



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE**  
**PLANTAS**



**JANAÍNE ROSSANE ARAÚJO SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOCULTURAL DE**  
***Colletotrichum* spp. ASSOCIADAS À ANTRACNOSE EM *Capsicum* spp.**  
**NO NORDESTE DO BRASIL**

Rio Largo - AL

2015

**JANAÍNE ROSSANE ARAÚJO SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOCULTURAL DE  
*Colletotrichum* spp. ASSOCIADAS À ANTRACNOSE EM *Capsicum* spp.  
NO NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção

Coorientador: Dr. Leonardo da Fonseca Barbosa

Rio Largo - AL

2015

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

S586c Silva, Janaíne Rossane Araújo.  
Caracterização molecular e morfo-cultural de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose em *Capsicum* spp. no nordeste do Brasil./ Janaíne Rossane Araújo Silva. – Maceió, 2015.  
60f. : il. tabs., graf.

Orientadora: Iraildes Pereira Assunção.  
Dissertação (mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015.

Bibliografia: f.45-60.

1. Patogenicidade. 2. Antracnose. 3. Pimentão. 4. Pimenta. 5. Antracnose. 6. Multilocus. I. Título.

CDU: 632.4

JANAÍNE ROSSANE ARAÚJO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOCULTURAL DE  
*Colletotrichum* spp. ASSOCIADAS À ANTRACNOSE EM *Capsicum* spp.  
NO NORDESTE DO BRASIL**

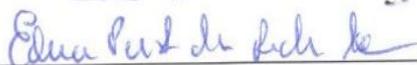
Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 31 de Julho de 2015.



---

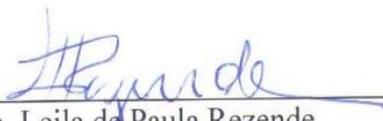
Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção  
Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

**Banca Examinadora:**



---

Prof. Dra. Edna Peixoto da Rocha Amorim  
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)



---

Prof. Dra. Leila de Paula Rezende  
Universidade Federal de Alagoas (Examinador Externo)

Rio Largo - AL

2015

## AGRADECIMENTOS

A minha maior gratidão ao meu eterno Deus. Minha fortaleza e consolo nos momentos de dificuldade.

Agradeço aos meus pais, Maria da Silva e José Araújo da Silva, pelo amor, apoio, incentivo, investimento, dedicação e esforços despendidos a mim para realização deste sonho. Aos meus irmãos Jamila Ranyelle Araújo Silva Frutuoso, Janiele Rayssa Araújo Silva Melo e Jamis Henri Araújo Silva e a minha sobrinha Maria Luiza Araújo Frutuoso pela amizade, cuidado e amor.

Ao meu namorado, Marlisson Araújo Cabral, pela companhia e apoio em todos os momentos.

A Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção pela confiança e orientação. Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima pela confiança e apoio. Aos Profs. Dra. Fátima Muniz, Dr. Gildemberg Leal e Dra Edna P. R. Amorim pelos valiosos ensinamentos e apoio para realização deste trabalho.

Ao Dr. Leonardo da Fonseca Barbosa pela co-orientação e apoio. Ao Dr. Roberto Ramos Sobrinho pelas sugestões e ensinamentos. E a Dra. Jaqueline Figueredo pela amizade e apoio dado ao trabalho

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários da Secretaria da pós-graduação, Geraldo de Lima, Marcos Antônio Lopes e Michele Cristina Mela pela convivência;

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia Molecular que tive a oportunidade de conhecer e conviver. Em especial a Tamires Paixão e Ana Raphaela Gomes da Silva pelo constante apoio e grande contribuição nos trabalhos práticos. E a Lauraestela Hermogenes pela amizade e incentivo.

Aos colegas e amigos da pós-graduação pela convivência durante a realização do curso. Em especial Mayra Ferro, Aline Marques, Ronycleide da Silva Sousa, Lucas Jobim e Maria Quitéria Cardoso.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

A antracnose é uma importante doença para hortaliças solanáceas, como pimentão e pimenta. A doença é causada por fungos do gênero *Colletotrichum* que provocam grandes prejuízos na produção mundial, tanto em campo como em pós-colheita, podendo levar a perdas de até 100%. O objetivo do presente estudo foi a identificação das espécies do gênero *Colletotrichum* através da caracterização molecular e morfocultural em *Capsicum* spp. Isolados foram obtidos de pimentões e pimentas com sintomas de antracnose, coletados em municípios dos estados de Alagoas, Sergipe e Pernambuco. Os trinta e oito isolados foram, inicialmente, analisados com base nas sequências do gene gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), para conhecer a diversidade de espécies presentes nestas culturas. A identificação dos isolados foi confirmada com análise concatenada dos genes GAPDH,  $\beta$ -tubulina (TUB2) e da região ITS-rDNA. Para caracterização cultural, das espécies identificadas, foi realizada a avaliação da taxa de crescimento micelial dos isolados, e observada a coloração das colônias, cultivadas em BDA sintético, após sete dias. Para caracterização morfológica, o comprimento e a largura de 50 conídios e apressórios foram mensurados. As espécies identificadas foram submetidas a teste de patogenicidade cruzada em pimentão, pimenta, tomate e jiló, mantidos a 25°C, no escuro. Espécies em pelo menos quatro complexos distintos do gênero *Colletotrichum* estão associadas à antracnose em frutos de *Capsicum* spp. no Nordeste do Brasil, sendo a espécie *C. scovillei* do complexo *C. acutatum*, a mais frequentemente encontrada causando antracnose em *Capsicum* spp. Pimenta, pimentão, tomate e jiló fazem parte da gama de hospedeiros das espécies *C. scovillei*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. truncatum*.

**Palavras-chave:** Pimentão. Pimenta. Antracnose. Multilocus. Patogenicidade.

## ABSTRACT

Anthracnose is an important disease for solanaceous vegetables such as sweet peppers and chili peppers. The disease is caused by fungi of *Colletotrichum* genus that cause great losses in world production, both in the field and post-harvest, leading to losses of up to 100%. The aim of this study was to identify the species of the genus *Colletotrichum* through molecular characterization and morphocultural in *Capsicum* spp. Isolates were obtained from sweet peppers and chili peppers with symptoms of anthracnose, collected in municipalities in the states of Alagoas, Sergipe and Pernambuco. The thirty-eight isolates were initially analyzed based on the sequences of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH), to know the diversity of species present in these cultures. The identification of the isolates was confirmed with concatenated analysis of GAPDH genes,  $\beta$ -tubulin (TUB2) and ITS-rDNA region. For cultural characterization of the identified species, it was carried out the assessment of mycelial growth rate of isolated and observed the color of the colonies grown in synthetic BDA, after seven days. For morphological characterization, the length and width of 50 conidia and apleria were measured. The identified species were subjected to cross-pathogenicity test in chili pepper, sweet pepper, tomatoes and eggplant, kept at 25 ° C in the dark. Species in at least four distinct genus *Colletotrichum* complexes are associated with anthracnose on fruits of *Capsicum* spp. in northeastern Brazil, and the specie *C. scovillei* from complex *C. acutatum* was most often found causing anthracnose in *Capsicum* spp. Chili pepper, sweet pepper, tomatoes and eggplant are part of the host range of *C. scovillei*, *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. truncatum*.

**Key words:** Sweet pepper. Chili pepper. Anthracnose. Multilocus. Pathogenicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Teste de patogenicidade: pimentão inoculado com o isolado P1, sem fermento (1) e com fermento (2) (A); e pimentas Dedo de moça, sem fermento (1) e com fermento (2), inoculados com o isolado Pi18 (B).....30
- Figura 2 – Árvore filogenética de Inferência Bayseana com os isolados de *Colletotrichum* pertencentes a quatro complexos, usando o gene GAPDH. ....31
- Figura 3 – Porcentagem de ocorrência das espécies de *Colletotrichum* identificadas neste trabalho.....32
- Figura 4 – Árvore filogenética de Inferência Bayseana com um isolado de *Colletotrichum* do complexo *C. gloeosporioides*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS. *Colletotrichum boninense* foi usado como outgroup.....35
- Figura 5 – Árvore filogenética de Inferência Bayseana com três isolados de *Colletotrichum* do complexo *C. acuntatum*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS. *Colletotrichum boninense* foi usado como outgroup.....36
- Figura 6 – Aspecto dos cinco morfogrupos de isolados de *Colletotrichum* cultivados em meio BDA sintético, observados ao 7º dia. *C. scovillei*: I (A) e (B). *C. siamense*: II (A) e (B). *C. truncatum*: III (A) e (B). *C. tropicale*: IV (A) e (B). *C. brevisporum*: V (A) e (B). Parte superior (A) e reverso (B) da placa de Petri.....37
- Figura 7 – Características morfológicas da espécie *C. scovillei*: Conídios retos, cilíndricos com extremidades arredondas ou com final mais ou menos agudos (A). Apressórios castanho médio a escuro, subglobosos, ovoides a elipsoidais (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.....39
- Figura 8 – Características morfológicas da espécie *C. tropicale*: Conídios curtos e largos com extremidades arredondados, com uma leve contração perto do centro (A). Apressórios subglobosos, ovoides e clavados (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.....39
- Figura 9 – Características morfológicas da espécie *C. siamense*: Conídios cilíndricos com extremidades arredondados, com uma leve contração perto do centro (A). Apressórios clavados, algumas vezes ovoides (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.....40

- Figura 10 – Características morfológicas da espécie *C. truncatum*: Conídios compridos com a parte central ligeiramente curvada, afinando em direção ao ápice mais fortemente curvos (A). Apressórios clavados, às vezes irregulares (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.....40
- Figura 11 – Características morfológicas da espécie *C. brevisporum*: Conídios cilíndricos, com extremidades arredondadas (A). Apressórios irregulares e às vezes ovais (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.....41
- Figura 12 – Patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose no Nordeste do Brasil em pimentão, tomate, pimenta e jiló.....42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos isolados usados para identificação e caracterização de espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. associados à antracnose em <i>Capsicum</i> spp.....	22
Tabela 2 – Descrição dos <i>primers</i> usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero <i>Colletotrichum</i> .....	24
Tabela 3 – Isolados incluídos nas análises de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.....	26 e 27
Tabela 4 – Modelo de substituição selecionado para os genes através do programa MrModeltest 2.3.....	34
Tabela 5 – Médias de comprimento e largura de conídios e apressórios, e taxa de crescimento micelial de espécies de <i>Colletotrichum</i> .....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Gênero <i>Capsicum</i> .....	13
2.2 Importância Econômica do Gênero <i>Capsicum</i> .....	14
2.3 Antracnose.....	15
2.4 Caracterização do Gênero <i>Colletotrichum</i> Corda (1831).....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 Obtenção dos Isolados.....	21
3.2 Cultura Monospórica.....	21
3.3 Preservação dos Isolados.....	23
3.4 Teste de Patogenicidade.....	23
3.5 Caracterização Molecular.....	23
3.5.1 Extração de DNA.....	23
3.5.2 Amplificação e sequenciamento do DNA.....	24
3.5.3 Análises filogenéticas.....	25
3.6 Estudos Morfológicos das Espécies de <i>Colletotrichum</i> .....	28
3.7 Virulência de Espécies de <i>Colletotrichum</i> em Diferentes Hospedeiros.....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1 Teste de Patogenicidade.....	30
4.2 Caracterização Molecular.....	31
4.3 Estudos Morfológicos das Espécies de <i>Colletotrichum</i> .....	36
4.4 Patogenicidade de Espécies de <i>Colletotrichum</i> em Diferentes Hospedeiros.....	41
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* spp. compreende as pimentas (*Capsicum* spp.) e pimentões (*Capsicum annuum* L.). Estas hortaliças apresentam diversos tamanhos, cores, sabores e picância, fazem parte da riqueza cultural do Brasil e são consideradas patrimônios valiosos da nossa biodiversidade. O cultivo ocorre em quase todas as regiões do país devido ao consumo *in natura* de pimentões e pimentas, assim como do processamento na forma de molhos, condimentos, conservas e geleias (FILGUEIRA, 2003; AZEVEDO et al., 2006; COSTA et al., 2007).

No Brasil, a área anual cultivada é de cerca de 18 mil ha e os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Bahia (MAROUELLI e SILVA, 2012; GENUNCIO; ZONTA; NASCIMENTO, 2015). A crescente demanda do mercado, tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas e pimentões um dos mais importantes do país. Além do mercado interno, parte da produção brasileira de pimentas é exportada em diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas ornamentais (COSTA et al., 2007). O estado de Alagoas, vem crescendo em importância, devido a produção na área denominada de cinturão verde, na região do município de Arapiraca, e da produção em pequenas propriedades espalhadas por todo o estado.

No entanto, problemas fitossanitários, tanto em cultivo protegido como em campo aberto, comprometem o rendimento da produção (AZEVEDO et al., 2006). A antracnose é considerada uma importante doença para estas culturas, pois resulta em significativas perdas tanto em campo como em pós-colheita, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; REIS; BOITEUX; HENZ, 2009; JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014). Em locais com alta concentração de inoculo e em épocas chuvosas, a doença pode afetar 100% da produção (KURUZAWA; PAVAN, 2005; COLATTO, 2010).

No gênero *Colletotrichum* estão compreendidos os patógenos que causam a antracnose. Estes fitopatógenos apresentam ampla gama de hospedeiros de importância econômica como cereais, gramíneas, hortaliças, legumes e frutas (IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004; ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARÉK, 2012). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para identificação de espécies deste gênero em diferentes culturas (ROCA et al., 2004; LINS; ALVES; ABREU, 2007; SILVA et al., 2012; CARNEIRO et al., 2012; KUPPER;

GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007; CIA, 2005; COSTA et al., 2010; VIDA et al., 2006; BONETT et al., 2010). Estes estudos contribuem para: a identificação de espécies, correlação de espécies hospedeiras e no desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficientes (GUIMARÃES, 2011).

A diversidade de espécies e a falta de informações sobre as relações com determinados hospedeiros tornam sua taxonomia e nomenclatura bastante confusa (GUIMARÃES, 2011; GUERBER et al, 2003), uma vez que, a antiga forma de classificação dos fungos era baseada apenas nos caracteres morfológicos e fisiológicos (COLATTO, 2010), causando discordância entre pesquisadores, dificultando assim sua identificação (CAI et al., 2009; ANDRADE et al., 2007).

