

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Tese

**Recursos genéticos de pimentas (*Capsicum*,
Solanaceae): diversidade genética, resistência à
antracnose e produção de metabólitos especializados**

Henrique Kuhn Massot Padilha

Pelotas, 2017

Henrique Kuhn Massot Padilha

Recursos genéticos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae): diversidade genética, resistência à antracnose e produção de metabólitos especializados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientadora: Dr^a Rosa Lía Barbieri

Co-Orientador: Dr. Fábio Clasen Chaves

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P123r Padilha, Henrique Kuhn Massot

Recursos genéticos de pimentas (*Capsicum*,
solanaceae): diversidade genética, resistência à antracnose
e produção de metabólitos especializados / Henrique Kuhn
Massot Padilha ; Rosa Lía Barbieri, orientadora ; Fábio
Chaves, coorientador. — Pelotas, 2017.

107 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,
Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Banco ativo de germoplasma. 2. Descritores
morfológicos. 3. Entropia. 4. *Colletotrichum*. 5.
Metabolômica. I. Barbieri, Rosa Lía, orient. II. Chaves, Fábio,
coorient. III. Título.

CDD : 633.83

Banca examinadora:

Dr^a Rosa Lía Barbieri – Embrapa Clima Temperado (presidente)

Dr. Gustavo Heiden – Embrapa Clima Temperado

Dr^a Raquel Silvana Neitzke – Prefeitura de Arroio do Padre

Dr^a Márcia Vizzotto – Embrapa Clima Temperado

À minha família
À minha esposa

Dedico

Agradecimentos

À minha querida orientadora Rosa Lía Barbieri, pela confiança na realização deste trabalho, pela amizade, incentivo e dedicação. Pelo amplo conhecimento transmitido até o momento. Por instigar o aluno na busca pelo conhecimento. Pelo ótimo exemplo de profissional, pesquisadora e pessoa que motiva os que estão a sua volta, meu muito obrigado.

Ao meu co-orientador Fábio Chaves, pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos e diversas oportunidades de aprendizado. Pelas conversas em momentos de dúvidas para que tudo ocorresse da melhor forma possível. Até mesmo quando estava longe (Canadá) se mostrou muito presente.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/FAEM-UFPel, pela oportunidade de cursar o doutorado. Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela troca de conhecimento.

Agradeço a CNPq pela bolsa de estudo concedida, extremamente importante para a realização do doutorado.

À Embrapa Clima Temperado, reconhecido centro de pesquisa, pela oportunidade e infraestrutura para executar os meus experimentos. A todos os funcionários da empresa especialmente Carlos Luís (Caçapava) e Falcão pelo auxílio nas atividades do campo. Agradeço muito ao amigo Breno Pai, pelo auxílio na logística, atividades de campo, piadas, histórias e conversas agradáveis. Todos foram essenciais para execução da pesquisa.

Tenho muito a agradecer aos meus queridos amigos e colegas dos Recursos Genéticos da Embrapa Clima Temperado e do Laboratório de Frutas e Hortaliças (Lab710) da Universidade Federal de Pelotas. Agradeço a Dani, Ju, Claudete, Carla, Marene, Raquel, Tângela, Rebeca, Andrey, Patrick, Eduardo, Luís, Marcelo, Gustavo H., Gustavo G., Paulo, Laísa, Ênio, Carol, Márcia; ao Lab710, a Jéssica, Rosane, Bianca, Nathalia, Marcela, Dylan, Nathan, Francine, fica aqui meu agradecimento pelos momentos vividos, pelo constante incentivo e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Tenho muito a agradecer a minha família! São pessoas fundamentais, que sempre me apoiam em todas as circunstâncias. Sempre me motivam a seguir em

frente. Agradeço, do fundo do coração, aos meus pais, Manoel e Marly, a minha vó Olívia, minha irmã Mariana, por investirem amor!

Agradeço a minha esposa Bárbara, essa pessoa maravilhosa, que não mede esforços para me apoiar, seja em momentos bons ou ruins, está sempre ao meu lado. Pelo companheirismo desde o ensino médio, graduação, mestrado e agora doutorado. Pelo amor, dedicação e incentivo em todos os caminhos que escolho seguir.

Aos meus familiares, tios e tias, primos e primas, por todo apoio. Mesmo de longe se mostram presentes através de mensagem ou oração.

Aos meus grandes amigos, pelos agradáveis momentos de convivência e amizade. Agradeço a Deus por ter amigos tão especiais.

A todos os colegas e amigos do Fitomelhoramento, pelos momentos de descontração, futebol, churrascos e pela troca de conhecimento e experiências.

Agradeço a Deus, pela saúde, proteção e por encontrar ótimas pessoas durante esta caminhada no doutorado. Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade”
Albert Einstein

Resumo

PADILHA, Henrique Kuhn Massot. **Recursos genéticos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae): diversidade genética, resistência à antracnose e produção de metabólitos especializados**. 2017. 107f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O consumo de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) vem aumentando progressivamente, devido à diversidade, multiplicidade dos usos e propriedades funcionais dos seus frutos. Um dos problemas que limita a produtividade de pimentas é a antracnose, doença fúngica recorrente na região sul do Brasil, que resulta em prejuízos ao produtor e ao consumidor. Frente a esse problema, a ampla diversidade genética encontrada nas pimentas representa uma importante fonte para novas alternativas. O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para a caracterização de recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum*. A tese está apresentada na forma de três capítulos, cujos objetivos foram caracterizar morfológicamente acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, avaliar a divergência genética e estimar a entropia dos caracteres avaliados; avaliar a reação de acessos de pimentas à antracnose e identificar possíveis fontes de resistência; e realizar a avaliação metabôlômica de acessos de pimentas contrastantes para resposta à antracnose. No primeiro capítulo, foram caracterizados 21 acessos de pimentas (*C. baccatum* e *C. chinense*) com o uso de 47 descritores morfológicos. Foi verificada ampla diversidade genética para os caracteres avaliados. Os descritores posição da flor, posição do estigma, cor de fruto maduro, pungência e comprimento de planta apresentaram elevada entropia. No segundo capítulo, os mesmos acessos foram avaliados quanto à resposta à antracnose. Os frutos foram colhidos e inoculados em duas fases de maturação. Foi possível diferenciá-los a partir da inoculação com um isolado do fungo *Colletotrichum acutatum*. Os acessos avaliados não apresentaram resistência total à antracnose. Foi observada variação para resposta à antracnose. A resistência de pimentas à antracnose se expressa de forma diferente de acordo com a fase de maturação do fruto. Dentre os acessos avaliados, P27 apresentou maior resistência à doença e P175 maior suscetibilidade. No terceiro capítulo, foi realizada a avaliação metabôlômica dos frutos dos acessos contrastantes para a resistência à antracnose. Para as análises foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida, gasosa e espectrometria de massas. A concentração de metabólitos especializados em frutos de pimentas varia conforme a fase de maturação. A concentração de capsaicinoides e capsinoides dos frutos não influencia a resistência à antracnose. A produção dos compostos butano-2,3-diol, L-threitol, D-frutose e α -D-glucopyranoside nos frutos foi alterada pela incidência da antracnose. O estudo da relação dos compostos dos frutos de pimenta em resposta ao ataque do patógeno gera informações sobre o processo de resistência e suscetibilidade, assim como desperta novos estudos que busquem elucidar a compressão da interação planta-patógeno e uso de recursos genéticos para obtenção de genótipos resistentes.

Palavras-chave: Banco Ativo de Germoplasma, descritores morfológicos, *Colletotrichum*, metabôlômica.

Abstract

PADILHA, Henrique Kuhn Massot. **Genetic resources of peppers (*Capsicum*, Solanaceae): genetic diversity, resistance to anthracnose and production of secondary metabolites.** 2017. 107f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The consumption of peppers (*Capsicum*, Solanaceae) increases progressively, due to diversity, multiplicity of usage and the functional properties of the fruits. One of the problems that limit the peppers productivity is anthracnose, a recurrent fungal disease in South of Brazil, results in losses to producers and consumers. Facing this problem, the wide genetic diversity found in peppers represents an important source of new alternatives. The general objective of this work was to contribute to the characterization of genetic resources of *Capsicum* peppers. The thesis is presented in form of three chapters, whose objectives were to perform morphological characterization of peppers accessions from the *Capsicum* Genebank of Embrapa Temperate Agriculture, to evaluate the genetic divergence and estimate the entropy of descriptors; we performed the evaluation of peppers accessions reaction to anthracnose, as well as to identify possible new sources of resistance; and to perform the metabolomic evaluation of contrasting peppers accessions to anthracnose response. In the first chapter, 21 accessions of peppers (*C. baccatum* and *C. chinense*) were characterized using 47 morphological descriptors. A wide genetic diversity was verified for the evaluated characters. The descriptors flower position, stigma position, ripe fruit color, pungence and plant length presented high entropy. In the second chapter, the same accessions were evaluated for anthracnose response. It was possible to differentiate them through inoculation of *Colletotrichum acutatum* isolate. The fruits were detached and inoculated in two maturation stage. Accessions did not present complete resistance to anthracnose. Great genetic diversity was observed to anthracnose response. Anthracnose resistance of peppers was expressed differently according to fruit maturation stage. Among evaluated accessions, P27 presented greater resistance to the disease and P175 more susceptibility. In the third chapter, metabolomic evaluation of contrasting accessions for anthracnose resistance was performed. Liquid chromatography, gas chromatography and mass spectrometry were used for analyzes. Different metabolomic responses were observed for pepper accessions. The concentration of specialized metabolites in peppers fruits varies according to maturation stage. Capsaicinoids and capsinoids content in fruits did not influence resistance to anthracnose. The production of butane-2,3-diol, L-threitol, D-fructose and α -D-glucopyranoside in fruits was affected by anthracnose. The study of relationship of pepper fruit compounds in response to pathogen's attack, generates information about resistance and susceptibility process, as well as instigates new studies that aim to understand the plant-pathogen interaction and the usage of genetic resources to obtain resistant genotypes.

Key-words: Genebank, morphological descriptors, *Colletotrichum*, metabolomics.

Lista de figuras

CAPITULO I - Diversidade morfológica e entropia em pimentas (*Capsicum baccatum* e *Capsicum chinense*, Solanaceae)

Figura 1 Acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado que foram avaliados neste trabalho. **27**

Figura 2 Dendrograma de 21 acessos de *Capsicum*, obtido pelo método hierárquico (UPGMA) baseado na distância euclidiana, com base em 47 descritores morfológicos. **29**

CAPÍTULO II - Resposta à antracnose em acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae)

Figura 3 Gabarito utilizado na determinação do tamanho das lesões provocadas pelo fungo *Colletotrichum acutatum* em frutos de pimenta (*Capsicum*, Solanaceae). **50**

Figura 4 Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos imaturos e maduros dos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) avaliados. **57**

Figura 5 Diferentes reações à antracnose manifestada através dos sintomas nos frutos maduros dos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) avaliados aos 10 dias após a inoculação. **59**

Figura 6 Diferentes reações dos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) à antracnose. Sintomas da doença em frutos imaturos e maduros do acesso P27 (*C. baccatum*) e acesso P175 (*C. chinense*) aos 10 dias após a inoculação. **60**

CAPITULO III - Metabolômica de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) contrastantes para resistência à antracnose

Figura 7 Cromatograma dos capsaicinoides e capsinoides identificados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) obtido por CL-EM/EM). **76**

Figura 8 *Heatmap* obtido a partir da análise de *cluster* e visualização **78**

dos dados metabólicos encontrados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae).

- Figura 9** Tempo de retenção (tr) e massa carga (m/z) dos principais metabólitos identificados por PLS-DA. **79**
- Figura 10** Perfil de fragmentação dos principais metabólitos identificados por PLS-DA encontrados através da espectrometria de massa nas amostras de *Capsicum* (Solanaceae). **80**
- Figura 11** *Cloud plot* dos compostos metabólitos presentes nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). **82**
- Figura 12** Metabólitos encontrados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) por CG-EM a partir do teste de *Cloud plot Multigroup* e cromatogramas de íon extraído. **83**

Lista de tabelas

CAPÍTULO I – Diversidade morfológica e entropia em pimentas (*Capsicum baccatum* e *C. chinense*, Solanaceae)

Tabela 1 Acessos, nome popular, espécie e procedência dos acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado avaliados. **22**

Tabela 2 Agrupamento de 21 acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, segundo o método de otimização de Tocher, baseado em 47 descritores morfológicos. **30**

Tabela 3 Caracteres avaliados, classes fenotípicas, frequência de acessos (FA) em cada uma das classes e entropia dos caracteres (H) nos acessos de *Capsicum* avaliados. **32**

CAPÍTULO II - Resposta à antracnose em acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae)

Tabela 4 Acessos, nome popular, espécie e procedência dos acessos de *Capsicum* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado avaliados. **47**

Tabela 5 Incidência da doença (%), diâmetro da lesão aos 10 dias após a inoculação (DAI) e período de incubação em frutos imaturos (FI) e frutos maduros (FM) nos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) inoculados com *Colletotrichum acutatum*. **52**

Tabela 6 Velocidade de crescimento da lesão (mm/dia) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para frutos imaturos e maduros nos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) inoculados com *Colletotrichum acutatum*. **54**

Tabela 7 Coeficientes de correlação de Pearson entre os pares de variáveis avaliadas nos acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado inoculados com isolado de *Colletotrichum acutatum*. **57**

CAPITULO III - Metabolômica de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) contrastantes para resistência à antracnose

- Tabela 8** Acesso, reação à antracnose, fase de maturação, sanidade e nomenclatura adotada para as amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). **64**
- Tabela 9** Características físico-químicas (pH, Acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST) dos frutos de *Capsicum* avaliados. Resultados de acidez expressos em g de ácido cítrico 100g⁻¹ do fruto em base úmida; SST: expresso em °Brix. **72**
- Tabela 10** Compostos fitoquímicos totais das amostras de frutos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). **73**
- Tabela 11** Capsaicinoides (capsaicina e dihidrocapsaicina), capsinoides (dihidrocapsiate e nordihidrocapsiate) e escala Scoville de pungência (*Scoville heat unit*, SHU) identificados e quantificados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). **76**
- Tabela 12** Descrição dos principais metabólitos identificados por PLS-DA a partir das análises por CL-EM/EM nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). **81**
- Tabela 13** Quantificação dos compostos metabólicos encontrados por CG-EM nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). **84**
- Tabela 14** Análise de variância pelo teste F comparando o conteúdo de enzimas dos diferentes tratamentos nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). **86**
- Tabela 15** Concentrações das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), polifenoloxidase (PPO), superoxidodesmutase (SOD) e peroxidase (POD) nos frutos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) avaliados. **87**

Sumário

1. Introdução geral.....	15
2. CAPÍTULO I – Diversidade morfológica e entropia em pimentas (<i>Capsicum baccatum</i> e <i>C. chinense</i>, Solanaceae).....	20
2.1 Introdução.....	20
2.2 Material e métodos.....	22
2.3 Resultados e discussão.....	27
2.4 Conclusões.....	38
3. CAPÍTULO II – Resposta à antracnose em acessos de pimentas (<i>Capsicum</i>, Solanaceae)	39
3.1 Introdução.....	39
3.2 Material e métodos.....	48
3.3 Resultados e discussão.....	52
3.4 Conclusões.....	60
4. CAPÍTULO III – Metabolômica de pimentas (<i>Capsicum</i>, Solanaceae) contrastantes para resistência à antracnose.....	61
4.1 Introdução.....	61
4.2 Material e métodos.....	64
4.3 Resultados e discussão.....	73
4.4 Conclusões.....	88
5. Considerações finais.....	89
Referências.....	91

1. Introdução geral

Ao longo da história evolutiva das pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) ocorreram diferentes rearranjos e combinações gênicas, mutações e tipos de seleções que refletem na atual diversidade de formatos, tamanhos, cores, sabores, aromas, pungências e composição nutricional de seus frutos. Existe uma diversidade de locais onde as plantas são cultivadas e de etnias que cultivam este gênero. Atualmente, as pimentas são utilizadas no mundo todo, consumidas *in natura* ou como condimento, fornecendo pungência, aroma e cor na culinária (BOSLAND; VOTAVA, 2012; ALI et al., 2016).

Os frutos são ricos em compostos antioxidantes e vitaminas. Eles produzem grandes quantidades de vitamina C, provitamina A, vitamina E, flavonoides, tiamina (B1), riboflavina (B2) e niacina (B3). Um único fruto de pimenta, normalmente contém a quantidade suficiente ou mais de ácido ascórbico (vitamina C) que um ser humano adulto necessita diariamente, que é 60 mg (URREA-LÓPEZ et al., 2014).

As pimentas estão entre as primeiras espécies a serem domesticadas no hemisfério ocidental. De fato, o gênero *Capsicum* possui uma relação antiga de uso pelos povos nativos das Américas. Registros arqueológicos evidenciaram a presença de vestígios de milho e pimenta em utensílios de cerâmica utilizados por eles há cerca de 9.000 anos (PERRY et al., 2007). Quando os navegadores europeus tiveram o primeiro contato com estas plantas, cinco diferentes espécies já tinham sido domesticadas de forma independente, em diferentes regiões nas Américas (México, América Central e América do Sul). As espécies domesticadas são *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. e *C. pubescens* Ruiz & Pav. (IPGRI, 1995).

Não há consenso sobre a taxonomia e o número de espécies do gênero *Capsicum*, mas existem pelo menos 32 espécies silvestres e cinco espécies domesticadas. As espécies de pimentas são diplóides e predominantemente realizam autofecundação. As espécies domesticadas possuem o mesmo número de cromossomos, $2n=2x=24$, mas algumas espécies silvestres possuem $2n=2x=26$. O tamanho do genoma de *C. annuum* (3,48GB) é quatro vezes maior do que o do tomate (*Solanum lycopersicum*) (KIM et al., 2014).

As espécies domesticadas pertencem a três *pool* gênicos distintos, que agrupam também algumas espécies silvestres. Embora as barreiras de hibridização

entre estes *pool* gênicos sejam rompidas pela ação do homem, isso dificilmente aconteceria na natureza. Os grupos foram divididos em três complexos: complexo *Capsicum pubescens*, que consiste nas espécies *C. pubescens*, *C. eximium* Hunz. e *C. cardenasii* Heiser & P.G.Sm.; complexo *Capsicum baccatum*, consiste em *C. baccatum*, *C. praetermissum* Heiser & P.G.Sm. e *C. tovarii* Eshbaugh, P.G.Sm. & Nickrent; e complexo *Capsicum annuum*, que consiste em *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. chacoense* Hunz. e *C. galapagoense* Hunz. (BOSLAND; VOTAVA, 2012; SIKORA et al., 2014).

A sensação de ardência é a característica mais marcante em pimentas do gênero *Capsicum*. Isso se deve a produção de alcaloides sintetizados na placenta dos frutos e também no pericarpo para aquelas pimentas extremamente pungentes (BOSLAND et al., 2015). O grau de ardência é mensurado pela escala Scoville, criada em 1912 em homenagem ao farmacêutico Wilbur Scoville que desenvolveu o primeiro método de avaliação sensorial de pungência em pimentas. O método consiste em realizar diluições necessárias para que a pungência não seja perceptível pelo avaliador, ou seja, uma amostra com valor de 20.000 SHU indica que foi necessário diluir vinte mil vezes para que a pungência não fosse mais percebida (WAHYUNI et al., 2013). Atualmente, existem métodos precisos e eficientes de extração, detecção e quantificação de capsaicinoides, como cromatografia líquida, cromatografia gasosa e espectrometria de massas (DUELUND et al., 2016).

Alguns tipos de pimentas, denominadas popularmente de pimentas “nucleares”, apresentam altíssimo teor de pungência, ultrapassando 1.000.000 SHU (*Scoville Heat Unit*), por exemplo *Bhut Jolokia*, *Trinidad Scorpion*, *Naga Morich*, *Trinidad Moranas*, *Carolina Reaper*. Outros tipos conhecidos de pimentas apresentam níveis de pungência diferentes, como, *Jalapeño* (20.000 SHU), *dedo-de-moça* (30.000 SHU), *malagueta* (100.000 SHU) e *Habanero* (200.000 SHU). Alguns genótipos não possuem pungência, o que se deve a mutações no genoma que inibem a produção de capsaicinoides. Alguns genótipos de espécies domesticadas como *C. annuum* (pimentão), *C. baccatum*, *C. chinense* não apresentam pungência, assim como espécies silvestres de *C. ciliatum* (Kunth) Kuntze e *C. lanceolatum* (Greenm.) C.V.Morton & Standl (SAXENA et al., 2016; PADILHA et al., 2016).

Os maiores produtores de pimentas *Capsicum in natura* no mundo são a China (15 milhões de toneladas/ano), o México (2,8 milhões de toneladas/ano) e a

Turquia (1,9 milhões de toneladas/ano). Para pimentas desidratadas, os países que se destacam são a Índia (1,3 milhões de toneladas/ano), a China (275 mil toneladas/ano) e o Paquistão (164 mil toneladas/ano) (FAOSTAT, 2016). Na última década a produção mundial de pimentas teve um aumento significativo. Em 2011, a produção gerou 14,4 bilhões de dólares, sendo 40 vezes maior que o valor obtido em 1980. Da mesma forma, o consumo continua a aumentar, principalmente devido ao valor nutricional e propriedades funcionais de seus frutos (KIM et al., 2014).

No Brasil, existe uma grande diversidade de pimentas cultivadas pelos agricultores. Não existe um dado exato sobre a produção no país, mas estima-se que exista em torno de 5 mil hectares de área plantada com produção de 250 mil toneladas/ano. A produtividade varia de acordo com o tipo de pimenta, por exemplo, a dedo-de-moça produz em torno de 25 t/ha, enquanto que a *Jalapeño* em torno de 45 t/ha (REIFSCHNEIDER, 2000).

Existem coleções de germoplasma conservando os mais variados tipos de pimentas. A coleção do USDA (United States Department of Agriculture - National Plant Germoplasm System) localizada em Griffin, Geogia, nos Estados Unidos, mantém mais de 5000 acessos de *Capsicum* provenientes de vários continentes. Outras importantes coleções de pimenta são mantidas por AVRDC (Asian Vegetable Research and Development Center) em Tainan, Taiwan; CATIE (Centro Agronómico Tropical de Invertigations y Ensenanza) em Turrialba, na Costa Rica; CGN (Centre of Genetic Resources) em Wageningen, na Holanda e CIGG (Central Institute for Genetics and Germoplasm) em Gatersleben, na Alemanha (BOSLAND; VOTAVA, 2012). No Brasil, a Embrapa mantém três Bancos Ativos de Germoplasma de *Capsicum*: o Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças (em Brasília, DF), o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado (em Pelotas, RS) e o Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Amazônia Oriental (em Belém, PA).

Para minimizar os efeitos da perda de recursos genéticos, a conservação de germoplasma é uma das mais eficientes ferramentas utilizadas ao redor do mundo. O enriquecimento das coleções de germoplasma por meio de coleta e intercâmbio, a conservação em bancos de germoplasma, a caracterização e a utilização do germoplasma em programas de melhoramento, visando à exploração da variabilidade genética disponível, constituem medidas fundamentais de valorização dos recursos genéticos (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008). O conhecimento sobre

os diferentes acessos conservados deverá ser o mais detalhado possível, para permitir sua identificação, diferenciação e direcionar de forma eficiente seu uso (RODRIGUES et al., 2010).

A antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é a principal doença no cultivo de pimenta no sul do Brasil. Ela pode danificar todos os órgãos da planta, como ramos, folhas e principalmente os frutos, tanto antes como depois da colheita (AGRIOS, 2005; SAXENA et al., 2016). As infecções podem resultar em 100% de perdas durante o armazenamento (PRUSKY, 1996, ALI et al., 2016). Os sintomas da antracnose nos frutos de *Capsicum* são característicos: geralmente apresentam lesões deprimidas circulares ou angulares, com anéis concêntricos de acérvulos que estão geralmente úmidos, e produzem massa conidial que varia da cor rosada a alaranjada. A doença se espalha rapidamente para outras plantas, principalmente em ambientes de elevada umidade e temperatura (BOSLAND; VOTAVA, 2012).

A antracnose teve um papel fundamental para a diminuição do cultivo de pimentas no município de Tururu – RS, capital nacional da pimenta vermelha (NEITZKE, 2012). A doença dizimou lavouras de pimentas dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*) e fez com que parte dos agricultores da região substituíssem esse cultivo por outros. Devido a este fato, Tururu diminuiu muito a produção de pimentas durante alguns anos, em especial na safra 2000/2001. Atualmente, o município continua com notoriedade pelo cultivo de pimentas, principalmente devido ao incremento da diversidade e variabilidade das espécies cultivadas e nos produtos vendidos pelos produtores de *Capsicum* desta região.

Fontes de resistência à estresses bióticos são encontrados na natureza, ou naquelas variedades crioulas conservadas e mantidas por agricultores (BARBIERI et al., 2014). Em meio aos métodos de controle, o uso de cultivares resistentes é considerado o mais efetivo deles e também o menos agressivo ao produtor e ao ambiente (THAN et al., 2008; PARK et al., 2012). A resistência pode ser conferida pela produção de compostos únicos de cada espécie de planta, como metabólitos especializados, os quais possuem potencial antifúngico. Tratando-se de pimentas, onde a diversidade e variabilidade genética é extremamente ampla, muitas características não foram ainda totalmente exploradas para seu devido uso (PICKERSGILL, 1997).

Os metabólitos especializados produzidos pelas plantas podem contribuir com a resistência às doenças. Abhayashree et al. (2016) observaram maior atividade de enzimas de defesa como fenilalanina amonialiase (PAL) e peroxidase (POX) em frutos de *C. annuum* contra a antracnose. Os compostos fenólicos produzidos pelas plantas exercem um papel de defesa contra os patógenos, seja contra fungos, bactérias e insetos, e a sua concentração na planta é alterada de acordo com o nível de estresse (TREUTTER, 2006; KOSHIMÄKI et al., 2009). Chaves & Gianfagna (2007) estudando dois genótipos de cacão (*Theobroma cacao*) com comportamento contrastante à vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) observaram elevados níveis de procianidinas (flavonoides) nas folhas dos genótipos resistentes quando comparados aos suscetíveis.

Considerando o exposto acima, este trabalho teve como objetivo geral contribuir para o conhecimento dos recursos genéticos de acessos de *Capsicum* que fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado. Desta forma, serão apresentados a seguir três capítulos, cujos objetivos são, respectivamente, avaliar a diversidade morfológica e entropia de acessos de pimentas, avaliar a resposta à antracnose em acessos de pimentas e avaliar os metabólitos especializados em pimentas relacionados a resposta à antracnose.

CAPITULO I

Diversidade morfológica e entropia em pimentas (*Capsicum baccatum* e *C. chinense*, Solanaceae)¹

2.1 Introdução

As pimentas *Capsicum*, são consumidas mundialmente, com os mais diversos usos, mas principalmente na alimentação, devido à pungência dos frutos que conferem sabor único aos alimentos. Os frutos de pimenta podem ser consumidos frescos ou desidratados, como condimento. Extratos de pimenta são usados em produtos cosméticos e farmacêuticos. Além do uso na alimentação, como condimento e medicinal, as pimentas também possuem uso ornamental quando cultivadas em jardins ou em vasos (BOSLAND; VOTAVA, 2012; AGUIAR et al., 2015).

