

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO
TRÓPICO ÚMIDO – PPGATU**

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Colletotrichum ASSOCIADOS AO GÊNERO *Capsicum* NO AMAZONAS**

LAÍS BENTES DE ALMEIDA

**MANAUS – AMAZONAS
AGOSTO/2015**

LAÍS BENTES DE ALMEIDA

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Colletotrichum ASSOCIADOS AO GÊNERO *Capsicum* NO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito final para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Rogério Eiji Hanada, Dr.

COORIENTADOR: Gilvan Ferreira da Silva, Dr.

MANAUS – AMAZONAS

AGOSTO/2015

Aos meus pais, José Valder e Iêda, por todos os ensinamentos de vida e incentivo aos estudos.

Às minhas irmãs, Walessa, Valéria e Lívia, pela parceria e presença em cada minuto.

À minha sobrinha, Sarah, por ser fonte de um amor incondicional que rega minha vida e me enche de alegria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Força Maior que rege nossos passos, protege nossas vidas e me dá combustível para viver e apreciar o sabor de mais uma vitória.

À Fapeam – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas, pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido (PPG-ATU/INPA), aos professores pelo conhecimento transmitido, a infraestrutura e suporte financeiro.

Ao meu querido orientador e maior incentivador, Dr. Rogério Eiji Hanada, que transborda generosidade com tantos conselhos sábios sobre a vida. Muito obrigada pelas conversas, por inserir a pesquisa na minha vida acadêmica com muito entusiasmo, pela paciência e por acreditar em mim.

Ao laboratório de Fitopatologia, na pessoa do técnico Luiz Alberto Guimarães Assis, pra mim, sempre ‘O Grande Mestre Tirico’, que dividiu comigo muitas risadas, conhecimento prático e uma agradável companhia nos dias de coleta de material.

À Embrapa Amazônia Ocidental, por permitir a integração pesquisa e ensino e ceder estrutura física para o desenvolvimento das atividades do projeto de dissertação.

Ao meu coorientador Dr. Gilvan Ferreira da Silva, que abriu as portas do Laboratório de Biologia Molecular e me recebeu com muita boa vontade, paciência e trabalho aos montes. Muito obrigada, Criatura!

Aos técnicos Jefferson Cruz e Karina Bichara pelo auxílio em todas as etapas do experimento no laboratório, me tornando autossuficiente para trabalhar e o ter conseguido sem usar o chuveiro ou a saída de emergência. À Pós doc. Kedma Matos e todos os bolsistas e amigos do BIOMOL, que tornaram meus dias mais divertidos e fizeram das minhas refeições um momento para contar histórias, fofocar e rir muito.

Aos colegas do ATU, pelo aprendizado adquirido com a convivência, em especial a Kamila Freire, Vanessa Kellen, Jonathas Alves e Tiago Ayub, pela parceria. Valeu!

À minha família, que foi mais do que suporte, foi meu porto seguro, minha fortaleza e os mercedores dessa vitória, foi por vocês! Amo demais.

Aos amigos, todos vocês, que tem seu lugar e sua parcela de contribuição em cada degrau alcançado nessa imensa escada da vida. Ana Xik, Jones e Ariane, muito obrigada pela presença (em todos os sentidos) na minha vida, vocês fazem parte do meu quebra-cabeça. Amo todos. Muito obrigada!!!

RESUMO

Espécies do gênero *Colletotrichum* são amplamente distribuídas por regiões temperadas, tropicais e subtropicais e causam uma doença conhecida como antracnose em numerosos gêneros de plantas hospedeiras. É comum encontrar várias espécies de *Colletotrichum* patogênicas a um mesmo hospedeiro, assim como é comum uma mesma espécie causar sintomas da doença em diversas plantas hospedeiras. O cultivo de pimentões e pimentas é frequentemente atacado por várias espécies de *Colletotrichum* e registra altas perdas no rendimento econômico devido aos danos gerados pela doença. Assim, a correta identificação do agente causal é primordial para definir as estratégias de controle e manejo integrado, de modo que o desenvolvimento de uma estratégia de gestão eficaz depende, entre outros fatores, do conhecimento sobre a etiologia da doença, da diversidade genética e estrutura da população do patógeno. Com o intuito de identificar as espécies de *Colletotrichum* responsáveis por causar antracnose em frutos de plantas do gênero *Capsicum* no Estado do Amazonas, neste trabalho foram analisados 94 isolados obtidos de frutos de pimentão, pimenta cheirosa e pimenta murupi. A identificação foi realizada com base no sequenciamento e análise multilocus de regiões parciais dos genes ACT, CHS, GAPDH, HIS e GS e permitiu a identificação de sete diferentes espécies de *Colletotrichum* associadas à lesões de antracnose em frutos de plantas de *Capsicum* (*C. scovillei*, *C. truncatum*, *C. brevisporum*, *C. siamense*, *C. fruticola*, *C. theobromicola* e *C. gloeosporioides*). Foi possível verificar a predominância de *C. scovillei* nos municípios de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, *C. siamense* no município de Manacapuru, *C. brevisporum* em Manacapuru e *C. truncatum* exclusivamente no município de Iranduba. As espécies patogênicas de *Colletotrichum* encontram-se amplamente difundidas no Estado do Amazonas afetando a sanidade dos plantios e causando prejuízos econômicos aos produtores, confirmando a distribuição cosmopolita, baixa especificidade patogênica e alto potencial evolutivo das espécies pertencentes a esse gênero.