Para reduzir estas discordâncias, nos estudos de identificação e taxonomia do gênero *Colletotrichum*, além das características morfológicas, culturais e fisiológicas, tem sido levado em consideração características moleculares (SCHENA et al., 2014; DAMM et al., 2013; LIMA et al., 2013; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; BONETT et al. 2010; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; ANDRADE et al., 2007). Vários marcadores filogenéticos são utilizados na identificação e solução de divergências de espécies do gênero *Colletotrichum*. Os genes mais utilizados são actina (ACT), quitina sintetase (CHS-1),  $\beta$ -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), histona (HIS3), glutamina sintetase (GS) e a região *Internal transcribed spacer* (ITS) (CANNON et al., 2012; WEIR, JOHNSTON, DAMM, 2012; PENG et al., 2012; SHARMA et al., 2013). A análise destes genes associados a caracterização morfológicas, culturais e fisiológicas, tem permitido maior segurança na identificação de espécies de *Colletotrichum*.

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies do gênero *Colletotrichum* associadas à antracnose em *Capsicum* spp. coletados em três diferentes estados do nordeste do Brasil, através da caracterização molecular e morfocultural.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Capsicum*

A família Solanaceae está presente em quase todos os lugares do mundo e inclui cerca de 150 gêneros e 3000 espécies que se concentram na Região Neotropical. No Brasil está representada por 30 gêneros e cerca de 450 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012).

Diversas plantas cultivadas, ricas em vitaminas e sais minerais, utilizadas na alimentação humana, pertencem à família Solanaceae. Dentre estas plantas, podemos citar o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a batata (*S. tuberosum* L.), as pimentas e o pimentão, a berinjela (*S. melongena* L.) e o Jiló (*S. gilo* Raddi) (SOUZA; LORENZI, 2012; FILGUEIRA, 2008).

O gênero *Capsicum* é originário da América Central e América do Sul. Segundo sua classificação taxonômica, pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, ordem Solanales e família Solanaceae (KRISHMA DE, 2003).

Embora, ainda exista uma controvérsia de quantas espécies estão incluídas dentro do gênero, de modo geral, acredita-se que 20 espécies e mais de 100 variedades estão distribuídas em todo mundo, sendo esta diversidade justificada pela facilidade de ocorrer polinização cruzada entre as espécies. Com o cultivo dos tipos selvagens, surgiram cinco espécies domesticadas consideradas as mais importantes espécies dentro do gênero, são elas: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*. A maioria das variedades comerciais pertencem às espécies *C. annuum* e *C. frutescens* (KRISHMA DE, 2003; DEWITT; BOSLAND, 1996).

A espécie *C. annuum* inclui a maioria das variedades mais comuns, tais como, jalapeño, pimentão, mulata, pimenta-de-mesa e piquin (ZANCANARO, 2008; KRISHMA DE, 2003; DEWITT; BOSLAND, 1996). E na espécie *C. frutescens* inclui as variedades malagueta, pimenta-de-passarinho, tabasco, malagueta e malagueta (ZANCANARO, 2008; COSTA et al., 2007).

A espécie *C. baccatum* é representada pelas variedades cambuci, cumari verdadeira, dedo-de-moça, peito-de-moça, pimenta fina, pitanga, cifre-de-veado, e sertãozinho (ZANCANARO, 2008; COSTA et al., 2007). *C. chinense* compreende as variedades cabacinha, chora-menino, cumari-do-Pará, murupi, pimenta-de-bode, pimenta-de-cheiro, pimenta-de-biquinho e pimenta-de-cheiro-do-Norte (ZANCANARO, 2008; COSTA et al., 2007). Das

espécies domesticadas, apenas *C. pubescens* não é produzida no Brasil, sendo provavelmente a menos conhecida (COSTA et al., 2007).

O centro de diversidade da espécie *C. annuum* var. *annuum* é o México e a América Central; o de *C. frutescens*, inclui as terras baixas do sudeste brasileiro até a América Central e as Antilhas, no Caribe; *C. baccatum* var. *pendulum*, tem como centro de diversidade a Bolívia e o sudeste brasileiro e *C. chinense*, a mais brasileira das espécies domesticadas, a Bacia Amazônia (COSTA et al., 2007).

As plantas de *Capsicum* são arbustivas e apresentam diferentes tamanhos e formas de crescimento de acordo com a espécie e as condições de cultivo. O caule é resistente e o sistema radicular pivotante, com amplas ramificações laterais. As folhas apresentam tamanho, coloração, formato e pilosidade variáveis. As flores típicas são hermafroditas e bastante utilizadas na taxonomia das espécies. O fruto define-se como uma baga, de estrutura oca e forma lembrando uma cápsula, apresentando variadas formas, tamanhos, colorações e pungências. Este ardido é característica comum das pimentas, com algumas exceções, devido a presença do alcaloide capscicina na placenta do fruto. (FILGUEIRA, 2008; COSTA et al., 2007).

## **2.2 Importância Econômica do Gênero *Capsicum***

A partir do descobrimento das américas, as espécies de *Capsicum* se disseminaram pelo mundo, e atualmente são cultivadas tanto em países de clima tropical como temperado (COSTA et al., 2007). O cultivo comercial de pimentões e pimentas vem acendendo em importância econômica, no Brasil e em outros países, devido ao aumento do consumo *in natura* do pimentão e do processamento de molhos, temperos e conservas de pimentas. (AZEVEDO et al., 2006).

Segundo dados da FAO, a produção de pimentas e pimentões no mundo, atingiu o total de 31.131. 225, 56 toneladas em 2013. No ano de 2012, a Índia liderou o *ranking* dos países produtores de pimentas e pimentões secos no mundo, com um total arrecadado de U\$1.423.990 e uma produção de 1.299.940 MT, seguido pela China com um rendimento de U\$317.674, Peru com U\$191.699 e Bangladesh com U\$188.413 (FAO, 2015).

A produção de pimentas no Brasil está em torno de 22 mil toneladas por ano, variando em produtividade de 10 a 45 t/ha, em função da espécie plantada. A estimativa para a área cultivada é de 5 mil a 6 mil e 500 hectares, sendo os principais estados produtores Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (GENUNCIO; ZONTA; NASCIMENTO, 2015).

A produção brasileira de pimentão, produz cerca de 290 mil toneladas de frutos em uma área em torno de 13 mil hectares, sendo São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro os principais estados produtores (MAROUELLI e SILVA, 2012).

A utilização das pimentas tem sido devido sua versatilidade culinária, industrial, ornamental e também por suas propriedades medicinais (RIBEIRO et al., 2008), sendo indicadas no tratamento de doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas, doenças infecciosas e parasitárias, doenças da pele, do sistema osteomuscular e do sistema respiratório, entre outros (GIRALD; HANAZAKI, 2010; ROMAN et al., 2011). A riqueza nutricional destas plantas, como também a variedade de sabores e ardume, garantem sua aceitação na dieta humana, sendo utilizada na culinária no preparo de molhos, conservas, saladas, cozidos, ensopados, diversas carnes, entre outros (ZANCANARO, 2008). O valor nutricional dos frutos de *Capsicum* é garantido pela presença de metabolitos secundários como capsaicínoides, carotenóides, flavonóides, vitaminas, antocianinas e atividade antioxidante que são componentes fundamentais para uma boa saúde (CARVALHO et al., 2015; WAHYUNI, 2013).

Ainda podemos citar, o efeito de extratos de *C. annuum* (pimentão) na inibição do crescimento de *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, nas concentrações 1,5 ml/100 g de carne e 0.3 ml/100 g de carne, respectivamente. E o efeito bactericida sobre *P. aeruginosa* na concentração de 3 ml/100 g e sobre *S. typhimurium* de 1.5 ml/100 g (CAREAGA et al. (2003). Extratos de *C. annuum*, também apresentaram efeito na inibição do crescimento de diferentes espécies de bactérias, onde as espécies com maiores teores dos ácidos cinâmico e m-cumárico demonstraram maior capacidade inibitória (DORANTES et al., 2000).

### 2.3 Antracnose

A antracnose é conhecida há mais de 2000 anos, sendo considerada a doença mais antiga na fitopatologia, com registro nos achados dos povos gregos e latinos (Enciclopédia Agrícola Brasileira, 1995). Definida como:

Doença causada por fungos, principalmente por diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* [...]. Os sintomas são caracterizados por lesões circulares ou alongadas, de coloração pardo-escura, deprimidas na região central, geralmente apresentando massas rosadas que correspondem a estruturas do tipo conídios produzidos em acérvulos. [...] (Enciclopédia Agrícola Brasileira, 1995, p.209).

É considerada uma importante doença para diversas plantas cultivadas, sendo de ocorrência comum em solanáceas, como pimentão e pimenta (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006), podendo resultar em grandes prejuízos econômicos,

especialmente em regiões tropicais e subtropicais (REIS; BOITEUX; HENZ, 2009). Sob condições climáticas favoráveis, períodos de chuva associados a incidência de clima quente e úmido, os prejuízos podem levar a perdas de até 100% na produção de frutos (AZEVEDO et al., 2006). Associado ao fator ambiental, o grau de suscetibilidade da planta intensifica a severidade da doença (ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARÉK, 2012; COLATTO, 2010).

Os sintomas da doença em solanáceas podem ocorrer nas folhas e ramos, onde aparecem com menos frequência e em forma de pequenas lesões necróticas circulares, e nos frutos (REIS; BOITEUX; HENZ, 2009; AZEVEDO et al., 2006). São as lesões que ocorrem nos frutos que caracterizam a doença e provocam maiores prejuízos para a produção, tanto em campo como em pós-colheita (ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARÉK, 2012; AZEVEDO et al., 2006), aumentando os custos de produção com a necessidade de controle no campo e na pós-colheita (COLATTO, 2010).

A antracnose pode ocorrer tanto em frutos imaturos como maduros (ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARÉK, 2012), mas manifesta-se, frequentemente, no estágio de maturação avançada dos frutos e como métodos de controle torna-se necessário a aplicação de fungicidas antes dessa fase e o cuidado na hora da colheita e manuseio para evitar ferimentos (GALLI et al., 1980; TAVARES; SOUZA, 2005). Pois, conforme Cia (2005, p.16):

Durante o desenvolvimento dos frutos e após sua colheita, a resistência natural a doenças geralmente declina resultando nos inevitáveis processos de infecção e doença. Em frutos, as doenças pós-colheitas causadas por fungos usualmente são provenientes de infecções quiescentes, estabelecidas no campo, ou de infecções por ferimentos, originados durante subsequente colheita e manuseio. O declínio da resistência natural pode ativar infecções quiescentes e o aumento da incidência e/ou severidade da doença.

Dessa forma, se torna necessário desenvolver novas estratégias de controle para esta doença que causa grandes perdas na produção de hortaliças, tanto em campo com em pós-colheita.

A disseminação da doença ocorre por meio de irrigação e respingos de água, vento, animais, ferramentas e utensílios agrícolas que carregam os esporos que podem estar presentes no solo, em restos de cultura, em ramos secos, em plantas não cultivadas, em pecíolos e folhas velhas até o hospedeiro (ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARÉK, 2012; AZEVEDO et al., 2006; TAVARES; SOUZA, 2005; PUTZKE, J.; PUTZKE, M, 2002). As mudas, também, podem atuar como inoculo primário contribuindo para a introdução da doença em novas áreas, visto que é difícil a identificação de sintomas nesta fase (KOSOSKI et al., 2001). E ainda, sementes contaminadas podem igualmente transmitir a doença (ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARÉK, 2012).

## 2.4 Caracterização do Gênero *Colletotrichum* Corda (1831)

As várias espécies de fungo responsáveis por causar a doença antracnose pertencem ao gênero *Colletotrichum* (IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004; ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARREK, 2012) que possuem como teleomorfos as espécies de *Glomerella* (SUTTON, 1992), isso ocorre porque a maioria dos fungos apresentam duas formas de frutificação, como consequência um mesmo fungo pode apresentar dois nomes científicos.

Segundo a classificação do *Dictionary of the fungi* (2008), o gênero *Colletotrichum* pertence ao grupo dos fungos Anamórficos, classe Sordariomycetes, ordem Incertae sedis e família Glomerellaceae. O gênero *Colletotrichum* possui micélio septado, conídios hialinos e unicelulares, reprodução assexuada por meio dos conídios que são produzidos apicalmente em conidióforos do tipo acérvulos (PUTZKE, J.; PUTZKE, M., 2002) e apressórios que são estruturas de infecção que possibilitam a penetração do fungo no hospedeiro (MENEZES, 2006).

Os conídios são disseminadas por diversos agentes, e em presença de água forma os apressórios que dão início ao processo de infecção, penetrando no tecido do hospedeiro (TAVARES; SOUZA, 2005). Nesse processo, através de uma mucilagem hemicelulósica, o apressório adere à superfície do hospedeiro (MENEZES, 2006) e após a penetração ocorre a colonização, onde o fungo se distribui pelas células e os tecidos, retirando os nutrientes para sua alimentação (AMORIM. REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

A colonização ocorre por meio de enzimas e toxinas excretadas pelo micélio que degradam os componentes da parede celular, causando decomposição e promovendo o desenvolvimento de sintomas e das estruturas de reprodução do patógeno (AMORIM. REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). As espécies de *Colletotrichum* produzem

[...] enzimas pectolíticas e toxinas que promovem a desorganização a nível celular correspondente às lesões de aspecto encharcado que se desenvolvem com rapidez e, além de deprimidas apresentam massa cotonosa constituída de hifas e estruturas de frutificação (BEDENDO, 1995 apud ROZWALKA, 2003, p.12).