O centro de origem das pimentas *Capsicum* cultivadas e silvestres é o continente americano. As pimentas estão entre as primeiras espécies a serem domesticadas no hemisfério ocidental. O gênero *Capsicum* possui uma relação antiga com os povos nativos americanos. Quando os navegadores europeus tiveram o primeiro contato com estas plantas, cinco diferentes espécies já tinham sido domesticadas de forma independente, em diferentes regiões nas Américas: *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*. Esta domesticação precoce se deve ao fato das pimentas serem bastante utilizadas pelos indígenas, principalmente na medicina. A partir das grandes navegações do século XVI, as pimentas foram introduzidas em diferentes países e etnias e atualmente se encontram dispersas pelo mundo (BOSLAND; VOTAVA, 2012; CHIOU et al., 2014).

Existe uma grande diversidade genética entre as espécies do gênero, assim como variabilidade genética dentro de cada uma das espécies (PADILHA et al., 2016). Para facilitar e padronizar o método de caracterização morfológica de espécies vegetais, o IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*) desenvolveu uma lista padronizada com 50 descritores para pimentas *Capsicum* (IPGRI, 1995). Os descritores são geralmente caracteres altamente herdáveis que podem ser facilmente observados por identificação visual e são igualmente expressos em todos os ambientes (RODRIGUES et al., 2010).

¹ Trabalho publicado na revista International Journal of Current Research

De acordo com os valores de entropia e frequência dos acessos para cada descritor é possível verificar o comportamento de cada característica avaliada. A entropia será maior conforme o aumento do número de classes fenotípicas e quanto mais equilibrada é a proporção da frequência do acesso na classe. Assim, para um descritor morfológico com duas classes fenotípicas, a menor entropia ocorre quando uma das classes fornece 100% e outra 0% para os acessos avaliados (HILL, 1973; VIEIRA et al., 2008).

A caracterização dos recursos genéticos é imprescindível para a manutenção e garantia de preservação, pois a medida que se utilizam os acessos incrementa-se sua conservação, evitando a perda dos recursos genéticos e favorece a disponibilidade de genótipos para uso imediato ou futuro. Da mesma forma, os programas de melhoramento genético de plantas são habilitados pela disponibilidade de informações detalhadas da diversidade genética do germoplasma (HILL et al., 2013). Trabalhos realizados nos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) permitem facilitar a escolha de acessos com potencial para o melhoramento, tornando mais eficiente a seleção já que se tem um melhor conhecimento das características individuais do acesso de interesse.

No Brasil são cultivadas variedades crioulas de pimentas do gênero *Capsicum*, com grande diversidade genética. Parte destes recursos genéticos são conservados em BAGs. Em 2002, foi instituído o BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS). Atualmente, o BAG mantém 403 acessos das cinco espécies domésticas (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*) provenientes de doações feitas por agricultores (variedades locais) e colecionadores de pimenta, e aquisição em mercados populares.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de proceder a caracterização morfológica de acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, avaliar a divergência genética e estimar a entropia dos caracteres avaliados.

2.2 Material e Métodos

Foram avaliados 21 acessos de *Capsicum* (12 acessos de *C. baccatum* e 9 de *C. chinense*) que fazem parte do acervo do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado. Na Tabela 1 estão listados os 21 acessos avaliados, com nome popular, espécie e procedência.

Tabela 1 – Acessos, nome popular, espécie e procedência dos acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado avaliados.

Acesso	Nome popular	Espécie	Procedência
P27	pimenta amarela	<i>Capsicum baccatum</i>	Renascença, PR
P34	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Renascença, PR
P41	pimenta	<i>Capsicum chinense</i>	Pedro Afonso, TO
P157	pimenta pitanga	<i>Capsicum chinense</i>	Rio de Janeiro, RJ
P164	cambuci	<i>Capsicum baccatum</i>	Guarujá, SP
P169	estrela do mar	<i>Capsicum baccatum</i>	Belo Horizonte, MG
P171	pimenta	<i>Capsicum chinense</i>	São Paulo, SP
P175	murupí doce	<i>Capsicum chinense</i>	Salvador, BA
P179	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Rio Grande, RS
P209	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Pelotas, RS
P223	pimenta café ardida	<i>Capsicum baccatum</i>	Rio de Janeiro, RJ
P225	pimenta biquinho suave	<i>Capsicum chinense</i>	Rio de Janeiro, RJ
P232	pimenta dedo de moça suave	<i>Capsicum baccatum</i>	Rio de Janeiro, RJ
P235	pimentinha dedo-de-moça	<i>Capsicum baccatum</i>	Belém do Pará, PA
P239	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Pelotas, RS
P249	pimenta de bico doce	<i>Capsicum chinense</i>	Rio de Janeiro, RJ
P273	pimenta	<i>Capsicum chinense</i>	Pelotas, RS
P275	pimenta dedo-de-moça	<i>Capsicum baccatum</i>	Turuçu, RS
P286	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Cachoeira do Sul, RS
P299	habanero	<i>Capsicum chinense</i>	Pelotas, RS
P319	pimenta acerola	<i>Capsicum chinense</i>	Belém, PA

Os acessos foram semeados em setembro de 2014 em bandejas de poliestireno expandido preenchidas com substrato comercial esterilizado, as quais foram mantidas em casa-de-vegetação. Após 15 dias da data de semeadura, todos os acessos haviam germinado. Para evitar danos decorrentes da mudança brusca de ambiente, antes do transplante para o campo, foi realizada aclimatização gradual das mudas durante um período de 20 dias, com a transferência das bandejas da casa-de-vegetação para a área externa durante cerca de seis horas por dia. Quando

atingiram em torno de 10 cm de estatura, as mudas foram transplantadas para o campo experimental previamente preparado, na Embrapa Clima Temperado, no espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,3 m entre fileiras.

Os canteiros foram cobertos com plástico tipo *mulching* preto, para o controle de plantas invasoras e manutenção da umidade do solo. As plantas foram irrigadas, sempre que necessário, por sistema de irrigação localizada por gotejamento. A água utilizada foi captada, através de um sistema de bombas, de um açude localizado próximo à área de cultivo das pimentas. O solo teve a correção do pH efetuada e foi adubado conforme a recomendação técnica para pimentão (*C. annuum*) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004). Foi utilizado delineamento experimental completamente casualizado com dez plantas por parcela experimental.

Para a caracterização morfológica, foram empregados 47 descritores qualitativos estabelecidos pelo International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI (1995), com algumas alterações sugeridas por Carvalho et al. (2003). Os descritores qualitativos selecionados e seus respectivos estados, estão listados a seguir.

01) **espécie**: (1) *Capsicum annuum*; (2) *C. baccatum*; (3) *C. chinense*; (4) *C. frutescens*; (5) *C. pubescens*.

02) **cor da haste**: (1) verde; (2) verde com estrias violeta; (3) violeta.

03) **antocianina nodal**: (1) verde; (3) violeta claro; (5) violeta; (7) violeta escuro.

04) **formato da haste**: (1) cilíndrica; (2) angulada; (3) alada.

05) **pubescência da haste**: (3) esparsa; (5) intermediária; (7) densa.

06) **comprimento da planta (cm)**: (1) abaixo de 25; (2) 25-45; (3) 46-65; (4) 66-85; (5) acima de 85;

07) **hábito de crescimento**: (3) prostrado; (5) intermediário; (7) ereto; (9) outro.

08) **comprimento de dossel (cm)**: (1) até 80; (2) 80-120; (3) >120 a 160; (4) acima de 160;

09) **densidade de ramificação**: (3) esparsa; (5) intermediária; (7) densa.

10) **densidade de folhas**: (3) esparsa; (5) intermediária; (7) densa. 10) pubescência da folha: (3) esparsa; (5) intermediária; (7) densa.

11) **cor da folha**: (1) amarelo; (2) verde claro; (3) verde; (4) verde escuro; (5) violeta claro; (6) violeta; (7) variegada; (8) verde com antocianina.

- 12) **forma da folha:** (1) deltoide; (2) ovalada; (3) lanceolada.
- 13) **pubescência da folha:** (3) esparsa; (5) intermediária; (7) densa.
- 14) **dias para início de florescimento:** (1) até 30; (2) 31 a 60; (3) 61 a 90; (4) acima de 90;
- 15) **número de flores por axila:** (1) uma; (2) duas; (3) três ou mais; (4) muitas com entrenó curto; (5) uma e duas; (6) uma, duas e três; (7) duas e três; (8) duas, três e quatro.
- 16) **posição da flor:** (3) pendente; (5) intermediária; (7) ereta; (9) todas posições; (11) intermediária e ereta; (13) pendente e intermediária.
- 17) **cor da corola:** (1) branco; (2) amarelo claro; (3) amarelo; (4) amarelo esverdeado; (5) violeta com base branca; (6) branco com base violeta; (7) branco com margem violeta; (8) violeta; (9) branco esverdeado; (10) branco com mancha púrpura; (11) branco esverdeado com mancha púrpura.
- 18) **cor da mancha na corola:** (1) branco; (2) amarelo; (3) verde amarelado; (4) verde; (5) violeta; (6) sem mancha.
- 19) **cor da antera:** (1) branco; (2) amarelo; (3) azul pálido; (4) azul; (5) violeta; (6) amarelo com mancha azul-claro.
- 20) **cor do filamento:** (1) branco; (2) amarelo; (3) verde; (4) azul; (5) violeta-claro; (6) violeta; (7) azul-violeta.
- 21) **posição do estigma:** (3) inserto; (5) mesmo nível; (7) excerto; (9) mesmo nível e excerto; (11) inserto e mesmo nível; (13) inserto e excerto.
- 22) **pigmento do cálice:** (0) ausente; (1) presente.
- 23) **margem do cálice:** (1) inteiro; (2) intermediário; (3) dentado.
- 24) **construção anelar do cálice:** (0) ausente; (1) presente.
- 25) **cor do fruto imaturo:** (1) branco; (2) amarelo; (3) verde; (4) laranja; (5) violeta; (6) violeta escuro; (7) amarelo esverdeado; (8) verde amarelado; (9) branco amarelado; (10) marrom. Quando o fruto apresenta mais de uma cor de fruto imaturo, é considerada a cor do primeiro estágio.
- 26) **posição do fruto:** (3) pendente; (5) intermediário; (7) ereto; (9) todas; (11) pendente e intermediária; (13) pendente e ereto; (15) intermediário e ereto.
- 27) **cor do fruto maduro:** (1) branco; (2) amarelo limão; (3) amarelo laranja pálido; (4) amarelo laranja; (5) laranja pálido; (6) laranja; (7) vermelho claro; (8) vermelho; (9) vermelho escuro; (10) violeta; (11) marrom; (12) preto; (13) amarelo; (14) amarelo pálido.

- 28) **formato do fruto:** (1) alongado; (2) arredondado; (3) triangular; (4) campanulado; (5) retangular.
- 29) **comprimento do fruto (cm):** (1) até 1,0; (2) de 1,1 a 2,0; (3) de 2,1 a 4,0; (4) 4,1 a 8,0; (5) de 8,1 a 12,0; (6) acima de 12,0.
- 30) **largura do fruto (cm):** (1) até 1,0; (2) de 1,1 a 2,5; (3) 2,6 a 5,0; (4) 5,1 a 8,0; (5) acima de 8,0.
- 31) **massa fresca do fruto (g):** (1) até 1,0; (2) de 1,1 a 3,0; (3) de 3,1 a 9,0; (4) de 9,1 a 27,0; (5) de 27,1 a 81,0; (6) acima de 81.
- 32) **comprimento do pedúnculo (cm):** (1) até 2,0; (2) de 2,1 a 4,0; (3) de 4,1 a 6,0; (4) acima de 6,0.
- 33) **espessura da parede do fruto (mm):** (1) até 1,0; (2) de 1,1 a 2,0; (3) 2,1 a 3,0; (4) 3,1 a 4,0; (5) de 4,1 a 5,0; (6) acima de 5,0.
- 34) **ombro do fruto:** (1) agudo; (2) obtuso; (3) truncado; (4) cordado; (5) lobato.
- 35) **presença de pescoço na base do fruto:** (0) ausente; (1) presente.
- 36) **formato da ponta do fruto:** (1) pontiagudo; (2) truncado; (3) afundado; (4) afundado com ponta.
- 37) **apêndice na ponta do fruto:** (0) ausente; (1) presente.
- 38) **secção transversal do fruto:** (3) levemente corrugado; (5) intermediário; (7) corrugado.
- 39) **número de lóculos:** (1) um; (2) dois; (3) três; (4) quatro; (5) cinco.
- 40) **superfície do fruto:** (1) liso; (2) semi-rugoso; (3) rugoso; (4) liso com estrias; (5) semi-rugoso com estrias.
- 41) **persistência entre fruto e pedicelo:** (3) pouco persistente; (5) intermediário; (7) persistente.
- 42) **comprimento da placenta:** (1) até $\frac{1}{4}$ do comprimento do fruto; (2) de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ do comprimento do fruto; (3) acima de $\frac{1}{2}$ do comprimento do fruto.
- 43) **pungência:** (1) doce; (2) picante baixo; (3) picante médio; (4) picante alto.
- 44) **aroma do fruto:** (1) baixo; (2) médio; (3) alto.
- 45) **cor das sementes:** (1) amarelo; (2) marrom; (3) preto; (4) outra.
- 46) **superfície da semente:** (1) lisa; (2) rugosa; (3) corrugada.
- 47) **número de sementes por fruto:** (1) menor que 20; (2) de 20 a 50; (3) acima de 50.

Os dados qualitativos foram submetidos a análise estatística pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) baseado na distância euclidiana utilizando o programa R (v.3.1.2). Para verificar o ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma, foi obtido o coeficiente de correlação cofenética (r). O número ideal de grupos formados foi determinado de acordo com o critério de Mojena (MOJENA, 1977). Foi utilizado o ponto de corte baseado no critério $k = 1,25$ (MILLIGAN; COOPER 1985) para a definição dos grupos formados.

Os dados também foram submetidos à análise de divergência genética pelo procedimento de dados multicategóricos do programa computacional GENES (CRUZ, 2007). A metodologia consiste na obtenção de um índice em que são considerados vários caracteres simultaneamente, e cada caráter pode apresentar várias classes. Foi gerada uma matriz de dissimilaridade com base no complemento do coeficiente de coincidência simples. O índice leva em consideração a ocorrência e concordância de valores. A distância entre os genótipos i e j é dada pela fórmula $D_{ij} = (1-C) / (C+D)$, em que C é a concordância de valores, e D é a discordância. A partir das informações dessa matriz, os acessos foram agrupados pelo método de otimização de Tocher, utilizando o programa GENES (CRUZ, 2007).

Foi estimado o nível de entropia dos caracteres (H) por meio do coeficiente de entropia de Renyi, $H = - \sum p_i \ln p_i$, onde: a entropia é uma medida da frequência da distribuição de (n) acessos $P = (p_1, p_2 \dots p_s)$, sendo: $p_1 = f_i/n$ e $(p_1 + p_2 + \dots + p_s = 1)$ desde que $(n = f_1 + f_2 + \dots + f_s)$, onde $f_1, f_2, \dots f_n$, são as contagens de cada uma das classes no descritor considerado. A análise de entropia foi realizada com o auxílio do programa Multiv v.2.3 (PILLAR, 1997).

2.3 Resultados e Discussão

Foi possível observar diversidade e variabilidade genética nos acessos de *Capsicum* avaliados a partir da caracterização morfológica realizada neste trabalho, como pode ser observado na Figura 1.



Figura 1 – Acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado que foram avaliados neste trabalho. Foto: Henrique Padilha.

Foram realizados métodos estatísticos de agrupamento com o intuito de diferenciar os acessos mais divergentes e reunir aqueles semelhantes para as características morfológicas avaliadas (Figura 2 e Tabela 2). De acordo com o agrupamento (UPGMA) (Figura 2) com similaridade de 0,81 foram formados quatro grupos (G1, G2, G3 e G4), reunindo os acessos mais semelhantes. A correlação cofenética (r) obtida a partir do dendrograma e a matriz da distância genética foi 0,78. De acordo com Bussab (1990) valores de (r) maiores que 0,80 indicam boa representatividade.

No grupo 1, foram reunidos cinco acessos (P171, P225, P319, P157 e P249), todos pertencentes à espécie *Capsicum chinense*. Estes acessos apresentaram dias para florescimento (acima de 90 dias), constrição anelar nos frutos, formato de folha ovalada, mesma cor da mancha da corola (sem mancha) e margem do cálice intermediário. O grupo 2 reuniu quatro acessos, também da mesma espécie (*C. chinense*). Estes acessos apresentaram posição de fruto pendente, densidade de ramificação e hábito de crescimento intermediário.

O método de agrupamento UPGMA reuniu acessos com características semelhantes, indicando assim o melhor uso para eles. Por exemplo, o Grupo 1 (G1) reuniu cinco acessos (P171, P225, P319, P157 e P249), todos pertencentes à espécie *Capsicum chinense*. Estes apresentaram dias de floração acima de 90 dias, aspecto importante para o desenvolvimento de novas cultivares com ciclos mais curtos ou mais longos, permitindo aos agricultores o maior número de opções para a implantação da lavoura. Além disso, o G2 reuniu acessos com hábito de ramificação intermediário e hábito intermediário de crescimento de plantas. Estes aspectos são importantes porque influenciam diretamente a sua indicação de uso como cultivo em vasos, jardins ou campos. Além disso, características como altura da planta e diâmetro do dossel direcionam o planejamento da estrutura da lavoura (distância entre plantas, número de plantas por área).

Os grupos 1 e 2 pertencem a espécie *C. chinense*, enquanto os grupos 3 e 4 pertencem a *C. baccatum*. No dendrograma, é possível observar uma formação inicial de dois grandes grupos, separando essas duas espécies, o que já era esperado, uma vez que acessos da mesma espécie compartilham algumas características morfológicas similares. Essas características são utilizadas para identificar as espécies, por exemplo, *C. pubescens* é a única espécie que apresenta

sementes pretas; *C. baccatum* possui mancha na corola; *C. chinense* apresenta constrição anelar no cálice.

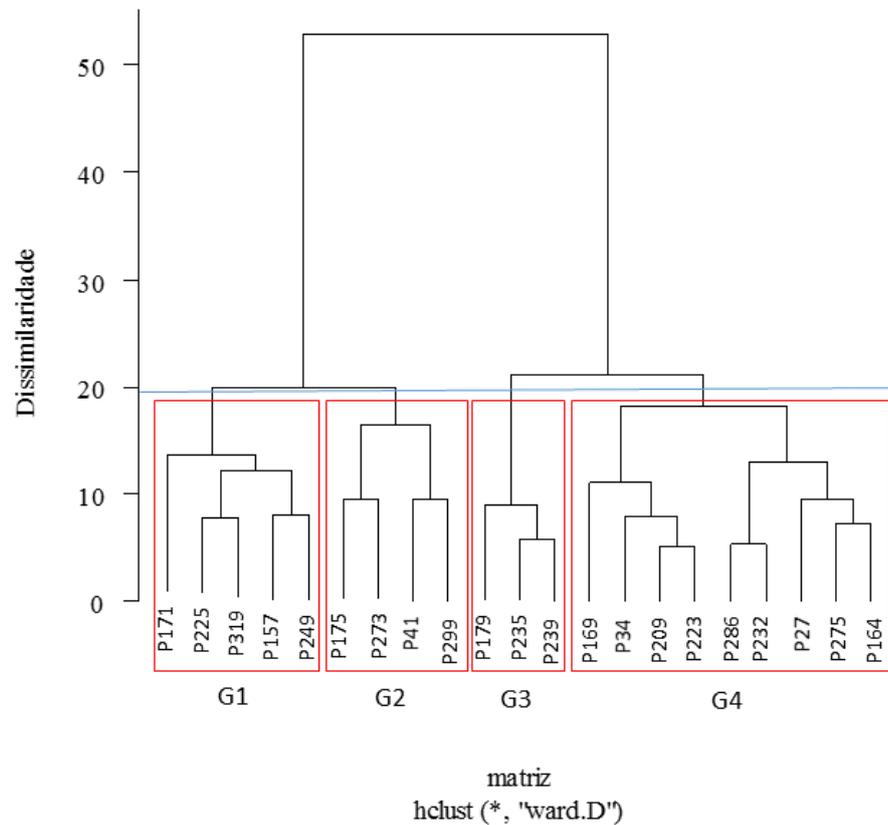


Figura 2 - Dendrograma de 21 acessos de *Capsicum*, obtido pelo método hierárquico (UPGMA) baseado na distância euclidiana, com base em 47 descritores morfológicos.

No grupo 3, foram reunidos três acessos (P179, P235 e P239) de *C. baccatum*. Todos apresentaram frutos alongados de cor vermelha quando maduros e posição pendente na planta, densidade de folhas intermediária, uma flor por axila, posição da flor intermediária, cor de corola branca e estigma amarelo. Por fim, o grupo 4 reuniu nove acessos, também de *C. baccatum*. Neste, estão presentes pimentas de tipo ornamental (P34, P169, P209 e P223), cambuci (P27 e P164) e dedo-de-moça (P286, P232 e P275). Outros autores também utilizaram o agrupamento UPGMA para identificar acessos de *Capsicum* mais similares de acordo com suas características morfológicas (BÜTTOW et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2014).

Também foi realizado o agrupamento de acordo com o método de Tocher (Tabela 2). Diferente do agrupamento UPGMA, neste foram formados 11 grupos

distintos baseados nas características morfológicas avaliadas. O grupo 1, reuniu acessos com persistência entre fruto e pedúnculo elevada, frutos com três lóculos, superfície do fruto semi-rugosa e pubescência da haste intermediária. No grupo 2 estão os acessos P27, P209 e P299, os quais apresentaram mesmo comprimento de dossel e densidade de ramificação (intermediária).

Tabela 2 - Agrupamento de 21 acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, segundo o método de otimização de Tocher, baseado em 47 descritores morfológicos. Pelotas – RS, 2016.

Grupos	Acessos
1	P179, P286, P275
2	P209, P27, P299
3	P232, P235, P175
4	P223, P273
5	P164, P169
6	P157, P319
7	P249, P34
8	P171
9	P41
10	P239
11	P225

Os grupos 3, 4, 6 e 7 reuniram acessos de diferentes espécies, mas, ainda assim, compartilharam algumas características em comum como, por exemplo, no grupo 3, todos os acessos apresentaram frutos de formato alongado, pendentes na planta e cor vermelha para fruto maduro. O grupo 5 reuniu dois acessos de *C. baccatum*, ambos apresentaram plantas de hábito intermediário, com frutos pendentes de formato campanulado. Os grupos 8 (P171), 9 (P41), 10 (P239) e 11 (P225) reuniram apenas um acesso em cada. O acesso P171 (*C. chinense*) apresenta características distintas dos demais acessos, como por exemplo, cor de haste e folhas violeta, cor de frutos imaturos violeta e cor da corola branco esverdeado com mancha púrpura. O agrupamento de Tocher foi eficiente para separação de grupos de acessos de *Capsicum* em outros trabalhos (FARIA et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2014).

Foi realizada a análise da entropia e a frequência dos acessos para cada descritor utilizado (Tabela 3). O termo entropia é amplamente utilizado em ecologia principalmente para modelagem de distribuição geográfica de espécies, um problema crítico na área de biologia da conservação. A entropia refere-se ao grau de aleatoriedade em qualquer sistema físico, onde pode ser usado para avaliar a diversidade e uniformidade de uma população específica (HILL, 1973). Assim,

quanto maior a desordem, maior a mudança do estado do sistema e, portanto, maior o grau de entropia. A entropia de um determinado descritor será mais elevada conforme aumenta o número de classes fenotípicas e quanto mais equilibrada for a proporção entre a frequência dos acessos nas diferentes classes. Ou seja, para um descritor morfológico com duas classes fenotípicas, a menor entropia ocorrerá quando uma das classes apresentar 100% e a outra classe 0% dos acessos avaliados.

Os descritores que obtiveram maiores valores de entropia foram posição da flor (1,48), posição do estigma (1,47), cor de fruto maduro (1,34), pungência (1,30) e comprimento de planta (1,29) indicando maior diversidade e variabilidade genética para essas características. Os descritores que obtiveram menores valores de entropia foram formato de haste, forma da folha, comprimento de placenta e cor de semente. Estes obtiveram valor zero de entropia, ou seja, foram monomórficos, onde todos os acessos receberam apenas uma classe para cada um desses descritores, como por exemplo, formato de haste angulada. Desta forma, cabe observar a grande variabilidade genética existente para a maioria dos descritores avaliados, onde apenas quatro foram monomórficos.

A variabilidade genética observada pode ser atribuída ao tipo de seleção realizada pelos agricultores ao longo dos anos e ao sistema de fecundação das plantas. Apesar de autofecundação ser a regra em pimentas domesticadas, pode ocorrer polinização cruzada dependendo do ambiente de cultivo (com vento e presença de insetos). Em cultivo protegido, a taxa de polinização cruzada é praticamente nula, no entanto, pode ser significativa em cultivo a campo aberto (RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008).

Vieira et al. (2008) avaliaram a entropia dos descritores morfológicos em acessos de mandioca (*Manihot esculenta*), identificaram caracteres com maior e menor variabilidade, e predisseram possíveis métodos de seleção utilizados pelos agricultores ao longo dos anos. Sugerem, por exemplo, que o carácter raízes sem contrições foi sempre selecionado ao longo dos anos, e isso se reflete em uma baixa entropia para esta característica, embora exista uma grande variabilidade genética para outras características morfológicas nos acessos de mandioca conservados no Banco Ativo de Germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados. Por outro lado, as características com elevada entropia (por exemplo, cor externa de caule), não possuem interesse agrônômico, e provavelmente foi pouco visada ao longo dos

anos de seleção, seja de modo consciente ou inconsciente, fato que permitiu a manutenção da variabilidade para este carácter.

Nas pimentas, existe grande diversidade genética para a maioria dos descritores avaliados, onde apenas quatro foram monomórficos. Isto representa o estado atual da diversidade genética de *Capsicum* e também reflete um pouco da história do processo de seleção realizado ao longo dos anos (BOSLAND; VOTAVA, 2012). Atualmente, existem diferentes tipos de formatos de frutos, arquitetura da planta e pungência e essas diferenças dependem diretamente da característica alvo. Por exemplo, a característica pungência dos frutos ($H = 1,30$) é muito mais interessante para a seleção, onde se podem explorar diferentes níveis de ardência quando comparado a uma característica pouco atrativa como formato de haste ($H = 0$).

A diversidade genética observada pode ser atribuída ao método de seleção utilizado pelos agricultores ao longo dos anos, especialmente para as variedades crioulas. Outro fato relevante é o sistema de reprodução das plantas. O processo de troca de material genético é diferente para espécies autógamas e alógamas. As espécies de pimentas domesticadas realizam autofecundação, mas pode ocorrer polinização cruzada dependendo do ambiente de cultivo. A taxa de polinização cruzada é praticamente nula em casa de vegetação, no entanto, pode ser bastante significativa no cultivo em campo aberto (RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008).

Tabela 3 - Caracteres avaliados, classes fenotípicas, frequência de acessos (FA) em cada uma das classes e entropia dos caracteres (H) nos acessos de *Capsicum* avaliados.