Palavras-chave: antracnose, filogenia, análise multilocus

ABSTRACT

Colletotrichum species of the genus are widely distributed in temperate, tropical and subtropical regions and cause a disease known as anthracnose in numerous genres of host plants. It is common to find several *Colletotrichum* species pathogenic to the same host, as it is a species common cause disease symptoms in various host plants. The cultivation of chillies and peppers are often attacked by several species of this pathogen and register high losses in economic output due to damage caused by the disease. Thus, the correct identification of the causative agent is essential for defining control strategies and integrated management, so that the development of an effective management strategy depends, among other factors, the understanding of the etiology of disease, genetic diversity and structure of the pathogen population. In order to identify the species of *Colletotrichum* responsible for causing anthracnose in the *Capsicum* plant fruits in the State of Amazonas, this study analyzed 94 isolates from three host plants. The identification was based on multilocus sequencing and analysis of partial regions of the ACT gene, CHS, GAPDH, HIS and GS and allowed the identification of seven different species of the pathogen affecting fruit chilli, pepper and fragrant murupi pepper (*C. scovillei*, *C. truncatum*, *C. brevisporum*, *C. siamense*, *C. fruticola*, *C. theobromicola* and *C. gloeosporioides*). It was possible to confirm the predominance of *C. scovillei* in the municipalities of Presidente Figueiredo and Rio Preto da Eva, *C. siamense* in the city of Manacapuru, *C. brevisporum* in Manacapuru and *C. truncatum* exclusively in the municipality of Iranduba. The pathogenic species of *Colletotrichum* are widespread in the State of Amazonas causing anthracnose in fruits of *Capsicum*, confirming the cosmopolitan distribution, low pathogenic specificity and high evolutionary potential of the species belonging to this genre.

Keywords: anthracnose, phylogeny, multilocus analysis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendrograma gerado pelos marcadores CGRN_ACT, CGRN_CAL, CGRN_CHS, CGRN_GAPDH, CGRN_HIS e ERIC-PCR, constituído com base na similaridade genética entre os 94 isolados de *Colletotrichum* obtido pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Nomeou-se os isolado com uma sigla, as primeiras letras referem-se à origem geográfica: Iranduba (IRA), Manacapuru (MPU), Presidente Figueiredo (PF) e Rio Preto da Eva (RPE). As duas últimas letras referem-se ao hospedeiro: pimentão (PI), pimenta cheirosa (PC) e pimenta murupi (PM). O número corresponde à ordem no isolamento..... 344
- Figura 1.** Dendrograma gerado pelos marcadores CGRN_ACT, CGRN_CAL, CGRN_CHS, CGRN_GAPDH, CGRN_HIS e ERIC-PCR, constituído com base na similaridade genética entre os 94 isolados de *Colletotrichum* obtido pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Nomeou-se os isolado com uma sigla, as primeiras letras referem-se à origem geográfica: Iranduba (IRA), Manacapuru (MPU), Presidente Figueiredo (PF) e Rio Preto da Eva (RPE). As duas últimas letras referem-se ao hospedeiro: pimentão (PI), pimenta cheirosa (PC) e pimenta murupi (PM). O número corresponde à ordem no isolamento..... 355
- Figura 2.** Distribuição geográfica das espécies de *Colletotrichum* identificadas, onde IRA (Iranduba), MPU (Manacapuru), PF (Presidente Figueiredo) e RPE (Rio Preto da Eva)..... 378
- Figura 3.** Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS concatenadas contendo isolados do complexo *C. acutatum*. Como *outgroup* foi utilizado os isolados *C. orchidophilum* (CBS 63180 e CBS 63280). Valores de probabilidade a posteriori são mostrados nos nós dos ramos da árvore.....39
- Figura 4.** Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS concatenadas contendo isolados do complexo *C. gloeosporioides*. Como *outgroup* foi utilizado *C. boninense* (MAFF 305972). Valores de probabilidade a posteriori são mostrados nos nós dos ramos da árvore.....41
- Figura 5.** Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS contendo isolados do complexo *C. truncatum*. Como *outgroup* foi utilizado o isolado *C. lindemuthianum* (CBS 15128). Valores de probabilidade a posteriori são mostrados nos nós dos ramos da árvore.....43
- Figura 6.** Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS concatenadas contendo isolados de *Colletotrichum brevisporum* e outras espécies do gênero. Como *outgroup* foi utilizado os isolados de *C. chlorophyti* (CBS 14279 e IMI 103806). Valores de probabilidade a posteriori são mostrados nos nós dos ramos da árvore.....44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Espécies de *Colletotrichum* relatadas como agentes causais da antracnose em *Capsicum* spp..... 18
- Tabela 2.** Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos do gênero *Capsicum* no Amazonas. **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 3.** Lista de *primers* utilizados para análise da diversidade em *Colletotrichum* spp. **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 4.** Lista de *primers* utilizados para o sequenciamento e análise filogenética. **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 5.** Distribuição dos isolados de *Colletotrichum* por local de coleta e hospedeiro..... 33
- Tabela 6.** Isolados selecionados para o sequenciamento com base no polimorfismo genético. 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Geral.....	12
2.2 Específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 O gênero <i>Colletotrichum</i>	14
3.2 Marcadores moleculares.....	21
3.3 Complexo de espécies.....	Erro! Indicador não definido.
3.4 Antracnose.....	16
3.5 Importância socioeconômica das pimentas.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Obtenção dos isolados.....	25
4.2 Manutenção dos isolados.....	Erro! Indicador não definido.
4.3 Extração de DNA.....	Erro! Indicador não definido.
4.4 Diversidade genética por meio de marcadores moleculares.....	Erro! Indicador não definido.
4.5 Identificação molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.....	Erro! Indicador não definido.
4.6 Análise filogenética.....	Erro! Indicador não definido.
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Distribuição geográfica dos isolados.....	33
5.2 Diversidade genética.....	33
5.3 Análise filogenética.....	37
5.3.1 Complexo acutatum.....	38
5.3.2 Complexo gloeosporioides.....	40
5.3.3 Complexo truncatum.....	42
5.3.4 <i>Colletotrichum brevisporum</i> Noireung.....	43
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de hortaliças da família Solanaceae, em especial de plantas do gênero *Capsicum*, possui elevada importância econômica no Brasil, gerando altos rendimentos financeiros com seus frutos sendo consumidos *in natura*, no processamento de molhos, temperos ou conservas de pimentas (Viana 2007; Alves 2008). No Amazonas, o cultivo de plantas deste gênero é desenvolvido principalmente por agricultores familiares, onde além de cumprir importante papel social, criando empregos em especial durante a colheita, é também uma fonte significativa de geração de renda para as populações agrícolas (Moreira *et al.* 2006).