Conforme suas estratégias de nutrição, são classificados como patógenos hemibiotróficos, que iniciam a colonização como biotróficos, se alimentando das células vivas do hospedeiro, e depois de estabelecida as relações parasitárias estáveis passam para fase necrotrófica, obtendo os nutrientes de células mortas do hospedeiro (AMORIM. REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

O gênero *Colletotrichum* é apontado como um dos principais patógenos causadores de doenças em plantas e ataca uma vasta gama de hospedeiros de importância econômica como cereais, gramíneas, hortaliças, legumes e frutas (IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004; ROBERTS; PERNEZNY; KUCHARREK, 2012). Dentre as culturas de interesse econômico, podemos citar: algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (ROCA et al., 2004), café (*Coffea arabica* L.) (LINS; ALVES; ABREU, 2007; SILVA et al., 2012), cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (CARNEIRO et al., 2012), cítricos (*Citrus* spp. L.) (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007), mamão (*Carica papaya* L.) (CIA, 2005), milho (*Zea mays* L.) (COSTA et al., 2010), pupunheira (*Bactris speciosa* (Mart.) H. Karst.) (VIDA et al., 2006), jiló, pimentão e pimenta (*Capsicum frutescens* L.) (BONETT et al., 2010), sendo possível observar que um hospedeiro pode ser infectado por diferentes espécies e que uma mesma espécie pode infectar vários hospedeiros.

A espécie *C. gloeosporioides* tem se destacado, pois é muito conhecida e amplamente distribuída na natureza, possuindo mais de 600 sinonímias e sendo indicada como anamorfo de *Glomerella cingulata* (MENEZES, 2006). Segundo Phoulivong et al. (2010) a *C. gloeosporioides* tem infectado pelo menos 1000 espécies de planta.

Em *Capsicum* spp., a espécie *C. gloeosporioides* tem sido relatada em vários países como agente causal da doença antracnose (RAMDIAL; RAMPERSAD, 2015; THAN et al., 2008; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; OH et al., 1998; McGOVERN; POLSTON, 1995; HADDEN; BLACK, 1989; JOHNSTON; JONES, 1997). Mas, outras espécies também tem sido descritas em diferentes regiões do mundo, como: *Glomerella cingulata*, *C. capsici*, no Reino Unido (ADIKARAM; BROWN; SWINBURNE, 1983); *C. coccodes*, *C. musae*, *C. orbiculare*, *G. miyabeana* e *C. acutatum* em Nova Zelândia (JOHNSTON; JONES, 1997); *C. truncatum*, em Trinidad (RAMDIAL; RAMPERSAD, 2015); *C. acutatum*, *C. capsici* na Tailândia (THAN et al., 2008); *C. acutatum*, *C. coccodes* e *C. capsici* nos Estados Unidos (IVEY; NAVA-DIAZ; MILLER, 2004, HADDEN; BLACK, 1989; McGOVERN, 1995; ROY; KILLEBREW; RATNAYAKE, 1997). No Brasil, foram identificadas as espécies *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. capsici* e *C. boninense* (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; TOZZE JÚNIOR et al., 2007; TOZZE JÚNIOR et al., 2009). Mais recentemente a espécie *C. scovillei* foi relatada no Brasil, Japão e na Tailândia (CAIRES et al., 2014; KANTOS et al., 2014; DAMM et al., 2012).

Para a identificação e taxonomia do gênero *Colletotrichum* têm sido consideradas as características moleculares em conjunto com as características morfológicas, culturais e fisiológicas (SCHENA et al., 2014; DAMM et al., 2013; LIMA et al., 2013; WEIR;

JOHNSTON; DAMM, 2012; BONETT et al. 2010; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; ANDRADE et al., 2007). A região ITS do 5.8S rDNA tem sido amplamente sequenciada em estudos de identificação molecular das espécies do gênero *Colletotrichum* (MILLS et al., 1992). A epitipificação para *C. gloeosporioides* com base nas sequências de ITS, por exemplo, possibilitou um grande avanço no entendimento deste gênero (CANNON; BUDDIE; BRIDGE, 2008). No entanto, já são conhecidas as limitações da região ITS para identificação de algumas espécies, e o desenvolvimento de genes mais informativos tornou-se cada vez mais necessário (SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2013; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; SILVA et al., 2011).

Os genes GAPDH, CAL, ACT, CHS (sintetase de quitina), EF1 $\alpha$  (fator de alongação 1 $\alpha$ ) e a região ITS foram sequenciados de isolados de *C. gloeosporioides sensu lato* e avaliados quanto a capacidade em separar os grupos. Os genes GAPDH, CAL e ACT foram indicados como bons candidatos para barcode nesta espécie (CAI et al., 2009).

O gene GAPDH tem sido utilizado em muitos trabalhos como medida inicial de diversidade de espécie do gênero *Colletotrichum* (LIMA et al., 2013; COSTA, 2014) e tem sido indicado como barcode secundário na identificação de espécies, visto que sua combinação com outros genes pode ser utilizado para distinguir de forma confiável a maioria dos táxons (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Através da análise multilocus (CHS-1, ACT, TUB2 e ITS) as espécies deste gênero foram separadas em nove principais complexos: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum*, *C. graminicola*, *C. spaethianum*, *C. destructivum*, *C. dematium*, *C. truncatum*, *C. orbiculare* (CANNON et al., 2012) e posteriormente, o complexo *C. brevisporum* foi adicionado (NOIREUNG et al., 2012). Estes complexos são estabelecidos com base na análise filogenética, onde clados distintos são formados com espécies geneticamente próximas entre si, ou seja, cada clado corresponde a um complexo.

A partir do conceito de complexos dentro do gênero *Colletotrichum* vários trabalhos foram desenvolvidos, como as revisões dos complexos *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum*, *C. destructivum*, com base em análise multilocus utilizando os genes GAPDH, ACT, CHS-1, TUB2, CAL, HIS3, GS, superóxido-dismutase de manganês (SOD) e a região ITS (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM et al.; 2012a; DAMM et al. 2012b; DAMM et al., 2014; CANNON et al., 2012). As ferramentas moleculares em conjunto com os métodos clássicos de taxonomia, tem possibilitado a identificação de novas espécies. As espécies *C. tropicale* e *C. fruticola* foram relatadas recentemente na cultura da manga (*Mangifera indica*

L.), e também uma nova espécie, *C. dianasii*, foi identificada no nordeste do Brasil (LIMA et al., 2013).

Estudos de identificação de espécies de *Colletotrichum* são importantes para o desenvolvimentos de melhores estratégias de controle, pois diferentes espécies podem infectar um mesmo hospedeiro (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; CANNON et al., 2012; PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012) e apresentarem diferentes níveis de sensibilidade a fungicidas (LIMA et al., 2013; COSTA, 2014).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado de maio de 2014 a julho de 2015 no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) localizado no km 85 da BR 104 Norte (9°27'54.71"S – 35°49'39.27"O), no Município de Rio Largo-Al.

#### **3.1 Obtenção dos Isolados**

Foram coletadas pimentas e pimentões apresentando sintomas de antracnose de plantios comerciais, em municípios dos estados de Alagoas, Sergipe e Pernambuco (Tabela 1). Após a coleta, os frutos foram levados ao laboratório, lavados, secos com papel toalha e identificados. Quatro fragmentos, de cada fruto, foram retiradas da região de transição entre o tecido doente e sadio. Em seguida, procedeu-se a desinfecção superficial em cabine de fluxo laminar, na seguinte sequência: álcool a 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 1% (1 minuto). Posteriormente, os fragmentos foram lavados duas vezes em água destilada esterilizada (ADE). Utilizou-se papel de filtro esterilizado para retirar a umidade e, então, os mesmos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) solidificado. As placas contendo os tecidos foram mantidas na temperatura ambiente, em torno de 25°C, durante três dias. Observado o crescimento do patógeno, foram retirados discos (5 mm) das bordas das colônias e posteriormente, estes foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As culturas dos isolados foram mantidas na temperatura ambiente por aproximadamente sete dias, ou até o surgimento das estruturas de reprodução do patógeno.

#### **3.2 Cultura Monospórica**

Observada a presença de esporos nos isolados realizou-se a metodologia para obtenção de cultura monospórica, garantindo a pureza genética necessária à realização dos estudos de caracterização cultural, morfológica e molecular. Inicialmente, preparou-se uma suspensão de esporos com 1mL de água destilada esterilizada (ADE). A suspensão de esporos foi obtida através de uma raspagem superficial sobre a colônia com o auxílio de uma alça de alumínio previamente esterilizada na chama e resfriada. Em seguida, com auxílio de uma pipeta contendo 200 µL de ADE, foi realizada uma diluição seriada em 10<sup>-6</sup>. Então, 200 µL desta suspensão

foram colocados em uma placa de Petri contendo BDA e espalhada uniformemente com auxílio de uma alça de Drigalski, previamente esterilizada na chama e resfriada, com duas repetições por isolado. As placas de Petri contendo os esporos foram mantidas à temperatura de 25°C. Decorridos dois dias, discos de BDA (5mm) contendo um único esporo germinado foram transferidos para placas de Petri com meio BDA.

Tabela 1 – Descrição dos isolados usados para identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose em *Capsicum* spp.

Hospedeiro	Código do Isolado	Local de Coleta	Ano da Coleta
Pimentão	P1	Maceió (AL)	2014
Pimentão	P5	Arapiraca (AL)	2014
Pimenta	Pi5	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi6	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi8	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi9	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi10	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi11	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi12	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi13	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi14b	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi15a	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi16	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi17	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi18	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi19	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi20	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi21	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi22	São Sebastião (AL)	2015
Pimenta	Pi23	São Sebastião (AL)	2015
Pimenta	Pi24	São Sebastião (AL)	2015
Pimenta	Pi25	São Sebastião (AL)	2015
Pimenta	Pi26	São Sebastião (AL)	2015
Pimenta	Pi27	São Sebastião (AL)	2015
Pimenta	Pi28	São Sebastião (AL)	2015
Pimenta	Pi30	São Sebastião (AL)	2015
Pimentão	P2	Cannindé do São Francisco (SE)	2015
Pimentão	P3.1	Cannindé do São Francisco (SE)	2015
Pimentão	P3.2	Cannindé do São Francisco (SE)	2015
Pimentão	P4.1	Cannindé do São Francisco (SE)	2015
Pimentão	P4.2	Cannindé do São Francisco (SE)	2015
Pimenta	Pi1	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi31	Cannindé do São Francisco (SE)	2015
Pimentão	P6	Camucin de São Felix (PE)	2014
Pimenta	Pi32	Arapiraca (AL)	2014
Pimenta	Pi33	Arapiraca (AL)	2014
Pimenta	Pi2	Coruripe (AL)	2014
Pimenta	Pi4	Coruripe (AL)	2014

### 3.3 Preservação dos Isolados

Para preservação dos isolados provenientes da cultura monospórica foram utilizados três métodos. Os isolados foram preservados em água, através do método de Castellani (1967); em tubos de ensaio contendo meio BDA, onde o disco de micélio foi depositado sobre a superfície do meio de cultura e mantidos em temperatura ambiente (28°C), e em tubos eppendorf (2,0 mL). Após sete dias de crescimento da colônia, discos de micélio foram transferidos para os tubos e mantidos a 4°C.

### 3.4 Teste de Patogenicidade

Pimentas e pimentões sadios foram desinfestados com solução de hipoclorito a 1% por dois minutos, lavados em água destilada (AD) e secos com papel toalha. O inóculo constituiu-se de uma gota de 10µL de suspensão de esporos com concentração de 10<sup>5</sup> conídios/mL, depositadas equidistantes uma das outras sobre a superfície dos frutos sadios, com duas repetições para cada tratamento (com ferimento/sem ferimento). Os ferimentos foram feitos com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada na chama. A testemunha, com e sem ferimento, foi composta apenas por ADE. Os frutos foram colocados, separadamente, em um saco de polietileno contendo um algodão embebido em ADE ou em caixas gerbox com uma folha de papel filtro esterilizada umedecida com ADE para não permitir a desidratação do fruto e favorecer a germinação das estruturas de reprodução do patógeno. Para evitar o contato direto com a superfície úmida foram utilizados tampas e fundos de placas de Petri esterilizadas. Os experimentos foram mantidos em estufa incubadora BOD a 25°C ± 1°C e foto-período de 12 horas por sete dias.

### 3.5 Caracterização Molecular

#### 3.5.1 Extração de DNA

Para obtenção da massa micelial dos isolados de *Colletotrichum* usados na extração de DNA, três discos de BDA (5mm) contendo o patógeno foram cultivados em frascos de Erlenmeyer (50mL) contendo 30 mL do meio Sacarose-Extrato de levedura-Asparagina (sacarose 10 g, L-asparagina 2 g, extrato de levedura 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g,

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,44 mg, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,48 mg, e MnC<sub>12</sub>.H<sub>2</sub>O 0,36 mg) (ZAUZA et al., 2007), incubadas por 7 dias, sob temperatura de 25±1°C, sem agitação, e fotoperíodo de 12 horas.

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Doyle; Doyle (1987), onde os micélios dos isolados foram macerados com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo.

Após maceração, o micélio foi transferido para tubos de micro centrífuga com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 4% (CTAB 4%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 4 µL de β-mercaptoetanol (0,1% v/v), e depois, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 600µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) e 40 µL de CTAB 10% aquecido a 65°C. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi acrescentando 400µL de etanol absoluto.

O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendido com 40 µL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) + RNase (10µg/mL). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio a 5% e observado sob luz UV. O material foi armazenado sob temperatura de -20°C.

### 3.5.2 Amplificação e sequenciamento do DNA

Os isolados obtidos foram amplificados com o gene que codifica para a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), para uma identificação prévia das espécies de *Colletotrichum*. Posteriormente, as espécies encontradas foram amplificadas com o gene β-tubulina (TUB2) e a região ITS-rDNA para confirmação das espécies identificadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos *primers* usados para identificação de espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*.

Gene	Primer	Sequencia (5' - 3')	Referências
GAPDH	GDR	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Guerber et al., 2003
	GDF	GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT	
TUB2	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O' Donnel; Cigelnik, 1997
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

As reações de PCR foram realizadas com tampão 10X, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DNTP's 10 mM, 10 µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1µL de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 30µL com água Milli-Q autoclavada. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler)* nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 4 min (desnaturação inicial); 35 ciclos a 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento), e 72°C por 1 min (extensão); e um ciclo final à 72°C por 7 min, para o gene GAPDH. Para o gene TUB2, a desnaturação inicial consistiu em de 95°C por 4 min e 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e um ciclo final de 7 min por 72°C. E para a região ITS, a desnaturação inicial foi de 95°C por 2 min e 38 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e um ciclo final de 10 min por 72°C. Em seguida, o produto de PCR foi enviado para purificação e sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados na amplificação.