Descritor	Classes Fenotípicas	FA (%)	H
Cor da haste	Verde	19,05	0,85
	Verde com estrias violeta	76,19	
	Violeta	4,76	
Antocianina nodal	Verde	19,05	1,27
	Violeta claro	33,33	
	Violeta	4,76	
	Violeta escuro	42,86	
Formato da haste	Cilíndrica	-	0,00
	Angulada	100	
	Alada	-	
Pubescência de folha	Esparsa	-	0,53
	Intermediária	85,71	
	Densa	14,28	
Comprimento de planta (cm)	Menor que 25	-	1,29
	25-45	28,57	

	46-65	38,09	
	66-85	28,57	
	Maior que 85	4,76	
Hábito de crescimento	Prostrado	19,05	0,85
	Intermediário	76,19	
	Ereto	4,76	
	Outro	-	
Comprimento de dossel (cm)	Até 80	71,42	0,88
	>80 até 120	23,8	
	>120 a 160	4,76	
	Acima de 160	-	
Densidade de ramificação	Esparsa	14,29	0,53
	Intermediária	85,74	
	Densa	-	
Densidade de folha	Esparsa	9,52	0,93
	Intermediária	71,43	
	Densa	19,04	
Cor da folha	Amarelo	-	0,90
	Verde-claro	2,85	
	Verde	66,66	
	Verde-escuro	4,76	
	Violeta claro	-	
	Mesclado	-	
	Verde com antocianina	-	
Forma da folha	Deltoide	-	0,00
	Ovalada	100	
	Lanceolada	-	
Pubescência da folha	Esparsa	-	0,35
	Intermediária	95,23	
	Densa	4,76	
Dias para o florescimento	Até 30	-	0,53
	31 a 60	-	
	61 a 90	14,28	
	Acima de 90	85,71	
Número de flores por axila	Uma	19,05	1,23
	Duas	-	
	Três ou mais	-	
	Muitas com entrenó curto	-	
	Uma e duas	57,14	
	Uma, duas e três	19,05	
	Duas e três	-	
	Duas, três e quatro	4,76	
Pose da flor	Pendente	9,52	1,48
	Intermediária	28,57	
	Ereta	4,76	
	Todas posições	-	

	Intermediária e ereta	42,82	
	Pendente e intermediária	14,28	
Cor da corola	Branco	57,14	0,93
	Amarelo claro	-	
	Amarelo	-	
	Amarelo esverdeado	-	
	Violeta com base branca	-	
	Branco com base violeta	-	
	Branco com margem violeta	-	
	Violeta	-	
	Branco esverdeado	38,09	
	Branco com mancha púrpura	-	
	Branco esverdeado com mancha púrpura	4,76	
Cor da mancha da corola	Branco	-	0,69
	Amarelo	-	
	Verde amarelado	57,14	
	Verde	-	
	Violeta	-	
	Sem mancha	42,86	
Cor da antera	Branco	-	1,03
	Amarelo	57,14	
	Azul pálido	14,28	
	Azul	28,57	
	Violeta	-	
	Amarelo com mancha azul claro	-	
Cor do filamento	Branco	61,90	1,01
	Amarelo	-	
	Verde	-	
	Azul	-	
	Violeta claro	23,80	
	Violeta	14,28	
	Azul violeta	-	
Posição do estigma	Inserto	4,76	1,47
	Mesmo nível	14,28	
	Excerto	47,61	
	Mesmo nível e excerto	9,52	
	Inserto e mesmo nível	23,80	
	Inserto e excerto	-	
Pigmentação do cálice	Ausente	38,09	0,68
	Presente	61,90	
Margem do cálice	Inteiro	4,76	0,93
	Intermediário	38,09	
	Dentado	57,14	
Construção anelar	Ausente	57,14	0,69
	Presente	42,85	
Comprimento de Fruto (cm)	Até 1	-	0,94

	>1 a 2	4,76	
	>2 a 4	42,86	
	>4 a 8	33,33	
	>8 a 12	19,04	
	Acima de 12	-	
Largura de Fruto (cm)	Até 1	-	0,94
	>1 a 2,5	52,38	
	>2,5 a 5	42,86	
	>5 a 8	4,76	
	Acima de 8	-	
Peso de fruto (g)	Até 1	-	1,03
	>1 a 3	14,28	
	>3 a 9	47,61	
	>9 a 27	38,09	
	>27 a 81	-	
	Acima de 81	-	
Comprimento Pedúnculo (cm)	Até 2	9,52	1,01
	>2 a 4	47,61	
	>4 a 6	42,86	
	Acima de 6	-	
Espessura parede (mm)	Até 1	-	1,21
	>1 a 2	38,09	
	>2 a 3	47,61	
	>3 a 4	9,52	
	>4 a 5	4,76	
	Acima de 5	-	
Cor de fruto imaturo	Branco	-	1,13
	Amarelo	4,76	
	Verde	80,95	
	Laranja	-	
	Violeta	-	
	Violeta escuro	4,76	
	Amarelo esverdeado	4,76	
	Verde amarelado	4,76	
	Branco amarelado	-	
	Marrom	-	
Posição do fruto	Pendente	57,14	1,19
	Intermediário	-	
	Ereta	9,52	
	Todas	4,76	
	Pendente e intermediário	28,57	
	Pendente e ereto	-	
	Intermediário e ereto	-	
Cor de fruto maduro	Branco	-	1,34
	Amarelo limão	-	
	Amarelo laranja pálido	-	

	Amarelo laranja	-	
	Laranja pálido	4,76	
	Laranja	4,76	
	Vermelho claro	-	
	Vermelho	76,19	
	Vermelho escuro	4,76	
	Violeta	-	
	Marrom	-	
	Preto	-	
	Amarelo	4,76	
	Amarelo pálido	4,76	
Formato do fruto	Alongado	47,62	1,21
	Arredondado	-	
	Triangular	38,09	
	Campanulada	9,52	
	Retangular	4,76	
Ombro do fruto	Agudo	4,76	1,26
	Obtuso	28,57	
	Truncado	47,62	
	Cordato	19,04	
	Lobato	-	
Pescoço do fruto	Ausente	95,23	0,35
	Presente	4,76	
Formato da ponta do fruto	Pontiagudo	57,14	1,19
	Truncado (<i>blunt</i>)	28,57	
	Afundado	9,52	
	Afundado com ponta	4,76	
Apêndice na ponta do fruto	Ausente	80,95	0,58
	Presente	19,04	
Secção transversal	Levemente corrugado	28,57	1,09
	Intermediário	38,09	
	Corrugado	33,33	
Número de lóculos	Um	-	0,46
	Dois	-	
	Três	90,47	
	Quatro	9,52	
	Cinco	-	
Superfície do fruto	Liso	19,04	1,15
	Semi-rugoso	66,66	
	Rugoso	9,52	
	Liso com estrias	-	
	Semi-rugoso com estrias	4,76	
Persistência entre fruto e pedicelo	Pouco persistente	14,28	1,24
	Intermediário	47,62	
	Persistente	38,09	
Comprimento de placenta	Até ¼	-	0,00

	De $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$	-	
	Acima de $\frac{1}{2}$	100	
Pungência	Doce	42,86	1,30
	Picante baixo	33,33	
	Picante médio	14,28	
	Picante alto	9,52	
Aroma	Baixo	23,81	1,08
	Médio	42,86	
	Alto	33,33	
Cor da semente	Amarelo	100	0,00
	Marrom	-	
	Preto	-	
	Outros	-	
Superfície da semente	Lisa	95,23	0,35
	Rugosa	4,76	
	Corrugada	-	
Número de sementes por fruto	Menor que 20	-	0,53
	20 a 50	85,71	
	Acima de 50	14,28	

2.4 Conclusão

Os descritores morfológicos utilizados são eficientes para caracterizar os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado e evidenciar a diversidade genética nos acessos.

Os descritores posição da flor, posição do estigma, cor de fruto maduro, pungência e comprimento de planta apresentam elevada entropia, ou seja, existe maior variação para esses caracteres nos acessos avaliados. Os descritores formato de haste, forma da folha, comprimento de placenta e cor de semente apresentam entropia nula, uma vez que são monomórficos nos acessos avaliados.

3. CAPÍTULO II

Resposta à antracnose em acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae)²

3.1 Introdução

A antracnose é uma doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*. No cultivo de pimentas, ela pode danificar todos os órgãos da planta, como ramos, folhas e principalmente os frutos, tanto antes como depois da colheita (AGRIOS, 2005; SAXENA et al., 2016; SATO et al., 2016). As infecções podem resultar em 100% de perdas durante o armazenamento de frutos na pós-colheita (PRUSKY, 1996, ALI et al., 2016).

Colletotrichum acutatum é um fungo cosmopolita, ou seja, amplamente distribuído e que consegue sobreviver em diferentes e diversos tipos de ambiente no nosso planeta (PERES et al., 2005; DIAO et al., 2015). A doença atinge ampla gama de hospedeiros e consegue se desenvolver na planta a campo como também nos frutos após serem colhidos (BOSLAND; VOTAVA, 2012).

No gênero *Colletotrichum* estão presentes as espécies mais eficientes em patogenicidade de planta, capazes de causarem grandes perdas econômicas em cultivos de regiões tropicais, sub-tropicais e temperadas (OO; OH, 2016). No Brasil, a antracnose ocorre em todas as regiões produtoras de pimenta, sendo constatada desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste (SALGADO; TOKESHI, 1980; LOPES; ÁVILA, 2003).

Frutos de *Capsicum* foram identificados com sintomas pela primeira vez há mais de um século em Nova Jersey, Estados Unidos, por Halsted (1890) e ainda hoje coloca em risco regiões onde as pimentas são cultivadas (ALEXANDER; PERNEZNY, 2003; THAN et al., 2008).

Os sintomas da antracnose nos frutos de pimentas são bastante característicos, geralmente apresentam lesões deprimidas circulares ou angulares, com anéis concêntricos de acérvulos que estão geralmente úmidos, e produzem massa conidial que varia da cor rosada a alaranjada. A doença consegue se disseminar rapidamente para outras plantas dependendo das condições ambientais (BOSLAND; VOTAVA, 2012; THAN et al., 2008).

As estratégias utilizadas no controle da antracnose em *Capsicum* são uso de sementes sadias, rotação de cultivos com espécies que não sejam solanáceas,

² Trabalho será submetido para publicação na revista Journal of General Plant Pathology

eliminação de hospedeiros alternativos e restos culturais, controle biológico e o mais utilizado, a aplicação de fungicida (THAN et al., 2008; PARK et al., 2012). Porém, o uso contínuo de fungicidas afeta negativamente a saúde dos produtores e consumidores, assim como resulta em gasto econômico e impacto ambiental pela geração de resíduos (SUN et al., 2015). Em meio a todos esses métodos de controle, o uso de cultivares resistentes é considerado o mais efetivo deles (THAN et al., 2008; PARK et al., 2012).

Os fatores ambientais também influenciam no desenvolvimento da antracnose e sua epidemia. A relação entre intensidade de chuva, local de desenvolvimento da planta e presença de inóculo dispersante, podem resultar em diferentes níveis de severidade da doença (KANTO et al., 2014). Geralmente a infecção ocorre durante períodos de calor e umidade elevada. Temperaturas em torno de 27° C e alta umidade (em média 80%) são as condições ideais para desenvolvimento do fungo, e conseqüentemente da antracnose (ROBERTS et al., 2001).

3.1.1 Aspectos gerais e taxonomia do gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* pertence ao reino Fungi, filo Deuteromycota (Mitospóricos), classe Coelomycetes, ordem Melanconiales e família Melanconiaceae. *Colletotrichum* é a forma anamórfica (forma imperfeita ou assexuada) do fungo e sua forma teleomórfica (forma perfeita ou sexuada) é *Glomerella*, que pertence ao filo Ascomycota. Existem espécies na forma teleomórfica (por exemplo: *G. cingulata*, *G. acutata*), embora ainda hoje raramente encontradas. As espécies do gênero *Colletotrichum* são predominantemente observadas na forma assexuada, inclusive esta foi a primeira a ser encontrada (RÉBLOVÁ et al., 2011; CANNON et al., 2012).

O gênero *Colletotrichum* abrange mais de 100 espécies, e são responsáveis pela antracnose em diferentes espécies vegetais voltadas para alimentação, produção de fibra e pastagens (CROUCH et al., 2014). A antracnose é considerada um complexo etiológico, porque pode ser causada por diferentes espécies do gênero como *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides* (THAN et al., 2008; MAHASUK et al., 2009; MONGKOLPORN et al., 2010; PARK et al., 2012). No Brasil, *C. acutatum* é a espécie predominante, responsável por mais de 70% das ocorrências dessa doença no cultivo de pimentas (PEREIRA et al., 2011).

É possível diferenciar *C. acutatum* de outras espécies do gênero. Esta possui características distintas, no que se refere a morfologia de colônia, formato dos conídios, presença ou ausência de setas e escleródios, formato e tamanho do apressório (FREEMAN et al., 1998). Outras características como taxa de crescimento e sensibilidade ao fungicida benomyl tem sido bastante eficiente para diferenciar *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (PERES et al., 2005). KIM et al. (2004) relataram que diferentes espécies do fungo causam a doença em diferentes órgãos de uma planta de pimenta, por exemplo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* infectam os frutos em todas as fases de desenvolvimento, mas normalmente, não atacam folhas e ramos. Por outro lado, espécies de *C. coccodes* e *C. dematium* costumam atacar apenas estas partes da planta. Para suprir as falhas da tradicional caracterização morfológica de fungos, marcadores moleculares vêm sendo utilizados para auxiliar na taxonomia do gênero (MORIWAKI et al., 2002; PHOTITA et al., 2005; THAN et al., 2008). Recentemente o genoma completo de *C. acutatum* foi sequenciado e anotado, fornecendo mais uma ferramenta de auxílio na pesquisa sobre a resistência a antracnose (HAN et al., 2016).

3.1.2 Mecanismos de infecção do fungo

O ciclo da antracnose causada por *C. acutatum*, independente do hospedeiro atacado, possui características em comum. Geralmente, produzem acérvulos (corpos de frutificação) com conídios (esporos) em abundância. Localizam-se em um ou mais tecidos do hospedeiro. Os conídios são dispersos pela ação das gotas de chuva e assim, contaminam outras plantas (PERES et al., 2005). O fungo pode hibernar em hospedeiros alternativos, como por exemplo outras solanáceas, restos vegetais e frutos em decomposição no campo. Além disso, podem produzir microescleródios, que permitem sua dormência durante vários anos no solo (PRING et al., 1995; THAN et al., 2008; SAHITYA et al., 2014).

Para romper a superfície dos tecidos de frutos, hastes e folhas do hospedeiro, o gênero *Colletotrichum*, assim como outros fungos, possui uma estrutura chamada apressório. Os apressórios possuem diferentes formatos e tamanhos. Em geral, as formas variam entre globosas, ovóides ou oblongas, e o tamanho varia de 5 a 15 micrômetros de diâmetro. O apressório se origina a partir do tubo germinativo que é originado a partir do núcleo da célula do conídio (esporo assexual). Quando o tubo germinativo se desenvolve, simultaneamente, o núcleo desta célula realiza uma

divisão mitótica. Um núcleo permanece no conídio e o outro é transferido para o futuro apressório, o qual se desconecta do tubo germinativo pela formação de um septo (LIU et al., 2016). A parede celular do apressório imaturo começa a ficar mais espessa pela deposição de uma camada de melanina. O apressório adere-se à superfície do hospedeiro utilizando uma camada grossa de material adesivo (KUBO; TAKANO, 2013). Este processo completa-se com a emergência da estrutura de penetração, que rompe a cutícula e entra na epiderme da planta (KUBO; FURUSAWA, 1991; BECHINGER et al., 1999). O apressório também secreta pectinases e enzimas que degradam a parede celular, responsáveis por funções de infecção, adesão, sinalização e amolecimento da parede celular do hospedeiro (MENDGEN et al., 1996; KLEEMANN et al., 2012).

Existem espécies de *Colletotrichum* que se comportam como saprofitas, sobrevivendo no solo ou em matéria orgânica. Ou ainda, aquelas que podem sobreviver em associação com as plantas pelo mecanismo de latência (endofitismo), importante componente do ciclo de vida de fungos deste gênero. As grandes perdas na pós-colheita são causadas pelo atraso do aparecimento dos sintomas na planta a campo, onde o fungo está presente no fruto, mas vivendo de forma endofítica (sem causar sintomas) (YUAN et al., 2011). Elevados níveis de resistência podem resultar em latência, enquanto reduzida resistência leva a penetração da hifa e posterior manifestação da doença (KIM et al., 2004; CROUCH et al., 2014).

Como estratégia de sobrevivência, os fungos produzem hifas biotróficas intracelulares nas fases iniciais da doença e posteriormente ou simultaneamente formam hifas necrotróficas. Ou seja, *Colletotrichum* é um fungo hemibiotrófico (parasita facultativo), onde, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, pode se comportar como biotrófico ou como necrotrófico (SAHITYA et al., 2014).

Curiosamente, existem casos, ainda raros, em que membros deste gênero, conseguiram infectar organismos fora do reino vegetal, como insetos, tartarugas, gatos e humanos (CANO et al., 2004; SHIVAPRAKASH et al., 2011; CROUCH et al., 2014).

3.1.3 Resistência a patógenos em plantas

Epidemiologicamente, tolerância e resistência são conceitos diferentes (VANDERPLANK, 1963). Segundo Fry (1982), resistência é a característica de uma planta que restringe o desenvolvimento do patógeno e da doença. Resistência pode

ser conceituada como a habilidade da planta em suprimir, retardar ou prevenir a entrada ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (Parlevliet, 1997). Ou ainda, resistência é o retardo da infecção e crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro (Strange, 2003). As três definições não mencionam os efeitos da resistência sobre a produção da planta.

Existem dois processos que determinam a resistência para a maioria dos fitopatógenos: A resistência à patógenos acontece pelo fato da espécie de planta fazer parte de um grupo taxonômico que é naturalmente imune ao patógeno; a planta apresenta genes de resistência contra o patógeno, processo denominado de resistência verdadeira. A resistência verdadeira é geneticamente controlada pela presença de um, poucos ou muitos genes para resistência. Desta forma, o hospedeiro e o patógeno podem ser incompatíveis em menor ou maior grau, possivelmente pela falta de reconhecimento químico entre os dois ou porque a planta hospedeira se defende da infecção causada pelo patógeno (AGRIOS, 2005).

Van der Plank (1963) classificou a resistência de plantas às doenças em dois tipos: resistência vertical e resistência horizontal. A resistência vertical é também conhecida como resistência raça-específica, qualitativa, monogênica ou oligogênica (um ou poucos genes de efeito maior). Esta é pouco alterada pela ação do ambiente e a expressão da resistência é manifestada apenas de duas formas: resistência total ou suscetibilidade total, dependendo da interação com as raças do patógeno. Portanto, na resistência vertical há diferenciação entre raças do patógeno, uma vez que atua efetivamente contra determinadas raças específicas, mas não exerce ação alguma sobre outras. A resistência horizontal é também conhecida como raça não específica, quantitativa ou poligênica (vários genes de efeito menor). Esta pode ser alterada pelo efeito do ambiente, assim como levar a diferentes níveis de intensidade da doença. Existe interação de várias raças do patógeno em relação ao genótipo do hospedeiro e a planta atua tentando reduzir a taxa de progresso da doença (MIZUBUTI; MAFFIA, 2007).

3.1.4 Tolerância a patógenos em plantas

Segundo Caldwell et al. (1958), tolerância é a capacidade que a planta apresenta, em suportar a doença sem perdas severas em produtividade ou qualidade. Segundo Camargo (1995), tolerância refere-se à capacidade inerente ou adquirida de uma planta em suportar a infecção por patógeno (fungo, vírus,

nematoides, bactérias etc) sem que ocorram danos significativos em sua produção. Agrios (2005) define como a habilidade da planta produzir uma boa colheita, mesmo quando infectada por um patógeno. Vale ressaltar que incidência é uma medida de intensidade de doença normalmente quantificada pela porcentagem de plantas doentes em uma determinada área. A severidade é outra forma de medir intensidade de doença, porém, com base na porcentagem de tecido vegetal afetado pelo agente causal (patógeno).

Os conceitos apresentados anteriormente enfatizam que a produção e a intensidade de doença são as variáveis mais importantes para quantificar a tolerância. Tolerância envolve certo grau de compensação do dano causado pela doença. Plantas tolerantes produzem mais que plantas não tolerantes, submetidas a mesma intensidade de doença. Entretanto, embora as plantas tolerantes possam apresentar bons rendimentos quando doentes, maiores produções são alcançadas quando as plantas estão saudas (AGRIOS, 2005). Assim, quando se emprega o termo tolerância é necessário considerar o potencial produtivo das plantas, a intensidade de doença e a quantidade produzida. Tolerância é uma variável difícil de ser medida e facilmente confundida com a resistência horizontal.

3.1.5 Mecanismos de resistência da planta

As pimentas do gênero *Capsicum* apresentam características que auxiliam na resistência à doença, como mecanismos relacionados à fatores genéticos, metabólitos especializados, enzimáticos, bioquímicos, estruturais, escape etc. Durante o processo coevolutivo, as plantas desenvolveram estratégias para inibir o ataque de patógenos e garantir sua sobrevivência. Ao mesmo tempo, os patógenos igualmente desenvolveram inúmeros mecanismos para vencer a imunidade do hospedeiro, gerando insistentes estratégias de ataque e contra-ataque (BURDON et al., 2009). Porém, os patógenos apresentam vantagens seletivas sobre os genótipos hospedeiros, entre elas o rápido ciclo de vida e facilidade de liberação de novas combinações genéticas de patogenicidade, principalmente devido às mutações espontâneas e seus mecanismos próprios de recombinação sexual ou assexual (MATIELLO et al., 1997).

Abhayashree et al. (2016) observou maior atividade de enzimas de defesa como fenilalanina amonialiase (PAL) e peroxidase (POX) em frutos de *C. annuum* contra a antracnose. Os compostos fenólicos produzidos pelas plantas exercem um

papel de defesa contra os patógenos, seja contra fungos, bactérias e insetos, e a sua concentração na planta é alterada de acordo com o nível de estresse (TREUTTER, 2006; KOSHIMÄKI et al., 2009). Chaves & Gianfagna (2007) estudando dois genótipos de cacao (*Theobroma cacao*) com comportamento contrastante à vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) observaram elevados níveis de procianidinas (flavonoides) nas folhas dos genótipos resistentes quando comparados aos suscetíveis.

Geneticamente, a resistência do hospedeiro e a habilidade do patógeno em causar a doença é controlado por um par de genes, onde um gene de resistência (R) está presente na planta e o outro gene de avirulência (Avr) no patógeno. A resistência do hospedeiro é conferida pela presença de alelos dominantes em *locus* complementares, onde os alelos dominantes devem estar presentes no mesmo *locus* do fungo e da planta (FLOR, 1955). Porém, nem todas as resistências de plantas mantêm relações mendelianas de 3:1, algumas se comportam como variáveis quantitativas, as quais são controladas por muitos genes e influenciadas pelas condições do ambiente (ALLARD, 1960).

O padrão da herança de resistência depende das espécies de *Colletotrichum* e isolados, da fonte de resistência e também da fase de maturação do fruto. A resistência de PBC932 (*C. chinense*) à antracnose (*C. acutatum*) se deve a presença de um QTL maior localizado no cromossomo P5, tanto em frutos imaturos quanto maduros. Porém, foram identificados QTLs menores nos cromossomos P3, P7, P10 e P12 apenas em frutos imaturos, sugerindo maior resistência nesta fase de maturação (SUN et al., 2015).

As principais fontes de resistência à antracnose foram identificadas nas espécies *C. baccatum* e *C. chinense* (KIM et al., 2010; LEE et al., 2010). Foram identificadas fontes de resistência de amplo espectro nas duas espécies, *C. baccatum* (PBC80, PBC81, PI594137, PI497985-1 e PI260550) e *C. chinense* (PBC932) (MONTRI et al., 2009). PBC80 e PBC81 foram resistentes para a maioria dos isolados testados, enquanto PBC932 apresentou resistência para isolados de *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides* (KIM et al., 2008; THAN et al., 2008; PARK et al., 2009). Essas fontes de resistência foram identificadas pelo AVRDC (*Asian Vegetables Research and Development Center*) e são utilizadas por grupos de pesquisa para estudar a herança de resistência da antracnose (KIM et al., 2010; LEE et al., 2010; SUN et al., 2015). A identificação de genótipos resistentes é um

importante passo para diminuição de custos e do impacto ambiental provocado pela aplicação excessiva de fungicidas (PARLEVLIT, 2002; THAKUR, 2007).

3.1.6 Recursos genéticos de *Capsicum* como fontes de resistência à antracnose

Existem estudos que visam encontrar novas fontes de resistência a diversas doenças, ou pelo menos, compreender os mecanismos que conferem resistência, para assim, facilitar a obtenção de plantas mais adaptadas a situações de estresses bióticos (SUN et al., 2015; HAN et al., 2016). Genótipos foram identificados como potenciais resistentes à antracnose, seja em termos de conteúdo metabólico, sobrevivência de plantas ou estabilidade produtiva (KIM et al., 2008; SILVA et al., 2014). Esses genótipos representam uma importante fonte de recursos genéticos que podem ser incorporados em programas de melhoramento vegetal, e consequentemente melhores produtos para os produtores e consumidores.

Fontes de resistência a estresses bióticos são encontradas na natureza, ou naquelas variedades conservadas e mantidas por agricultores familiares. Essas variedades crioulas podem ser cultivadas com sucesso em ambientes com condições de estresses abióticos e bióticos, devido ao seu potencial de resiliência e adaptabilidade (BARBIERI et al., 2014). Tratando-se de pimentas, onde a diversidade e variabilidade genética é extremamente ampla, muitas características não foram ainda totalmente exploradas para seu devido uso (PICKERSGILL, 1997).

No Brasil, são cultivadas variedades crioulas de pimentas do gênero *Capsicum*, com grande diversidade genética. Parte destes recursos genéticos são conservados nos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs). Eles realizam importantes atividades de conservação e caracterização da diversidade genética das espécies cultivadas e de seus parentes silvestres, evitando a perda dos recursos genéticos e favorecendo a disponibilidade de genótipos para uso imediato ou futuro. Em 2002, foi instituído o BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS). Atualmente, o BAG mantém 403 acessos das cinco espécies domesticadas do gênero: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*. Dos acessos conservados, 61,29% (247) foram caracterizados morfológicamente, 14,89% (60) foram caracterizados quanto a compostos bioativos (compostos fenólicos, carotenoides e antocianinas) e atividade antioxidante nos frutos e 5,71% (23) foram submetidos à caracterização molecular com marcadores

microssatélites. Nenhum acesso do BAG havia sido caracterizado quanto à resposta à antracnose, que é uma doença preocupante na produção de pimentas no mundo e na região sul do Brasil.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a reação de frutos de acessos de pimentas à antracnose, e identificar possíveis fontes de resistência para o uso em programas de melhoramento genético.

3.2 Material e Métodos

Foram avaliados 21 acessos de *Capsicum* (12 acessos de *Capsicum baccatum* e 9 de *C. chinense*) que fazem parte do acervo do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado. Na Tabela 4 estão listados os 21 acessos avaliados, com nome popular, espécie e procedência.

Tabela 4 – Acessos, nome popular, espécie e procedência dos acessos de *Capsicum* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado avaliados.