As condições climáticas de altas temperaturas e umidade encontradas na região Amazônica são consideravelmente favoráveis ao desenvolvimento e disseminação de espécies do gênero *Colletotrichum*. Esses fungos são responsáveis por causar doenças em mais de 470 gêneros de plantas hospedeiras, incluindo hortícolas, cereais, frutíferas e ornamentais, infectando vários órgãos da planta como folhas, flores, frutos e ramos. As lesões causadas por estes patógenos afetam as plantas em todas as fases de cultivo, resultando em perdas de até 100% na produção de algumas culturas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Bailey e Jeger 1992; Lins e Coelho 2004; Viana 2007).

A ocorrência de doenças em espécies cultivadas por agricultores familiares na Calha do Rio Solimões foi relatada por Noda e colaboradores (2007), que destacaram a antracnose como frequente em vários hospedeiros e responsáveis por causar enormes prejuízos econômicos no cultivo de pimentões e pimentas todos os anos. Dentre os frutos do gênero *Capsicum* mais afetados por espécies de *Colletotrichum*, de acordo com o número de relatos de ocorrência da doença, são citadas *C. annuum* L. (pimentão), *C. frutescens* L. (pimenta malagueta) e *C. chinense* Jacq. (pimenta bode e pimenta-de-cheiro) em diversas partes do mundo.

É comum encontrar diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* causando antracnose em um único hospedeiro, e apenas uma espécie como causadora da doença em diversas espécies de plantas. (Menezes 2006). Até o momento, pelo menos cinco espécies já

foram citadas como agentes causais da antracnose em pimentões e pimentas no mundo inteiro (Azevedo 2006; Tozze Júnior *et al.* 2006, 2008).

A correta identificação do patógeno é de fundamental importância para aplicação direcionada das práticas de manejo, pois representa o passo inicial para adoção de tais medidas. O conhecimento da identidade do agente causal permite relacionar informações sobre o desenvolvimento da doença com as condições do ambiente e hospedeiro, visando o manejo integrado e consequente controle do patógeno e redução dos danos econômicos.

A diferenciação entre espécies de *Colletotrichum* é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos e culturais, como crescimento micelial, tamanho de conídios, formação de apressórios, coloração das colônias e presença de setas (Menezes 2006). Entretanto, devido à alta variabilidade genética, instabilidade e escassez dos caracteres morfológicos, o uso de técnicas baseadas em características fenotípicas pode não ser suficiente para diferenciar espécies com precisão, necessitando de métodos complementares e mais sensíveis na identificação de fitopatógenos (Tozze Júnior *et al.* 2007).

Nas últimas décadas, métodos baseados em análises de DNA têm sido amplamente utilizados em diversos estudos como ferramentas úteis para diferenciação de variabilidade genética e distinção de isolados do gênero *Colletotrichum* (Peres 2002; Afanador-Kafuri *et al.* 2003). As informações geradas por estes trabalhos são indispensáveis como base de todo e qualquer programa de melhoramento genético de plantas visando à obtenção de cultivares resistentes à doença, bem como recomendações para a escolha adequada de espécies em cultivo rotacionado (Tozze Júnior *et al.* 2007).

Diante disso, o emprego de métodos moleculares foi utilizado no presente estudo com a finalidade de permitir a identificação precisa das espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose em plantas do gênero *Capsicum* no Amazonas, fundamental para o entendimento da epidemiologia da doença, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de manejo e controle, e para o melhoramento de variedades de plantas resistentes à doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar isolados de *Colletotrichum* oriundos de plantas de gênero *Capsicum* no Amazonas.

2.2 Específicos

Analisar a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* por meio de marcadores moleculares.

Realizar a identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* obtidos de plantas do gênero *Capsicum* com base em análise filogenética.