### 3.5.3 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos foram montadas com o software *Codon Code Aligner v. 4.1.1* ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)) (*Codon Code Corporation*, Dedham, Massachusetts, USA), e analisadas visualmente. O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Sequências parciais obtidas para o gene GAPDH foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)), e também comparadas com sequências no banco de dados Q-Bank *Fungi* para determinar as espécies fúngicas com as quais elas compartilharam maior identidade de sequência.

Para identificação preliminar dos isolados, foi construída uma árvore filogenética bayesiana com as sequências parciais do gene GAPDH. Para posicionamento taxonômico definitivo, um subgrupo de isolados foi escolhido para obtenção de sequências adicionais com os genes TUB2 e ITS. Foram então obtidas filogenias para os dados concatenados das sequências parciais dos genes GAPDH, TUB2 e ITS do subgrupo dos isolados obtidos neste trabalho e sequências disponíveis no GenBank (Tabela 3).

Tabela 3 - Isolados incluídos nas análises de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank.

Espécies	Nº acesso da cultura	Nº de acesso do GenBank		
		ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. aenigma</i>	C1256	JX010243	JX009913	JX010390
<i>C. aeschynomenes</i> *	3-1-3	JX010176	JX009930	JX010392
<i>C. alatae</i> *	C1275	JX010190	JX009990	JX010383
	C1276	JX010191	JX010011	JX010449
<i>C. alienum</i> *	C824	JX010251	JX010028	JX010411
	C1189	JX010217	JX010018	JX010385
<i>C. asianum</i> *	C1315	JX010406	JX010053	JX010406
	C1187	JX010192	JX009915	JX010384
<i>C. boninense</i> *	CBS 123755	JQ005153	JQ005240	JQ005588
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126518	-	AFO60561	AFO61882
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126519	-	AFO60562	AFO61883
<i>C. dianesei</i> *	CMM4083	KC329779	KC517194	KC517254
<i>C. endophytica</i>	DNCL075	KF242123	KF242181	KF254857
<i>C. grevilleae</i>	CBS 132879	KC 297078	KC297102	KC297010
<i>C. gossypii</i>	CML 2379	JX844082	JX847010	JX844108
<i>C. gossypii</i>	CML 2374	JX844077	JX8470091	JX844104
<i>C. guajavae</i>	IMI 350839	-	AFO60560	AFO61881
<i>C. hymenocallidis</i>	CSSN 3	GQ485601	GQ856759	GQ849439
<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551	NR 111744	JQ948618	JQ949939
<i>C. jasmini-sambac</i>	CLTA-01	HM131515	HM131501	HM153772
	LLTA-01	HM131511	HM131497	HM153768
<i>C. kahawae</i> *	C1266	JX010231	JX010012	JX010444
	C1275	JX010238	JX010042	JX010432
<i>C. laticiphilum</i>	CBS 112989	NR111745	JQ948619	JQ949940
	CBS129827	JQ948290	JQ948620	JQ949941
<i>C. murrayae</i> *	GZAAS5.09506	JQ247632	JQ247609	JQ247644
	GZAAS5.09538	JQ247633	JQ247608	JQ247645
<i>C. musae</i> *	CBS116870	JX010146	JX010050	HQ596280
	C1266.11	JX010142	JX010015	JX010395
<i>C. nupharicola</i> *	C1275.24	JX010187	JX009972	JX010398
	C1275.25	JX010189	JX009936	JX010397
<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753	NR111742	JQ948615	JQ949936
<i>C. proteae</i> *	CBS 132882	KC297079	KC297009	KC297101
	CBS 134301	KC842385	KC842379	KC842387
<i>C. queenslandicum</i> *	ICMP 1778	JX010276	JX009934	JX010414
	C956	JX010185	JX010036	JX010412
<i>C. salsolae</i> *	C1314	JX010242	JX009916	JX010403
<i>C. scovillei</i>	CBS 126529	-	AFO60559	AFO61880
	CBS 120708	-	AFO60557	AFO61878
<i>C. sloanei</i>	IMI364297	NR111743	JQ948617	JQ949938
<i>C. simmondsii</i>	CBS 122122	NR111741	JQ948606	JQ949927
<i>C. simmondsii</i>	CBS 29467	FJ972610	FJ972581	FJ907444

Tabela 3 - Isolados incluídos nas análises de sequências multi-gene, com detalhes de espécies, número de acesso das culturas e números de acessos do GenBank (Conclusão).

<i>C. siamense</i> *	C1315	JX010171	JX009924	JX010404
	C1316	JX010294	JX010006	JX010447
<i>C. theobromicola</i> *	C1275	JX010286	JX010024	JX010373
	C1270	JX010289	JX009962	JX010380
<i>C. tropicale</i> *	C5101	JX010264	JX010007	JX010407
	C1272	JX010275	JX010020	JX010396
<i>C. viniferum</i> *	YG4	JN412804	JN412798	JN412813
	GG4	JN412802	JN412800	JN412811
<i>C. walleni</i>	CBS 125472	-	AFO60565	AFO61886

\* Espécie tipo. TUB-2:  $\beta$ -tubulin; GAPDH: *glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*; ITS: *partial rDNA-ITS region*.

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para os conjuntos de dados GAPDH e dados concatenados (GAPDH, TUB2 e ITS) utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2013). A análise de Inferência Bayesiana (BI) para os conjuntos de dados GAPDH e dados concatenados dos complexos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foi realizada, separadamente, empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), no web portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012).

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para os dados de cada região genômica usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações, para cada conjunto de dados. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise, como uma fase de *burn-in*. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA, YANG, 1996) foram determinados a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. A convergência dos logs de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (beast.bio.ed.ac.uk/Tracer). As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

### 3.6 Estudos Morfológicos das Espécies de *Colletotrichum*

Baseados nas espécies fúngicas identificadas nas análises filogenéticas, isolados foram selecionados e utilizados para caracterização das colônias e morfologia dos conídios.

Para caracterização cultural, discos de BDA (5mm) contendo o micélio de cada isolado foram retirados da borda da colônia cultivada por sete dias. Estes foram transferidos, individualmente, para o centro de placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA sintético. Os tratamentos foram mantidos em incubadora BOD a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, dispostas em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial das colônias (cm) em duas direções diametricamente opostas no fundo externo das placas, com auxílio de uma régua milimétrica, durante sete dias. Também foram observadas a coloração das colônias e o aspecto do micélio aéreo.

A caracterização morfológica baseou-se no tamanho e forma de 50 conídios e apressórios de cada espécie, escolhidos aleatoriamente, provenientes das estruturas do patógeno crescidos em meio BDA por sete a 14 dias. Para mensuração dos esporos, foram preparadas lâminas, onde foi depositada uma gota (40  $\mu\text{L}$ ) do corante azul de metileno juntamente com os conídios e observadas em microscópico óptico.

A formação de apressórios foi realizada utilizando duas metodologias. Na primeira, foi utilizada uma gota de suspensão de esporos depositada sobre uma lâmina de vidro estéril acondicionada em placa de Petri forrada com papel filtro estéril umedecido com ADE, para manter o ambiente úmido e permitir a germinação dos conídios. E na segunda, foi realizada a microcultura. Após 48 horas, as imagens dos apressórios foram capturados. Para a mensuração de comprimento e largura, considerou-se como comprimento, a distância entre o septo existente entre o apressório e o tubo germinativo e a extremidade mais distante do mesmo. A largura foi mensurada em sentido perpendicular ao considerado para o comprimento (SUSSEL, 2005).

As medidas de comprimento e largura dos conídios e apressórios foram obtidos através de imagens capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada ao microscópio óptico com aumento de 400x, projetada em monitor de computador, através do *software Cellsenses Standard* (SAMSUNG SDC-415®). Foram calculados as médias dos conídios e apressórios.

Análises de variância (ANOVA) foram conduzidas para determinar as diferenças de significância nas dimensões dos conídios, apressórios e taxas de crescimento com espécies de *Colletotrichum*, e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey em nível de 5% de

probabilidade, utilizando o utilizando o programa ASSISTAT 7.6 beta desenvolvido por Santos e Silva (2013).

### **3.7 Patogenicidade de Espécies de *Colletotrichum* em Diferentes Hospedeiros**

A patogenicidade de quatro espécies de *Colletotrichum*, isoladas de pimentas e pimentões, com sintomas de antracnose, foi avaliada em diferentes hospedeiros, constituída por frutos comerciais de pimenta Dedo-de-moça, pimentão verde, tomate e jiló. Os frutos foram lavados com detergente em água corrente, desinfestados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por 3 minutos e lavados com ADE. Após a secagem, a epiderme de cada fruta foi perfurada em um ponto na região mediana, à profundidade de 3 mm, com auxílio de agulha esterilizada. O inóculo constituiu-se de uma gota de 10 $\mu$ L de suspensão de esporos com concentração de 10<sup>5</sup> conídios/mL, depositadas sobre o ferimento na superfície de cada fruto. A testemunha foi composta apenas por ADE.

Os frutos foram colocados em gerbox forrados com papéis filtro esterilizados umedecidos com ADE e cobertos com saco plástico, para manter a umidade relativa do ar elevada. Os gerbox foram incubados a 25°C, no escuro. Após 48h, foi retirada a câmara úmida, e os frutos foram mantidos na mesma temperatura. O fungo foi inoculado nos hospedeiros separadamente e para cada hospedeiro o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por espécie e um fruto por repetição. A patogenicidade foi avaliada aos sete dias após a inoculação pela medição do diâmetro da lesão (cm) em duas direções perpendiculares e calculado a média do diâmetro da lesão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT 7.6 beta desenvolvido por Santos e Silva (2013).

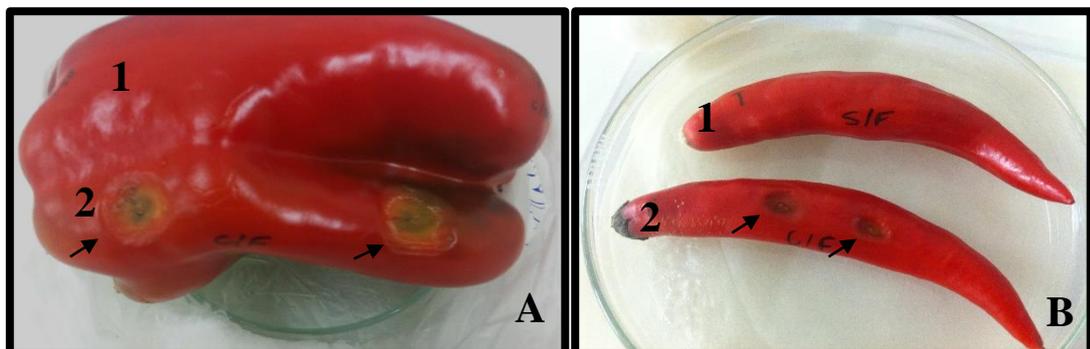
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teste de Patogenicidade

Foram obtidos 38 isolados pertencentes ao gênero *Colletotrichum* de pimentões e pimentas coletados nos estados de Alagoas, Pernambuco e Sergipe. Todos os isolados apresentaram patogenicidade quando inoculados em frutos sadios de pimentas e/ou pimentões com ferimento (Figura 1). Entretanto, quando inoculados em frutos sem ferimento, estes isolados não foram patogênicos. Os frutos com ferimento apresentaram sintomas típicos de antracnose.

As diferenças observadas em frutos com e sem ferimentos estão relacionadas à vulnerabilidade causada pelos ferimentos que facilitam a ação de fungos (KANTO et al., 2014), sendo importante no processo de penetração e infecção de algumas espécies de *Colletotrichum* (BAILEY et al., 1992). Além disso, diferentes estágios de maturação dos frutos influenciam na suscetibilidade a patógenos, pois no processo de maturação e após a colheita, a resistência natural dos frutos declina (CIA, 2005). Neste caso, os estágio de maturação em que se encontravam os frutos não influenciou na infecção do patógeno, pois este não foi capaz de iniciar o processo de infecção nos frutos sem ferimento, provavelmente, esta resistência dos frutos sem ferimento pode ter ocorrido devido os resíduos de agrotóxicos utilizados para controlar a ação de patógenos na pós-colheita.

Figura 1 – Teste de patogenicidade: pimentão inoculado com o isolado P1, sem ferimento (1) e com ferimento (2) (A); e pimentas Dedo de moça, sem ferimento (1) e com ferimento (2), inoculados com o isolado Pi18 (B).

