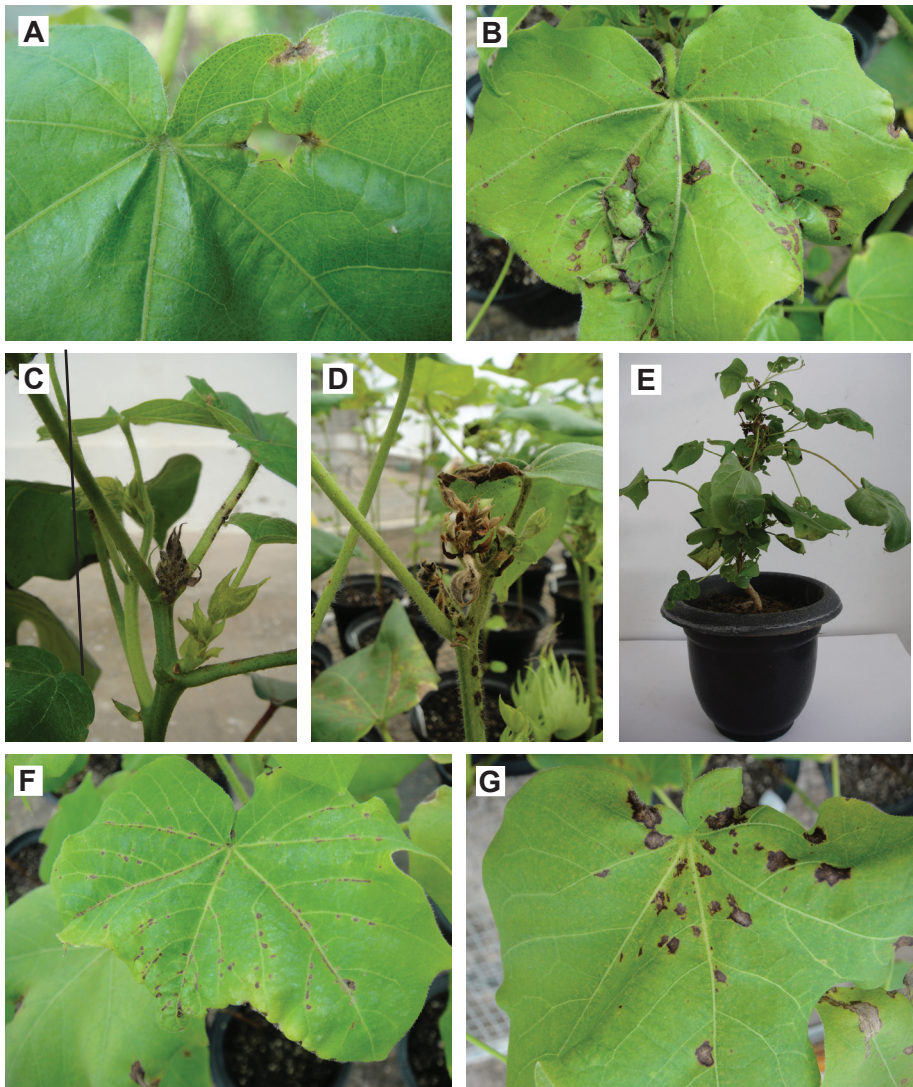
Diferente da antracnose do algodoeiro, a ramulose é uma ameaça constante para as áreas produtivas de algodoeiro no país, sendo as sementes contaminadas a sua principal via de disseminação. Por representar elevado risco econômico à cultura do algodão, o nível de tolerância do agente causal da ramulose é de 0% em lotes comerciais de sementes de algodoeiro (Brasil, 2009).

A identificação desses dois biótipos de fungos por meio de técnicas tradicionais, não é uma tarefa fácil. Tanaka et al. (1996) propôs a separação de CG de CGC por meio de marcadores morfológicos desses fungos crescidos em sementes de algodoeiro submetidas ao teste de sanidade (*blotter test*), enquanto Silva-Mann et al. (2005) sugeriram a diferenciação desses patógenos usando de marcadores moleculares AFLP. Em trabalho publicado por Hyde et al. (2009), foi relatado não existirem marcadores morfológicos e moleculares consistentes para identificar essas duas espécies fúngicas, até a data de publicação. Alguns autores consideraram *C. gossypii* sinônimo de *C. gloesporioides*; no entanto, esse taxon não foi aceito por Sutton (1992). Salustiano et al. (2014) demonstrou, por meio de análises filogenéticas, que esses dois fungos são espécies distintas. Em trabalho publicado por nossa equipe de pesquisa na Embrapa Algodão em 2018 (Aires et al., 2018), foi associado o uso de marcadores moleculares e testes de patogenicidade como referência para ensaios não destrutivos de provas de conceito usando a Tecnologia de Imagens Químicas (TIQ) para identificação de CG e CGC.