Verificar a distribuição geográfica e a predominância de espécies nos municípios de coleta.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância socioeconômica das pimentas

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanacea e inclui pimentas doces e picantes, entre elas espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres. O local de origem e centro de dispersão desse gênero ocorre em toda a região tropical do continente americano, abrangendo o México, América Central e América do Sul, porém o centro de diversidade pode variar conforme a espécie.

Entre as 27 espécies conhecidas do gênero *Capsicum*, as mais populares são *C. annuum* L. (pimentão), *C. chinense* Jacq. (pimenta cheirosa), *C. frutescens* L. (pimenta malagueta), e *C. baccatum* L. (pimenta cumari), com diferentes centros de diversidade para cada espécie. O núcleo de diversidade de *C. annuum* var. *annuum* inclui o México e a América Central, o de *C. frutescens* inclui as terras baixas do Sudeste brasileiro até a América Central e as Antilhas no Caribe, o de *C. baccatum* var. *pendulum* inclui a Bolívia, onde ocorre a maior diversidade, e o Sudeste brasileiro, enquanto o de *C. chinense*, a mais brasileira das espécies domesticadas, é a Bacia Amazônica (De Witt; Bosland 1993; Reifschneider 2000).

O Brasil possui ampla diversidade de espécies de *Capsicum*, com destaque para *C. annuum* var. *annuum*; *C. baccatum* var. *pendulum*; *C. chinense* e *C. frutescens*, responsáveis por um ramo do agronegócio que movimenta, desde o processamento até a comercialização, cerca de R\$ 80 milhões por ano, com produtividade média variando de 10 a 30 t/ha/ano. A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de unidades processadoras, colocando o agronegócio de pimentas (doces e picantes) em realce. Parte da produção brasileira de pimentas é exportada em diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas ornamentais e o produto fresco ou em conserva é consumido principalmente no mercado interno (Reifschneider 2000; Viana 2007).

O cultivo de pimentas no Brasil é de grande importância, por suas características de rentabilidade, quando o produtor agrega valor ao produto e por sua importância social. O plantio dessas hortaliças é desenvolvido principalmente por agricultores familiares e gera empregos e renda, pois exige elevada quantidade de mão de obra, em especial durante a colheita (Moreira *et al.* 2006).

No Amazonas, a baixa utilização de insumos exigidos para a condução do plantio, além da pouca exigência em mão-de-obra qualificada durante a colheita, torna o cultivo dessas hortaliças uma alternativa viável para o incremento da renda familiar (Moreira *et al.*

2006). Segundo dados do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM), o Estado produz em média 4.455 toneladas de pimentões e pimentas por ano, com destaque para os municípios de Iranduba, Manacapuru, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva.

Os problemas fitossanitários representam um sério entrave à produtividade com grande risco de perdas para o produtor. Durante o cultivo, diversas pragas e doenças ocorrem tanto em cultivo protegido como em campo aberto, principalmente viroses, murchas bacterianas, murcha de fitófitora, oídios, antracnoses, ácaros e tripes, que são extremamente limitantes à produção e podem causar perdas significativas.

Dentre estas, a antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, pode ser considerada uma doença comum e de ocorrência generalizada no Brasil, especialmente quando o período de cultivo coincide com clima quente e úmido. Nestas circunstâncias, a antracnose é altamente destrutiva e causa perdas de até 100% na produção de frutos (Kurozawa e Pavan 2005).

O cultivo dessas hortaliças revela grande potencial para a expansão da cultura na região amazônica devido às suas características de ciclo curto e de fácil manejo, trazendo inúmeros benefícios aos produtores locais. O controle eficiente da antracnose representa diminuição das perdas dos frutos e dos gastos com insumos, gerando menores custos de produção e consequentemente maior incremento na renda familiar.

3.2 O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* descrito por Corda em 1831, pertence ao Filo Ascomycota, família Glomerellaceae e possui a fase teleomórfica denominada de *Glomerella* spp. Este gênero compreende diversas espécies com hábitos de vida diferentes, incluindo endofíticas, saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas últimas, responsáveis por doenças economicamente importantes comumente denominadas de antracnoses, que ocorrem em extensa gama de hospedeiros (Costa *et al.* 2013). Os danos causados por esse patógeno o colocam em oitavo lugar no grupo de fungos fitopatogênicos de maior relevância mundial, eleito por pesquisadores com base na sua importância científica e econômica (Dean *et al.* 2012).

Colletotrichum spp. é um fungo cosmopolita e de ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em várias regiões do globo com ocorrência nas zonas temperada, subtropical e tropical (Freeman 1998). Cerca de 900 espécies já foram descritas ou transferidas para o gênero *Colletotrichum*, onde apenas para a espécie *C. gloeosporioides*

(Penz.) Penz. & Sacc. são citadas cerca de 600 sinônimas, indicando o grande número de indivíduos com características distintas e variáveis agrupados dentro de um mesmo complexo de espécies (Von Arx 1957 e Bailey *et al.* 1992).

Devido às diferenças existentes entre as espécies desse gênero, há grande dificuldade no desenvolvimento de medidas de controle da antracnose quando causada por mais de uma espécie simultaneamente, dificultando também a seleção de cultivares resistentes à doença (Menezes 2006). Grande parte das espécies de *Colletotrichum* apresenta baixa especificidade patogênica e tem a capacidade de afetar caules, raízes, folhas, frutos e flores, o que causa enormes prejuízos nas fases de pré e pós-colheita, especialmente em regiões tropicais e subtropicais em que as condições climáticas favorecem o desenvolvimento do patógeno (Piccinin *et al.* 2005).