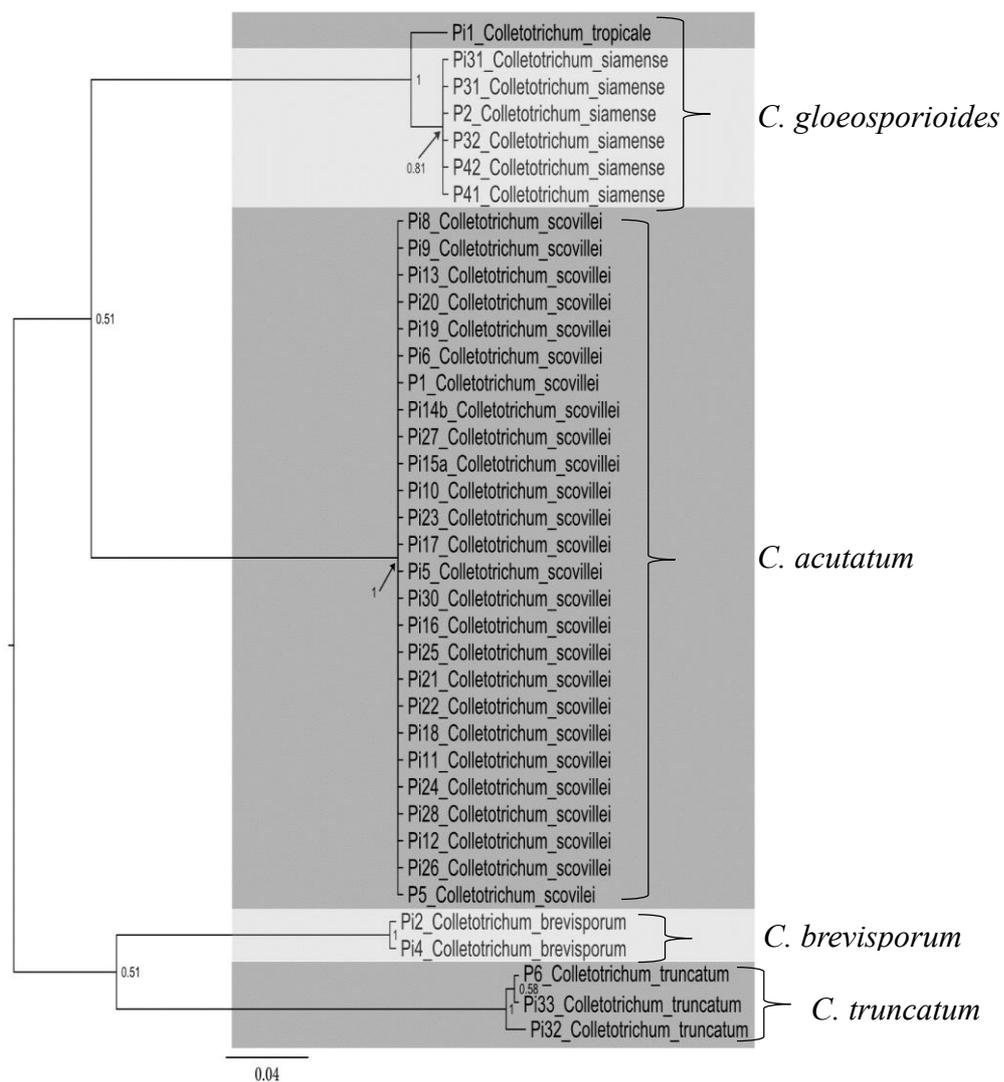


Fonte: SILVA, J. R. A.; PAIXÃO, T.; SILVA, A. R. G. da, 2015.

## 4.2 Caracterização Molecular

A análise molecular do gene GAPDH dos 38 isolados, permitiu a identificação de cinco espécies de *Colletotrichum* pertencentes a quatro complexos: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. truncatum* e *C. brevisporum* (Figura 2).

Figura 2 – Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com os isolados de *Colletotrichum* pertencentes a quatro complexos, usando o gene GAPDH.

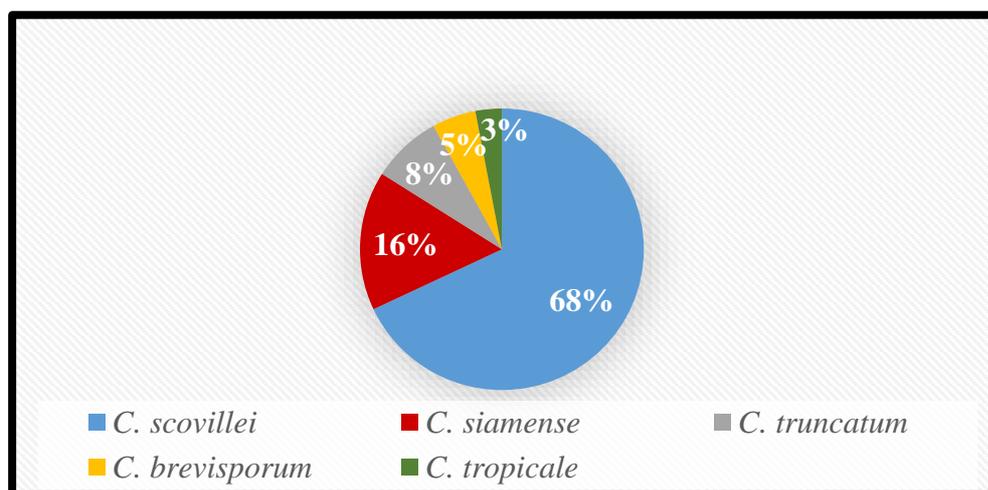


Fonte: SILVA, J. R. A., 2015.

Os espécies identificadas foram: *C. scovillei* (26/38) Damm, *C. tropicale* (1/38) E.I. Rojas, S.A. Rehner & Samuels, *C. siamense* (6/38) Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, *C. truncatum* (3/38) (Schw.) Andrus & Moore e *C. brevisporum* (2/38) S. Phoulivong, P.

Noireung, L. Cai & K.D. Hyde. As espécies apresentaram diferentes porcentagens de ocorrência (Figura 3).

Figura 3 - Porcentagem de ocorrência das espécies de *Colletotrichum* identificadas neste trabalho.



Fonte: SILVA, J. R. A., 2015.

A espécie *C. scovillei* foi obtido a partir do isolamento em pimentas, coletadas em áreas de plantio dos municípios de Coruripe-AL e São Sebastião-AL e de pimentões das áreas de plantio dos municípios de Arapiraca-AL e Maceió-AL. Estes isolados representam o maior clado da árvore filogenética, representado por 68% de ocorrência, sendo a espécie predominante no estado de Alagoas, nestas culturas.

Essa espécie foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 2014, associada a frutos de *C. annum* coletados no estado de Minas Gerais (CAIRES et al., 2014) e no mundo, foi identificada na Tailândia e no Japão (DAMM et al., 2012b; KANTO et al., 2014). Existem trabalhos que apontaram que espécies do complexo *C. acutatum*, isolados de pimentas e pimentões, identificadas como *C. acutatum*, foram recentemente reclassificados como *C. scovillei* (DAMM et al, 2012b). No Brasil, este foi o primeiro relato de *C. scovillei* associado ao cultivo de pimenta (*C. frutescens* L.).

Do complexo *C. gloeosporioides*, duas espécies, *C. siamense* e *C. tropicale*, foram identificadas. A primeira foi oriunda do plantio de Cannindé do São Francisco-SE, com 16% de ocorrência, e a segunda, *C. tropicale*, de Coruripe –AL, com 3% de ocorrência.

Deste complexo, *C. siamense* já foi relatada associada a pimenta na Índia, Laos e Tailândia (SHARMA; SHENOY, 2014; PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012). Além de outros hospedeiros, como: Pitaia (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) na Tailândia; cebola (*Allium cepa* L.) no sudoeste da Índia; jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam), nêspera

(*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl), figueira (*Ficus carica* L.), hortelã (*Mentha* sp. L.), pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e cacau (*Theobroma cacao* L.) na Austrália; café, na Tailândia e pêssego (*Prunus persica* (L.) Batsch), em Carolina do Sul (MEETUM; LEKSOMBOON; KANJANAMANEESATHIAN, 2014; CHOWDAPPA; CHETHANA; PAVANI, 2015; JAMES et al., 2014; PRIHASTUTI et al., 2009; HU; GRABKE; SCHNABEL, 2015). No Brasil, é descrita em goiaba (*Psidium guajava* L.), manga, abacate (*Persia americana* Mill), pêssego, maçã (*Malus domestica* (Borkh.) Borkh), caju (*Anacardium occidentale* L.) (BRAGANÇA, 2013), pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.) (COSTA, 2014).

A outra espécie do complexo *C. gloeosporioides*, *C. tropicale*, já foi associada a manga, pinha e graviola, no Brasil (LIMA et al., 2013; COSTA, 2014); cacau e graviola, no Panamá (ROJAS et al., 2010; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012); lichia (*Litchi chinensis* Sonn), no Japão (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) e gramínea (*Terpsichore taxifolia* L.), em Porto Rico (DOYLE et al., 2013).

Estas duas espécies tem sido associadas a cultura do pimentão em estudos de infecção cruzada, com isolados obtidos de orquídeas (*C. siamense*) na China (YANG et al., 2011) e de manga (*C. tropicale*) no Brasil (LIMA et al., 2013).

Do complexo *C. truncatum*, foram identificados três isolados como pertencentes a espécie *C. truncatum*, representando 8% de ocorrência, sendo um isolado de pimentão, coletado no estado de Pernambuco, e dois isolados de pimenta, coletados do estado de Alagoas. Essa espécie foi descrita em *Capsicum* spp., na Tailândia (RAMDIAL; RAMPERSAD, 2015), na Austrália (RANATHUNGE, et al 2012) e em Trinidad (MAHARAJ; RAMPERSAD, 2011). No Brasil, sua ocorrência tem sido registrada em soja (*Glycine max* (L.) Merr.), sendo considerada o agente causal da antracnose nessa cultura (ROGERIO, 2015) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) (CAVALCANTE et al., 2012). Também tem ocorrido em outros hospedeiros como lentilha (*Lens culinaris* Medik.) no Canadá (FORD et al., 2004), pega-pega (*Desmodium tortuosum* (Sw.) DC) nos EUA (CARDINA; LITRELL; HANLIN, 1988) e espécies da família Amaryllidaceae (YANG et al., 2009).

Além disso, a espécie *C. capsici*, sinonímia da *C. truncatum* (DAMM et al., 2009) foi relatada no Reino Unido (ADIKARAM; BRON; SWINBURNE, 1983), EUA (HADDEN; BLACK, 1989; ROY; KILLEBREW; RATNAYAKE, 1997) e Tailândia (THAN et al., 2008) em *Capsicum* spp.

Do complexo *C. brevisporum* foram identificados dois isolados provenientes de Coruripe-AL, com 5% de ocorrência. Essa espécie foi recentemente descrita por Noireung et

al. (2012) na Tailândia, sendo considerada uma nova espécie dentro do gênero *Colletotrichum*, estando no clado próximo a *C. cliviae* Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. dracaenophilum* D.F. Farr & M.E. Palm e *C. yunnanense* Xiao Ying Liu & W.P. Wu, dando origem a um novo complexo. A ocorrência desta espécie tem sido relatada na Índia (SHARMA; PINNAKA; SHENOY, 2013), na Coreia, em vinha matrimônio (*Lycium chinense* Mill) (PAUL et al., 2014) e no Brasil, em mamoeiro (VIEIRA; NASCIMENTO; MICHEREFF, 2013). Esta foi a primeira vez que *C. brevisporum* foi relatada em *C. frutescens*.

A concatenação dos genes GAPDH, TUB2, e região ITS dos isolados representantes dos complexos *C. gloeosporioides* (Figura 4) e *C. acutatum* (Figura 5), confirmaram a análise preliminar (com o gene GAHPD), ou seja, que os isolados identificados nestes complexos são *C. tropicale* e *C. scovillei*, respectivamente.

O alinhamento concatenado, com os genes GAPDH, TUB2 e região ITS, para o complexo *C. acutatum* apresentou 1315 caracteres, nos quais 62 são sítios informativos parcimônia e 1062 sítios conservados. Os limites do locus nos alinhamentos foram: TUB2: 1-506, GAPDH: 507-771 e ITS: 772-1315. Para o complexo *C. gloeosporioides*, o alinhamento obteve 1390 caracteres, nos quais 363 são sítios informativos parcimônia e 859 sítios conservados. Os limites do locus nos alinhamentos foram: GAPDH: 705-1008, ITS: 1009-1390, TUB2: 1-704. O modelo de substituição selecionado para os genes baseado no *Akaike Information Criterion* (AIC) está descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Modelo de substituição selecionado para os genes através do programa MrModeltest 2.3.

<b>Gene</b>	<b>Complexo <i>C. gloeosporioides</i></b>	<b>Complexo <i>C. acutatum</i></b>
GAPDH	HKY+G	HKY
ITS	SYM+I	K80+I
TUB2	GTR+G	GTR+G

HKY- Hasegawa, Kishino e yano; SYM - Symmetrical Model; GTR - General time reversible; K80 - Kimura 2-parâmetros; G - Distribuição gama; I - Proporção de sítios invariáveis.

Figura 4 – Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com um isolado de *Colletotrichum* do complexo *C. gloeosporioides*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS. *Colletotrichum boninense* foi usado como outgroup.