A utilização de técnicas moleculares, em particular a técnica de PCR, tem sido bastante utilizada para solucionar os problemas metodológicos na detec-

ção e diferenciação de patógenos em sementes (Weir et al., 2012). No entanto, é uma técnica laboriosa, demorada, e de alto custo, o que pode inviabilizar economicamente o teste de sanidade em larga escala.

Fotos: Wirton Macedo Coutinho



**Figura 1.** Sintomas da ramulose e antracnose em plantas de algodão inoculadas durante teste de patogenicidade em casa de vegetação. A-B) Lesões foliares causada pelo CGC. C-D) Morte do meristema apical da planta atacada pelo CGC após 20 dias de inoculação. E) Encurtamento de entrenós, atrofia e desenvolvimento excessivo de galhos (sintomas da vassoura de bruxa, causados pelo CGC. F-G) Folhas com lesões típicas de antracnose, causada pelo CG.

Novas abordagens têm sido exploradas usando métodos espectrais baseados no conceito de *impressões digitais* (fingerprint) obtidos por métodos instrumentais capazes de gerar informação de composição de forma não destrutiva e rápida (Yao et al., 2008; Kong et al., 2013). Nos últimos anos, técnicas utilizando ferramentas espectroscópicas têm sido empregadas para identificação, classificação de produtos e determinações multicomponentes, sem o uso de reagentes e preservando a constituição da amostra. O grande destaque é que essas ferramentas podem ser aplicadas em uma variedade de pesquisas na identificação e classificação de microrganismos, no caso fungos patogênicos (Singh et al., 2012).

A mais moderna abordagem de ferramentas espectrais está associada ao conceito de imagens químicas (IQ) (Lorente et al., 2012; Tibola et al., 2018). A técnica gera uma imagem de camadas múltiplas, análogas as imagens hiperespectrais, em que cada camada é definida como um único comprimento de onda espectral, o qual é utilizado para detectar características em função de grupos químicos específicos (Doneus et al., 2014).

Na aplicação da TIQ em problemas de identificação ou classificação, empregam-se técnicas de reconhecimento de padrões supervisionado (Beebe et al., 1998). Dentre elas, há aquelas que requerem seleção de variáveis como, por exemplo, o algoritmo Successive Projections Algorithm (SPA). Essa é uma estratégia interessante para seleção de variáveis e desenvolvimento de métodos de classificação mais simples (Pontes et al., 2005). Esse algoritmo minimiza a colinearidade entre as variáveis reais de um conjunto de espectros aliado à Análise Discriminante Linear - Linear Discriminant Analysis (LDA). A LDA é uma técnica a qual consiste em estimar uma combinação linear de duas ou mais variáveis independentes obtendo uma função linear, que pode distinguir características relativas aos dados de dois ou mais grupos (Kowalski, 1984; Massart et al., 1988).

Neste documento é detalhado um novo método para identificação dos fungos CG e CGC, crescidos em meio de cultura, com a técnica TIQ-NIR usando um modelo de classificação APS-LDA (Aires et al., 2018), sendo esse o passo inicial para o desenvolvimento de um método de identificação desses patógenos em sementes individualizadas de algodoeiro submetidos a testes de sanidade.

## Material e métodos

---

### Origem dos Isolados

Foram utilizados neste estudo cinco isolados de CG e 46 isolados de CGC coletados de amostras de sementes e folhas de algodão. Os isolados de CG e CGC tiveram origem em distintas áreas produtoras dos estados de Goiás (CG=1 e CGC=14) e Mato Grosso (CG=4 e CGC=32). Todos os isolados utilizados pertencem à coleção de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão.