A taxonomia deste gênero ainda é confusa, e recentemente, tem passado por diversas modificações com o intuito de revelar as relações sistemáticas e uniformizar a nomenclatura e características de cada espécie de *Colletotrichum* descrita. Tanto para as espécies anamórficas como as teleomórficas (*Glomerella* spp.), quando há necessidade de informações detalhadas a cerca de determinado isolado fitopatogênico, os critérios morfológicos se tornam incipientes (Weir *et al.* 2012).

A identificação e caracterização deste gênero tradicionalmente basearam-se em caracteres morfológicos, como dimensões e formato de conídios e apressórios, culturais como coloração da colônia e taxa de crescimento micelial e patogênicos em testes de gama de hospedeiros (Tozze Júnior *et al.* 2006). Berstein *et al.* (1995) estudando isolados de abacate (*Persea americana* Mill.), maçã (*Malus domestica* Borkh.), morango (*Fragaria vesca* L.), pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) e pêssego (*Prunus pérsica* L.), constataram que os isolados identificados como *C. acutatum* apresentavam coloração rosada e alaranjada e os isolados identificados como *C. gloeosporioides* apresentavam colônias de coloração acinzentada. Entretanto, estes critérios por si só nem sempre são suficientes para diferenciar as espécies devido às variações na morfologia e fenótipo sob diferentes condições ambientais (Than *et al.* 2008).

O estudo sobre a patogenicidade específica a determinado hospedeiro ou grupo de hospedeiros, é também constantemente utilizado como método auxiliar na identificação de espécies de *Colletotrichum*, sendo importante para determinar se o patógeno em particular é específico do hospedeiro ou tem uma ampla gama de espécies hospedeiras. Se o grupo taxonômico tem uma ampla gama de hospedeiros, a espécie é passível de ser cosmopolita e um provável agente patogênico oportunista. Estudos de gama de hospedeiros podem fornecer

dados úteis para a classificação e futura delimitação das espécies (Sutton 1980; Baxter *et al.* 1983; Cai *et al.* 2009). Por meio de testes de patogenicidade em ramos e frutos de macieira, Carvalho *et al.* (2000) caracterizaram isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* J.H. Simmonds, ambos associados à podridão amarga da maçã. As inoculações em frutos revelaram que as duas espécies são capazes de causar podridões, com algumas diferenças na sintomatologia. Porém, somente os isolados da espécie *C. gloeosporioides* foram patogênicos às folhas de macieira, sendo, portanto, essa espécie agente causal da mancha de *Glomerella* em macieiras no Brasil.

Devido à grande plasticidade fenotípica dos caracteres morfológicos, à extensa gama de hospedeiros e à variabilidade patogênica de espécies de *Colletotrichum*, métodos tradicionais antes utilizados como critérios únicos de classificação, hoje têm sido usados como complemento, que em conjunto com técnicas moleculares tem fornecido as bases para a moderna taxonomia deste gênero (Menezes 2006; Pereira 2009). O advento da aplicação em larga escala de métodos moleculares em estudos de *Colletotrichum* revolucionou a pesquisa nesse gênero e o número de trabalhos utilizando tais métodos para elucidar as relações em *Colletotrichum* aumentou rapidamente após o início de 1990 (Cannon *et al.* 2012).

O uso de marcadores e técnicas moleculares têm se tornado a principal ferramenta para identificação precisa e entendimento das relações sistemáticas encontradas entre as espécies em cada patossistema. A identificação precoce do agente causal é primordial para se buscar mais rapidamente medidas de controle e prevenção da antracnose em campo (Atkins; Clark, 2004).

3.3 Antracnose

De origem grega, a palavra antracnose que significa "carvão", dá nome a uma doença comum e de ocorrência generalizada, caracterizada por lesões enegrecidas e deprimidas causadas por fungos do gênero *Colletotrichum*. Os patógenos causam significativas perdas econômicas em culturas de regiões temperadas, subtropicais e tropicais. Cereais, frutíferas, plantas ornamentais, hortaliças e plantas florestais podem ser seriamente afetadas por este patógeno. Embora muitas frutíferas e hortaliças cultivadas sejam infectadas por *Colletotrichum*, as perdas econômicas mais significativas ocorrem nas fases de pré e pós-colheita (Piccinin *et al.* 2005; Garg *et al.* 2014).

Em plantas pertencentes ao gênero *Capsicum* a antracnose é uma das principais causas de danos econômicos aos produtores e tem ganhado cada vez mais atenção devido aos prejuízos ocasionados em campo, em virtude dos altos investimentos em agrotóxicos utilizados para controlar a doença (Garg *et al.* 2014). Nos frutos deste gênero, foi observado que dois tipos distintos de infecção podem ocorrer: as que infectam o fruto em desenvolvimento no campo (pré-colheita) e as que infectam os frutos maduros durante o armazenamento (pós-colheita). A capacidade de causar infecções latentes ou quiescentes tem agrupado *Colletotrichum* entre os patógenos mais importantes também na fase de pós-colheita (Pereira 2009).