Acesso	Nome Popular	Espécie	Procedência
P27	pimenta amarela	<i>Capsicum baccatum</i>	Renascença, PR
P34	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Renascença, PR
P41	pimenta	<i>Capsicum chinense</i>	Pedro Afonso, TO
P157	pimenta pitanga	<i>Capsicum chinense</i>	Rio de Janeiro, RJ
P164	cambuci	<i>Capsicum baccatum</i>	Guarujá, SP
P169	estrela do mar	<i>Capsicum baccatum</i>	Belo Horizonte, MG
P171	pimenta	<i>Capsicum chinense</i>	São Paulo, SP
P175	murupí doce	<i>Capsicum chinense</i>	Salvador, BA
P179	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Rio Grande, RS
P209	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Pelotas, RS
P223	pimenta café ardida	<i>Capsicum baccatum</i>	Rio de Janeiro, RJ
P225	pimenta biquinho suave	<i>Capsicum chinense</i>	Rio de Janeiro, RJ
P232	pimenta dedo-de-moça suave	<i>Capsicum baccatum</i>	Rio de Janeiro, RJ
P235	pimentinha dedo-de-moça	<i>Capsicum baccatum</i>	Belém do Pará, PA
P239	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Pelotas, RS
P249	pimenta de bico doce	<i>Capsicum chinense</i>	Rio de Janeiro, RJ
P273	pimenta	<i>Capsicum chinense</i>	Pelotas, RS
P275	pimenta dedo-de-moça	<i>Capsicum baccatum</i>	Turuçu, RS
P286	pimenta	<i>Capsicum baccatum</i>	Cachoeira do Sul, RS
P299	habanero	<i>Capsicum chinense</i>	Pelotas, RS
P319	pimenta acerola	<i>Capsicum chinense</i>	Belém, PA

Os 21 acessos foram semeados em setembro de 2014 em bandejas de poliestireno expandido preenchidas com substrato comercial esterilizado, as quais foram mantidas em casa-de-vegetação. Após 15 dias da data de semeadura, todos os acessos haviam germinado. Para evitar danos decorrentes da mudança brusca de ambiente, antes do transplante para o campo, foi realizada aclimatização gradual das mudas durante um período de 20 dias, com a transferência das bandejas da casa-de-vegetação para a área externa durante cerca de seis horas por dia. Quando

atingiram em torno de 10 cm de estatura, as mudas foram transplantadas para o campo experimental previamente preparado, na Embrapa Clima Temperado, no espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,3 m entre fileiras.

Os canteiros foram cobertos com plástico tipo *mulching* preto, para o controle de plantas invasoras e manutenção da umidade do solo. As plantas foram irrigadas, sempre que necessário, por sistema de irrigação localizada por gotejamento. A água utilizada foi captada de um açude localizado próximo à área de cultivo das pimentas por sistema de bombas. O solo teve a correção do pH efetuada e foi adubado conforme a recomendação técnica para pimentão (*C. annuum*) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004). Foi utilizado delineamento experimental completamente casualizado com dez plantas por parcela experimental. Foram realizadas duas coletas manuais de frutos, uma na fase de frutos imaturos e outra na fase de frutos maduros. Em ambas foram coletados dois frutos sadios de cada planta, totalizando vinte frutos por acesso em cada fase de maturação. A coleta se baseou na coloração e desenvolvimento de fruto.

3.2.1 Isolamento do patógeno

O isolado de *Colletotrichum acutatum* foi obtido a partir de lesões típicas de antracnose de frutos de pimenta. A determinação da espécie foi baseada em características morfológicas do fungo observadas com auxílio de microscópio óptico, na velocidade de crescimento micelial e aspectos morfológicos das colônias de cada isolado, quando cultivados em meio BDA. O isolamento foi realizado pela coleta de esporos presentes em uma única lesão com agulha esterilizada. Após as etapas rotineiras de limpeza e desinfestação do material, fragmentos da região de transição, entre a lesão e os tecidos sadios foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, foram incubados a 25 °C até a formação das colônias (entre sete e dez dias), expostos a alternância luminosa fornecida por lâmpadas fluorescentes (12h de claro/ 12h de escuro). Posteriormente, fragmentos do micélio de colônias características do gênero *Colletotrichum* foram transferidos para tubos contendo BDA e incubados nas mesmas condições para multiplicação do fungo.

3.2.2 Preparo da suspensão e inoculação

A suspensão de conídios foi preparada minutos antes de cada inoculação, a partir do cultivo do fungo *Colletotrichum acutatum* conservado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado. A concentração da suspensão foi calculada em câmara de Neubauer e ajustada para concentração de 10^5 conídios mL^{-1} . Para a inoculação foi utilizado micro injetor composto por uma seringa (modelo 1705 TLL) acoplada ao distribuidor PB600-1 (Hamilton, Switzerland) com agulha (1mm x 1mm), garantindo a estabilidade de profundidade de perfuração e quantidade de suspensão injetada. Foi inoculado 20 μL de suspensão no centro do pericarpo de cada fruto (KANCHANA-UDOMKAN et al., 2004). Os frutos foram inoculados e distribuídos de forma aleatória em bandejas plásticas (39 cm x 28 cm x 12 cm). As bandejas foram cobertas com plástico transparente para estabelecer uma câmara úmida e favorecer a manifestação de sintomas (GNIFFKE, 2003; SANTOS et al., 2004).

3.2.3 Avaliação de resistência em frutos

Após a inoculação, os frutos foram incubados no escuro a 25°C e 100% de umidade relativa (UR) por 24h. Nos dias posteriores a UR se manteve entre 80-90%. Os seguintes componentes de resistência foram utilizados para avaliação: (1) incidência da doença, obtida pela porcentagem de frutos infectados; (2) diâmetro de lesão, aos diferentes dias após inoculação, medido com auxílio de régua milimétrica; (3) período de incubação, medido em dias a partir da inoculação até o aparecimento do sintoma; (4) velocidade de crescimento de lesões, obtido pela mensuração sucessiva das lesões no tempo e calculado em mm/dia e (5) área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Para avaliação da AACPD foi utilizada escala de notas (uso de gabarito com diâmetros da lesão pré-estabelecidos), onde foi considerado o tamanho da lesão causada pelo fungo (Figura 3). As avaliações foram realizadas no período de 0, 4, 7 e 10 dias após a inoculação. Com os dados de severidade em cada avaliação foi calculado, para cada acesso, os valores da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) pela equação citada por SHANER & FINNEY (1977).

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(Y_i + 1 + Y_i)/2] * [(T_i + 1 - T_i)]$$

Onde:

n – é o número de observações.

Y_i – é a severidade da doença na “i”-ésima observação;

T_i – é o tempo em dias na “i”-ésima observação;

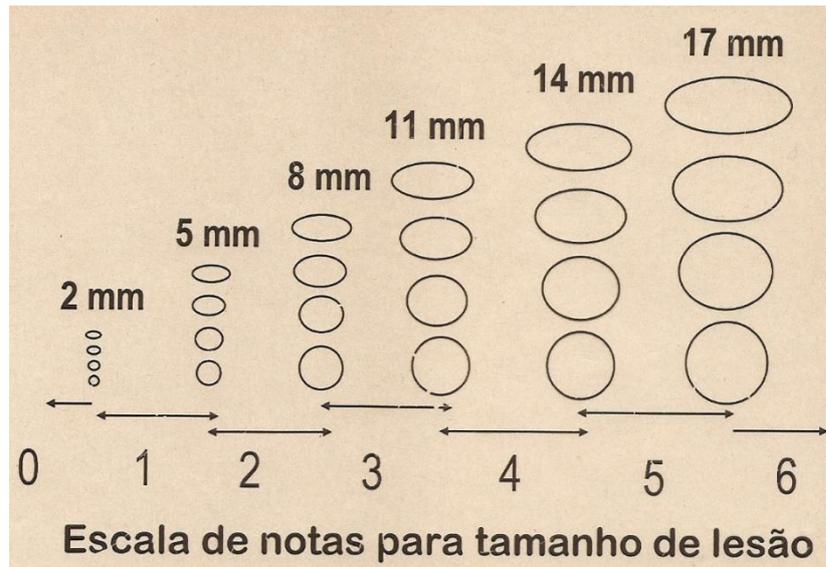


Figura 3 - Gabarito utilizado na determinação do tamanho das lesões provocadas pelo fungo *Colletotrichum acutatum* em frutos de pimenta (*Capsicum*, Solanaceae). Fonte: Bernardo Ueno.

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação dos valores médios das variáveis referentes aos acessos. Ao verificar a existência de diferença significativa entre tratamentos, de acordo com o valor de p associado ao teste F, foi avaliada a magnitude destas diferenças utilizando teste de comparações múltiplas. Foi utilizado o teste de Scott-Knott para a comparação de médias com 95% de confiança. Os dados foram submetidos à análise de correlação de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico R 3.2.0 (*Project for Statistical Computing*).

3.3 Resultados e Discussão

Os dados obtidos evidenciaram a presença de variabilidade genética para reação dos acessos de pimentas à antracnose, tanto em frutos imaturos como maduros.

A incidência da doença refere-se à porcentagem de frutos infectados em relação ao número total de amostras. Outros autores (KIM et al., 2008; SUN et al., 2015) utilizaram este parâmetro para diferenciar genótipos em relação a antracnose, tanto para uma população segregante de pimentas (*C. annuum*) como para frutos em diferentes fases de maturação. A incidência da doença variou de 80% a 100% para frutos imaturos e de 50% a 100% para frutos maduros após 10 dias de inoculação (DAI). Destaque para o acesso P27, que obteve menor incidência de doença nas duas fases de maturação (Tabela 5). A média da incidência da doença nos frutos imaturos (97%) foi superior à média dos frutos maduros (94%). Não houve acessos que apresentassem incidência nula da doença. Silva et al. (2014) observaram que o número de genótipos de pimentas (*C. baccatum* e *C. chinense*) infectados foi menor para frutos maduros quando comparados a frutos imaturos, tanto em condições de frutos na planta quanto para frutos destacados.

Para frutos imaturos, o acesso P27 foi o que apresentou menor diâmetro de lesão (10,84 mm) aos 10 DAI (Tabela 5). Em contrapartida, os acessos P164 (25,67 mm), P171 (25,94 mm), P175 (26,69 mm), P225 (26,44 mm) e P299 (26,65 mm) apresentaram maiores diâmetros de lesão para frutos imaturos, pertencendo ao grupo a. Para esta variável houve a formação de seis grupos distintos. Pereira et al. (2011) observaram lesões com diâmetros que variaram de 12 mm a 41 mm aos 11 DAI em frutos imaturos de 129 acessos de pimentas *Capsicum*. Em relação ao diâmetro da lesão aos 10 DAI para frutos maduros, houve a formação de três grupos. Os acessos P27 (7,49 mm), P179 (8,74 mm) e P232 (10,61 mm) foram os que obtiveram menores diâmetros de lesão, pertencendo ao grupo c. O diâmetro da lesão variou de 7,49 mm (P27) a 19,06 (P175). Em média, os valores de tamanho da lesão aos 10 DAI foram maiores para frutos imaturos (20,67 mm) quando comparados aos frutos maduros (15,35 mm). Santos et al. (2004), estudando a severidade da antracnose em frutos de *C. baccatum*, observaram valores de 27,1 mm (frutos imaturos) e 29,1 mm (frutos maduros) de diâmetros das lesões aos 8 DAI.

Tabela 5 – Incidência da doença (%), diâmetro da lesão aos 10 dias após a inoculação (DAI) e período de incubação em frutos imaturos (FI) e frutos maduros (FM) nos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) inoculados com *Colletotrichum acutatum*.

Acesso	Incidência da doença (%)		Diâmetro da lesão (mm)		Período de incubação (DAI)	
	FI	FM	FI	FM	FI	FM
P27	80	50	10,84 ± 1,16 f	7,49 ± 1,90 c	7	7
P34	100	100	21,45 ± 0,78 c	17,94 ± 0,42 a	3	4
P41	100	100	23,57 ± 0,77 b	18,56 ± 0,15 a	4	4
P157	100	100	23,88 ± 0,93 b	18,25 ± 0,16 a	3	3
P164	100	100	25,67 ± 0,40 a	17,47 ± 0,39 a	3	4
P169	100	100	14,76 ± 0,53 e	16,22 ± 0,42 a	4	3
P171	100	100	25,94 ± 0,34 a	16,89 ± 0,06 a	3	3
P175	100	100	26,69 ± 0,20 a	19,06 ± 0,10 a	3	3
P179	100	70	23,57 ± 0,73 b	8,74 ± 1,63 c	4	4
P209	100	100	23,05 ± 1,22 b	14,51 ± 0,33 b	4	6
P223	95	90	12,94 ± 1,01 e	14,35 ± 1,35 b	4	4
P225	100	100	26,44 ± 0,46 a	17,47 ± 0,45 a	3	4
P232	100	95	17,34 ± 1,19 d	10,61 ± 0,98 c	6	6
P235	100	100	19,16 ± 0,80 d	13,57 ± 1,12 b	4	4
P239	85	95	14,38 ± 1,24 e	14,19 ± 1,73 b	6	7
P249	100	100	23,83 ± 0,41 b	15,23 ± 0,41 a	3	4
P273	85	100	13,93 ± 1,03 e	18,74 ± 0,01 a	4	4
P275	100	85	22,95 ± 0,77 b	13,10 ± 1,39 b	4	4
P286	100	100	16,91 ± 0,57 d	12,48 ± 0,40 b	4	4
P299	100	100	26,65 ± 0,39 a	18,69 ± 0,01 a	3	3
P319	100	100	20,18 ± 0,63 c	18,70 ± 0,01 a	4	4
Média	97,38	94,52	20,67	15,35	3,95	4,24
CV	6,21	13,27	12,36	18,30	28,26	28,80

Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Scott Knott com 95% de probabilidade.

O período de incubação, que consiste no período de tempo (dias) entre a inoculação e o aparecimento de sintomas, variou de 3 a 7 DAI tanto para frutos imaturos quanto para frutos maduros (Tabela 5). Em média, o período de incubação para frutos maduros foi maior (4,2) do que para frutos imaturos (3,9). Em frutos maduros, os acessos P27 e P239 obtiveram maior período de incubação. Em

contrapartida, os acessos P157, P169, P171, P175 e P299 apresentaram menores períodos de incubação, manifestando sintomas iniciais após três dias de inoculação. Fungos do gênero *Colletotrichum* conseguem sobreviver na superfície do fruto sem causar danos nos tecidos. Elevados níveis de resistência podem levar a períodos de latência, enquanto baixos níveis de resistência podem facilitar a penetração da hifa (EDIRISINGHE et al., 2014). Quanto maior o período de incubação, maior o atraso para aparecimento de sintomas. Este pode ser um importante atributo na qualidade de pós-colheita de pimenta pois prolonga a vida de prateleira e durabilidade de seus frutos.

A velocidade de crescimento da lesão é uma forma de avaliar a reação do fungo inoculado nos diferentes acessos de *Capsicum* (Tabela 6). Em frutos imaturos, a velocidade de crescimento da lesão variou de 1,17 mm/dia (P27) a 2,64 mm/dia (P175). Em frutos maduros, o acesso P27 obteve menor velocidade de crescimento da lesão (0,832 mm/dia) enquanto os acessos P41, P157, P164, P171, P175, P225 e P299 obtiveram os maiores valores, pertencendo ao grupo a. Acessos que apresentaram menores velocidades de crescimento da lesão tendem a ser mais resistentes que aqueles que obtiveram maiores velocidades de crescimento da lesão. Tanto para frutos imaturos quanto para frutos maduros houve a formação de quatro grupos. Em média, a velocidade de crescimento da lesão foi maior para frutos imaturos (2,17 mm/dia) do que para frutos maduros (1,53 mm/dia). Pereira et al. (2011) observaram valores de velocidade de crescimento de lesão de 1,5 mm/dia a 3,6 mm/dia para frutos maduros de pimentas *Capsicum*. Os fungos utilizam os tecidos dos frutos como fonte de nutrientes para realizarem seu crescimento e desenvolvimento. Por outro lado, também existem compostos presentes nos frutos que podem inibir o desenvolvimento do fungo, como metabólitos especializados de efeito negativo para o estabelecimento do patógeno (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2013; WEBER et al., 2015; ABHAYASHREE et al., 2016). Neste processo, existe uma constante competição pela sobrevivência entre a planta e o patógeno.

Tabela 6 – Velocidade de crescimento da lesão (mm/dia) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para frutos imaturos e maduros nos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) inoculados com *Colletotrichum acutatum*.

Acesso	Velocidade de crescimento da lesão (mm/dia)		AACPD	
	FI	FM	FI	FM
P27	1,17 ± 0,17 d	0,83 ± 0,21 d	23,73 ± 4,31 f	19,80 ± 5,03 g
P34	2,21 ± 0,11 b	1,49 ± 0,12 b	64,4 ± 2,82 c	52,65 ± 3,86 d
P41	2,53 ± 0,11 a	1,94 ± 0,02 a	63,49 ± 4,16 c	73,80 ± 2,29 b
P157	2,52 ± 0,08 a	1,85 ± 0,04 a	76,22 ± 3,26 b	89,70 ± 3,35 a
P164	2,47 ± 0,06 a	1,92 ± 0,03 a	64,38 ± 7,44 c	75,78 ± 3,95 b
P169	1,54 ± 0,08 d	1,66 ± 0,04 b	44,85 ± 1,82 d	75,30 ± 2,34 b
P171	2,68 ± 0,05 a	1,87 ± 0,01 a	80,18 ± 2,46 a	77,47 ± 2,43 b
P175	2,64 ± 0,04 a	1,97 ± 0,02 a	82,72 ± 2,13 a	94,30 ± 1,79 a
P179	2,55 ± 0,09 a	1,05 ± 0,17 c	73,07 ± 3,68 b	26,92 ± 6,21 g
P209	2,29 ± 0,18 b	1,59 ± 0,03 b	58,70 ± 3,73 c	39,15 ± 3,24 f
P223	1,35 ± 0,16 d	1,24 ± 0,11 c	35,0 ± 3,14 e	44,10 ± 4,07 e
P225	2,73 ± 0,02 a	1,82 ± 0,03 a	71,36 ± 4,97 b	68,55 ± 3,89 b
P232	1,88 ± 0,17 c	1,16 ± 0,10 c	42,19 ± 3,83 d	31,72 ± 2,75 f
P235	2,07 ± 0,13 b	1,09 ± 0,09 c	49,62 ± 3,06 d	36,67 ± 3,79 f
P239	1,57 ± 0,20 d	1,16 ± 0,14 c	31,89 ± 4,27 e	37,42 ± 5,07 f
P249	2,75 ± 0,02 a	1,60 ± 0,03 b	82,07 ± 2,31 a	59,70 ± 4,71 c
P273	1,42 ± 0,16 d	1,55 ± 0,02 b	36,97 ± 1,97 e	56,70 ± 2,87 d
P275	2,45 ± 0,10 a	1,49 ± 0,03 b	63,60 ± 2,08 c	45,60 ± 4,93 e
P286	1,79 ± 0,11 c	1,34 ± 0,04 c	46,25 ± 1,60 d	44,32 ± 2,99 e
P299	2,88 ± 0,08 a	1,79 ± 0,03 a	71,26 ± 1,77 b	90,82 ± 3,28 a
P319	2,10 ± 0,09 b	1,58 ± 0,02 b	60,98 ± 1,68 c	61,95 ± 3,76 c
Média	2,17	1,53	58,23	57,26
CV	24,08	21,81	18,73	21,01

Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Scott Knott com 95% de probabilidade.

Houve variação para os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Figura 4). Para frutos imaturos, o acesso P27 obteve menor nota (23,73). Em contrapartida, os acessos P171 (80,18), P175 (82,72) e P249 (82,07) apresentaram os maiores valores (Tabela 6). Para frutos maduros, houve a formação de sete grupos. Os acessos P27 (19,8) e P179 (26,92) obtiveram menores valores para AACPD. Os acessos P157 (89,7), P175 (94,3) e P299 (90,82) apresentaram as maiores notas. Em média, os valores para frutos imaturos (58,23) foram ligeiramente superiores quando comparados aos frutos maduros (57,26). Resultados comparativos entre diferentes genótipos evidenciaram maiores valores

de AACPD em frutos maduros do que em frutos imaturos (SILVA et al., 2014; BOSLAND; VOTAVA, 2012). Entretanto, Kim et al. (1999) observaram sintomas mais severos em frutos imaturos do que em frutos maduros em pimentas *C. annuum*, concordando com os resultados observados no presente trabalho. De acordo com Sun et al. (2015), em ambas as fases de maturação foram observados QTLs de efeito maior no cromossomo 5, porém QTLs menores foram identificados apenas em frutos imaturos, sugerindo que nesta fase de maturação sejam mais resistentes do que quando maduros. Outro fato interessante, é de que a concentração de compostos fenólicos totais presente na planta auxilia na resistência ao ataque do fungo, e estes compostos foram observados em maiores concentrações em frutos imaturos (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2013; CASTRO-CONCHA et al., 2014). Porém essas informações não concordaram com as obtidas neste estudo, onde frutos maduros se mostraram mais resistentes à antracnose. Por outro lado, Jang et al. (2015) observaram maior atividade antioxidante em frutos com maturação mais avançada, o que corrobora com as informações obtidas neste trabalho. Deve-se levar em consideração que existe uma grande diversidade genética em pimentas, o que reflete em diferentes respostas nas amostras avaliadas neste trabalho e em outros trabalhos publicados (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2014).

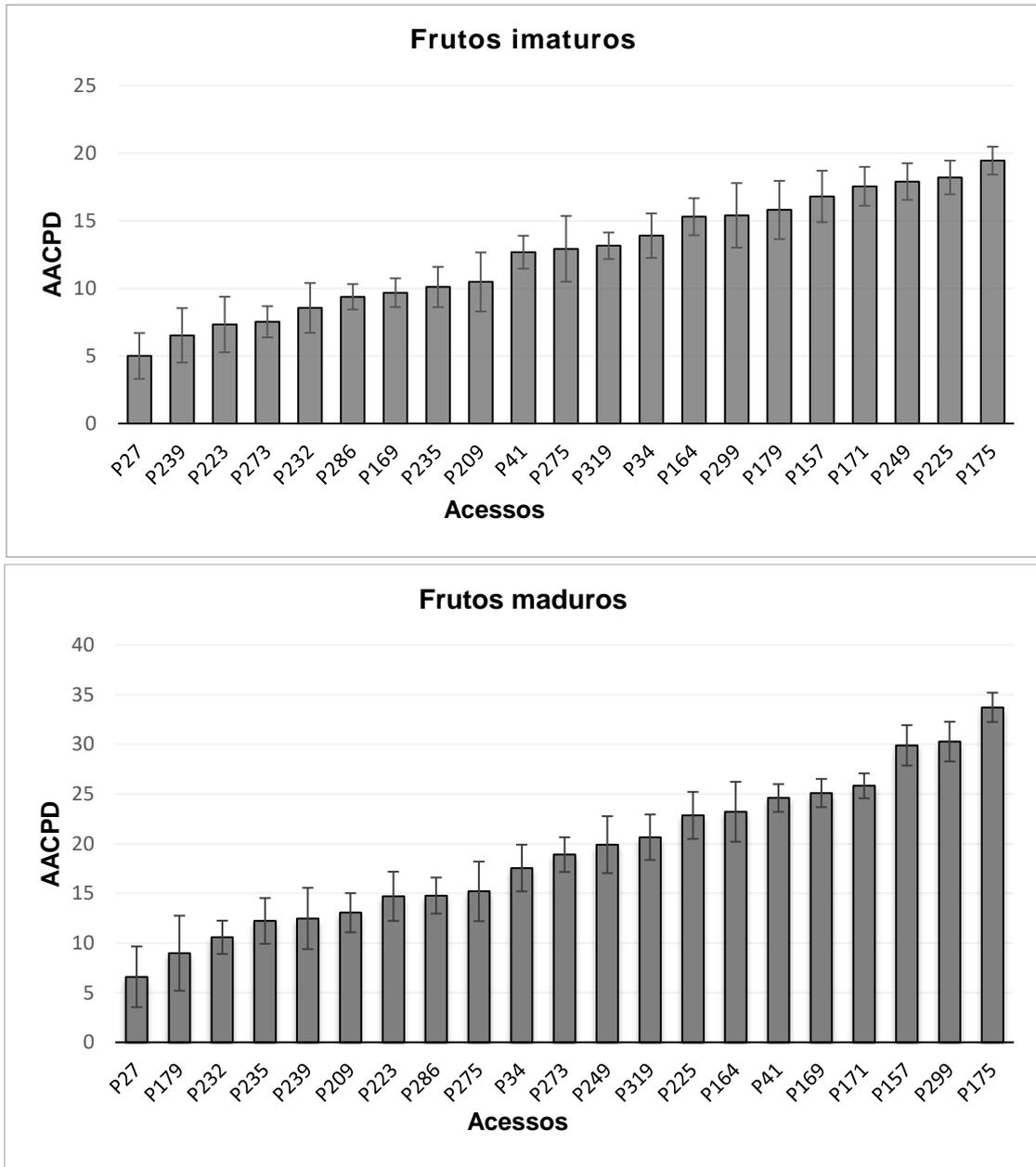


Figura 4 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos imaturos e maduros dos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) avaliados.

A presença de correlação entre as variáveis independentes foi analisada pelo coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 7). Foi observada elevada correlação (correlação superior a 0,70) entre as variáveis diâmetro de lesão em frutos imaturos e AACPD em frutos imaturos; diâmetro de lesão em frutos maduros e velocidade de crescimento de lesão em frutos maduros; diâmetro de lesão em frutos maduros e AACPD em frutos maduros; velocidade de crescimento de lesão em frutos maduros e AACPD em frutos maduros. A maior correlação foi encontrada entre diâmetro de lesão em frutos maduros e velocidade de crescimento da lesão em frutos maduros

(0,904). Para a maioria dos pares de variáveis foi observada uma correlação moderada (correlações entre 0,30 e 0,70). Houve baixa correlação (correlação inferior a 0,30) entre diâmetro de lesão em frutos imaturos e diâmetro de lesão em frutos maduros; diâmetro de lesão em frutos maduros e AACPD para frutos imaturos. Ou seja, existe baixa correlação para caracteres de fruto imaturo em relação a fruto maduro. Por exemplo, um acesso resistente na fase de frutos imaturos, não será obrigatoriamente resistente na fase de frutos maduros. Isso se deve principalmente ao fato da resistência ser controlada por diferentes genes de efeito maior e menor nas diferentes fases de maturação (SILVA et al., 2014; SUN et al., 2015).

Tabela 7 - Coeficientes de correlação de Pearson entre os pares de variáveis avaliadas nos acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado inoculados com isolado de *Colletotrichum acutatum*.

	DI	DM	VCI	VCM	AACPD IMAT	AACPD MAD
DI	-	0,275	0,686	0,412	0,848	0,404
DM	0,275	-	0,318	0,904	0,276	0,741
VCI	0,686	0,318	-	0,452	0,653	0,392
VCM	0,412	0,904	0,452	-	0,385	0,768
AACPD IMAT	0,848	0,276	0,653	0,385	-	0,410
AACPD MAD	0,404	0,741	0,392	0,768	0,410	-

DI: diâmetro da lesão em frutos imaturos; DM: diâmetro da lesão em frutos maduros; VCI: velocidade de crescimento da lesão em frutos imaturos; VCM: velocidade de crescimento da lesão para frutos maduros; AACPD IMAT: área abaixo da curva de progresso da doença em frutos imaturos; AACPD MAD: área abaixo da curva de progresso da doença em frutos maduros.