### Cultivo dos fungos e extração de DNA

Os isolados foram mantidos em meio de cultura para crescimento rápido (2,0 g de Peptona, 10,0 g de Dextrose, 1,5 g de Caseína, 2,0 g de Extrato de Levedura e 16,0 g de ágar para 1,0 L de H<sub>2</sub>O). Os isolados foram crescidos em frascos de 250,0 mL com 50,0 mL de meio descrito acima sob agitação de 150 rpm por 3 dias a 25°C. O DNA total foi extraído seguindo os procedimentos de extração por CTAB (Doyle; Doyle, 1990). A quantificação do DNA foi estimada por método espectrométrico NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), em gel de agarose 0,8% para análise da quantidade e qualidade das amostras. Todas as amostras foram diluídas até uma relação de 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### Diagnóstico molecular de CG e CGC

Para o diagnóstico molecular diferencial entre CG e CGC foi utilizado a região IGS (Intergenic Spacer) do rDNA para cada isolado. Um fragmento de 3,3 kb de CG e outro de 2,7 Kkb de CGC foram completamente sequenciados e os gaps entre CG e CGC foram localizados para desenho de um conjunto de *primers* que permitissem o diagnóstico molecular via PCR.

Os *primers* IGS detect F2-5'GAAAAGTAAGTACCCCCGAA3' e IGS detect R- TGGCGGCGGTGAGTTCGGGGTGC amplificam um fragmento de 432 pb para CG e 148 pb em CGC. As reações de PCR foram realizadas em volume de 20,0  $\mu\text{L}$  utilizando 50,0 ng de DNA total; tampão com 2,0 mmolL<sup>-1</sup> de

MgCl<sub>2</sub>; dNTPs 0,4 m molL<sup>-1</sup>; Taq DNA Polimerase 1U e 0,2 μ molL<sup>-1</sup> 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 s, anelamento dos *primers* a 65°C por 15 s, síntese 72°C por 30 s. Após finalizar os ciclos foi realizada uma extensão de 72°C por 10 minutos.

Um teste de patogenicidade foi realizado em casa de vegetação para confirmação da relação entre o ensaio molecular e a capacidade dos isolados em gerar as doenças associadas em algodoeiro.

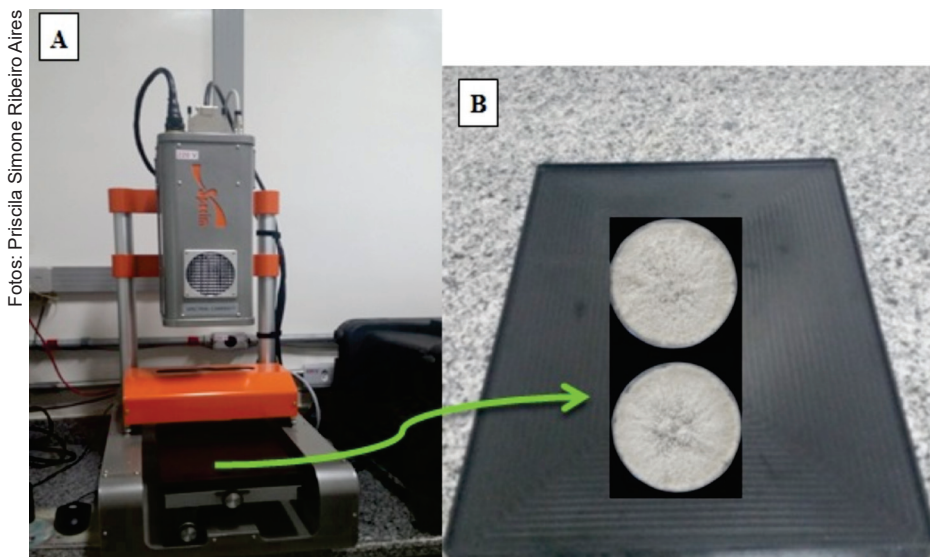
## Cultivo dos fungos e obtenção das imagens químicas no NIR

Os isolados utilizados neste estudo foram crescidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 20,0 mL de meio Czapeck-ágar [3,00% (m/v) de sacarose, 0,30% (m/v) de NaNO<sub>3</sub>, 0,10% (m/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% (m/v) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05% (m/v) KCl e 0,001% (m/v) FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O] solidificado com 1,5% (m/v) de ágar. As placas com os isolados fúngicos foram incubados por 15 dias em BOD com temperatura ajustada para 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após esse período de incubação, as placas com os fungos crescidos tiveram suas imagens hiperespectrais obtidas. As medidas foram realizadas em espectrômetro sisuChema SWIR - Specim<sup>®</sup>, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland, na faixa espectral de 1000 nm a 2500 nm, com uma lente de 50 mm usando o software ChemaDAQ (Figura 2).