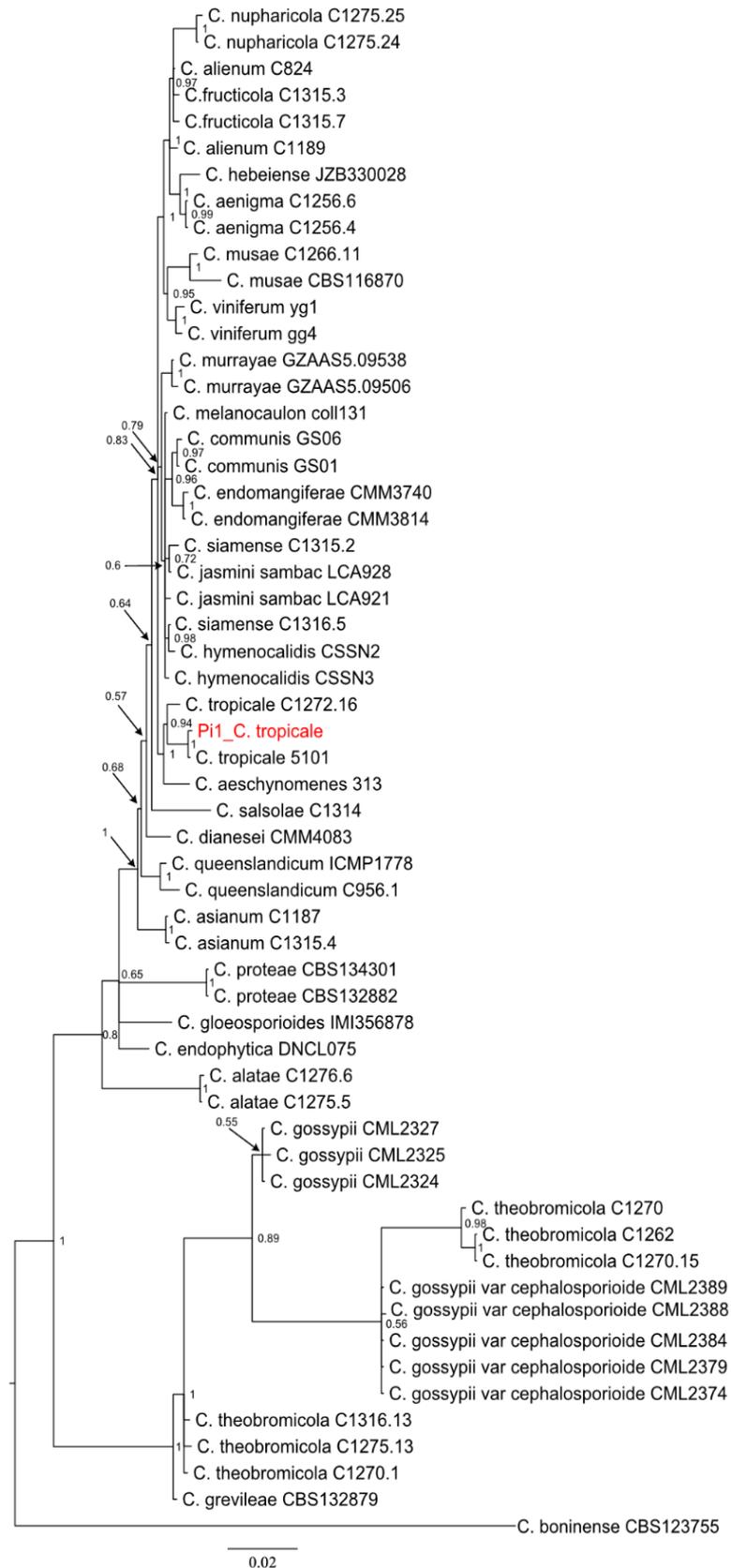
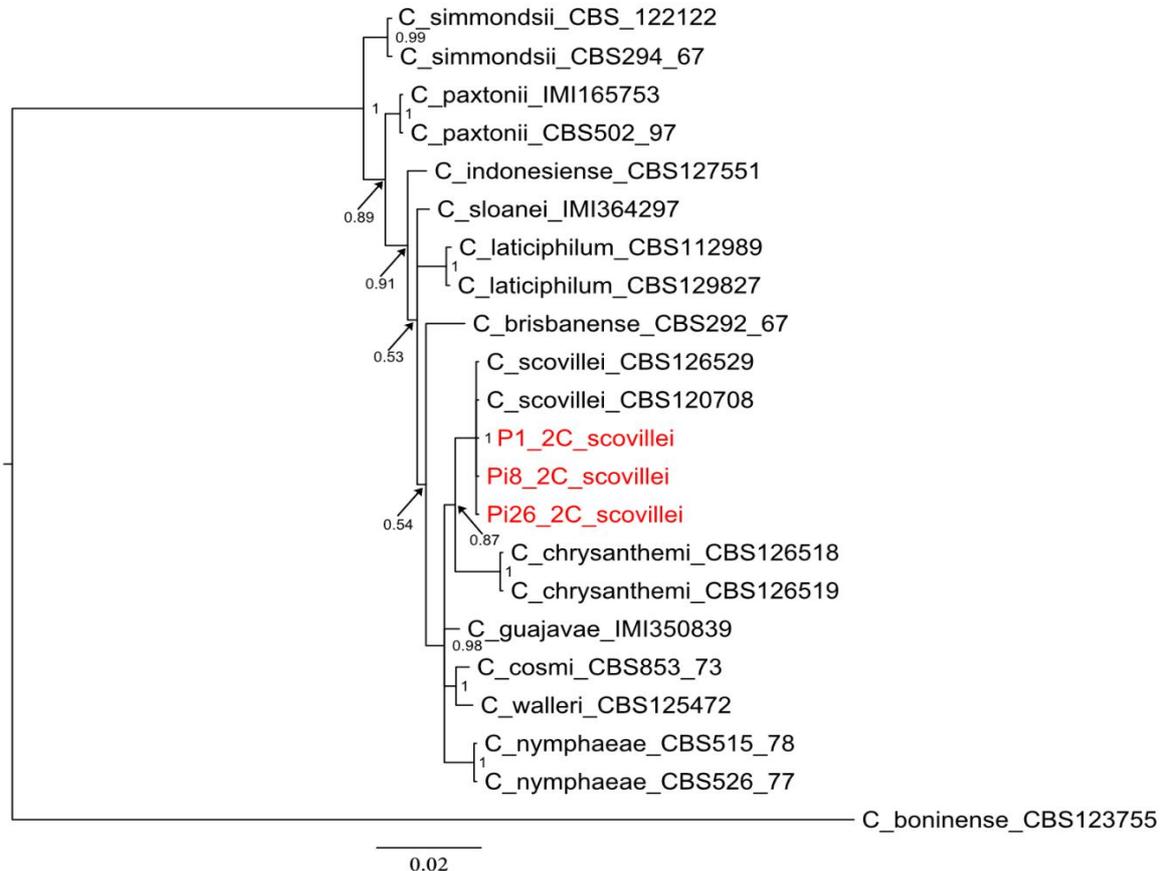


Figura 5 – Árvore filogenética de Inferência Bayesiana com três isolados de *Colletotrichum* do complexo *C. acutatum*, usando a sequência da combinação parcial de dados dos genes GAPDH, TUB-2 e ITS. *Colletotrichum boninense* foi usado como outgroup.



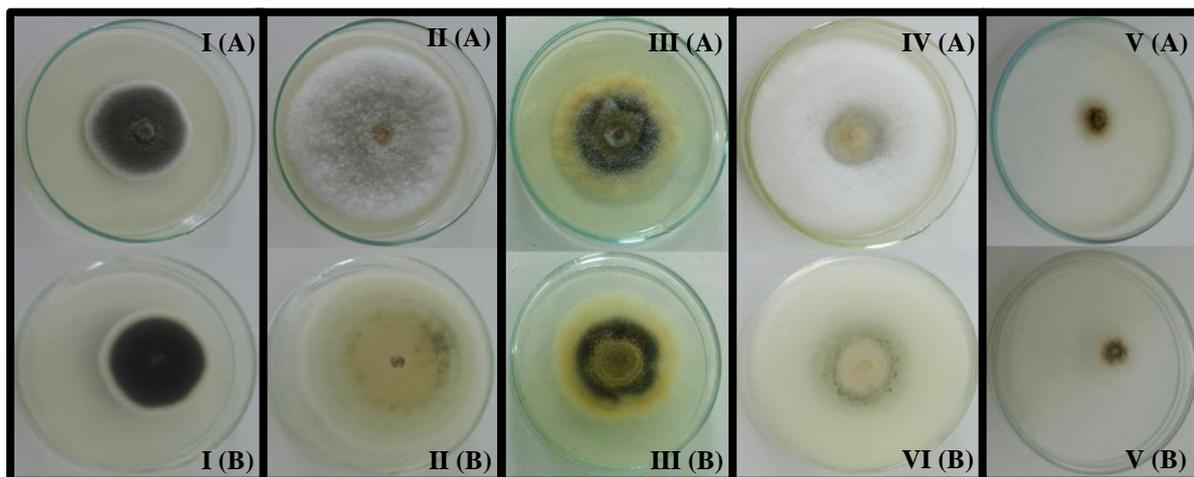
Fonte: SILVA, J. R. A., 2015.

### 4.3 Estudos Morfológicos

Com base na coloração das colônias, os isolados das espécies de *Colletotrichum* agruparam-se em cinco morfogrupos distintos (Figura 6). O morfogrupo I, foi composto por colônias cinza escuro com bordas brancas e reverso verde musgo com bordas brancas, com um isolado apresentando massa alaranjada no centro, correspondendo a espécie *C. scovillei*. Colônias brancas acinzentas com presença de massa de conídios no centro e reverso variando de bege alaranjado a bege esverdeado estão inseridas no morfogrupo II, e agrupou os isolados identificados como *C. siamense*. Isolados da espécie *C. truncatum* apresentaram colônias salmão claro e centro esverdeado, reverso salmão claro com halo esverdeado no centro formando o morfogrupo III. Um isolado com colônia branca e centro cinza e reverso branco com halo verde oliva circundando o centro branco, com massa de conídios na parte superior e

no reverso da placa, formou o morfogrupo IV, correspondendo a espécie *C. tropicale*. A coloração rósea com centro esverdeado na parte superior e no reverso da placa correspondeu ao morfogrupo V agrupou a espécie *C. brevisporum*.

Figura 6 - Aspecto dos cinco morfogrupos de isolados de *Colletotrichum* cultivados em meio BDA sintético, observados ao 7º dia. *C. scovillei*: I (A) e (B). *C. siamense*: II (A) e (B). *C. truncatum*: III (A) e (B). *C. tropicale*: IV (A) e (B). *C. brevisporum*: V (A) e (B). Parte superior (A) e reverso (B) da placa de Petri.



Fonte: SILVA, J. R. A.; PAIXÃO, T.; SILVA, A. R. G. da, 2015.

Os isolados das espécies de *Colletotrichum* provenientes de pimenta e pimentão do Nordeste do Brasil apresentaram coloração das colônias bastante variáveis, conforme já observado para estas mesmas espécies isoladas em outras regiões do mundo. As espécies de *Colletotrichum* apresentaram as seguintes variações de cor: micélio branco acinzentado a cinza escuro, branco-gelo, com reverso branco ao verde musgo, salmão claro e centro esverdeado, cinza e micélio aéreo branco, róseo com centro esverdeado, reverso bege alaranjado a bege esverdeado e incolor a laranja com manchas escuras e conídios em massa alaranjada (DAMM et al., 2012b; SUTTON, 1980; SUTTON, 1992; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; BONETT et al., 2010). Estas características culturais podem variar dentro de uma mesma espécie, pois estão sujeitas a mudanças de acordo com as condições de cultivo. Temperatura, luminosidade e meio de cultura, interferem na estabilidade e aspecto das colônias (COUTO; MENEZES, 2004; MENEZES, 2002).

Em relação ao crescimento micelial das diferentes espécies de *Colletotrichum*, observamos que houve variação estatística entre as espécies do complexo *C. gloeosporioides* que apresentaram maior taxa de crescimento micelial (TCM), quando comparada com as espécies dos demais complexos. A espécie *C. brevisporum* apresentou menor taxa de crescimento micelial, diferindo estatisticamente de todas as outras espécies (Tabela 5).

Os dados culturais são importantes na caracterização das espécies como informações complementares que contribuem na sua identificação, apesar de não serem características que devam ser levadas em consideração isoladamente. Neste trabalho, os dados de TCM, corroboraram com o que é descrito na literatura, por exemplo, a espécie *C. siamense* apresentou TCM de 0,95cm, semelhante a isolados desta mesma espécie, na China e na Tailândia que apresentaram TCM variando entre 1,05-1,24 (YANG et al., 2009).

Os conídios apresentaram-se hialinos e unicelulares, com formato, comprimento e largura variáveis. Houve diferença estatística entre *C. truncatum* (maior comprimento) e *C. brevisporum* que diferiu de *C. siamense* que também diferiu de *C. scovillei* e *C. tropicale* que apresentaram diferença estatística em relação aos demais espécies (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias de comprimento e largura de conídios e apressórios, e taxa de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum*.

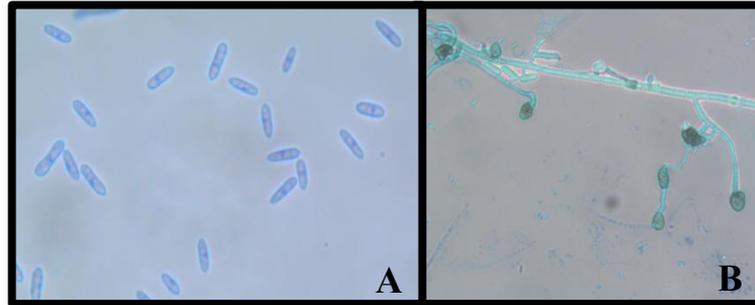
Espécies	Conídios		Apressórios		TCM cm/dia
	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	
<i>Colletotrichum</i>					
<i>C. tropicale</i>	<b>14,73d</b> (12,84-16,65)	<b>5,46a</b> (4,44-6,36)	<b>9,67c</b> (6,79-9,68)	<b>7,26b</b> (6,0-9,67)	<b>1,10a</b>
<i>C. scovillei</i>	<b>14,97d</b> (13,24-17,08)	<b>4,20c</b> (3,58-4,59)	<b>10,81b</b> (7,25-14,73)	<b>7,74ab</b> (5,22-2,53)	<b>0,71b</b>
<i>C. siamense</i>	<b>16,20c</b> (13-18,39)	<b>4,86b</b> (3,44-6,1)	<b>11,86a</b> (9,12-16,49)	<b>8,24a</b> (5,80-9,85)	<b>0,95a</b>
<i>C. truncatum</i>	<b>27,45a</b> (23,34-31,25)	<b>3,66d</b> (3,14-4,29)	<b>5,03d</b> (3,84-7,66)	<b>3,26c</b> (2,40-5,32)	<b>0,67b</b>
<i>C. brevisporum</i>	<b>17,17b</b> (13,63-23,72)	<b>5,54a</b> (4,47-7,02)	-	-	<b>0,28c</b>

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. TCM= Taxa de crescimento micelial em cm.

A espécie *C. scovillei* produziu conídios hialinos, asseptados, lisos, retos, cilíndricos com extremidades arredondas ou com final mais ou menos agudos, com valores médios de comprimento e largura  $X = 14,97 \times 4,20 \mu\text{m}$ . Formato e valores semelhantes foram relatados para esta espécie, variando entre 12,5-19,5  $\mu\text{m}$  para o comprimento e 3,5-4,5  $\mu\text{m}$  para a largura (DAMM et al., 2012b; CAIRES et al., 2014; KANTO et al., 2014). Os apressórios tiveram coloração castanho médio a escuro, de parede lisa, subglobosos e ovoides a elipsoidais, em todo o contorno, às vezes ondular, com  $X = 10,81 \times 7,74 \mu\text{m}$ . As medidas de apressórios encontrados neste trabalho foram maiores do que as relatados por Damm et al. (2012b) e Kanto et al. (2014) que variam entre  $6,3 \times 5,6 \mu\text{m}$  (Figura 7-A e B). Um dos fatores relacionados a estas diferenças

é o tipo de meio de cultura utilizado no trabalho, pois Kanto et al. (2014) e Damm et al. (2012b) utilizaram meio de cultura SNA (*Synthetic Nutrient Agar*), além disso outras características do ambiente e do isolado podem ter influenciado no tamanho de apressórios.