Foi possível observar ampla variação para a resposta à antracnose, assim como diferenciar os acessos de *Capsicum* avaliados e destacar aqueles com comportamentos contrastantes para a resposta de resistência à doença (Figura 5). De acordo com as variáveis respostas de incidência da doença, diâmetro da lesão, período de incubação, velocidade de crescimento da antracnose e AACPD, o acesso P27 merece destaque para os aspectos avaliados neste trabalho, uma vez que mostrou os menores sintomas de antracnose. Em contrapartida, o acesso P175 apresentou maiores notas referentes a manifestação e desenvolvimento de sintomas, assim como curto período de incubação, salientando maior suscetibilidade à doença. A reação de hipersensibilidade foi observada nos frutos do acesso P27 (Figura 6), a qual consiste na formação de pequenos pontos marrom escuros ao redor da perfuração realizada pela inoculação do fungo, o que indica a presença de

células necrosadas e caracteriza uma eficaz estratégia de resistência contra o patógeno (MAHASUK et al., 2009).



Figura 5 – Diferentes reações à antracnose manifestada através dos sintomas nos frutos maduros dos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) avaliados aos 10 dias após a inoculação.

Park et al. (2009) sugerem que *C. baccatum* possui maiores níveis de resistência à antracnose quando comparado a outras espécies do gênero, sendo uma importante fonte de recursos genéticos para a resistência à antracnose. Entretanto, de acordo com Mahasuk et al. (2009), acessos de *C. chinense* são mais utilizados no melhoramento de plantas para resistência à antracnose porque pertencem ao mesmo *pool* gênico que *C. annuum*, espécie amplamente cultivada e comercializada mundialmente, o que facilita a chance de sucesso na transferência de genes de resistência entre as espécies.



Figura 6 – Diferentes reações dos acessos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) à antracnose. Sintomas da doença em frutos imaturos e maduros do acesso P27 (*C. baccatum*) e acesso P175 (*C. chinense*) aos 10 dias após a inoculação.

3.4 Conclusão

A inoculação do fungo *Colletotrichum acutatum* nos frutos destacados é eficaz para diferenciar os acessos de pimentas (*Capsicum baccatum* e *C. chinense*) quanto à reação à antracnose. Os acessos avaliados não apresentam resistência total à antracnose. Existe variabilidade genética para resposta ao desenvolvimento da antracnose em frutos imaturos e maduros de pimentas. A resistência de pimentas à antracnose se expressa de forma diferente de acordo com a fase de maturação dos frutos. Dentre os acessos avaliados, P27 apresenta maior resistência à doença e P175 maior suscetibilidade.

4. CAPITULO III

Metabolômica de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) contrastantes para resistência à antracnose³

4.1 Introdução

O consumo e a produção de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) vêm crescendo ao longo dos anos, principalmente devido ao valor nutricional e propriedades funcionais de frutos, capazes de proporcionar benefícios à saúde de quem os consome (KIM et al., 2014). Porém, a produção de pimentas é comprometida pela antracnose, doença causada por fungos *Colletotrichum* spp., capazes de danificar todos os órgãos da planta, como ramos, folhas e principalmente os frutos, tanto antes como depois da colheita (THAN et al., 2008). Os sintomas da doença são bastante característicos, geralmente apresenta lesões deprimidas circulares ou angulares, com anéis concêntricos de acérvulos que estão geralmente úmidos, e produzem massa conidial que varia da cor rosada a alaranjada (BOSLAND; VOTAVA, 2012).

Dentre os métodos de controle, o cultivo de variedades é considerado o mais efetivo e também o menos agressivo ao produtor e ao ambiente. A resistência pode ser conferida pela produção de compostos únicos da planta, como metabólitos especializados, os quais possuem potencial antifúngico. A produção e a concentração desses compostos podem sofrer alterações dependendo da fase de desenvolvimento da planta, assim como infecção e/ou presença do patógeno no hospedeiro (THAN et al., 2008; PARK et al., 2012).

As plantas possuem mecanismos de sinalização para a ativação da expressão de genes que codificam para produção de metabólitos especializados de defesa aos patógenos (GUETSKY et al, 2005; LEE; BOSTOCK 2007). Por outro lado, os fungos também produzem metabólitos especializados usados como resposta ou ataque ao hospedeiro. As lacases, por exemplo, que pertencem à família das fenóis oxidases, são utilizadas por várias espécies de fungos para degradar lignina e compostos fenólicos de defesa produzidos pela planta (BALDRIAN, 2006). Liao et al. (2012) ao analisarem o isolado Coll-524 (*Colletotrichum acutatum*) identificaram intensa atividade da lacase com efetiva patogenicidade em frutos de pimentas *Capsicum*.

³ Trabalho será submetido para publicação na revista Scientia Horticulturae

Os compostos fenólicos presentes nas plantas, de modo geral, possuem função de defesa contra estresses bióticos (fungos, bactérias e insetos) e sua composição é alterada em resposta ao estresse (TREUTTER, 2006; KOSHIMÄKI et al., 2009). Chaves & Gianfagna, (2007) ao estudarem dois genótipos de cacão (*Theobroma cacao*) contrastantes para a doença vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), observaram maiores concentrações de procianidinas (flavonoides) nas folhas das plantas resistentes quando comparadas às suscetíveis. Guetsky et al. (2005) relataram que o aumento de epicatequina em frutos imaturos de abacate (*Persea americana*), influenciou positivamente o acúmulo do composto antifúngico AFD (1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene) que, subsequentemente levou à dormência do fungo *C. gloeosporioides*. Da mesma forma, Podila et al. (1993) e Kolattukudy et al. (1995) verificaram a indução química da germinação do conídio de *C. gloeosporioides* em abacate (*Persea americana*), onde a germinação dos conídios e a formação do apressório foram seletivamente estimuladas por um composto lipídico (cera) presente na superfície do fruto.

Existe uma constante competição entre planta e patógeno, onde, em uma relação coevolutiva, ambos buscam desenvolver mecanismos para garantir sua sobrevivência e gerar descendentes férteis (RAI; AGARKAR, 2016). Fontes de resistência a estresses bióticos são encontrados na natureza, ou em variedades crioulas (*landraces*) conservadas por agricultores (BARBIERI et al., 2014). As pimentas apresentam uma ampla diversidade genética e grande parte destes recursos genéticos são conservados em Bancos Ativos de Germoplasma. A partir da caracterização detalhada dos acessos conservados é possível diferenciá-los para muitos aspectos como, por exemplo, a resposta à antracnose, podendo ser uma excelente fonte para obtenção de novos genótipos resistentes (PICKERGILL, 1997).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização e avaliação metabolômica de acessos de pimentas contrastantes para resposta à antracnose. Assim, o estudo da relação dos compostos presentes nos frutos de *Capsicum* em resposta ao ataque do patógeno pode facilitar o entendimento do processo de resistência e suscetibilidade ao patógeno, facilitar a seleção de genótipos mais resistentes e estabelecer métodos de controle alternativo à doença.

4.2 Material e Métodos

Foram selecionados dois acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado com resposta contrastante para resistência à antracnose (*Colletotrichum acutatum*): P27 (*Capsicum baccatum*), resistente e P175 (*C. chinense*), suscetível. Os acessos foram semeados em setembro de 2014 em bandejas de poliestireno expandido preenchidas com substrato comercial esterilizado, as quais foram mantidas em casa-de-vegetação. Todos os acessos germinaram 15 dias após a semeadura. Quando atingiram em torno de 10 cm de estatura, as mudas foram transplantadas para o campo experimental previamente preparado, na Embrapa Clima Temperado, no espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,3 m entre fileiras. Os canteiros foram cobertos com plástico tipo *mulching* preto, para controle de plantas invasoras e manutenção da umidade do solo. Foi utilizado delineamento experimental completamente casualizado com dez plantas por acesso (parcela experimental). Foram coletados manualmente quatro frutos sadios de cada planta em cada fase de maturação (imaturo e maduro, determinados a partir da coloração), totalizando 80 frutos por acesso. Desse total, 40 frutos foram armazenados em *freezer* (-20°C) e 40 frutos foram levados para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado para inoculação.

4.2.1 Isolamento do patógeno

O isolado de *Colletotrichum acutatum* foi obtido a partir de lesões típicas de antracnose de frutos de pimenta. A determinação da espécie foi baseada em características morfológicas do fungo observadas com auxílio de microscópio óptico, na velocidade de crescimento micelial e aspectos morfológicos das colônias de cada isolado, quando cultivados em meio BDA. O isolamento foi realizado pela coleta de esporos presentes em uma única lesão com agulha esterilizada. Após as etapas rotineiras de limpeza e desinfestação do material, fragmentos da região de transição, entre a lesão e os tecidos sadios foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, foram incubados a 25°C até a formação das colônias (entre sete e dez dias), expostos à alternância luminosa fornecida por lâmpadas fluorescentes (12h de claro/ 12h de escuro). Posteriormente, fragmentos do micélio de colônias do fungo, foram transferidos para tubos contendo BDA e incubados nas mesmas condições para multiplicação.

4.2.2 Preparo da suspensão e inoculação

A suspensão de conídios foi preparada minutos antes de cada inoculação, a partir do cultivo do isolado de *C. acutatum* conservado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado. A concentração da suspensão foi calculada em câmara de Neubauer e ajustada para concentração de 10^5 conídios mL^{-1} . Para a inoculação foi utilizado um micro injetor composto por uma seringa (modelo 1705 TLL) acoplada ao distribuidor PB600-1 (Hamilton, Switzerland) com uma agulha (1 x 1 mm), garantindo a estabilidade de profundidade de perfuração e quantidade de suspensão injetada. Foi inoculado 20 μL de suspensão no centro do pericarpo de cada fruto (KANCHANA-UDOMKAN et al., 2004). Vinte frutos de cada acesso em cada fase de maturação foram inoculados com o isolado, totalizando 40 frutos por acesso. Os frutos inoculados permaneceram em bandejas com temperatura e umidade controlada durante dez dias para manifestação dos sintomas, e então foram armazenados em *freezer* (-20°C). Todos os frutos congelados (não inoculados e inoculados com o isolado de *Colletotrichum acutatum*) foram liofilizados e utilizados para análise metabolômica. A Tabela 8 apresenta a nomenclatura utilizada nas amostras a partir das variáveis formadas.

Tabela 8 – Reação à antracnose, fase de maturação, sanidade e nomenclatura adotada para as amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae).

Acesso	Reação à antracnose	Fase de maturação do fruto	Sanidade do fruto	Nomenclatura adotada
P27	Resistente	Imaturo	Sadio*	P27IS
P27	Resistente	Imaturo	Doente**	P27ID
P27	Resistente	Maduro	Sadio	P27MS
P27	Resistente	Maduro	Doente	P27MD
P175	Suscetível	Imaturo	Sadio	P175IS
P175	Suscetível	Imaturo	Doente	P175ID
P175	Suscetível	Maduro	Sadio	P175MS
P175	Suscetível	Maduro	Doente	P175MD

* Sadio = frutos não inoculados com o isolado de *Colletotrichum acutatum*; Doente = frutos inoculados com o isolado do fungo.

4.2.3 Sólidos solúveis, pH e acidez

O teor de sólidos solúveis dos frutos foi medido a 23°C utilizando refratômetro digital (Atago, PR-32 α), sendo os valores expressos em $^\circ$ Brix.

Para análise de pH e de acidez, foram adicionados 5 mL de água destilada a 500mg de amostra liofilizada. O pH foi determinado por leitura direta em pHmetro (Hanna Instruments HI2221). Para análise de acidez a mistura foi titulada utilizando

NaOH 0,1 mol L⁻¹ até pH 8,1. Os resultados foram expressos em % de ácido cítrico em 100 g⁻¹ de peso seco (AOAC, 2006).

4.2.4 Teor de compostos fenólicos totais

Para extração de compostos fenólicos, 500 mg de amostra liofilizada foram pesadas em tubos de polietileno de 50 mL protegidos da luz e homogeneizados por 1 minuto em ultraturrax (IKA T18 digital) com 20 mL de metanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos à 7500 x g em centrífuga (Eppendorf, 5430) refrigerada à 4°C. A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi conduzida conforme procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965) com modificações. Para a reação, 250 µL do sobrenadante foram diluídos em 4 mL de água ultrapura, adicionados de 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu 0,25 N e homogenizados no vortex (Phoenix, Ap-56). Após 3 minutos de reação foram adicionados 500 µL de carbonato de sódio 1 N (Na₂CO₃) e a mistura foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Jenway 6705 UV-Vis) no comprimento de onda de 725 nm. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pela curva de calibração com padrão externo de ácido gálico (0 a 250 µg mL⁻¹) e os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico em 100 g⁻¹ de peso seco.

4.2.5 Teor de carotenoides totais

A determinação do teor de carotenoides totais foi realizada de acordo com o método 970.64 modificado da AOAC (2006). Para isso, 500 mg de amostra foram pesados em tubos de 50 mL protegidos da luz. Foram adicionados 15 mL da solução extratora (hexano:acetona:etanol:tolueno, na proporção de 10:7:6:7), agitando por 1 minuto em vórtex. Logo após, foi adicionado 1 mL de hidróxido de potássio (KOH) em metanol 10% (m/v), homogeneizando em vórtex por 1 minuto e em seguida submetido a saponificação à quente (20 minutos em banho-maria a 56°C). A mistura permaneceu a 25°C por 1 hora e em seguida foram adicionados aos tubos 15 mL de éter de petróleo e o volume (50 mL) foi aferido com solução de sulfato de sódio (Na₂SO₄) 10% em água (m/v). Após 1 hora de repouso, foi realizada a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro (Jenway 6705 UV-Vis) no comprimento de onda de 450 nm. A quantificação dos carotenoides totais foi realizada utilizando curva de

calibração com padrão externo de β -caroteno (0 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos em mg equivalente de β -caroteno em 100 g^{-1} de peso seco.

4.2.6 Análise de capsaicínoides, capsínoides e perfil metabólico por CL-EM/EM

Para a extração, 150 mg de amostra liofilizada foram adicionadas em frascos de polipropileno com volume de 2 mL. Foram adicionados 1 mL de solvente extrator (acetonitrila) e homogeneizado em vórtex (Phoenix, AP - 56). Em seguida, foram submetidos a banho de ultrassom (Unique, Ultracleaner 1400 A) por 10 minutos. Foi realizada centrifugação a $13.000 \times g$ em temperatura ambiente por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o processo foi repetido. Os sobrenadantes foram combinados e filtrados em filtro de seringa de nylon ($0,45 \mu\text{M}$). Esse extrato foi utilizado para análise de capsacínoides, capsínoides e perfil metabólico.

4.2.6.1 Instrumentação e condições para CL-EM/EM

Dez microlitros de extrato foram injetados em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (Prominence UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Foram utilizadas pré-coluna C18 ($2,0 \times 4 \text{ mm}$) e coluna Luna C18 ($2,0 \times 150 \text{ mm}$, 100 \AA , $3 \mu\text{m}$) Phenomenex (Torrance, CA, USA). A fase móvel utilizada foi solução de ácido fórmico em água ($0,1\% \text{ v/v}$, eluente A) e acetoneitrila com $0,1\%$ ácido fórmico (eluente B) com fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura da coluna a 40°C . O gradiente de eluição foi: $0\text{--}1 \text{ min}$, $10\% \text{ B}$; $1\text{--}6 \text{ min}$, $98\% \text{ B}$; $6\text{--}15 \text{ min}$, $98\% \text{ B}$; $15\text{--}17 \text{ min}$, $10\% \text{ B}$; $17\text{--}25 \text{ min}$, $10\% \text{ B}$. O detector PDA foi programado para operar entre $210\text{--}370 \text{ nm}$.

O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo, com voltagem do capilar em 4500 V , pressão do gás de nebulização (N_2) de 2 bar , gás de secagem em 9 L/min e temperatura da fonte de 200°C . O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM , cobrindo toda a faixa de aquisição (de 50 até 1200 m/z). Os analitos monitorados foram $[\text{M}+\text{H}]^+$: nordihidrocapsaicina, $\text{m/z} = 294,2064$; capsaicina, $\text{m/z} = 306,2064$; dihidrocapsaicina, $\text{m/z} = 308,2220$; homodihidrocapsaicina, $\text{m/z} = 323,2377$, capsiate, $\text{m/z} = 307,1903$; dihidrocapsiate, $\text{m/z} = 309,2060$; nordihidrocapsiate, $\text{m/z} = 295,1904$.

4.2.6.2 Quantificação dos capsaicínoides e capsínoides

O teor de capsaicínoides e capsínoides foi quantificado por curva de calibração (39 a 2500 ng mL⁻¹) dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O teor de capsaicínoides foi quantificado em relação a curva de calibração da capsaicina (padrão externo). Os parâmetros utilizados para a validação do método de análise dos capsaicínoides e capsínoides foram faixa de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (AOAC 2006). Os resultados foram expressos em mg por 100 g do fruto em base seca.

4.2.6.3 Identificação dos metabólitos

Os compostos que apresentaram importância para discriminação das amostras foram submetidos ao processo de identificação. Os compostos foram identificados pelo comprimento de onda UV/Vis (220-700nm), comparação dos tempos de retenção com os padrões externos, razão massa/carga (*m/z*) e perfil de fragmentação da molécula. Essas informações foram comparadas em base de dados online como METLIN (SMITH et al., 2005), KEGG (KANEHISA et al., 2008) CHEBI (HASTINGS et al., 2013) e Massbank (HORAI et al., 2010) e referências bibliográficas.

4.2.7 Análise metabolômica por CG-EM

Para a extração, 30 mg de amostra liofilizadas foram pesadas em tubos de centrifuga (eppendorf) de 2 mL devidamente identificados. Em seguida, foram adicionados 1400 µL de metanol grau HPLC (-20°C) e agitados em vortex durante 10s. Logo após, foram adicionados 60 µL da solução de ribitol (0,2 mg mL⁻¹ em H₂O) como padrão interno quantitativo e novamente agitados em vortex por 10 s. Posteriormente, as amostras foram agitadas durante 10 min a 70°C em termomisturador a 950 x g. Em seguida, foram submetidas a centrifugação (Jouan) por 10 minutos a 11.000 x g. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de polietileno tipo falcon de 15 mL, devidamente identificado. Aos tubos falcon, foram adicionados 750 µL de clorofórmio grau HPLC a -20 °C e 10 µL da solução de antrona (1 mg mL⁻¹ em clorofórmio grau HPLC) como padrão interno. Em seguida, foram adicionados 1500 µL de água ultra-pura a 4°C e agitados em vortex por 10 s. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 22000 x g (centrifuga Sorval RC5C). Então foram obtidas duas frações: superior (metanol e água - polar) e inferior

(clorofórmio - apolar). Foram coletadas 150 μL da fração superior (polar) e transferidas para tubo de centrifuga de 1,5 mL, devidamente identificado. Posteriormente foram evaporadas até secagem com sopro de gás nitrogênio e derivatizadas. As amostras da fração inferior (apolar) foram transferidas (700 μL) para *vials* e analisadas em CG-EM sem qualquer reação adicional.

4.2.7.1 Derivatização da fração polar

Para a derivatização da fração polar, foram adicionados 40 μL do reagente de metoxiamação (cloridrato de metoxiamina 20 mg mL⁻¹ em piridina) às amostras, permanecendo por 2 h a 37°C em termomisturador. Foi realizada centrifugação a 3000 x g por 2 min. Posteriormente, foram adicionados às amostras 70 μL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), e a mistura permaneceu por 30 min a 37°C em termomisturador. A mistura foi centrifugada (3000 x g por 2 min) e o sobrenadante transferido para inserts-*vials* para análise por CG-EM.

4.2.7.2 Equipamento e condições do CG-EM

Para a análise, foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu). Foi injetado 1 μL de amostra com a temperatura do injetor a 230 °C, com razão de split 1:50 para injeção da fração polar e aplicação no modo *splitless* para a fração apolar, com o fluxo de gás carreador hélio ajustado para 2 mL.min⁻¹ utilizando velocidade linear como controle de fluxo. A separação cromatográfica foi executada com uma coluna capilar de 30 m MDN-35. O programa de temperatura foi isotérmico durante 2 min a 80°C, seguido de aumento de 15°C por min até atingir 320°C, e então, estabilizando esta temperatura durante 6 min. A temperatura de linha de transferência e fonte de íons foi ajustada para 250°C. A faixa de massa registrada foi de 70 a 600 m/z em 20 varreduras por segundos. Filamento corrente de polarização foi de -70 V e tensão de detector foi de aproximadamente 1700-1850 V.

4.2.8 Atividade enzimática

Para a preparação do extrato enzimático foi utilizada a metodologia descrita por Giannopolitis & Ries (1977) e Lemoine et al. (2010) com modificações. Foram pesados 200 mg de amostra e adicionado 12 mL de tampão (0,1 mol/L fosfato de sódio pH 7,8, 10 mmol/L de EDTA, 10 g/L polivinilpolipirrolidona (PVPP). A suspensão obtida foi agitada durante 45 min., e centrifugada a 13000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado para o ensaio das atividades enzimáticas. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína.

4.2.8.1 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método de Chance & Maehly (1955) com modificações. A reação da catalase foi realizada pela mistura de 1000 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7.0) e 8000 μL de água, mantidas a 28°C por 10 minutos. No momento da leitura foi adicionado 100 μL de peróxido de hidrogênio 2509 mM, e 100 μL de amostra. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm de 15 em 15 segundos durante 3 min.

4.2.8.2 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada de acordo com o método de Nakano & Asada (1981). A reação da ascorbato peroxidase foi realizada pela mistura de 1000 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, 100 μL de ácido ascórbico 10 mM e 700 μL de água mantidas a 28°C por 10 minutos. Logo após foi adicionado 100 μL peróxido de hidrogênio 2 mM e 100 μL de amostra no momento da leitura. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo da absorbância a 290 nm de 15 em 15 segundos durante 3 min.

4.2.8.3 Polifenoloxidase (PPO)

A atividade da polifenoloxidase foi determinada pelo método descrito por Kumar et al. (2008) com modificações. A mistura de reação continha 20 μL de extrato bruto e 260 μL de catecol em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 a

40°C. A atividade enzimática foi determinada pelo acréscimo da absorbância a 420nm.

4.2.8.4 Peroxidase (POD)

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com o método de Morales-Blancas et al. (2002). O substrato foi preparado pela mistura de 0,1 mL guaiacol, 0,1 ml de peróxido de hidrogênio e 99,8 mL de tampão de fosfato de potássio 0,1 mmol/L pH 7. A atividade da POD foi realizada pela mistura de 10 uL de extrato bruto com 270 uL de substrato. A atividade enzimática foi determinada pelo acréscimo da absorbância a 470 nm e monitorizada durante 20 min.

4.2.8.5 Superóxido desmutase (SOD)

A atividade da superóxido desmutase foi determinada pelo método descrito por Giannopolitis and Ries (1977) com modificações. A atividade da SOD foi determinada pela mistura de 140 uL de tampão fosfato de sódio 100 mmol / L pH 7,8, 56 uL metionina 13 mmol / L, 3 uL de EDTA 0,1 mmol/L, 43 uL de água, 21 uL nitro azul de tetrazólio (NBT) 75 mmol/L, 14 uL de extrato bruto e 3 uL de riboflavina 2 mmol/L. A mistura foi preparada em microplacas, e então dispostas a 30 cm abaixo de lâmpadas 30W fluorescentes à temperatura ambiente durante 7 min. Em seguida, a absorbância da solução foi medida a 560 nm. Amostras não irradiadas não desenvolveram cor e foram utilizados como controle. Uma unidade de atividade enzimática (EAU) foi definida como a quantidade de enzima que inibe a foto-redução de NBT em 50% por mg de proteína.

4.2.9 Análise estatística

Os dados obtidos a partir das análises físico-químicas de pH, acidez, sólidos solúveis totais (SST), compostos fenólicos e carotenoides totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação dos valores médios. Ao verificar a existência de diferença significativa entre tratamentos, de acordo com o valor de *p* associado ao teste F, foi avaliada a magnitude destas diferenças utilizando teste de comparações múltiplas pelo método de Tukey com 95% de confiança. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa computacional R (v.3.2).

Os espectros de massas e os perfis de fragmentação obtidos a partir das análises por CL-EM/EM foram processados pelo software *Data analysis* 4.0 (Bruker

Daltonics, Bremen, Alemanha). O *software* ProfileAnalysis™ (versão 2.0, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) foi utilizado para o processamento dos dados de CL-EM/EM. O programa gera uma matriz de dados que contém a lista de picos detectados por amostra e traz as informações de tempo de retenção (tr), relação m/z e intensidade de cada composto detectado. Posteriormente, é realizado o alinhamento do tempo de retenção, normalização e escalonamento. Nesse trabalho foi utilizado a normalização por soma das intensidades e escalonamento por Pareto (Pareto scaling). Para explorar o conjunto de dados foram realizadas análises multivariadas. Foi utilizada a análise de componentes principais (ACP) e análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA). O PLS-DA gera uma pontuação para a importância das variáveis (VIP score). Essas análises foram realizadas no software MetaboAnalyst 3.0.

Os dados resultantes da análise por CG-EM foram processados no software GCMS Solution - Postrun Analysis. Foram realizados alinhamentos dos resultados com os dados da biblioteca do software a partir dos cromatogramas formados, tempo de retenção, relação m/z e perfil de fragmentação. Posteriormente, os dados brutos foram convertidos para formato mzXML e inseridos na plataforma XCMS online (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) para prosseguimento das análises estatísticas por PCA, *Cloud Plot* e *Heatmap*. Foi aplicado teste estatístico paramétrico de análise de variância. Os parâmetros de entrada na plataforma foram definidos como GC/Single Quadrupolo (matchedFilter), polaridade positiva e tempo de retenção em minutos. Para detecção dos metabólitos foi definido FWHM = 3, step = 0,5 e para alinhamento do cromatograma: mzwid = 0,025, minfrac = 0,5, e bw = 3.

Os dados obtidos a partir das análises enzimáticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação dos valores médios. Ao verificar a existência de diferença significativa entre tratamentos, de acordo com o valor de p associado ao teste F, foi realizado método de comparação de médias pelo teste de Tukey com 95% de confiança. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa computacional R (v.3.2).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Análises físico-químicas

Os dados obtidos a partir das análises físico-químicas apresentaram diferenças nos valores de pH, acidez e sólidos solúveis totais (SST) entre os acessos, as fases de maturação e a sanidade dos frutos (Tabela 9).

Tabela 9 - Características físico-químicas (pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST) dos frutos de *Capsicum* avaliados. Resultados de acidez expressos em g de ácido cítrico 100g⁻¹ do fruto em base úmida; SST: expresso em °Brix.

Amostra	pH	Acidez total	SST
P27IS	5,26 ± 0,01 c	1,68 ± 0,02 b	4,70 ± 0,58 d
P27ID	5,54 ± 0,01 b	1,47 ± 0,03 cd	4,80 ± 0,58 cd
P27MS	5,18 ± 0,01 c	1,63 ± 0,01 b	6,70 ± 0,00 a
P27MD	5,08 ± 0,01 c	1,83 ± 0,01 a	5,37 ± 0,33 b
P175IS	5,88 ± 0,08 a	1,05 ± 0,02 f	3,97 ± 0,88 e
P175ID	5,97 ± 0,01 a	1,47 ± 0,02 c	3,97 ± 0,88 e
P175MS	5,26 ± 0,01 c	1,38 ± 0,01 d	5,57 ± 0,67 b
P175MD	5,70 ± 0,02 b	1,22 ± 0,00 e	5,03 ± 0,33 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo método de Tukey ($p \leq 0,05$). P27 (*Capsicum baccatum*) – resistente à antracnose; P175 (*C. chinense*) – suscetível à antracnose; IS: fruto imaturo saudável; ID: fruto imaturo doente; MS: fruto maduro saudável; MD: fruto maduro doente.