A aquisição das IQ inclui a digitalização da matriz linear pela detecção ao longo do eixo Y, o movimento da amostra sobre o eixo X, e os espectros NIR no eixo Z da amostra. Assim, um dado hiper-cubo 3D com informação da imagem espacial e espectral (NIR) que pode ser utilizada para identificar os patógenos CG e CGC.

Os espectros médios obtidos no sistema imagens foram centrados na média e pré-processados pelo algoritmo de Savitzky Golay, usando uma janela de 2 pontos antes e 2 pontos depois do ponto central, e polinômio de segunda ordem. O Software Evince 2.7.10 foi empregado nas etapas preliminares de tratamento matemático e estatístico dos dados. Em fases posteriores usou-se o Matlab 2013b e MatLab<sup>®</sup> R2013a da The MathWorks.



Fotos: Priscila Simone Ribeiro Aires

**Figura 2.** Espectrômetro de imagens hiperespectrais NIR (sisuChema SWIR - Specim®) (A); Bandeja de leitura com duas amostras de isolados dos fungos (B).

## **Análise de reconhecimento de padrões - APS-LDA**

O APS-LDA foi formatado em três matrizes espectrais denominadas de treinamento, validação e predição. Esses conjuntos foram construídos empregando o algoritmo *Kennard-Stone (KS)*, desenvolvido em 1969, em que separou as amostras oriundas do fungo CG em 3, 1 e 1 e para o fungo CGC e 20, 8, 18, totalizando 23 (treinamento), 9 (validação) e 19 (predição) que somam as 51 amostras de fungos CG e CGC. Foi atribuído um índice de classe para as amostras chamados de Group\_Train, Group\_Test e Group\_Pred. Para as amostras da classe CG e CGC foram atribuídos indicadores específicos com o número mínimo ( $n=1$ ) e máximo ( $n=20$ ) de variáveis que o APS-LDA selecionou.

A resposta do APS-LDA para a classificação (identificação externa) fornece o número de erros dos conjuntos de validação e de previsão, bem como o custo obtido pelo conjunto de validação com o número ótimo de variáveis. Para saber qual foi a amostra que errou e para qual classe ela foi classificada, em ambiente de programação usando o MatLab, em que aplica-se o conjunto de previsão ao algoritmo com as variáveis selecionadas pelo APS.

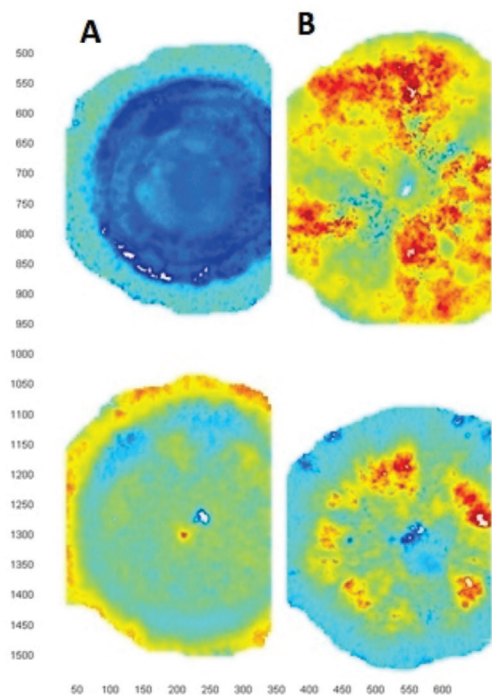


## Resultados e Discussão

As imagens processadas após a análise exploratória usando uma PCA possui a configuração apresentada, conforme Figura 3.

A projeção dos escores gerados na PCA (Figura 3) em nível de pixel poderá ser visualizada na Figura 4.