Esses fungos sobrevivem em restos culturais, no próprio hospedeiro ou em outras plantas hospedeiras vizinhas aos plantios. A disseminação do fungo a longas distâncias ocorre através de sementes infectadas e a curtas distâncias é realizada por meio dos respingos da água de chuva ou da irrigação por aspersão (Black *et al.* 1991). Como os propágulos desses fungos são disseminados por respingos de água, a ação do patógeno é favorecida por alta umidade, principalmente por chuvas abundantes. Chuvas de baixa intensidade favorecem o progresso da doença numa mesma planta, enquanto que chuvas acompanhadas de ventos tendem a transportar os propágulos do fungo para outras plantas, ocasionando epidemias severas (Ruggiero *et al.* 1996).

Em folhas e ramos, os sintomas são evidenciados pela presença de pequenas lesões necróticas de contornos circulares a alongados. Nos frutos, os sintomas são caracterizados por lesões de formato mais ou menos circulares e de coloração escura. Quando os sintomas são mais severos, formam-se lesões deprimidas, encharcadas, de coloração marrom, que podem coalescer resultando em uma grande mancha de formato irregular. Em locais com alta umidade, sobre o centro das lesões desenvolve-se uma massa mucilaginosa de cor róseo-alaranjada contendo os conídios do fungo. (Kimati *et al.* 2005; Kurozawa e Pavan 2005; Piccinin *et al.* 2005;). Quando a doença ocorre no campo, os frutos infectados não caem e as lesões permanecem firmes, a não ser que haja invasão de organismos secundários que acelerem a sua deterioração (Ávila 2003; Lopes 2003).

Até o momento, pelo menos cinco espécies de *Colletotrichum* já foram relatadas na literatura como causadores da antracnose em frutos de pimentão e pimentas em todo o mundo, podendo citar as espécies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. dematium*, *C. coccodes* e *C. boninense*, de acordo com a tabela 1 (Azevedo 2006; Tozze Júnior *et al.* 2006, 2008). Não foram encontrados na literatura dados referentes à identificação filogenética de *Colletotrichum* afetando *C. chinense* no Amazonas, foi localizado apenas relato de ocorrência

da doença realizado por Oliveira *et al.* (2013) baseado em marcadores moleculares espécie específico e Hanada *et al.* (2011) utilizando caracteres morfológicos que indicaram a ocorrência de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e outra espécie de *Colletotrichum* não identificada causando lesões de antracnose em frutos de pimenta cheirosa no Estado.

Os danos causados pela doença podem ser minimizados e controlados quando adotadas medidas de manejo integrado adequado. Nesta perspectiva, medidas culturais de controle são geralmente realizadas, como o uso de sementes sadias, rotação de culturas, poda e o plantio em espaçamento que permitam bom arejamento de todas as plantas. A limpeza do plantio, a queima imediata dos restos culturais, além da aplicação de fungicidas cúpricos, visando reduzir fontes de inóculo da área, também são medidas que contribuem para o controle da doença (Junqueira e Costa 2002; Piccinin *et al.* 2005).

Tabela 1. Espécies de *Colletotrichum* relatadas como agentes causais da antracnose em *Capsicum* spp.

Espécies de <i>Capsicum</i> hospedeiras	Espécies de <i>Colletotrichum</i>	Origem	Referência
<i>C. annuum</i>	<i>C. acutatum</i>	Bulgária	Jelev <i>et al.</i> 2008
	<i>C. asianum</i>	Laos	Phoulivong <i>et al.</i> 2010
	<i>C. boninense</i>	Brasil	Tozze Júnior <i>et al.</i> 2009
	<i>C. brisbanense</i>	Austrália	Damm <i>et al.</i> 2012
<i>C. annuum</i>	<i>C. capsici</i>	Bulgária	Bobev 2009
		Brunei Darussalam	Peregrine e Ahmad 1982
		Carolina do Norte	Winstead <i>et al.</i> 1960
		China	Teng 1996
		E.U.A.	Roberts e Snow 1990
		Cuba	Arnold 1986
		Indonésia	Crouch <i>et al.</i> 2009
		Índia	Mathur 1979
		Jamaica	Larter e Martyn 1943
		Malásia	Thompson e Johnston 1953
		Malásia	Turner 1971
		México	Alvarez 1976
		Myanmar	Thaung 2008
		Nepal	Dahal 1992
		Nigéria	West 1938
		Paquistão	Ahmad 1997
Serra leoa	Deighton 1936		
Taiwan	Sawada 1959		
Tanzânia	Riley 1960		
Tailândia	Shenoy 2007		
<i>C. annuum</i>	<i>C. coccodes</i>	Coreia	Cho e Shin 2004
		E.U.A.	Yang <i>et al.</i> 2009
		Índia	Beirn 2011
		Maynmar	Thaung 2008
		Polônia	Mulenko 2008