As amostras ficaram reunidas em três grupos distintos para a variável pH. Os resultados de pH variaram de 5,08 (P27MD) até 5,97 (P175ID). Os valores de pH para os frutos do acesso P175 foram superiores aos obtidos nos frutos do acesso P27, comparando cada fase de maturação e sanidade (IS, ID, MS, MD). Analisando isoladamente cada acesso, os maiores valores de pH foram obtidos para frutos imaturos e doentes (ID). O crescimento dos fungos é alterado de acordo com o pH do meio em que se desenvolvem. Araújo et al. (2010), ao avaliarem o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* em meios de cultivos com pHs diferentes, observaram maior crescimento micelial entre pH 5,0 a 6,0 e maior germinação de conídios entre pH 6,0 a 7,0.

A acidez total titulável (AT) variou de 1,05 (P175MD) até 1,83 (P27MD) g de ácido cítrico/100g de amostra. Em geral, comparando as quatro variáveis, o acesso P27 apresentou valores de acidez de fruto superiores ao acesso P175. A acidez é um importante parâmetro em relação ao estado de conservação dos frutos,

forneendo informações sobre o processo de decomposição de seus tecidos vegetais (OLIVEIRA, et al. 1999).

Há uma tendência de frutos maduros apresentarem maiores valores de SST. Segundo Antoniali et al. (2007), este comportamento pode ser justificado pelo fato de que, à medida em que o fruto amadurece, aumentam as reações metabólicas, aumentando a concentração dos açúcares. De modo geral, as variáveis apresentaram valores de SST compatíveis com cada fase de maturação, ou seja, valores mais baixos quando imaturos e mais elevados quando maduros. O maior valor de SST foi observado nos frutos da amostra P27MS (Tabela 9). A amplitude dos valores de SST nos frutos avaliados variou de 3,97 (P175IS) a 6,70 (P27MS) °Brix. Nos dois acessos avaliados, o teor de SST aumentou com o amadurecimento.

Na Tabela 10, é possível observar os valores obtidos para compostos fenólicos e carotenoides totais nas amostras avaliadas.

Tabela 10 – Compostos fenólicos e carotenoides totais das amostras de frutos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae).

Amostra	Compostos fenólicos	Carotenoides
P27IS	239,94 ± 4,02 c	17,93 ± 1,18 b
P27ID	257,88 ± 2,29 c	33,80 ± 1,81 b
P27MS	247,70 ± 0,70 c	56,15 ± 2,41 b
P27MD	245,27 ± 3,03 c	60,19 ± 4,11 b
P175IS	325,12 ± 1,49 a	19,68 ± 8,18 b
P175ID	304,31 ± 8,59 b	83,53 ± 2,46 b
P175MS	314,06 ± 0,90 ab	329,03 ± 37,50 a
P175MD	318,70 ± 4,06 ab	341,93 ± 15,51 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo método de Tukey ($p \leq 0,05$). Resultados de compostos fenólicos totais expressos em mg de ácido gálico $100g^{-1}$ de amostra em base úmida; Resultados de carotenoides totais expressos em mg β -caroteno $100g^{-1}$ do fruto em base úmida. P27 (*Capsicum baccatum*) –resistente à antracnose; P175 (*C. chinense*) –suscetível à antracnose; IS: fruto imaturo saudável; ID: fruto imaturo doente; MS: fruto maduro saudável; MD: fruto maduro doente.

Os compostos fenólicos totais variaram de 239,94 (P27IS) a 325,12 (P175IS) mg de ácido gálico $100g^{-1}$. Em geral os valores foram superiores para as amostras do acesso P175 quando comparados as amostras do acesso P27. Era esperado que o acesso resistente (P27) apresentasse maiores concentrações de compostos fenólicos, uma vez que estão relacionados ao sistema de defesa da planta, porém este dado não se confirmou neste trabalho. O acesso P27 apresentou menor

concentração de compostos fenólicos, e não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 10). Neitzke et al. (2012), ao avaliarem 24 acessos de *C. baccatum* do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, também identificaram baixas concentrações de compostos fenólicos no acesso P27. Antioxidantes não enzimáticos, como fenóis e carotenoides, auxiliam no combate dos radicais livres responsáveis pelo estresse oxidativo da célula. Estes radicais são produzidos naturalmente a nível celular, no entanto são potencializados a partir de situações de estresse, neste caso o desenvolvimento da doença (MIKULIC-PETKOVSEK, 2013).

Em relação aos carotenoides totais, as amostras foram reunidas em dois grupos (Tabela 10). As variáveis P175MS (329,03) e P175MD (431,93) apresentaram os maiores teores de carotenoides. Quando comparado as mesmas fases de maturação e sanidade entre os dois acessos, P175 apresentou maiores valores. O acesso P27 apresenta cor de fruto imaturo verde passando para amarelo quando maduro, em contrapartida, o acesso P175 apresenta fruto da cor verde quando imaturo e passa para vermelho quando maduro. Vale ressaltar, que mesmo não apresentando diferença significativa, amostras identificadas como doentes apresentaram maiores concentrações de carotenoides que amostras sadias. Os carotenoides são os principais compostos que conferem a pigmentação nos frutos de pimentas, sendo sintetizados principalmente na etapa de maturação dos frutos. Nesta etapa, ocorre a transformação dos cloroplastos em cromoplastos, há uma redução de clorofilas e os carotenoides são sintetizados (GIUFFRIDA et al., 2013). Outros trabalhos já indicaram baixos conteúdos de carotenoides totais para frutos maduros do acesso P27 (NEITZKE, 2012; PADILHA et al., 2015).

Existem mais de 50 formas de carotenoides já identificados em pimentas *Capsicum* (COLLERA-ZÚÑIGA et al., 2005; SCHWEIGGERT et al., 2005; CERVANTES-PAZ et al., 2014). Os carotenoides são os principais compostos responsáveis pela cor nos frutos de pimentas, além disso são explorados comercialmente para dar cor aos alimentos (ARIMBOOR et al., 2014). Os pigmentos mais abundantes em pimentas são capsantina, capsoburina, zeaxantina e β -caroteno. A concentração de carotenoides nos frutos geralmente aumentam conforme a maturação (CERVANTES-PAZ et al., 2014).

4.3.2 Capsaicinoides

Os capsaicinoides são metabólitos especializados (alcaloides) que conferem pungência (ardência) aos frutos de pimentas *Capsicum*. Estes compostos são sintetizados na placenta dos frutos e fazem parte do grupo de carotenoides, porém nem todos os capsaicinoides são responsáveis pela pungência, alguns conferem apenas cores aos frutos. Capsaicina e dihidrocapsaicina constituem em torno de 90% da quantidade total de capsaicinoides (AL OTHMAN et al., 2011). A partir das avaliações por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM) foi possível identificar capsaicinoides e capsinoides nas amostras dos frutos de *Capsicum* (Figura 7).

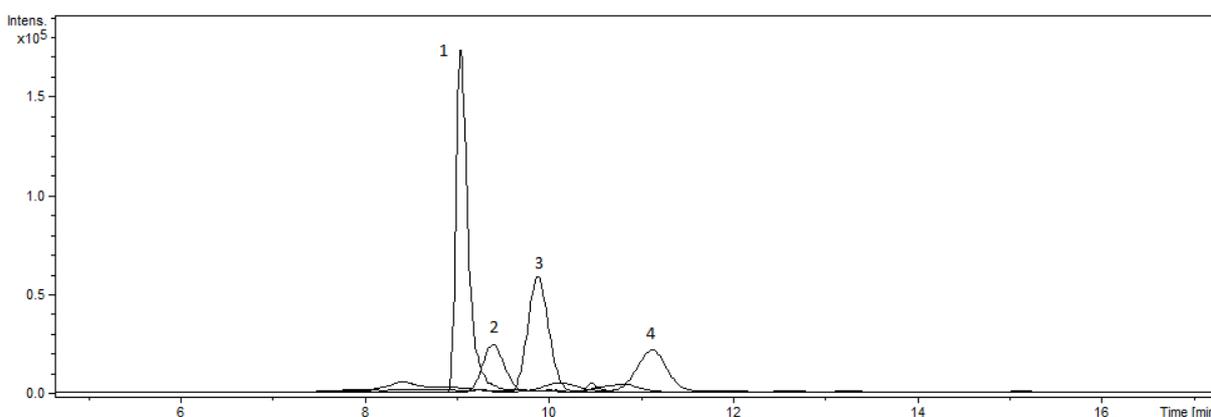


Figura 7 – Cromatograma dos capsaicinoides e capsinoides identificados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) obtido por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM/EM). 1= capsaicina, 2=dihidrocapsaicina, 3=nordihidrocapsiate, 4=dihidrocapsiate.

As concentrações de capsaicinoides e capsinoides foram baixos para os dois acessos, nas diferentes fases de maturação e sanidade, quando comparados com outros tipos de pimentas (Tabela 11). Ambos acessos apresentaram níveis de pungência similares à dos pimentões, onde 150,59 SHU (P175IS) foi o valor mais elevado. Os níveis são tão baixos que sua pungência pode passar despercebida ao consumi-los. A título comparativo, outros tipos conhecidos de pimentas, apresentam as seguintes pungências na escala Scoville (SHU): *Jalapeño* (20.000), *dedo-de-moça* (30.000), *malagueta* (100.000), *Habanero* (300.000) e *Carolina Reaper* (1.500.000). É possível detectar presença de capsaicinoides nos frutos com auxílio de técnicas analíticas, porém não necessariamente este fruto seja definido como pungente por análise sensorial, pois existe uma quantidade mínima desses compostos para que possamos sentir sua pungência (WAHYUNI et al., 2013).

Não foi detectada capsaicina nas amostras de P27. A amostra P175IS (7,47 ug.g) apresentou maior concentração deste composto. Dihidrocapsaicina foi

observada em maiores concentrações nas amostras do acesso P175. A amostra P27MS apresentou maior concentração de dihidrocapsiate (13,36 ug.g). Nordihidrocapsiate foi observado em maior concentração na amostra P27ID (41,44 ug.g). A pungência variou de 8,67 (P27MS) a 150,59 SHU (P175IS)).

Tabela 11 - Capsaicinoides (capsaicina e dihidrocapsaicina), capsinoides (dihidrocapsiate e nordihidrocapsiate) e escala Scoville de pungência (*Scoville heat unit*, SHU) identificados e quantificados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae).

Amostra	Capsaicina	Dihidrocapsaicina	Dihidrocapsiate	Nordihidrocapsiate	SHU
P27IS	nd	0,61 ± 0,00 e	4,28 ± 0,38 d	25,52 ± 0,10 b	9,76
P27ID	nd	0,96 ± 0,02 d	7,92 ± 1,25 bc	41,44 ± 1,00 a	15,39
P27MS	nd	0,54 ± 0,00 e	13,36 ± 0,46 a	11,82 ± 0,29 ef	8,67
P27MD	nd	0,58 ± 0,00 e	8,75 ± 1,24 b	10,03 ± 0,33 f	9,28
P175IS	7,47 ± 0,37 a	1,94 ± 0,09 b	8,68 ± 0,29 b	23,89 ± 2,63 bc	150,59
P175ID	3,77 ± 0,12 b	0,99 ± 0,02 d	9,25 ± 0,29 b	19,17 ± 0,19 cd	76,00
P175MS	4,47 ± 0,06 c	1,47 ± 0,02 c	6,41 ± 0,29 bcd	23,96 ± 2,63 ef	95,18
P175MD	5,80 ± 0,33 b	2,36 ± 0,08 a	5,02 ± 0,18 cd	15,01 ± 0,17 de	130,59

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo método de Tukey ($p \leq 0,05$). *nd = não detectado. Capsaicina, Dihidrocapsaicina, Dihidrocapsiate e Nordihidrocapsiate expresso em ug.g. P27 (*Capsicum baccatum*) – resistente à antracnose; P175 (*C. chinense*) –suscetível à antracnose; IS: fruto imaturo saudável; ID: fruto imaturo doente; MS: fruto maduro saudável; MD: fruto maduro doente.

Os capsaicinoides e capsinoides presentes nas pimentas *Capsicum* apresentam atividade antimicrobiana (GARCÍA PÉREZ et al., 1998; TEWKSBURY et al., 2008). Mesmo havendo diferenças significativas entre os acessos avaliados, ainda assim, os níveis de capsaicinoides e capsinoides obtidos nestes acessos são relativamente baixos quando comparados com outros tipos de pimentas. Lopez-Hernandez et al. (1996) observaram em frutos desidratados de *Cayenne* (*C. annum*): 1320 ug/g de capsaicina e 830 ug/g de dihidrocapsaicina por amostra. Porém, isto não significa obrigatoriamente que acessos pungentes sejam resistentes a patógenos.

A produção e os níveis de capsaicinoides nos frutos são influenciados por fatores genéticos e ambientais, sendo difícil de controlar e estabilizar os níveis de concentrações desses compostos no cultivo de pimentas (BOSLAND; VOTAVA, 2012). Vários autores relatam que o déficit hídrico, assim como o ataque de patógenos, aumenta o conteúdo de capsaicinoides nos frutos de pimentas (SUNG et al., 2005; TAHBOUB et al., 2008; RUIZ-LAU et al., 2011).

4.3.3 CL-EM/EM

A partir dos dados gerados pelas avaliações realizadas por cromatografia líquida e espectrometria de massas, foi obtido o *heatmap* com os metabólitos encontrados nas amostras (Figura 8). Foi possível observar variação para a produção de diferentes compostos entre as amostras. Baseado no gradiente de concentração, é possível observar maior (vermelho) ou menor (verde) quantidade do composto em uma amostra, o qual pode ser verificado a partir do tempo de retenção (*tr*) e da massa/carga (*m/z*). Foi definida a opção de visualização dos 70 compostos que mais se destacaram pela diferença de concentração entre as amostras.

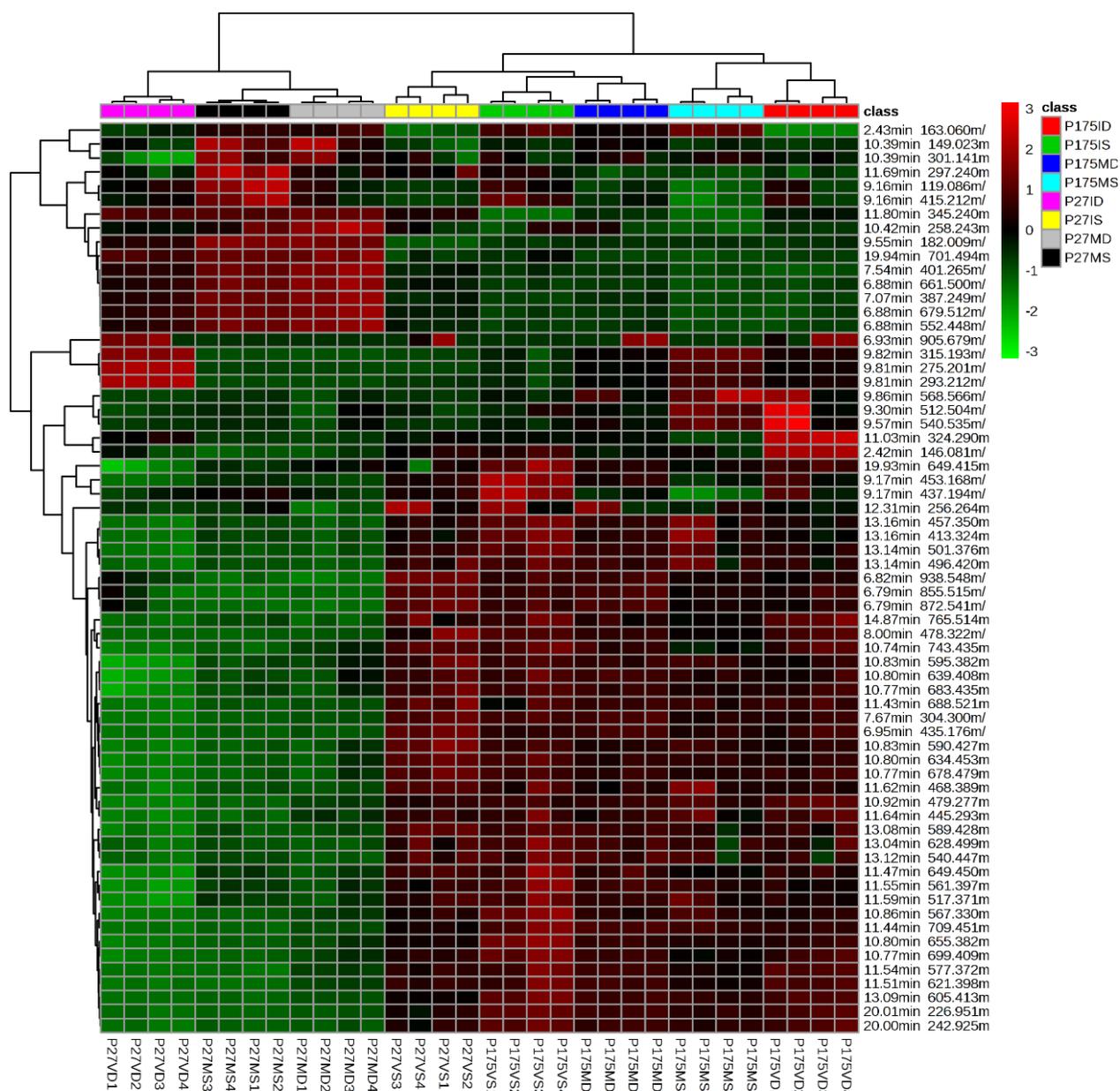


Figura 8 - *Heatmap* obtido a partir da análise de *cluster* e visualização dos dados metabólicos encontrados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). Cada linha representa um metabólito encontrado e cada coluna representa uma amostra. A concentração do composto é definida pela escala de cor vermelho-verde.

Os dados foram processados pelo método de PLS-DA (*Partial Least Squares - Discriminant Analysis*), onde foram obtidos os VIP Scores, ou seja, foram destacados os compostos metabólicos de maior importância presentes nas amostras que serviram para diferencia-las. De acordo com a Figura 9, é possível observar o composto, identificado pelo tempo de retenção (tr) e a relação massa carga (m/z), e sua concentração em cada amostra de acordo com sua coloração. Por exemplo, o composto 1 (tr: 11,80 e m/z : 345,2398) apresentou maior concentração na amostra P27MD, P27MS, P27ID, P27IS, P175ID, P175MD, P175MS e P175IS progressivamente. Este procedimento identificou os cinco compostos que mais se destacaram nas amostras avaliadas.

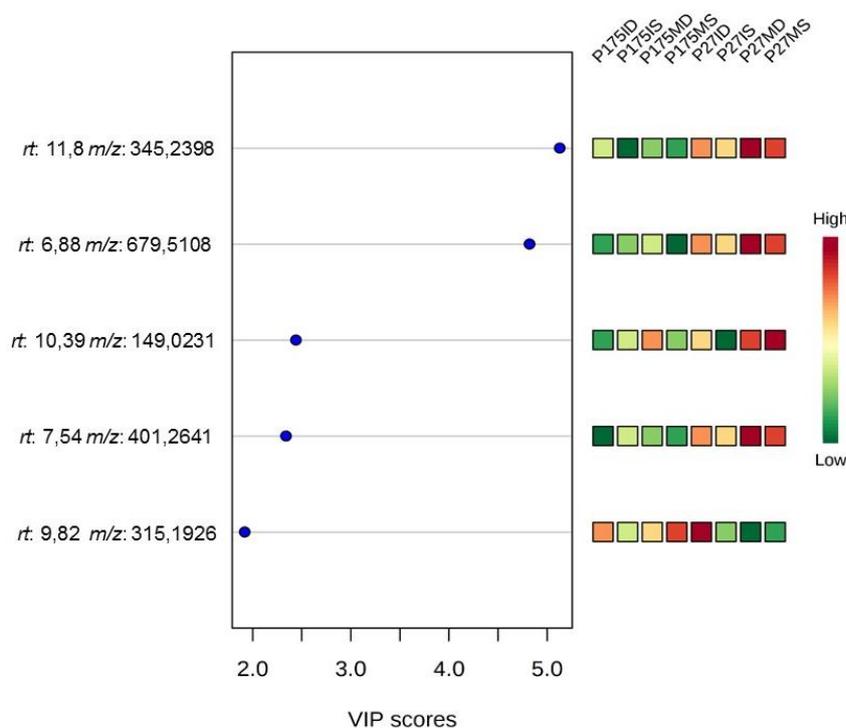


Figura 9 – Tempo de retenção (tr) e massa carga (m/z) dos principais metabólitos identificados por PLS-DA. As caixas coloridas à direita indicam a concentração relativa de cada metabólito correspondente a cada um dos grupos de estudo.

A partir do resultado das análises por PLS-DA, foi realizada a identificação dos desses compostos. Como estratégia de busca para confirmação dos compostos encontrados, foi obtido o perfil de fragmentação de cada composto oriundo da análise por espectrometria de massa (Figura 10), assim como pesquisa em bancos de dados metabolômicos como METLIN, Massbank, FooDB, MAVEN, Spectra.psc.riken e PubChem.

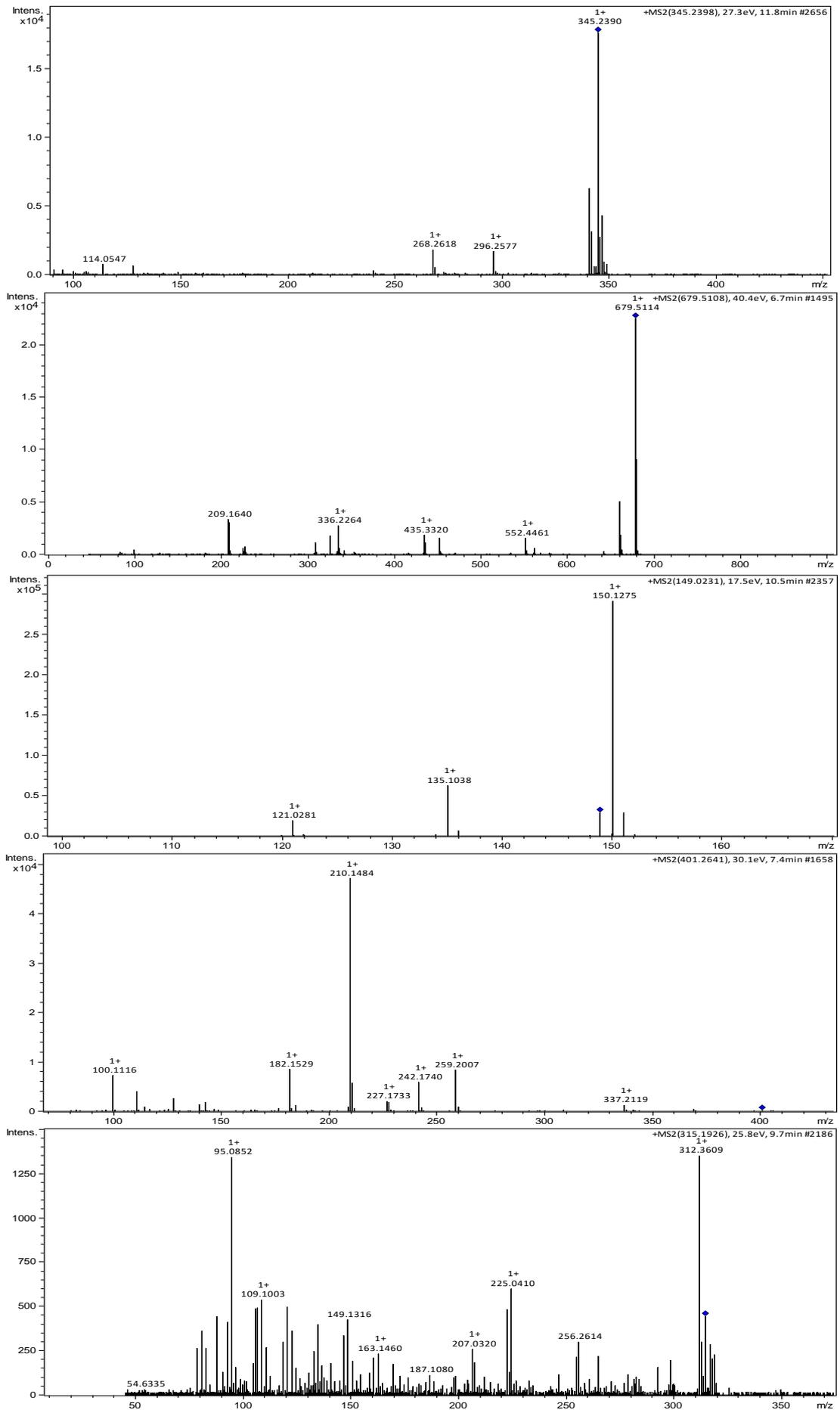


Figura 10 – Perfil de fragmentação dos principais metabólitos identificados por PLS-DA encontrados através de espectrometria de massa (CL-EM/EM) nas amostras de *Capsicum* (Solanaceae).

De acordo com o perfil de fragmentação e informações depositadas em bancos de dados foram sugeridos os seguintes compostos (Tabela 12). Os compostos 1 (tr: 11,8 e m/z: 345,2398), 2 (tr: 6,88 e m/z: 679,5108), 3 (tr: 10,39 e m/z: 149,0231) e 4 (tr: 7,54 e m/z: 401,2641) foram observados em maiores concentrações nas amostras P27. O composto 5 (tr: 9,82 e m/z: 315,1926) foi observado em maior concentração no acesso P175.

Tabela 12 - Descrição dos principais metabólitos identificados por PLS-DA (*Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) a partir das análises por CL-EM/EM (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas) nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae).

Nº	Nome do provável composto	Classe	tr	m/z
1	15(S)-Hydroxyeicosatrienoic acid	Ácido	11,8	345,2398
2	-	Hidrocarboneto	6,88	679,5108
3	2-Methylbenzothiazole	Composto aromático	10,39	149,0231
4	Myriocina	Lípido	7,54	401,2641
5	Safranina	Corante	9,82	315,1926

A resposta da planta à infecção geralmente envolve a ativação de mecanismos de defesas desencadeadas a partir de moléculas de sinalização, que resultam no acúmulo de fitoalexinas e a reação de hipersensibilidade, uma forma de morte celular programada que interrompe o desenvolvimento da doença (ANEJA et al., 2001). A infecção causada por *Colletotrichum coccodes* em frutos de pimentas *Capsicum annum*, ocasionou aumento de compostos envolvidos na defesa da planta como ácido clorogênico, chrysoeriol, quercetina e luteolina (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2013). Contudo, sabe-se que o sucesso dos fungos fitopatogênicos não depende exclusivamente da resposta de compostos naturais produzidos pelas plantas (ARDI et al., 1998). Porém, esses fungos devem criar estratégias que contornem os efeitos dos compostos de defesa (MORRISEY; OSBOURN, 1999).