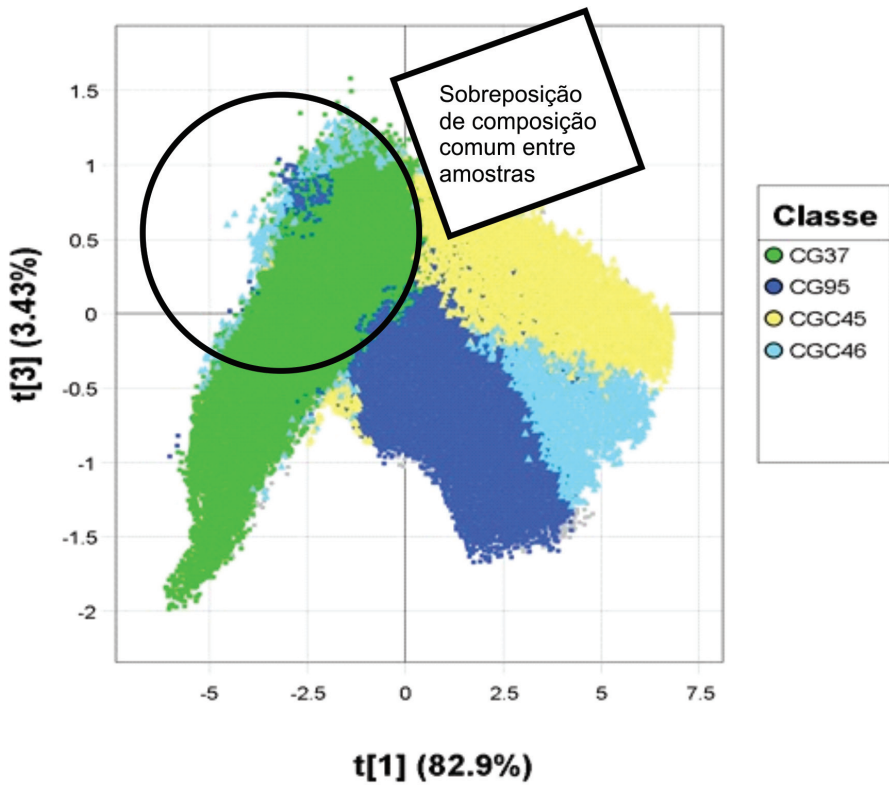
A faixa de 995 a 1381 nm foi selecionada considerando a minimização das absorções de OH da água em 1400 nm e 1900 nm, as quais causam sobreposição no espectro total de 995 nm a 2500 nm, além de maior dificuldade de processamento das imagens (Figura 5). Observa-se uma melhor evidência de separação entre os espectros na faixa de trabalho selecionada para as classes de CG e CGC.



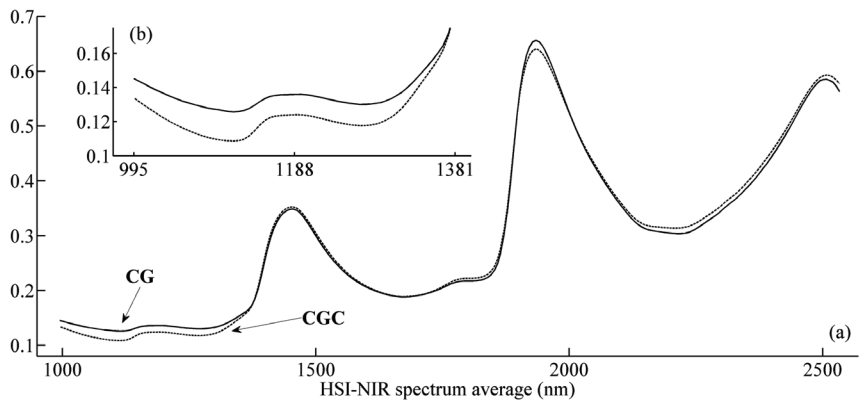
**Figura 3.** Mapa dos escores gerado pela PCA em função da distribuição espacial dos pixels (com 256 canais) sem nenhum pré-processamento para as isolados CG (A) e CGC (B).

No gráfico dos escores da PCA dos espectros médios oriundos das imagens de cada isolado, as amostras das classes de CG e CGC formam dois agrupamentos separados pela linha tracejada (valor de escore com limiar de -0,4) na projeção de PC1 vs PC2, com uma variância explicada igual a 99,77% (Figura 6).