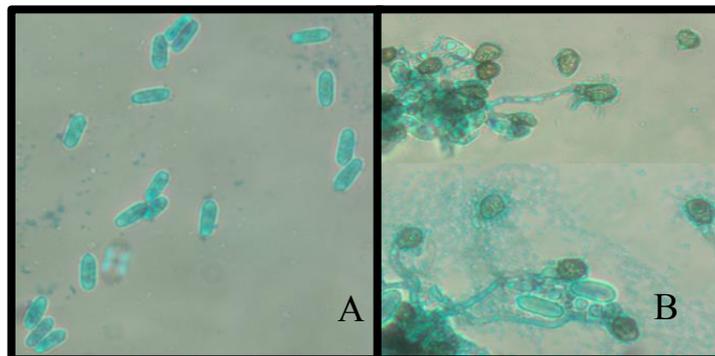
Figura 7 - Características morfológicas da espécie *C. scovillei* crescida em meio BDA: Conídios retos, cilíndricos com extremidades arredondadas ou com final mais ou menos agudos (A). Apressórios castanho médio a escuro, subglobosos, ovoides a elipsoidais (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.



Fonte: SILVA, J. R. A.; PAIXÃO, T.; SILVA, A. R. G. da, 2015.

*Colletotrichum tropicale* apresentou conídios cilíndricos curtos e largos com extremidades arredondados, com uma leve contração perto do centro, variando em tamanho entre 12,84-16,65 x 4,44-6,36 µm, X= 14,73 x 5,46 µm. Os apressórios se apresentaram subglobosos, ovoides e clavados, com comprimento variando entre 6,79-9,68 µm e largura 6,0-9,67 µm (Figura 8-A e B). Corroboram com este resultado o trabalho de Lima et al. (2013) que descreveu conídios cilíndricos com média= 14,12x4,82 µm e Rojas et al. (2010), que descreveu conídios variando entre 12,5–16,5 x 4,8–5,5 µm e apressórios 7,0–11,0 x 5,2–7,2 µm.

Figura 8 - Características morfológicas da espécie *C. tropicale*: Conídios curtos e largos com extremidades arredondados, com uma leve contração perto do centro (A). Apressórios subglobosos, ovoides e clavados (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.



Fonte: SILVA, J. R. A.; PAIXÃO, T.; SILVA, A. R. G. da, 2015.

Conídios unicelulares, de parede lisa, hialinos, fusiforme com ápices obtusos ligeiramente arredondados, por vezes, oblongo, são descrito para a espécie *C. siamense*, características estas observadas neste trabalho (Figura 9-A e B). Além disso, as médias de

comprimento e largura dos conídios, bem como formato de apressórios foram semelhantes as descritas para esta espécie (PRIHASTUTI et al., 2009; COSTA, 2014).

As espécies *C. tropicale* e *C. siamense* são consideradas próximas geneticamente e compartilham algumas características morfológicas: conídios curtos e largos, com extremidades arredondadas e muitas vezes suavemente apertados perto do centro (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

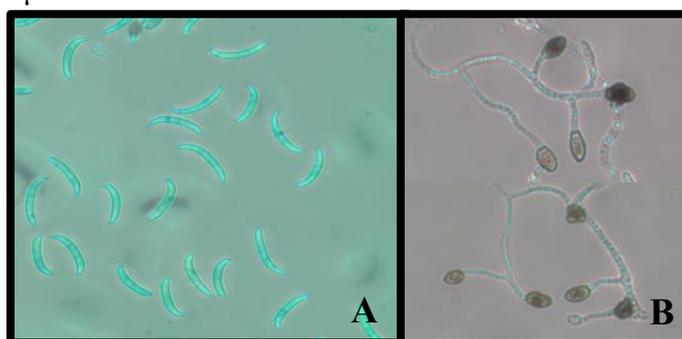
Figura 9 - Características morfológicas da espécie *C. siamense*: Conídios cilíndricos com extremidades arredondados, com uma leve contração perto do centro (A). Apressórios clavados, algumas vezes ovoides (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.



Fonte: SILVA, J. R. A.; PAIXÃO, T.; SILVA, A. R. G. da, 2015.

*Colletotrichum truncatum* apresentou conídios compridos, hialinos, de parede lisa, com a parte central ligeiramente curvada, afinando em direção ao ápice mais fortemente curvo. Os valores médios para comprimento e largura dos conídios foram de 27,45 x 3,66 µm. Os apressórios desta espécie mostraram-se clavados, ocasionalmente irregulares, semelhantes aos encontrados por Ford et al. (2004). As dimensões de apressórios foram X= 5,03 x 3,26 µm. (Figura 10-A e B). Os valores de comprimento e largura dos conídios para esta espécie na literatura variam de 20–24,5 x 2,8–4 µm (DAMM et al., 2009; ROGERIO, 2015) e 16,1–20,7 µm x 3,3–4,9 µm (FORD et al., 2004). E as dimensões de apressórios variam 6,9 – 18,47 x 4,13 – 10,03 µm (DAMM et al., 2009; ROGERIO, 2015).

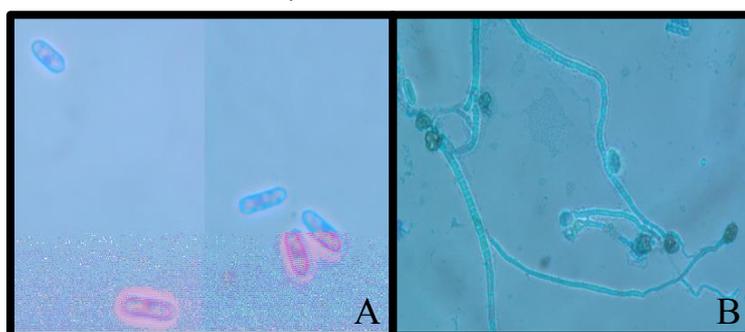
Figura 10 - Características morfológicas da espécie *C. truncatum*: Conídios compridos com a parte central ligeiramente curvada, afinando em direção ao ápice mais fortemente curvos (A). Apressórios clavados, às vezes irregulares (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.



Fonte: SILVA, J. R. A.; PAIXÃO, T.; SILVA, A. R. G. da, 2015.

A espécie *C. brevisporum* apresentou conídios cilíndricos, hialinos, com extremidades arredondadas e paredes lisas, e apressórios com formato irregular e às vezes oval, conforme já descrito por Paul et al. (2014) (Figura 11-A e B). No entanto, diferente do que é descrito por Noireung et al. (2012) e Vieira, Nascimento, Michereff (2013) os conídios não foram gutulados. As médias de comprimento e largura dos conídios foi 17,17 x 5,54 µm. Estas dimensões de conídios também corresponderam ao descrito na literatura X= 10,5-24 × 3,8-6 µm (NOIREUNG et al., 2012; VIEIRA; NASCIMENTO; MICHEREFF, 2013, 2013; PAUL et al., 2014). Para apressórios, as medidas de comprimento e largura variaram de 10-16,8 × 5-11µm (PAUL et al., 2014; NOIREUNG et al., 2012). Não foi possível obter as médias de apressórios para esta espécie, pois os isolados não produziram esta estrutura em quantidade suficiente.

Figura 11 – Características morfológicas da espécie *C. brevisporum*: Conídios cilíndricos, com extremidades arredondadas (A). Apressórios irregulares e às vezes ovais (B). As imagens (A) e (B) foram obtidas a 40x. Escala de 20µm.



Fonte: SILVA, J. R. A.; PAIXÃO, T.; SILVA, A. R. G. da, 2015.

#### 4.4 Patogenicidade de Espécies de *Colletotrichum* em Diferentes Hospedeiros

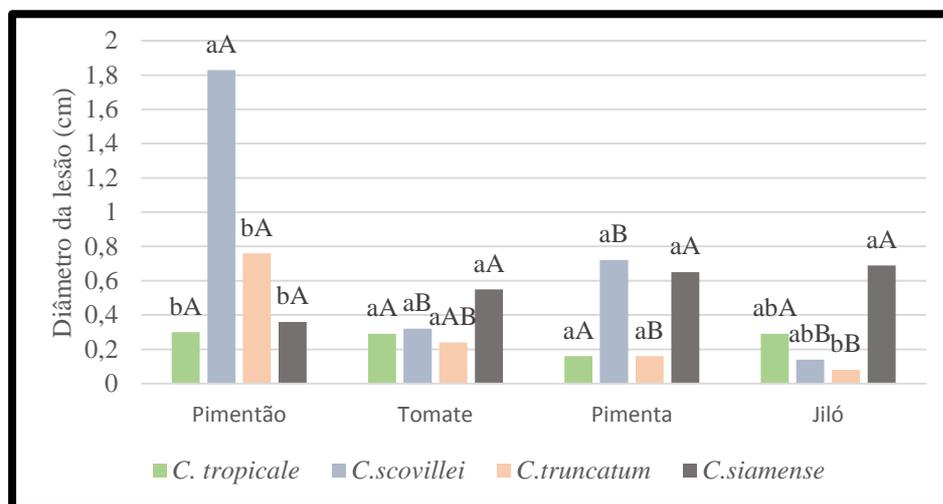
Todos as espécies de *Colletotrichum* apresentaram patogenicidade aos quatro hospedeiros (Figura 12).

Analisando a infecção das espécies de *Colletotrichum* spp. no mesmo hospedeiro é possível inferir que: *C. scovillei* apresentou maiores lesões em pimentão do que as espécies *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. truncatum*. Em tomate e pimenta não houve diferença estatística entre as espécies. No hospedeiro jiló, as espécies *C. siamense* e *C. truncatum* diferiram estatisticamente entre si, sendo que *C. siamense* apresentou as maiores lesões (0,69 cm) e *C. truncatum* as menores (0,08 cm).

Comparando a patogenicidade da mesma espécie em relação aos hospedeiros, observamos que: o pimentão se mostrou mais suscetível a espécie *C. scovillei*, diferindo significativamente dos demais hospedeiros. A espécie *C. truncatum* também causou maiores

lesões em pimentão, quando comparada com os demais hospedeiros, mas com lesões menores que *C. scovillei*. As espécies *C. siamense* e *C. tropicale* não diferiram entre os hospedeiros.

Figura 12 – Patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose no Nordeste do Brasil em pimentão, tomate, pimenta e jiló.



Médias seguidas pelas letras minúsculas iguais entre mesmo tipo de frutos e inoculadas por espécie de *Colletotrichum* diferente não diferem entre si, e letras maiúsculas iguais entre frutos diferentes inoculada pela mesma espécie de *Colletotrichum* não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Estes resultados demonstram que uma mesma espécie de *Colletotrichum* é capaz de infectar diferentes hospedeiros, evidenciando sua inespecificidade e ocorrência generalizada em vários hospedeiros (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; CANNON et al., 2012; LIMA et al., 2013). Diversos trabalhos demonstram a capacidade patogênica de diferentes espécies de *Colletotrichum* sobre uma gama de hospedeiros. Por exemplo, a espécie *C. gloeosporioides* demonstrou ser patogênica às frutas de durian (*Durio zibethinus* L.), abacate, manga, rambutão (*Nephelium lappaceum* L.), mangostão (*Garcinia mangostana* L.) e pini jambu (*Syzygium jambos* L.) (ALAHAKOON; BROWN; SREENIVASAPRASAD, 1994). A mesma espécie, isolada de abacate e manga, foi patogênica a morango (*Fragaria vesca* L.), pimentão, goiaba e mamão (SANDERS; KORSTEN, 2003). Estudos de infecção cruzada com as espécies *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. siamense* e *C. simmondsii* também foram avaliados em pimenta, mamão, tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), rose apple (*Eugenia javanica* Lam.), manga e goiaba, e os autores demonstraram que espécies oriundas de um determinado hospedeiro tem preferência por seu hospedeiro original (PHOULIVONG; MCKENZIE; HYDE, 2012). Neste trabalho, observou-se que *C. scovillei*, proveniente de *Capsicum* spp., apresentou lesões maiores, com média de 1,8 cm, em pimentão, evidenciando a possibilidade deste ser seu hospedeiro de origem.

A diferença no tamanho das lesões entre os hospedeiros pode estar associado com interações específicas de patógeno/hospedeiro, particularidades do isolado e/ou características próprias dos frutos inoculados (LIMA et al, 2013), como por exemplo níveis de suscetibilidade do hospedeiro, e também a densidade do inoculo (ALAHAKOON; BROWN; SREENIVASAPRASAD, 1994).

## 5 CONCLUSÃO

Espécies em pelo menos quatro complexos distintos do gênero *Colletotrichum* estão associadas à antracnose em frutos de *Capsicum* spp. no Nordeste do Brasil;

A espécie *C. scovillei* (Complexo: *C. acutatum*) é a mais frequentemente encontrada causando antracnose em *Capsicum* spp.;

Pimenta, pimentão, tomate e jiló fazem parte da gama de hospedeiros das espécies *C. scovillei*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. truncatum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIKARAM, N. K. B.; BROWN, A E.; SWINBURNE, T. R. Observations on infection of *Capsicum annuum* fruit by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum capsici*. **Trans. Br. mycol. Soc.**, Grã Bretanha, v. 80, n. 3, p.395-401, 1983.

ALAHAKOON, P.W., BROWN, A.E., SREENIVASAPRASAD, S. Genetic characterisation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates obtained from mango. **Inter. J of Pest Managem.**, v. 40, p. 225-229, 1994.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. v.1. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704p.

ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatopat. Bras.**, v. 32, p.21-31, 2007.

AZEVEDO, C. P. de. et al. Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. Comunicado Técnico 35. **Embrapa**. Brasília. Dez., 2006.

BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: **CAB International**. p. 88-120, 1992.

BONETT, L. P. et al. Caracterização morfocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência – Revis. do Set. de Ciênc. Agra. e Amb.**, Guarapuava., v. 6, n. 3, p.451-463, Set./Dez, 2010.

BRAGANÇA, C. A. D., **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. Associated with fruits in Brazil**. 2013 Tese (Doutorado em Patologia de plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2013.

CAIL, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Divers.n.**, v.39, p.183-204, 2009.

CAIRE S. et al. First Report of Anthracnose on Pepper Fruit Caused by *Colletotrichum scovillei* in Brazil. **Plant Dis.n.**, v. 98, n. 10, p. 1,437.3 - 1,437.3, Oct., 2014.