A superfície do tecido vegetal libera uma série de sinais químicos tais como açúcares, fenóis, lipídeos e metabólitos voláteis que os fungos são capazes de reconhecer. Da mesma forma, espécies do gênero *Colletotrichum* produzem apressório em resposta aos sinais físicos específicos e a topografia da superfície da folha (MAYER; STAPLES et al., 2002). O etileno, por exemplo, estimula o amadurecimento de frutas climatéricas e também promove a sinalização para fungos fitopatogênicos começarem o processo de infecção (KOLATTUKUDY et al., 1995). Os conídios de *C. gloeosporoides* e de *C. musae* germinam e produzem múltiplos apressórios quando expostos aos níveis de etileno produzidos pelo amadurecimento

de frutos de abacate e de banana, respectivamente. Por outro lado, em frutos transgênicos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) que não produzem etileno, não houve estímulo para a germinação do apressório dos fungos (PODILA et al., 1993).

4.3.4 CG-EM

Os dados gerados pela análise de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM) foram submetidos ao teste *Cloud Plot Multigroup*. Foram identificados mais de 3000 compostos a partir da configuração padrão (*default*) da plataforma XCMS Online. A localização da bolha no gráfico indica o tempo de retenção (eixo x) e sua massa carga (eixo y). O diâmetro das bolhas indica maior ou menor variação de concentração do composto metabólico nas amostras (Figura 11).

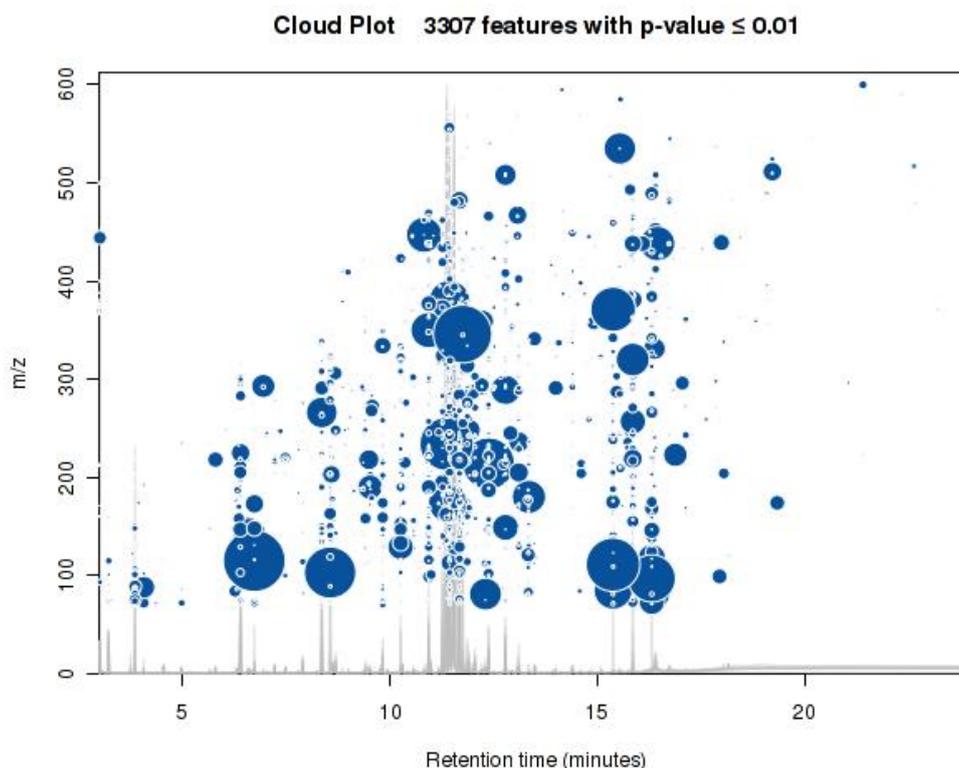


Figura 11 – *Cloud plot* dos compostos metabólitos presentes nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae). Cromatograma total com relação massa/carga (m/z) no eixo y e tempo de retenção (tr) em minutos no eixo x.

Para identificação e diferenciação dos metabólitos presentes nas amostras foram definidos filtros no painel de controle da plataforma XCMS para *p-value* = 0,01, intensidade de concentração do composto = 2.000.000, amplitude da relação massa carga (m/z) de 0-600 e variação de tempo de retenção de 0-25 minutos (Figura 12). A partir do gráfico de *Cloud plot* foram obtidos os cromatogramas de íon extraídos (XIC) dos compostos que mais se destacaram nas amostras: butano-2,3-

diol, L-threitol, D-frutose e alfa-D-glucopyranoside. Foi realizada a confirmação da identidade dos compostos a partir da similaridade de mais de 90% de acordo com informação na biblioteca do programa GCMS *Postrun Analysis*. Foi observado maior concentração do composto butano-2,3-diol (tr: 3,85 e m/z: 117,09) na amostra P27MD. L-threitol (tr: 8,55 e m/z: 73,05) foi observado em maior concentração na amostra P175MD. A amostra P175MS apresentou maior concentração do composto D-frutose (tr: 11,42 e m/z: 307,1). Por fim, a amostra P27MS apresentou maior concentração do composto alfa-D-glucopyranoside (tr: 15,84 e m/z: 361,15).

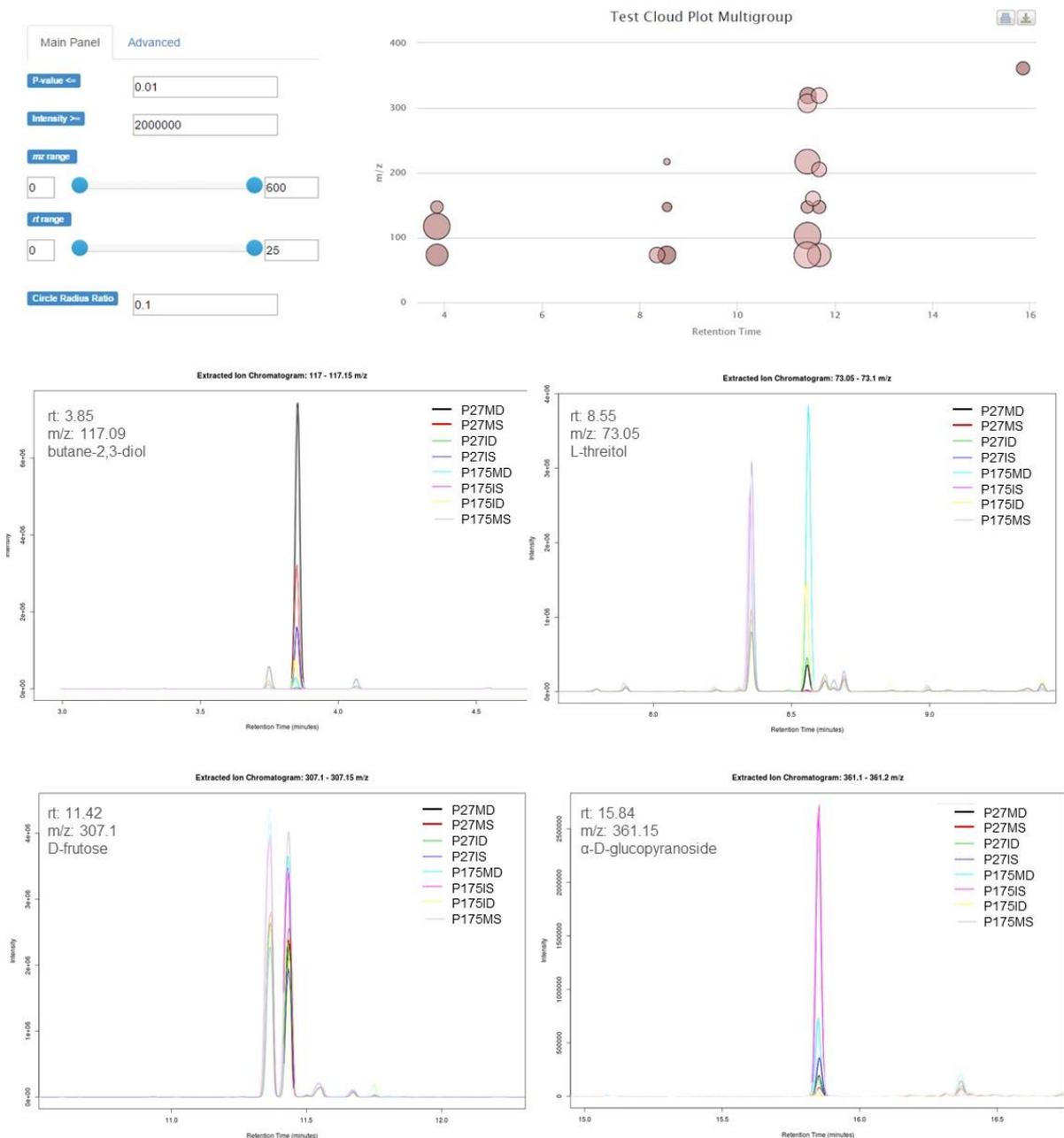


Figura 12 - Metabólitos encontrados nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) por CG-EM a partir do teste de *Cloud plot Multigroup* e cromatogramas de íon extraído. Filtro utilizado: p -value=0,01; Intensidade do pico >2.000.000; m/z range: 0-600; rt range: 0-25 min.

Na Tabela 13 podem ser observadas as concentrações dos compostos metabólicos encontrados nas amostras. O composto butano-2,3-diol foi observado em maior concentração na amostra P27MD (11,98 mg/g) e não foi detectado na amostra P175IS. L-threitol foi observado em maior concentração na amostra P175MD (11,41 mg/g) e menor concentração nas amostras P175MS (0,007 mg/g), P175IS (0,02 mg/g), P27IS (0,03 mg/g) e P27MS (0,03 mg/g). D-frutose foi observado em maior concentração nas amostras P175MS (41,11 mg/g), P175MD (37,08 mg/g) e P175IS (36,68 mg/g) e em menor concentração nas amostras P175ID (20,80 mg/g) e P27IS (19,65 mg/g). O composto α -D-glucopyranoside foi observado em maior concentração na amostra P175IS (9,06 mg/g) e não foi detectado na amostra P175ID.

Tabela 13 – Quantificação dos compostos metabólicos encontrados por CG-EM (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas) nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae).

	Butano-2,3-diol	L-threitol	D-frutose	α -D-glucopyranoside
P27IS	2,52 c	0,03 e	19,65 e	0,95 c
P27ID	0,06 e	1,59 c	34,60 bc	0,61 cd
P27MS	5,46 b	0,03 e	30,03 cd	0,31 cd
P27MD	11,98 a	1,02 d	28,70 d	0,66 cd
P175IS	ND	0,02 e	36,68 ab	9,06 a
P175ID	1,09 d	4,22 b	20,80 e	ND
P175MS	0,39 de	0,01 e	41,11 a	0,11 d
P175MD	0,41 de	11,41 a	37,08 ab	2,49 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo método de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores expressos em mg/g de amostra. ND: não detectado na amostra. P27 – acesso de *Capsicum baccatum* resistente à antracnose; P175 – acesso de *C. chinense* suscetível à antracnose; IS: fruto imaturo saudável; ID: fruto imaturo doente; MS: fruto maduro saudável; MD: fruto maduro doente.

Estudos evidenciaram que butano-2,3-diol produzidos por bactérias benéficas (rizobactérias), influenciou no crescimento de plantas e induziu a resistência à fitopatógenos (CHUNG et al., 2016). Testes com isômeros do composto indicaram que (2R,3R)-2,3-butanodiol promoveu o crescimento de *C. annuum* e *Arabidopsis thaliana* e induziram a resistência em *Nicotiana benthamiana* a *Colletotrichum orbiculare* (RYU et al., 2004; HAN et al., 2006; CHO et al., 2008; D'ALESSANDRO et al., 2014). O composto butano-2,3-diol tem um papel importante durante o processo de invasão do patógeno pois alcaliniza o ambiente extracelular, criando um ambiente desfavorável ao crescimento do fungo (XIAO; XU, 2007; EFFANTIN et al., 2011; KWAN et al., 2013). Butano-2,3-diol já foi encontrado em frutos de diferentes

cultivares de *C. annuum* (ZIINO et al., 2009). Portanto, este composto pode mediar a resistência em plantas dependendo das espécies (SONG; RYU, 2013).

L-threitol, assim como erythritol, são compostos cada vez mais utilizados na indústria de alimentos como agentes alternativos de adoçantes de baixa caloria. A maioria da ingestão deste composto é excretada sem ser metabolizada. Ambos compostos são conhecidos por agirem como crioprotetores no tecido de plantas (JESUS et al., 2006). Da mesma forma, Kim et al. (2002) observaram que o desenvolvimento da antracnose em pimentas diminuiu conforme o amadurecimento dos frutos e a soma total do acúmulo de açúcares.

Os açúcares solúveis, como D-frutose e alpha-D-glucopyranoside, desempenham papel de defesa durante o amadurecimento dos frutos. Genótipos de goiaba (*Psidium guajava*) que apresentaram elevadas concentrações de açúcares solúveis e ácido ascórbico foram mais resistentes ao fungo *Glomerella cingulata* (SING; SHARMA, 1981). Em uvas (*Vitis vinifera*) o acúmulo de proteínas e açúcares de efeito antifúngico durante o amadurecimento de frutos foi um importante mecanismo de defesa contra o fungo *Botrytis cinerea* (TATTERSALL et al., 1997). Em mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), foi observado correlação positiva entre o conteúdo de açúcares nos frutos e resistência à antracnose, o que sugere uma resistência potencial direta ou indireta destes compostos contra a doença (MILES et al., 2012).

4.3.5 Análise enzimática

A partir das análises de atividade enzimática foi possível observar diferença entre as respostas para as amostras avaliadas neste trabalho (Tabela 14). Os resultados de teste F indicam diferenças significativas para catalase (CAT) em todos os tratamentos exceto entre acesso e sanidade; interação entre acesso, fase de maturação e sanidade. Para atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) foi observado diferenças significativas para sanidade; interação entre acesso e fase de maturação; interação entre acesso, fase de maturação e sanidade. A polifenoloxidase (PPO) não apresentou diferença significativa somente para sanidade; interação entre acesso e sanidade. Para superóxido desmutase (SOD) houve interação apenas entre acesso e fase de maturação. A peroxidase (POD) apresentou diferença significativa para acesso; fase de maturação; interação entre acesso e fase de maturação.

Tabela 14 – Análise de variância pelo teste F comparando o conteúdo de enzimas dos diferentes tratamentos nas amostras de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae).

	CAT		APX		PPO		SOD		POD	
	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F	F Value	Pr > F
Sanidade (S)	5,54	0,0317	15,92	0,0011	0,00	0,9734	5,76	0,0289	0,63	0,4402
Acesso (A)	11,79	0,0034	2,44	0,1381	758,40	<,0001	744,82	<,0001	73,3	<,0001
Fase de maturação (FM)	25,36	0,0001	0,01	0,9218	76,36	<,0001	9,45	0,0073	8,86	0,0089
A*S	0,22	0,6426	0,63	0,4375	1,56	0,2294	5,52	0,0319	0,09	0,7629
FM*S	5,59	0,0310	0,02	0,8806	21,39	0,0003	17,16	0,0008	0,92	0,3511
A*FM	0,72	0,4072	8,45	0,0103	20,37	0,0004	1,65	0,2179	11,28	0,0040
A*FM*S	3,60	0,0760	17,76	0,007	289,14	<,0001	11,19	0,0041	2,97	0,1040

CAT: catalase; APX: Ascorbato Peroxidase; PPO: polifenoloxidase; SOD: superoxidodesmutase; POD: peroxidase; Números em negrito diferem estatisticamente.

Os diferentes resultados de atividade enzimática podem ser observados na Tabela 15. A catalase variou de 8,87 mmol/mg (P27IS) a 25,83 mmol/mg (P175MS). A amplitude de variação para ascorbate peroxidase (APX) foi de 252,52 mmol/mg (P175MS) a 688,47 m/mg (P27ID). Houve a formação de três grupos para a atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO), onde foi observado maior valor para amostra P27MS (75,47 mmol/mg) e menor valor na amostra P175ID (42,61 mmol/mg). Em geral, esta enzima apresentou níveis mais elevados para as amostras do acesso P27 comparando ao acesso P175. A atividade enzimática da superóxido desmutase (SOD) apresentou valores superiores para as amostras P175, com uma amplitude variando de 10,73 (P27MS) a 59,75 mmol/mg (P175ID). A peroxidase (POD) apresentou valores superiores para P27MD (56,09 mmol/mg) e P27MS (54,74 mmol/mg). Os menores valores foram encontrados nas amostras P175MS (1,0 mmol/mg) e P175ID (4,41 mmol/mg).

As enzimas oxiredutases catalisam as reações de oxidação e redução na célula, e são importantes no combate contra espécies reativas de oxigênio (ROS). A atividade de enzimas antioxidantes e os compostos antioxidantes tendem a aumentar em condições de estresse causados pela doença. Entre os componentes enzimáticos, a superóxido desmutase (SOD) desempenha um papel fundamental no sistema antioxidante de defesa, convertendo O_2^- a H_2O_2 . Posteriormente, H_2O_2 é convertido a H_2O e O_2 pela catalase (CAT) e peroxidase (POD) (FAROOQ et al., 2009). Uma molécula de CAT consegue remover cerca de seis milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto (BOGUSZEWSKA; ZAGDANSKA, 2012).

Tabela 15 - Concentrações das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), polifenoloxidase (PPO), superoxidodesmutase (SOD) e peroxidase (POD) nos frutos de pimentas (*Capsicum*, Solanaceae) avaliados.

Amostra	Catalase	APX	PPO	SOD	POD
P27IS	8,87 ± 0,80 d	289,34 ± 33,2 bc	59,95 ± 0,16 b	23,32 ± 0,84 c	26,09 ± 2,91 bc
P27ID	13,81 ± 0,44 bcd	688,47 ± 22,6 a	68,14 ± 0,97 a	13,19 ± 1,15 de	33,60 ± 12,1 ab
P27MS	15,85 ± 2,62 abcd	345,91 ± 120,7 bc	75,47 ± 1,17 a	10,73 ± 1,07 e	54,74 ± 0,26 a
P27MD	19,41 ± 2,48 abc	378,61 ± 69,6 abc	68,56 ± 0,27 a	20,92 ± 0,90 cd	56,09 ± 0,84 a
P175IS	10,67 ± 3,74 cd	313,85 ± 60,4 bc	56,97 ± 1,36 b	54,37 ± 2,60 ab	13,29 ± 0,73 bc
P175ID	19,82 ± 1,86 abc	260,88 ± 20,2 c	42,61 ± 2,06 c	59,75 ± 1,67 a	4,41 ± 0,36 c
P175MS	25,83 ± 1,84 a	252,52 ± 75,3 c	46,24 ± 0,34 c	47,35 ± 1,54 b	1,00 ± 0,21 c
P175MD	22,27 ± 1,10 ab	593,54 ± 42,4 ab	58,74 ± 0,21 b	54,89 ± 3,70 ab	13,70 ± 0,59 bc

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo método de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores expressos em mmol/mg de proteína. P27 (*Capsicum baccatum*) – resistente à antracnose; P175 (*C. chinense*) – suscetível à antracnose; IS: fruto imaturo saudável; ID: fruto imaturo doente; MS: fruto maduro saudável; MD: fruto maduro doente.

Edirisinghe et al. (2014) observaram aumento da atividade de PPO e POD em frutos de pimentão (*Capsicum annuum*) contaminados com *Colletotrichum capsici*, sugerindo maior resistência aos frutos conforme aumento da atividade destas enzimas. O aumento da atividade de PPO foi associada com a resistência da soja (*Glycine max*) à mancha alvo (*Colletotrichum cassiicola*) (FORTUNATO et al., 2015). Em relação ao processo de amadurecimento de frutos, Huang et al. (2007) observaram que a atividade de CAT de três cultivares de laranja (*Citrus sinensis*) apresentou diminuição progressiva de acordo com o amadurecimento dos frutos. De maneira geral, enzimas oxiredutases aumentam sua atividade em situações de estresse (ABHAYASHREE et al., 2016). Era esperado maior atividade enzimática no acesso resistente (P27), assim como nas amostras doentes, porém nem todas as enzimas apresentaram este tipo de comportamento.

4.4 Conclusões

A concentração de metabólitos especializados em frutos de pimentas (*Capsicum baccatum* e *C. chinense*) varia conforme a fase de maturação. A concentração de capsaicinoides e capsinoides presentes nos frutos não influencia a resistência à antracnose. A produção dos compostos butano-2,3-diol, L-threitol, D-frutose e α -D-glucopyranoside nos frutos é alterada pela incidência da antracnose.

5. Considerações finais

Estudos relacionados a caracterização de recursos genéticos são de extrema importância para o conhecimento, conservação e uso da variabilidade genética de uma espécie. Nesse sentido, este trabalho contribui para o incremento de informações a respeito dos acessos de pimentas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado.

A tese é composta por três capítulos. O primeiro aborda a caracterização morfológica e avaliação da divergência genética de acessos de pimentas, assim como a avaliação da entropia dos descritores morfológicos utilizados na caracterização. Desta forma, foi possível observar a diversidade genética de parte dos acessos conservados no banco de germoplasma, assim como caracterizá-los morfológicamente e observar o seu comportamento a campo. Essas informações serviram de base para a posterior avaliação dos acessos em relação à antracnose, abordada no segundo capítulo.

A antracnose é a principal doença no cultivo de pimentas na região sul do Brasil. Esta doença, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, ataca principalmente os frutos, tanto na planta a campo como na pós-colheita. Desta maneira, o segundo capítulo teve como objetivo avaliar e caracterizar acessos de pimentas quanto a resposta à antracnose, para que assim pudesse diferenciá-los e também destacar aqueles com potencial de resistência. Da mesma forma, surgiram informações importantes a respeito dos acessos conservados, ainda mais considerando que nenhum acesso do banco de germoplasma havia sido caracterizado quanto à resposta a essa doença.

O terceiro capítulo utiliza informações preliminares oriundas do segundo capítulo. A partir da identificação de acessos com características contrastantes para a resistência à antracnose, foram selecionados dois acessos (um resistente e um suscetível) para um *screening* inicial quanto à produção de metabólitos produzidos nos frutos e que pudessem estar envolvidos na resistência ou suscetibilidade à antracnose. Neste trabalho foram utilizadas técnicas modernas de cromatografia e espectrometria de massas, que permitiram observar diferenças quanto à produção de compostos especializados, e atividade enzimática. Foi possível identificar alguns metabólitos que podem contribuir para a resistência à antracnose (principalmente butano-2,3-diol, L-threitol). Da mesma forma, surgem novas oportunidades para estudos mais específicos, baseados nos resultados obtidos neste capítulo.

Merece destaque o acesso P27 (*Capsicum baccatum*), que apresentou resultados promissores nas avaliações dos três capítulos dessa tese, sendo altamente indicado para produtores da região Sul do Brasil como mais uma alternativa frente à incidência recorrente da antracnose. Além disso, esse acesso foi cadastrado no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com a denominação de BRS Ouro.

Referências bibliográficas

Introdução geral

AGRIOS, G. N. Plant pathology. 5. ed. New York: Academic Press. 2005. 922p.

ALI, A.; BORDOH, P. K.; SINGH, A.; SIDDIQUI, Y; DROBY, S. Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. **Crop Protection**, v. 90, p. 132–141, 2016.

BARBIERI, R.L.; GOMES, J.C.C.; ALERCIA, A.; PADULOSI, S. Agricultural biodiversity in southern Brazil: integrating efforts for conservation and use of neglected and underutilized species. **Sustainability**, v. 6, n. 1, p. 741–757, 2014.

BOSLAND, P. W.; COON, D.; COOKE, P. H. Novel formation of ectopic (nonplacental) capsaicinoid secreting vesicles on fruit walls explains the morphological mechanism for super-hot chile peppers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 140, n. 3, p. 253–256, 2015.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: Vegetable and spice *Capsicum***. CAB International, 2012.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-53.

DUELUND, L.; MOURITSEN, O.G. Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark. **Food Chemistry**, v. 221, p. 913-918, 2016.

FAOSTAT (*Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division*). Production/crops: Chillies and peppers. Available in: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acessado em: 28/06/2016.

IPGRI. 1995. Descritores para *Capsicum* (*Capsicum* spp.). Roma: IPGRI. 51p.

KIM, S.; PARK, M.; YEOM, S.I.; KIM, Y.M.; LEE, J.M.; LEE, H.A.; CHOI, D. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. **Nature Genetics**, v. 46, n. 3, p. 271–278, 2014.

NEITZKE, R. Recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum* – explorando a multiplicidade de usos. 2012. 115f. **Tese (Doutorado em Fitomelhoramento)** Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

PADILHA, H.K.M; BARBIERI, R.L. Plant breeding of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae) – A review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 15, p. 148-154, 2016.

PARK, S.; JEONG, W. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y.H.; JEONG, S. W.; KIM, G.;S.; BAE, D. W.; LIM, C.S.; JIN, J.S.; LEE, S.J.; SHIN, S.C. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by

anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 981–985, 2012.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, n. 1, p. 129–133, 1997.

PERRY, L.; DICKAU, R.; ZARRILLO, S.; HOLST, I.; PEARSALL, D. M.; PIPERNO, D. R.; ZEIDLER, J. A. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Science**, v. 315, n. 5814, p. 986–988, 2007.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 413–434, 1996.

REIFSCHNEIDER, F. I. B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças. 2000. 113p.

RODRIGUES, R.; BENTO, C.S.; SILVA, M.G.M.; SUDRÉ, C.P. Atividades de caracterização e avaliação em bancos de germoplasma. In: PEREIRA, T.N.S. **Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Arca, 2010. p. 115-140

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI, R.; GUPTA, V.K.; SINGH, H.B.; MAHAVIDYALAYA, M. Chilli anthracnose: The epidemiology and management. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 1-53, 2016.

SIKORA, B.; NOWACZYK, P. Application of rapd technique for identification of interspecific hybrids from genus *Capsicum*. **Acta Scientiarum Polonorum**, v. 13, n. 1, p. 155–166, 2014.

THAN, P. P.; JEEWON, R.; PRIHASTUTI, H.; PHOULIVONG, S.; TAYLOR, P. W.; HYDE, K. D. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **Journal Zhejiang University Science**, v. 9, p. 764–778, 2008.

URRÉA-LÓPES, R.; GARZA, R. I. D. DE LA; VALIENTE-BANUET, J. I. Effects of substrate salinity and nutrient levels on physiological response, yield and fruit quality of habanero pepper. **HortScience**, v. 49, n. 6, p. 812–818, 2014.

Capítulo 1

AGUIAR, A.C.; COUTINHO, J. P.; BARBERO, G. F.; GODOY, H. T., MARTÍNEZ, J. Comparative study of capsaicinoid composition in *Capsicum* peppers grown in Brazil. **International Journal of Food Properties**, v. 17, p. 1292-1302, 2015.

BOSLAND, P.W.; E.J. Votava, 2012. **Peppers: Vegetable and spice Capsicum**. Cabi: Publishing, p: 204.

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. 1990. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 105p.

BÜTTOW, M.V.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S.; HEIDEN, G.; CARVALHO, F.I.F. Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1264-1269, 2010.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; BUSTAMANTE, P. G.; SILVA, D. B. **Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum spp.*) da Embrapa Hortaliças**, Embrapa Hortaliças. Documentos n. 49, Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 49p

CHIOU, K.A.L.; HASTORF, C.A.; BONAVIA, D.; DILLEHAY, T.D. Documenting Cultural Selection Pressure Changes on Chile Pepper (*Capsicum baccatum* L.) Seed Size Through Time in Coastal Peru (7600 B. P. – Present). **Economic Botany**, v. 68, n. 2, p. 190–202, 2014.