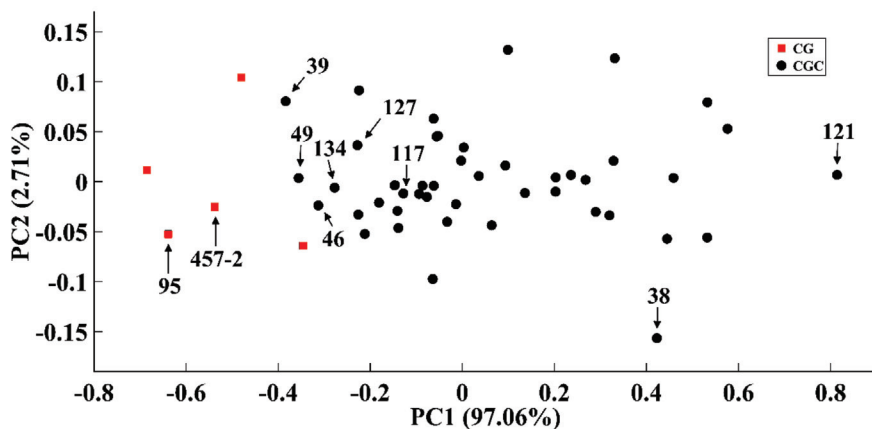
Com 62 variáveis espectrais entre 995 a 1381 nm dos espectros médios utilizadas pela PCA, apenas 7 variáveis foram selecionadas pelo algoritmo APS que são: 1261, 1381, 995, 1083, 1166, 1020 e 1350 nm (Figura 7). Elas estão atribuídas aos seguintes grupos químicos que geram frequências (vibrações características em comprimento de



**Figura 4.** Projeção dos escores em nível de pixels para as duas classes analisadas.

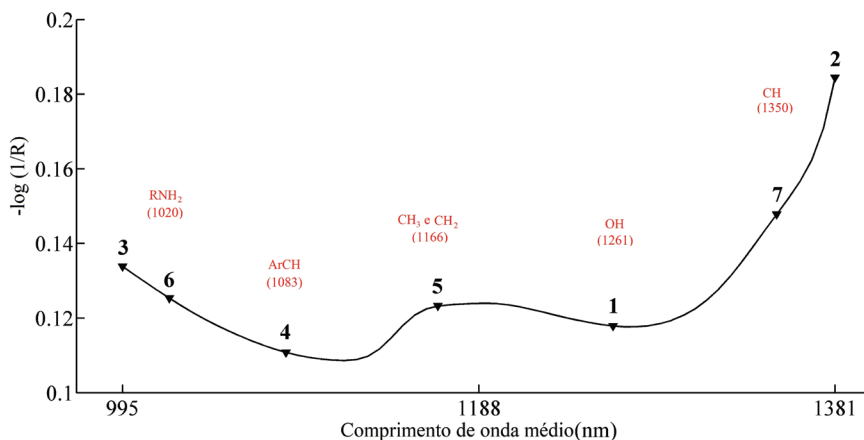


**Figura 5.** Espectros médio HSI-NIR total (a) e cortado (b) na parte inicial das amostras CG 37 (—) e CGC 39 (---).



**Figura 6.** Gráfico dos scores de PC1 x PC2 nos espectros médios IQ-NIR inicial das amostras dos fungos CG e CGC.

onda) em ligações C-H, O-H, N-H e S-H com alta energia vibracional. O 2º sobretom de CH com o final do grupo CH em 1261 nm, 10 sobretom de OH com as combinações de 10 sobretom de CH abrangendo as regiões de CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e o começo da absorbância de ArOH em 1381 nm, 20 sobretom de CH com o grupo ArCH em 1083 nm e com os grupamentos CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> em 1166 nm, 2º sobretom de NH com o grupo RNH<sub>2</sub> em 1020 nm e o começo do 10 sobretom de OH com a combinação do 1º sobretom de CH em 1350 nm.



**Figura 7.** Região de espectral de interesse com as variáveis selecionadas pelo algoritmo APS representadas na ordem em que foram selecionadas com a numeração de 1 a 7.

Após a seleção realizou-se uma Análise Discriminante Linear - LDA construído com sete variáveis espectrais NIR. O modelo APS-LDA para classificação forneceu 100% de acerto no conjunto de validação e de predição, em relação à análise de referência por PCR-DNA, sem evidência de erros do tipo I ou II.

A atribuição dos grupos químicos que ocorrem na região de 995 nm a 1381 nm e das variáveis selecionadas pelo APS evidencia características prováveis de absorção de aminoácidos, enzimas e proteínas específicas para a classificação de CG e CGC.