<i>C. annuum</i>	<i>C. dematium</i>	Brasil Grécia Porto Rico	Mendes 1998 Patidou 1973 Stevenson 1975
<i>C. annuum</i>	<i>C. dematium f. sp. capsicum</i>	Coreia	Cho e Shin 2004
<i>C. annuum</i>	<i>C. fruticola</i>	Tailândia	Phoulivong <i>et al.</i> 2010
<i>C. annuum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Brasil Cuba Coreia Índia Porto Rico Tailândia	Mendes <i>et al.</i> 1998 Arnold 1986 Cho e Shin 2004 Sarbhoy 1990 Stevenson 1975 Than <i>et al.</i> 2008
<i>C. annuum</i>	<i>C. nigrum</i>	Brasil China Cuba E.U.A. E.U.A.	Mendes <i>et al.</i> 1998 Tai 1979 Arnold 1986 Maneval 1937 Liu <i>et al.</i> 2013
<i>C. annuum</i>	<i>C. nigrum</i>	Gana Indonésia Jamaica México Nova Zelândia Filipinas Taiwan Venezuela	Dade 1940 Thaung 2008 Larter 1943 Alvarez 1976 Liu <i>et al.</i> 2013 Teodoro 1937 Sawada 1959 Chardon e Toro 1934
<i>C. annuum</i>	<i>C. novae-zelandiae</i>	Nova Zelândia	Damm <i>et al.</i> 2012
<i>C. annuum</i>	<i>C. phomoides</i>	E.U.A	Greene 1949
<i>C. annuum</i>	<i>C. scovillei</i>	Taiwan Tailândia Japan Brasil	Baroncelli <i>et al.</i> 2014 Damm <i>et al.</i> 2012 Kanto <i>et al.</i> 2013 Caires <i>et al.</i> 2014
<i>C. annuum</i>	<i>C. siamense</i>	Tailândia	Weir <i>et al.</i> 2012
<i>C. annuum</i>	<i>C. truncatum</i>	Índia Indonésia México Tailândia	Damm <i>et al.</i> 2009 Damm <i>et al.</i> 2009 Damm <i>et al.</i> 2009 Rampersad 2011
<i>C. frutescens</i>	<i>C. cordylinicola</i>	Tailândia	Phoulivong <i>et al.</i> 2010
<i>C. frutescens</i>	<i>C. acutatum</i>	Austrália	Simmonds 1966
<i>C. frutescens</i>	<i>C. atramentarium</i>	Austrália	Simmonds 1966
<i>C. frutescens</i>	<i>C. boninense</i>	China	Diao <i>et al.</i> 2013
<i>C. frutescens</i>		Brunei Darussalam	Peregrine e Ahmad 1982
		Cambodia	Litzenberger <i>et al.</i> 1962
	<i>C. capsici</i>	China Índia Nepal Tailândia Venezuela	Zhuang 2001 Gupta e Madaan 1982 Singh 1968 Richardson 1990 Urtiaga 1986
<i>C. frutescens</i>	<i>C. coccodes</i>	Canada China Panamá	Zhuang 2005 Zhuang 2005 Piepenbring 2006

<i>C. frutescens</i>	<i>C. dematium</i>	Austrália Porto Rico	Simmonds 1966 Stevenson 1975
<i>C. frutescens</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Austrália Brasil	Simmonds 1966 Mendes <i>et al.</i> 1998
<i>C. frutescens</i>	<i>C. gloeosporioides</i> <i>var. minor</i>	Austrália	Simmonds 1966
<i>C. frutescens</i>	<i>C. nigrum</i>	Costa Rica Honduras México	McGuire e Crandall 1967 McGuire e Crandall 1967 McGuire e Crandall 1967
<i>C. frutescens</i>	<i>C. piperatum</i>	Costa Rica	McGuire e Crandall 1967
<i>C. frutescens</i>	<i>C. simmondsii</i>	Austrália	Shivas e Tan 2009
<i>C. frutescens</i>	<i>C. truncatum</i>	Índia	Damm <i>et al.</i> 2009
<i>C. chinense</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Brasil	Oliveira <i>et al.</i> 2013
<i>C. chinense</i>	<i>C. acutatum</i>	Brasil	Oliveira <i>et al.</i> 2013

A aplicação de fungicidas é, há muitos anos, o mais difundido método de controle da antracnose em pimentões e pimentas no Brasil, com larga utilização de produtos a base de triazóis e estrobirulinas recomendadas para a cultura pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para controlar a doença. Entretanto, a adoção contínua do controle químico pode acarretar o surgimento de patógenos resistentes aos produtos utilizados, além da contaminação de alimentos e do ambiente, intoxicação de homens e animais, ressurgimento de algumas doenças e de outras, antes consideradas secundárias, tornando-se importantes (Ghini; Kimati, 2000; Azevedo *et al.* 2006; Lopes *et al.* 2015).

A necessidade de métodos mais seguros, eficientes, econômicos e não poluentes têm estimulado a busca de métodos de controle de doenças de plantas alternativos ao uso de produtos químicos (Stangarlin *et al.* 1999). Dentre as medidas de controle da antracnose, a principal e mais eficiente é a utilização de cultivares resistentes à doença, porém, o uso da resistência genética é dificultada pela alta variabilidade apresentada pelo patógeno, o que pode determinar que a cultivar resistente seja superada pela rápida adaptação de uma nova raça do patógeno.

Para o sucesso do uso da resistência genética é importante o conhecimento da diversidade da população do patógeno, assim como a correta identificação da espécie ou da raça predominante na população (Lopes *et al.* 2015). Essas informações são valiosas para superar o uso de agroquímicos e reduzir os impactos ambientais pelo uso inadequado de defensivos através do desenvolvimento de variedades resistentes aos patógenos e aos processos de especiação.

3.4 Marcadores moleculares

Diversas técnicas biotecnológicas permitem revelar variabilidade de dois ou mais indivíduos através de diferenças existentes em nível de DNA, as quais são herdadas geneticamente e conhecidas como marcadores moleculares. Com o desenvolvimento das áreas de genética e biologia molecular, os marcadores vêm demonstrando diversas aplicabilidades em análises genéticas, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, construção de mapas genéticos e identificação de espécies através do polimorfismo (Buso *et al.* 2003). Os primeiros estudos com regiões polimórficas foram realizados por Grodzicher *et al.* (1974), que determinaram o comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição em experimentos com vírus.