CRUZ, C.D. **Programa Genes (versão Windows)**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2007. 175p.

FARIA, P. N.; CECON, P.R.; SILVA, A.R.; FINGER, F. L.; SILVA, F.F.; CRUZ, C. D.; SÁVIO, F. L. Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 428-432, 2012.

HILL, T.A.; ASHRAFI, S.; REYES-CHIN-WO, J.; YAO, K.; STOFFEL, M.J.; TRUCO, A. Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene Pepper GeneChip. **PLoS One**, v. 2, n. 8, p.1-16, 2013.

IPGRI, 1995. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum spp.*)**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, v. 50, p. 159-179, 1985.

MOJENA R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.

PADILHA, H.K.M; VASCONCELOS, C.S; VILLELA, J.C.B; VALGAS, R.A.; BARBIERI, R.L. Agronomic evaluation and morphological characterization of chili peppers (*Capsicum annuum*, Solanaceae) from Brazil. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 13, p. 63-70, 2016.

PILLAR, V.P. Multivariate exploratory analysis and randomization testing using Multiv. **Coenoses**, Gorizia, v. 12, n. 1, p. 145-148, 1997.

R Development Core Team, 2007. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Website <http://www.r-project.org/>

RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. 2008. **Genética e melhoramento**. In: RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 55-69 p.

RODRIGUES, R.; BENTO, C.S.; SILVA, M.G.M.; SUDRÉ, C.P. **Atividades de caracterização e avaliação em bancos de germoplasma**. In: PEREIRA, T.N.S. *Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas*. Viçosa: Arca, 2010. p. 115-140.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. 10ª ed. Porto Alegre, 2004. 394p.

VASCONCELOS, C.S.; BARBIERI, R.L.; NEITZKE, R.S.; PRIORI, D.; FISCHER, S.Z.; MISTURA, C.C. Distância genética entre variedades crioulas de *Capsicum chinense*. **Magistra**, v. 26, n. 2, p. 178-185, 2014.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; SILVA, M. S.; FUKUDA, W. M.G.; FALEIRO, F.G. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 56-67, 2008.

Capítulo 2

ABHAYASHREE, M.S.; MURALI, M.; AMRUTHESH, K.N. Abiotic elicitors mediated resistance and enhanced defense related enzymes in *Capsicum annuum* L. against anthracnose disease. **Scientia Horticulturae**, v. 204, p. 172–178, 2016.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology** (5th ed.). San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.

ALEXANDER, S.A.; PERNEZNY, K. Anthracnose. In: PERNEZNY, K.L.; ROBERTS, P.D.; MURPHY, J.F.; GOLDBERG, N.P. (eds) **Compendium of pepper diseases**. APS Press, St. Paul. 2003. 9-10p.

ALI, A.; BORDOH, P.K.; SINGH, A.; SIDDIQUI, Y.; DROBY, S. Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. **Crop Protection**, v. 90, p. 132-141, 2016.

ALLARD, R.W. **Principles of Plant Breeding**. John Wiley & Sons Inc, New York, 1960. 381p.

BARBIERI, R.L.; GOMES, J.C.C.; ALERCIA, A.; PADULOSI, S. Agricultural biodiversity in Southern Brazil: Integrating efforts for conservation and use of neglected and underutilized species. **Sustainability**, v. 6, n. 741–757, 2014.

BECHINGER, C.; GIEBEL, K.F.; SCHNELL, M.; LEIDERER, P.; DEISING, H.B.; BASTMEYER, M. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1896–1899, 1999.

BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. **Peppers: Vegetable and Spice Capsicums** (2nd Edn), Centre For Agriculture and Biosciences International, Oxfordshire, UK. 2012. 248 pp.

BURDON, J.J.; THRALL, P.H. Coevolution of plants and their pathogens in natural habitats. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 755–756, 2009.

CALDWELL, R.; COMPTON, L.; PATTERSON, F. Tolerance to cereal leaf rusts. **Science**, v. 128, p. 714-715, 1958.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN, F.A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. v.1, 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.729-758.

CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum*: Current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.

CANO, J.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2450–2454, 2004.

CASTRO-CONCHA, L.A.; TUYUB-CHE, J.; MOO-MUKUL, A.; VAZQUEZ-FLOTA, F.A.; MIRANDA-HAM, M.L. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero pepper) at different stages of ripening. **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-5, 2014.

CHAVES, F.C.; GIANFAGNA, T. J. Cacao leaf procyanidins increase locally and systemically in response to infection by *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 70, p. 174–179, 2007.

CROUCH, J.A.; O'CONNELL, R.; GAN, P.; BUIATE, E.; TORRES, M.F.; BEIRN, L.; SHIRASU, K.; VAILLANCOURT, L. The Genomics of *Colletotrichum*. 69-102 p. In: DEAN, R.A.; LICHENS-PARK, A.; KOLE, C. (Ed.). **Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2014. 201p.

DIAO, Y.; ZHANG, C.; XU, J.; LIN, D.; LIU, L.; MTUNG'E, O.G.; LIU, X. Genetic differentiation and recombination among geographic populations of the fungal pathogen (*Colletotrichum truncatum*) from chili peppers in China. **Evolutionary Applications**, v. 8, p. 108–118, 2015.

EDIRISINGHE, M.; ALI, A.; MAQBOOL, M.; ALDERSON, P.G. Chitosan controls postharvest anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 4078–4083, 2014.

FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. **Phytopathology**, v. 45, p. 680–685, 1955.

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

FRY, W.E. **Principles of plant disease management**. San Diego: Academic Press, 1982, 378p.

GNIFFKE, P. **Host resistance to pepper anthracnose**. Progress Report. Shanhua, Taiwan: AVRDC – The World Vegetable Center. 2003. Disponível em: <<http://www.avrdc.org/pdf/03anthracnose.pdf>>. Acesso em: 10 junho 2016.

HALSTED, B.D. A new anthracnose of pepper. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 18, p. 14-15, 1890.

HAN, J.; CHON, J.; AHN, J.; CHOI, I.; LEE, Y.; KIM, K.S. Whole genome sequence and genome annotation of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose in pepper plants in South Korea. **Genomics data**, v. 8, p. 45-46, 2016.

JANG, Y.K.; JUNG, E.S.; LEE, H.A.; CHOI, D.; LEE, C.H. Metabolomic Characterization of Hot Pepper (*Capsicum annuum* "cM334") during Fruit Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 43, p. 9452-9460, 2015.

KANCHANA-UDOMKAN, C.; TAYLOR, P.W.J.; MONGKOLPORN, O. Development of a bioassay to study anthracnose infection of chili fruit caused by *Colletotrichum capsici*. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 37, p. 293–297, 2004.

KANTO, T.; UEMATSU, S.; TSUKAMOTO, T.; MORIWAKI, J.; YAMAGISHI, N.; USAMI, T.; SATO, T. Anthracnose of sweet pepper caused by *Colletotrichum scovillei* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 73–78, 2014.

KIM, K.D.; OH, B.J.; YANG, J. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruit. **Phytoparasitica**, v. 27, p. 97–106, 1999.

KIM, K.H.; YOON, J.B.; PARK, H.G.; PARK, E.W.; KIM, Y.H. Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. **Phytopathology**, v. 94, p. 1295-1304, 2004.

KIM, S.; KIM, K.T.; KIM, D.H.; YANG, E.Y.; CHO, M.C.; JAMAL, A.; CHAE, Y.; PAE, D.H.; OH, D.G.; HWANG, J.K. Identification of quantitative trait loci associated with anthracnose resistance in chili pepper (*Capsicum* spp.). **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 28, p. 1014-1024, 2010.

KIM, S.H.; YOON, J.B.; DO, J.W.; PARK, H.G. A major recessive gene associated with anthracnose resistance to *Colletotrichum capsici* in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Breeding Science**, v. 58, p. 137–141, 2008.

KLEEMANN, J.; RINCON-RIVERA, L.J.; TAKAHARA, H.; NEUMANN, U.; VAN THEMAAT, E.V.L.; VAN DER D.H.C.; O'CONNELL, R.J. Sequential delivery of host induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.

KOSHIMÄKI, J.J.; HOKKANEN, J.; JAAKOLA, L.; SUORSA, M.; TOLONEN, A.; MATTILA, S. Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defense responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 629–640, 2009.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I. Melanin biosynthesis: a prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. (eds) **The fungal spore and disease initiation in plants**. Plenum Press, New York, 1991, 205–218p.

KUBO, Y.; TAKANO, Y. Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, n. 4, p. 233-242, 2013.

LEE, J.; HONG, J.; DO, J.; YOON, J.; LEE, J.D.; HONG, J.H.; DO, J.W.; YOON, J.B. Identification of QTLs for resistance to anthracnose to two *Colletotrichum* species in pepper. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 13, p. 227–233, 2010.

LIU, F.; TANG, G.; ZHENG, X.; LI, Y.; SUN, X.; QI, X.; ZHOU, Y.; XU, J.; CHEN, H.; CHANG, X.; ZHANG, S.; GONG, G. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-17, 2016.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 96p.

MAHASUK, P.; TAYLOR, P.W.J.; MONGKOLPORN, O. Identification of two new genes conferring resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Capsicum baccatum*. **Phytopathology**, v. 99, p. 1100–1104, 2009.

MATIELLO, R.R.; BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 161–168, 1997.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DIESING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 34, 367-p. 386, 1996.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SCHMITZER, V.; JAKOPIC, J.; CUNJA, V.; VEBERIC, R.; MUNDA, A.; STAMPAR, F. Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 138–145, 2013.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. 2007. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 190p.

MONGKOLPORN, O.; MONTRI, P.; SUPAKAEW, T.; TAYLOR, P.W.J. Differential reactions on mature green and ripe chili fruit infected by three *Colletotrichum* spp. **Plant Disease**, v. 94, p. 306-310, 2010.

- MONTRI, P.P.; TAYLOR, P.W.J.; MONGKOLPORN, O. Pathotypes of *Colletotrichum capsici* the causal agent of chili anthracnose in Thailand. **Plant Disease**, v. 93, p. 17–20, 2009.
- MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, n. 4, p. 307–320, 2002.
- OO, M.M.; OH, S. Chilli anthracnose (*Colletotrichum* spp.) disease and its management approach. **Korean Journal of Agricultural Science**, v. 43, n. 2, p. 153-162, 2016.
- PARK, S.; JEONG, W.Y.; LEE, J.H.; KIM, Y.H.; JEONG, S.W.; KIM, G.S.; SHIN, S.C. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, p. 981–985, 2012.
- PARK, S.; KIM, S.H.; PARK, H.G.; YOON, J.B. Capsicum germplasm resistant to pepper anthracnose differentially interact with *Colletotrichum* isolates. **Horticulture Environment Biotechnology**, v. 50, p. 17-23, 2009.
- PARLEVLIET, J.E. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 147–156, 2002.
- PARLEVLIET, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 7-15, 1997.
- PEREIRA, M.J.Z; JUNIOR, N.M.; SUSSEL, A.A.B.; SALA, F.C.; COSTA, C.P.; BOITEUX, L.S. Reação de acessos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 569-576, 2011.
- PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 89, p. 784-796, 2005.
- PHOTITA, W.; TAYLOR, P.W.J.; FORD, R.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, H.C.; HYDE, K.D. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 117-133, 2005.
- PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, n. 1, p. 129-133, 1997.
- PRING, R.J.; NASH, C.; ZAKARIA, M.; BAILEY, J.A. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 137–152, 1995.
- PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review Phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 413–434, 1996.

R Development Core Team. 2007. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Website <http://www.r-project.org/>

RÉBLOVÁ, M.; GAMS, W.; SEIFERT, K.A. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 163–191, 2011.

ROBERTS, P.D.; PERNEZNY, K.; KUCHARÉK, T.A. 2001. **Anthraco­nose caused by *Colletotrichum* in pepper.** Gainesville, FL, USA: Factsheet of University of Florida/Institute of Food and Agricultural Sciences.

SAHITYA, U. L.; DEEPTHI, S.; KASIM, P.; SUNEETHA, P.; KRISHNA, M.S.R. Anthracnose, a Prevalent Disease in *Capsicum*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 1583-1604, 2014.

SALGADO, C.L.; TOKESHI, H. Doenças das Solanáceas. In: GALLI, F. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980, v.2, cap.34. p.497-510.

SANTOS, M.R.; HENZ, G.P.; LIMA, M.L.P.; CAFÉ FILHO, A.C. Reação de frutos verdes e maduros de *Capsicum* spp. à antracnose. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 1–58, 2004.

SATO, T. Studies on the taxonomy and identification of plant pathogenic fungi, based on morphology and phylogenetic analyses, and fungal pathogenicity focused on host specificity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, p. 332–337, 2016.

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI, R.; GUPTA, V.K.; SINGH, H.B.; MAHAVIDYALAYA, M. Chilli anthracnose: The epidemiology and management. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-18, 2016.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SHIVAPRAKASH, M. R.; APPANNANAVAR, M.; DHALIWAL, A.; GUPTA, S.; GUPTA, A.; GUPTA, C. *Colletotrichum truncatum*: an unusual pathogen causing mycotic keratitis and endophthalmitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2894–2898, 2011.

SILVA, S.A.M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P.; BENTO, C.S.; CARMO, M.G.F.; MEDEIROS, A.M. Resistance in *Capsicum* spp. to anthracnose affected by different stages of fruit development during pre- and post-harvest. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 335–341, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. 2004. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** Porto Alegre: Comissão de Química e Fertilidade do Solo. 394p.

STRANGE, R.N. 2003. **Introduction to Plant Pathology**. West Sussex UK. John Wiley and Sons.

SUN, C.; MAO, S.L.; ZHANG, Z.H.; PALLOIX, A.; WANG, L.H.; ZHANG, B.X. Resistances to anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) of *Capsicum* mature green and ripe fruit are controlled by a major dominant cluster of QTLs on chromosome P5. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 81–88, 2015.

THAKUR, R.P. Host plant resistance to diseases: potential and limitations. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 35, p. 17–21, 2007.

THAN, P.P.; JEEWON, R.; PRIHASTUTI, H.; PHOULIVONG, S.; TAYLOR, P.W.; HYDE, K.D. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **Journal Zhejiang University Science**, v. 9, p. 764–778, 2008.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p. 147–157, 2006.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York. Academic Press. 1963.

WEBER, N.; VEBERIC, R.; MIKULIC-PETKOVSEK, M.; STAMPAR, F.; KORON, D.; MUNDA, A.; JAKOPIC, J. Metabolite accumulation in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits and runners in response to *Colletotrichum nymphaeae* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 92, p. 119–129, 2015.

YUAN, Z.L.; SU, Z.Z.; MAO, L.J.; PENG, Y.Q.; YANG, G.M. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of Muscodor (Xylariaceae). **Journal of Microbiology**, v. 49, p. 15–23, 2011.

Capítulo 3

AL OTHMAN, Z.A.; AHMED, Y.B.; HABILA, M.A.; GHAFAR, A.A. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. **Molecules**, v.16, p. 8919-8929, 2011.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T.J. Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cacao (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicioso*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 13–16, 2001.

ANTONIALI, S.; LEAL, P.A.M.; MAGALHÃES, A.M.; FUZIKI, R.T.; SANCHES, J. Physico-chemical characterization of 'zarco hs' yellow bell pepper for different ripeness stages. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 1, p. 19-22, 2007.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of Analysis**. 18 ed. Washington DC US, 2006.

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 54–59, 2010.

ARDI, R.; KOBILER, I.; KEEN, N.T.; PRUSKY, D. Involvement of epicatechin biosynthesis in the resistance of avocado fruits to postharvest decay. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 53, p. 269-285, 1998.

ARIMBOOR, R.; NATARAJAN, R. B.; MENON, K.R.; CHANDRASEKHAR, L.P.; MOORKOTH, V. Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 1–14, 2014.

BALDRIAN, P. Fungal laccases—occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215–242, 2006.

BARBIERI, R.L.; GOMES, J.C.C.; ALERCIA, A.; PADULOSI, S. Agricultural biodiversity in Southern Brazil: Integrating efforts for conservation and use of neglected and underutilized species. **Sustainability**, v. 6, n. 741–757, 2014.

BOGUSZEWSKA, D.; ZAGDANSKA, B. 2012. ROS as signaling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions. In: LUSHCHAK V.L.; SEMCHYSHYN, H.M. (eds). **In oxidative stress – molecular mechanisms and biological effects**. 341-375p.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: Vegetable and spice *Capsicum***. CABI Publishing, 2012. 204p.

CERVANTES-PAZ, B.; YAHIA, E.M.; ORNELAS-PAZ, J.J.; VICTORIA-CAMPOS, C.I.; IBARRA-JUNQUERA, V.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J.D.; ESCALANTE-MINAKATA, P. Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeño peppers at intermediate stages of ripening. **Food chemistry**, v. 146, p. 188-96, 2014.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764–775, 1955.

CHAVES, F.C.; GIANFAGNA, T.J. Cacao leaf procyanidins increase locally and systemically in response to infection by *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 70, p. 174–179, 2007.

CHO, S.M.; KANG, B.R.; HAN, S.H.; ANDERSON, A.J.; PARK, J.Y.; LEE, Y.H.; CHO, B.H.; YANG, K.Y.; RYU, C.M.; KIM, Y.C. 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 8, p. 1067–1075, 2008.

CHUNG, J.; SONG, G.C.; RYU, C.M. Sweet scents from good bacteria: Case studies on bacterial volatile compounds for plant growth and immunity. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 677–687, 2016.

COLLERA-ZÚÑIGA, O.; JIMÉNEZ, F.G.; GORDILLO, R. M. Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. **Food Chemistry**, v. 90, p. 109-114, 2005.

D'ALESSANDRO, M.; ERB, M.; TON, J.; BRANDENBURG, A.; KARLEN, D.; ZOPFI, J.; TURLINGS, T.C. Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, p. 813–826, 2014.

EDIRISINGHE, M.; ALI, A.; MAQBOOL, M.; ALDERSON, P.G. Chitosan controls postharvest anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 4078–4083, 2014.

EFFANTIN, G.; RIVASSEAU, C.; GROMOVA, M.; BLIGNY, R.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. Massive production of butanediol during plant infection by phytopathogenic bacteria of the genera *Dickeya* and *Pectobacterium*. **Molecular Microbiology**, v. 82, p. 988–997, 2011.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185–212, 2009.

FORTUNATO, A.A.; DEBONA, D.; BERNARDELI, A.M.A.; RODRIGUES, F.A. Defence-Related Enzymes in Soybean Resistance to Target Spot. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 9, p. 731-742, 2015.

GARCÍA PÉREZ, M.; EGEEA, C.; CANDELA, M. Defence response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici*. **Physiologia Plantarum**, v. 103, p. 527– 533, 1998.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, p. 794-802, 2013.

GUETSKY, R.; KOBILER, I.; WANG, X.; PERLMAN, N.; GOLLOP, N.; AVILA-QUEZADA, G.; HADAR, I.; PRUSKY, D. Metabolism of the flavonoid epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on pathogenicity on avocado fruits. **Phytopathology**, v. 95, p. 1341–1348, 2005.

HAN, S.H.; LEE, S.J.; MOON, J.H.; PARK, K.H.; YANG, K.Y.; CHO, B.H.; KIM, K.Y.; KIM, Y.W.; LEE, M.C.; ANDERSON, A.J.; KIM, Y.C. GacS-dependent production of 2R,3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for

eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 924–930, 2006.

HASTINGS, J.; MATOS, P.; DEKKER, A.; ENNIS, M.; HARSHA, B.; KALE, N.; MUTHUKRISHNAN, V.; OWEN, G.; TURNER, S.; WILLIAMS, M.; STEINBECK, C. The ChEBI reference database and ontology for biologically relevant chemistry: enhancements for 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 1-10, 2013.

HASTINGS, J.; MATOS, P.; DEKKER, A.; ENNIS, M.; HARSHA, B.; KALE, N.; STEINBECK, C. The ChEBI reference database and ontology for biologically relevant chemistry: enhancements for 2013. **Nucleic acids research**, v. 41, 2013.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 184-185, 1990.

HORAI, H.; ARITA, M.; KANAYA, S.; NIHEI, Y.; IKEDA, T.; SUWA, K.; ODA, Y. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of mass spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010.

JESUS, A.J.L.; TOMÉ, L.I.N.; EUSÉBIO, M.E.S.; REDINHA, J.S. Determination of the enthalpy of solute-solvent interaction from the enthalpy of solution: Aqueous solutions of erythritol and L-threitol. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 18, p. 9280–9285, 2006.

KANCHANA-UDOMKAN, C.; TAYLOR, P.W.J.; MONGKOLPORN, O. Development of a bioassay to study anthracnose infection of *Capsicum chinense* Jacq. fruit caused by *Colletotrichum capsici*. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 37, p. 293-297, 2004.

KANEHISA, M.; ARAKI, M.; GOTO, S.; HATTORI, M.; HIRAKAWA, M.; ITOH, M.; YAMANISHI, Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 1, 2008.

KIM, S.; PARK, M., YEOM, S.I. et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. **Nature Genetics**, v. 46, n. 3, p. 271-278, 2014.

KIM, Y.S.; PARK, J.Y.; KIM, K.S.; KO, M.K.; CHEONG, S. J.; OH, B.J. A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. **Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 2, p. 125–135, 2002.

KOLATTUKUDY, P.E.; ROGERS, L.M.; LI, D.; HWANG, C.S.; FLAISHMAN, M.A. Surface signaling in pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 92, p. 4080-4087, 1995.

KOSKIMÄKI, J. J.; HOKKANEN, J.; JAAKOLA, L.; SUORSA, M.; TOLONEN, A.; MATTILA, S. Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defense

responses of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 629–640, 2009.

KUMAR, V. B. A.; MOHAN, T. C. K.; MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 328–333, 2008.

KWAN, G.; CHARKOWSKI, A.O.; BARAK, J.D. *Salmonella enterica* suppresses *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* population and soft rot progression by acidifying the microaerophilic environment. **MBio**, v. 4, n. 1, 55-57, 2013.

LEE, M. H., BOSTOCK, R. M. Fruit exocarp phenols in relation to quiescence and development of *Monilinia fructicola* infections in *Prunus* spp. A role for cellular redox? **Phytopathology**, v. 97, p. 269–277, 2007.

LEMOINE, M. L.; CHAVES, A. R.; MARTÍNEZ, G. A. Influence of combined hot air and UV-C treatment on the antioxidant system of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1313–1319, 2010.

LIAO, C.Y.; CHEN, M.Y.; CHEN, Y.K.; WANG, T.C.; SHEU, Z.M.; KUO, K.C.; CHANG, P.F.L.; CHUNG, K.R.; LEE, M.H. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, p. 599–608, 2012.

LOPEZ-HERNANDEZ, J.; ORUNA-CONCHA, M.J.; SIMAL-LOZANO, J.; GONZALES-CASTRO, M.J.; VAZQUEZ-BLANCO, M.E. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in cayenne pepper and padron peppers by HPLC. **Deutsche Lebensmittel Rundschau**, v. 92, p. 393-395, 1996.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SCHMITZER, V.; JAKOPIC, J.; CUNJA, V.; VEBERIC, R.; MUNDA, A.; STAMPAR, F. Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 138-145, 2013.

MILES, T.D.; HANCOCK, J.F.; CALLOW, P.; SCHILDER, A.M.C. Evaluation of screening methods and fruit composition in relation to anthracnose fruit rot resistance in blueberries. **Plant Pathology**, v. 61, n. 3, p. 555–566, 2012.

MORRISEY, J. P., OSBOURN, A. E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism to pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p.708-724, 1999.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.

NEITZKE, Raquel. **Recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum* – explorando a multiplicidade de usos**. 2012. 115f (Tese doutorado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

OLIVEIRA, A.L.; BRUNINI, M.A.; SALANDANI, C; BAZZO, F.R. Caracterização tecnológica de jacobinas “Sabará” provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 397–400, 1999.

PADILHA, H. K. M.; PEREIRA, E. S.; MUNHOZ, P. C.; VIZZOTTO, M.; VALGAS, R. A.; BARBIERI, R. L. Genetic variability for synthesis of bioactive compounds in peppers (*Capsicum annuum*). **Food Science and Technology**, v. 35, p. 516-523, 2015.

PARK, S.; JEONG, W. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y.H.; JEONG, S. W.; KIM, G.S.; SHIN, S. C. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 981–985, 2012.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, n. 1, p. 129-133, 1997.

PODILA, G.K.; ROGERS, L.M.; KOLATTUKUDY, P.E. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 267-272, 1993.

RAI, M.; AGARKAR, G. Plant-fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 78, p. 1–11, 2014.

RUIZ-LAU, N.; MEDINA-LARA, F.; MINERO-GARCIA, Y.; ZAMUDIO-MORENO, E.; GUZMAN-ANTONIO, A.; ECHEVARRIA-MACHADO, I. Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of *Capsicum chinense* Jacq. **Hortscience**, v. 46, n.3, p.487–492, 2011.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARE, P.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1017–1026, 2004.

SCHWEIGGERT, U.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2617–2628, 2005.

SINGH, J.P.; SHARMA, S.K. Screening and chemical basis of resistance in guava varieties to anthracnose (*Glomerella cingulata*). **Haryana Journal of Horticultural Sciences**, v. 10, p. 155-157, 1981

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SMITH, C. A.; O'MAILLE, G.; WANT, E. J.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; BRANDON, T. R.; SIUZDAK, G. METLIN: a metabolite mass spectral database. **Therapeutic drug monitoring**, v. 27, n.6, p. 747-751, 2005.

SONG, G.C.; RYU, C.M. Two Volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 9803–9819, 2013.

SUNG, Y.; CHANG, Y. Y.; TING, N. L. Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, n.1, p. 35–42, 2005.

TAHBOUB, M. B.; SANOGO, S.; BOSLAND, P. W.; MURRAY, L. Heat level in chile pepper in relation to root and fruit infection by *Phytophthora capsici*. **Hortscience**, v. 43, n. 6, p.1846–1851, 2008.

TATTERSALL, D.B.; VAN HEESWIJCK R.; HOJ, P.B. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. **Plant Physiology**, v. 114, p. 759–769, 1997.

TEWKSBURY, J. J.; REAGAN, K. M.; MACHNICKI, N. J.; CARLO, T. A.; HAAK, D.C.; PENALOZA, A.L.C.; LEVEY, D.J. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11808–11811, 2008.

THAN, P.P.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P.W.J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chili (*Capsicum* sp.) in Thailand. **Plant Pathology**, v. 57, n.3, p. 562–572, 2008.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p.147–157, 2006.

WAHYUNI, Y.; BALLESTER, A.R.; TIKUNOV, Y.; DE VOS, R.C.; PELGROM, K.T.; MAHARIJAYA, A.; SUDARMONOWATI, E.; BINO, R.J.; BOVY, A.G. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics**, v. 9, n.1, p. 130-144, 2013.

WEBER, N.; VEBERIC, R.; MIKULIC-PETKOVSEK, M.; STAMPAR, F.; KORON, D.; MUNDA, A.; JAKOPIC, J. Metabolite accumulation in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits and runners in response to *Colletotrichum nymphaeae* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 92, p. 119–129, 2015.

XIAO, Z.; XU, P. Acetoin metabolism in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 33, p. 127–140, 2007.

ZIINO, M.; CONDURSO, C.; ROMEO, V.; TRIPODI, G.; VERZERA, A. Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum annuum* L.) of different Calabrian varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 774–780, 2009.