## Conclusões

---

Neste trabalho foi desenvolvido uma nova estratégia analítica com aplicação de conceitos de imagens químicas e análise discriminante linear com prévia seleção de variáveis para identificação de isolados fúngicos de CG e CGC, agentes etiológicos da ramulose e antracnose do algodoeiro. Os resultados obtidos com o APS-LDA não apresentaram erros quando comparados ao método molecular de referência. Portanto, a combinação das técnicas IQ-NIR e APS-LDA foi eficiente para identificação de CG e CGC de forma rápida com múltiplas amostras, de maneira não destrutiva, com maior simplicidade quando comparada com métodos de referência.

## Agradecimentos

---

A Capes pelas bolsas pelo projeto “Diversificação e uso do algodoeiro no Semiárido brasileiro (Capes/Embrapa n° 15/2014), a Rede de espectroscopia NIR da Embrapa-Fase II e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA).

## Referências

---

AIRES, P. S. R.; GAMBARRA NETO, F. F.; COUTINHO, W. M.; ARAUJO, A. E.; SILVA, G. F.; GOUVEIA, J. P. G.; MEDEIROS, E. P. Near infrared hyperspectral images and pattern recognition techniques used to identify etiological agents of cotton anthracnose and ramulosis. **Journal of Spectral Imaging**, v. 7, a8, Apr. 2018. DOI: 10.1255/jsi.2018.a8.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: Wiley, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009. [Submete à consulta pública, por um prazo de 60 (Sessenta) dias a contar da data de publicação desta Portaria, o Projeto de Instrução Normativa e seus respectivos Anexos, que visa aprovar os níveis de tolerância de pragas para Pragas Não-Quarentenárias Regulamentadas – PNQR]. **Diário Oficial da União**, 2 mar. 2009. Seção 1, p. 10. Disponível em: <https://apps.agr.br/portaria-no-47-de-26-de-fevereiro-de-2009/>. Acesso em: 21 jun. 2019.

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, Dec. 2014. DOI: 10.1016/j.jas.2014.08.023.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

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.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* - names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

KIRPATRIC, T. L.; ROTHROCK, C. S. **Compendium of cotton diseases**. 2. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2001. 77 p. (The Disease Compendium Series of the American Phytopathological Society).

KONG, W.; ZHANG, C.; LIU, F.; NIE, P.; HE, Y. Rice seed cultivar identification using near-infrared hyperspectral imaging and multivariate data analysis, **Sensors**, v. 13, n. 7, p. 8916-8927, 2013. DOI: 10.3390/s130708916.

KOWALSKI, B. R. (Ed.). **Chemometrics: mathematics and statistics in chemistry**. Dordrecht: D. Reidel, 1984. 485 p. (NATO ASI Series. Series C: Mathematical and Physical Sciences; 138). Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry, Cosenza, Italy, September 12-23, 1983.

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, n. 4, p. 1121-1142, 2012.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. **Chemometrics: a textbook**. Amsterdam: Elsevier, 1988. (Data Handling in Science and Technology, v. 2).

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PONTES, M. J. C.; GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U.; MOREIRA, P. N. T.; PESSOA NETO, O. D.; JOSÉ, G. E.; SALDANHA, T. C. B. The successive projections algorithm for spectral variable selection in classification problems. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, n. 1, p. 11-18, 2005.

SALUSTIANO, M. E.; RONDON, M. N.; ABREU, L. M.; COSTA, S. D. S.; MACHADO, J. D. C.; PFENNING, L. H. The etiological agent of cotton ramulosis represents a single phylogenetic lineage within the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 357-367, 2014.

SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C.; BERNARDINO FILHO, J. R.; SALGADO, K. C. C.; STEVENS, M. R. AFLP markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 169-172, Mar./Apr. 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, n. 1, p.11-24, 2012.

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

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MACHADO, J. C. Hábito de crescimento de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro. **Bragantia**, v. 55, n. 1, p. 95-104, 1996.

TIBOLA, C. S.; MEDEIROS, E. P. de; SIMEONE, M. L. F.; OLIVEIRA, M. A. de (Ed.). **Espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 198 p.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Micology**, v. 73, n. 1, p. 115-180, 2012.

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.

**Embrapa**

---

*Algodão*