CANNON, P. F., BUDDIE, A. G., BRIDGE, P. D. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 104, p. 189-204, 2008.

CANNON, P.F. et al. *Colletotrichum*- current status and future directions. **Stud Mycol.** v.73, p.181-213, 2012.

CARDINA, J.; LITTRELL, R. H.; HANLIN, R. T. Anthracnose of Florida beggarweed (*Desmodium tortuosum*) caused by *Colletotrichum truncatum*. **Weed Scienc.n.**, v. 36, p. 329-334, 1988.

CAREAGA, M. et al. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **Inter. J. of Food Microbiol.**, v. 83, 2003.

CARNEIRO, S.M.T.P.G. et al. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. em *Carthamus tinctorius* L. no estado do Paraná. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v.38, n.2, p.163-166, Fev., 2012.

CARVALHO, A. V. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of pepper (*Capsicum* sp.) genotypes. **J. Food Sci. Technol.** Apr., 2015.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man sterile distilled water. Further researches. **J. of Trop. Med. and Hyg.**, v.70, p. 181-184, 1967.

CAVALCANTE et al. Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose. **Sum. Phytopathol.**, v.38, n.4, p.329-333, 2012.

CHOWDAPPA, P.; CHETHANA, C.S.; PAVANI, K.V. *Colletotrichum siamense* and *c. truncatum* are responsible for severe outbreaks of anthracnose on onion in Southwest India. **Jour. of Plant Pathol.**, v. 97, n. 1, 2015.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*).** Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

COLATTO, U. L. D. **Reação de progênies de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*).** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2010.

COSTA, C. S. R. et al. Pimenta (*Capsicum* spp.). **Embrapa Hortaliças.** Sistemas de Produção, 2. Nov., 2007.

COSTA, J. F. de O. **Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas.** 2014. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas (CECA), Rio Largo, 2014.

COSTA, R.V. et al. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. **Sum. Phytopathol.**, Botucatu, v.36, n.2, p.122-128, 2010.

COUTO, E.F., MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopat. Bras.** Brasília, v.29, n.4, p.406-412, Jul./Ago., 2004.

DAMM, U. et al. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fung. Diver.n.**, v. 39, p. 45-87, Dec., 2009.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Stud. in Mycol.**, v. 73, p.1-36, 2012a.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Stud. in Mycol.**, v.73, p. 37–113, Aug., 2012b.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. **Stud. in Mycol.**, v. 79, p. 49–84, Sept., 2014.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fung. Diver.**, v. 61, p. 29–59, Jul., 2013.

DEWITT, D.; BOSLAND, P. W. **The Complete Chile Pepper Book: A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving, and cooking.** Portland: Timber Press, 1996. 336p.

DORANTES, L. et al. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. **Inter. J. of Food Microbiol.**, v. 57, 125–128p., Jan., 2000.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull.**, v.19, p.11-15, 1987.

DOYLE, V. P. et al. Habitat and Host Indicate Lineage Identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from Wild and Agricultural Landscapes in North America. **PLoS ONE**, v. 8, ed. 5, 2013.

EDGAR, R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformat.**, v.5, p.1-19, 2004.

**Enciclopédia Agrícola Brasileira/ESALQ.** Apresentação de Humberto de Campos. São Paulo: Edusp, 1995.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2.ed: Viçosa: UFV. 2008. 412p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 15 maio 2015.

FORD, R. et al. Morphological and molecular discrimination of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on lentil in Canada. **Austra. Plant Pathol.**, v. 33, p. 559–569, 2004.

FREEMAN, S. KATAN, T. SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Dis.**, v. 82 p. 596-605, 1998.

GENUNCIO, G. da C.; ZONTA, E.; NASCIMENTO, E. C. do. Pimenta – Tipos e ardências que fazem toda a diferença. **Revista Campo & Negócios Hortifruti.** Uberlândia, Fev., 2015.

Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/pimenta-tipos-e-ardencias-que-fazem-toda-a-diferenca/>> Acesso em: 3 ago. 2015.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta bot. Bras.** v. 24, n.2, 395-406p, Fev., 2010.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **App. Environm. Microb.**, v. 61, p.1323-1330, 1995.

GUERBER, J.C. et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycolog.**, v. 95, p. 872-895, 2003.

GUIMARÃES, G. R. **Diversidade e caracterização morfocultural, biológica, bioquímica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.** Monografia (Especialização)-Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Urutaí, 2011.

HADDEN, J. F.; BLACK, L. L. Anthracnose on pepper caused by *Colletotrichum* spp. **Deprat. of Plant Path. And Crop Physiol.** v. 88, 1989.

HAYER, J. F. S. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*).** Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, 2010.

HU, M.; GRABKE, A.; SCHNABEL, G. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing peach anthracnose in South Carolina. **Plant Dis.**, v. 99, p. 797-805. Jun., 2015.

HUELSENBECK, J.P. et al. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. **Syst. Biol.**, v.51, p. 673-688, 2002.

HUELSENBECK, J.P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Scienc.**, v.294, p. 2310-2314, 2001.

IVEY, M. L. L., NAVA-DIAZ, C., MILLER, S. A. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. **Plant Dis.**, Wooster, v. 88, n. 11, p. 1198-1204, Nov., 2004.

JAMES, R.S. et al. *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory. Australia. **Australasian Plant Dis.**, v. 9, p. 138, 2014.

JOHNSTON, P. R.; JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycolog.**, v. 9, n.3, p. 420-430. Jan., 1997.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. **Principais doenças de anonáceas no Brasil: Descrição e Controle.**, v. 36, edição especial, p. 55-64, Jan., 2014.

KAMEI, S. H. et al. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revis. Brasileir. de Fruticult.**, v.36, ed. Especial. Janeiro, 2014.

KANTO, T. et al. Anthracnose of sweet pepper caused by *Colletotrichum scovillei* in Japan. **J. Gen. Plant. Pathol.**, v. 80, p. 73–78, 2014.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the fungi.** 10 ed. Wallingford: CABI Europe – UK, 2008.

KOSOSKI, R.M. et al. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatol. Brasileir.**, v. 26, p. 662-666, 2001.

KRISHMA DE, A. **Capsicum: The genus *Capsicum***. v. 33. New York: Taylor & Francis, 2003. 275p.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatol. Brasileir.** Brasília, v. 28, n.3, p.251-257, Maio/Jun., 2003.

KUROZAWA, C.; M. A. PAVAN. Doenças das Solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (eds.), **Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**, 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 663p., 2005.

LIMA, N.B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fung. Divers.**, v. 61, p.75-88, 2013.

LINS, S. R. O.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatol. Brasileir.**, v. 32, p.488-496, 2007.

MAHARAJ, A; RAMPERSAD, S. N. Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.) based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. **Mol. Biotechnol.**, v. 50, p.237-249. Jul., 2012.

MAROUELLI, W. A.; SILVA, W. L.C. Irrigação na cultura do pimentão. Circular técnico 101. **Embrapa**. 1 ed., Brasília. Mar., 2012.

MAU, B., NEWTON, M., LARGET, B. Bayesian phylogenetic inference via markov chain Monte carlo methods. **Biometrics**, v.55, p.1-12. 1999.

MCGOVERN, R. J.; POLSTON, J. E. First report of fruit rot of *Capsicum chinense* caused by two *Colletotrichum* species. **Plant Dis.**, v. 79, n. 2, 1995.

MEETUM, P.; LEKSOMBOON, C.; KANJANAMANEESATHIAN, M., First report of *Colletotrichum aenigma* and *C. siamense*, the causal agent of anthracnose disease of dragon fruit in Thailand. **Jour. of plant pathol.** Tailândia. Maio, 2015.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatol. Brasileir.**, v.27, p.23-24, 2002.

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

MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. CIPRES. Website. Disponível em: <[http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal](http://www.phylo.org/sub_sections/portal)>. Acesso em: 6 jun. 2015.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98, p.137-143, 1992.

NOIREUNG, P. et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Mycol.**, v. 33, n.3, 2012.

O'DONNELL K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNAITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molec. Phylog. Evol.**, v. 7, p. 103-116, 1997.

OH, B.; KIM, K D.; KIM, Y. S. A microscopic characterization of the infection of green and red pepper fruits by an isolate of *Colletotrichum gloeosporioides*. **J. Phytopathology.**, v. 146, p. 301-303, 1998.

PAUL, N. C. et al. Endophytic fungi from *Lycium chinense* Mill and characterization of two new Korean records of *Colletotrichum*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 9, p. 15272-15286, Aug., 2014.

PENG, L. et al. *Colletotrichum* species on citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptog. Mycolog.**, v.33, p.267-283, 2012.

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Indonésia, v. 44, n.1, p. 33-43, 2010.

PHOULIVONG, S.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. **Curr. Res. in Envir. & App. Mycol.**, v. 2, n. 2, p.99-111. Dec., 2012.

POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Syst Biol.**, v.53, p.793-808, 2004.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fung. Divers.**, v. 39, p.89-109, 2009.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc. 491 p., 2002.

RAMDIAL, H.; RAMPERSAD, S. N. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in Trinidad. **Phytoparasitica**. v. 43, p.37–49, 2015.

RANATHUNGE, N. P. et al. *Colletotrichum truncatum* Pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. **Austra. Plant Pathol.** v. 41, p.463–473. Jul., 2012.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**. v.43, p.304–311, 1996.

REIS A.; BOITEUX, L. S.; HENZ, G. P. Antracnose em Hortaliças da Família Solanacea. **Embrapa Hortaliças**. Circular Técnica 79. Brasília. Out., 2009.

RIBEIRO, C. S. da C. et al. Pimentas *Capsicum*. **Embrapa Hortaliças**. Brasília, 2008.

ROBERTS, P. D.; PERNEZNY, K. L.; KUCHARREK, T. A. **Anthracnose on pepper in Florida**. Electronic Data Information Source - Florida Cooperative Extension Publications: Universidade da Flórida, Gainesville, 2012.

ROCA, M., M.G. et al. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p.16-20, jan./fev., 2004.

ROGÉRIO, F. **Etiologia e variabilidade do agente causal da antracnose da soja no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2015.

ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycolog.** 102:1318–1338, 2010

ROMAN, A. L. C. et al. Uso medicinal da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) em uma comunidade de várzea à margem do rio Amazonas, Santarém, Pará, Brasil. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Hum. v. 6, n. 3, p. 543-557. Belém. Set./Dez., 2011.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, 2012.

ROY, K. W.; KILLEBREW, J. F.; RATNAYAKE, S. First Report of *Colletotrichum capsici* on Bell Pepper in Mississippi. **Plant Dis.** v. 81, n. 6. Jun., 1997.

ROZWALKA, L. C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SANDERS, G. M; KORSTEN, L. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiol. Res.** v. 158, p.143–150, 2003.

SANTOS e SILVA, F. A. ASSISTAT 7.6 beta (pt). Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN – UFCG, Campina Grande, 2013.

SCHENA et al. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. **Plant Pathol.** v. 63, p. 437–446, 2014.

SHARMA, G.; SHENOY B. D. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. **Archives of Phytopathology and Plant Protection.** Goa, Índia. v. 47, n. 10, p. 1179-1194, 2014.

SHARMA, G.; PINNAKA, A.K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Curr. Res. in Envir. & App. Mycol.** v. 3, n. 2, p. 194–220. Oct., 2013.

SILVA, M. R. L. et al. **Estudo da agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* proveniente de frutos e flores de cafeeiro.** In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7. 2011, Araxá. Articulação em Redes de Pesquisa e Novas Fronteiras do Conhecimento. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/4016/230.pdf?sequence=2>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

SOUZA, B. O. de; SOUZA, E. A. de; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciênc. e Agrotéc.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768p.

SUSSEL, A. A. B., **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas.** Dissertação. Piracicaba. São Paulo, 2005.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (eds.) *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control.* Wallingford. CAB International, p. 1-26, 1992.

SUTTON, B.C. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. **The Coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 696p, 1980.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecul. Biol. and Evolut.** v.28, n.10, p. 2731 – 2739, 2011.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. de. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotécnica**. Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, jan./fev, 2005.

THAN et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Patholog.** v. 57, p.562–572, 2008.

TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose on pepper in Brazil. **Plant Disease**. v. 93, n. 1. Jan., 2009.

TOZZE JÚNIOR H. J. et al. Natural occurrence of *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes causing anthracnose on pepper (*Capsicum annum* L.) in Brazil. **Summa Phytopathol.**, v. 33, n. 4, p. 418. Botucatu, 2007.

TOZZE JUNIOR, H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA-JUNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopatholog.**, Botucatu.v.32, n.1, p. 77-79, 2006.

UDAYANGA, D. et al. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits. **Fung. Diver.** v.61, p. 165-179, 2013.

VIDA, J.B. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on peach palm fruits in Minas Gerais and Paraná States, Brazil. **Summa Phytopatholog.**, Botucatu, v.32, n.4, p.379-380, 2006.

VIEIRA, W. A. S.; NASCIMENTO, R. J.; MICHEREFF, S. J. First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. **Plant Dis.** v. 97, n. 12, p.1659. Dec., 2013.

WAHYUNI, Y. et al. Secondary Metabolites of *Capsicum* Species and Their Importance in the Human Diet. **Jour. of Natur. Product.** v. 76, p. 783–793. Mar, 2013.

WEIR, B.S., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Stud Mycol.** v.73, p.115-180, 2012.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York, USA: p. 315-322, 1990.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. **Fung. Diver.** v. 39, p. 123-146, 2009.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* Species on Orchidaceae in Southwest China. **Mycolog.**, v. 32, n. 3, p. 229-253, 2011.

IVEY, M. L. L.; NAVA-DIAZ, C.; MILLER, S. A. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. **Plant Disease**, Wooster, v. 88, n. 11, p. 1198-1204, nov. 2004.

ZANCARO, R. D. **Pimentas: Tipos, utilização na culinária e funções no organismo.** Monografia (Especialização)-Centro de Excelência em Turismo-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ZAUZA, E. A. V., ALFENAS, A. C., MAFIA, G. R. **Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos.** In: ALFENAS, C. A. & MAFIA, R. G. (eds.). Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, p. 42, 2007.