Atualmente é possível utilizar essas técnicas para detectar regiões polimórficas existentes no DNA de um dado micro-organismo, que surgiram após o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase em laboratório, mais conhecida como PCR, desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), que tem se tornado ferramenta primordial na identificação de espécies de *Colletotrichum*. Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas ao longo dos anos, pode ser destacada a técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* ou simplesmente RAPD (Williams *et al.* 1990), por permitir a demonstração de locos dispersos pelo genoma, sem conhecimento prévio da sequência alvo e com boa sensibilidade para detecção desta, além da praticidade e rapidez na obtenção dos resultados, onde estes marcadores moleculares são originados através de mutações ou rearranjos entre sítios de hibridização dos *primers* (Lopes *et al.* 2002). Buscando demonstrar a divergência genética dentro e entre as raças de *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), Talamini *et al.* (2006) usaram o método de RAPD e verificaram a variabilidade dos isolados em estudo, a qual serviu de auxílio para ajuda-los na seleção de programas de melhoramento genético de plantas, a fim de recomendarem cultivares tolerantes a doença para cada região geográfica em estudo.

Outro marcador molecular baseado em reações de PCR e amplamente empregado em pesquisas biotecnológicas são os marcadores microssatélites ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). O sucesso desta técnica está relacionado com seus resultados, em que é possível observar alto grau de polimorfismo, sem necessidade de utilizar técnicas de sequenciamento, tornando a mesma uma técnica relativamente simples e com baixo valor econômico, além de permitir a reprodução em larga escala alelos de interesse por meio de *primers* complementares anelados em um microssatélite alvo (Parreira *et al.* 2010). Com a utilização de marcadores moleculares ISSR McKay *et al.* (2009) conseguiram identificar isolados de *C. acutatum* que

infectavam amêndoas na Austrália. Outros estudos com marcadores microssatélites ISSR permitiram diferenciar isolados de *Colletotrichum* spp. isolados na Guiana e no Brasil, através de variações específicas no DNA (Nascimento *et al.* 2010).

Em estudo realizado por Hulton *et al.* (1991) uma nova família de sequências gênicas repetitivas foi identificada em amostras de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Estas sequências integrantes de unidades repetitivas intergênicas (IRUs), foram definidas como elementos ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), compreendendo um conjunto de sequências conservadas distribuídas no genoma da maioria das espécies de eubactérias. Estes *primers* têm sido utilizados em experimentos com diversidade genética em fungos, servindo para diferenciar isolados geneticamente semelhantes. Em amostras de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. obtidas de pacientes portadores de ceratite micótica, a técnica de ERIC-PCR revelou maior poder discriminatório para diferenciação das amostras quando comparada à técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Godoy *et al.* 2004). Mehta e Mehta (2010) analisaram a variabilidade genética entre *C. gossypii* (CG) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC) através de RAPD-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence*). Neste estudo, 53 isolados coletados de sementes e folhas de plantas de algodão de diferentes cultivares nos Estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Paraíba, formaram clados distintos e bem definidos entre os isolados provenientes das sementes e aqueles provenientes de parte aérea, mostrando capacidade da técnica para distinguir isolados de CG e CGC.

A filogenia baseada no sequenciamento de regiões do DNA genômico tem permitido a distinção de espécies muitas vezes morfológicamente semelhantes, bem como aquelas pertencentes a gêneros complexos, assim como *Colletotrichum*. A análise dos fragmentos de DNA onde são encontradas regiões conservadas do genoma proporcionam estudos para a análise filogenética das espécies, permitindo estimar as relações de ancestralidade entre organismos, criar novos grupos taxonômicos, reconstruir árvores filogenéticas com representantes de diferentes áreas geográficas, assim como a separação dos isolados em espécies distintas e diferenciação dos isolados dentro de cada espécie (Freeman *et al.* 1999; Schneider 2007). A região ITS (*Intergenic Spacer*) é a que tem o maior número de sequências depositadas e foi inicialmente a mais utilizada para as análises moleculares do gênero *Colletotrichum*, entretanto, logo surgiram preocupações quanto à sua utilização, devido à baixa resolução que o gene tem fornecido para distinção das espécies (Cai *et al.* 2009; Firmino *et al.* 2014). Os autores afirmaram que a delimitação de espécies através de critérios moleculares baseados somente na análise filogenética de um único gene não tem obtido muito

sucesso. Dessa forma, apontam como causa parcial desse insucesso o grande número de espécies que estão depositadas com nomes errados no banco de dados GeneBank.

A abordagem mais recentemente utilizada é por meio de sequenciamento de genes conservados, seguido de filogenia multilocus (Damm *et al.* 2012). Cai *et al.* (2009) relataram que a filogenia multilocus provê entendimento muito melhor do relacionamento filogenético dentro do gênero *Colletotrichum* e deve ser sempre empregada. De acordo com os autores, a sistemática de *Colletotrichum* deve ser baseada em filogenia multilocus, comparando espécimes-tipo, e linhagens mais estreitamente relacionadas.

As primeiras análises filogenéticas multilocus para espécies de *Colletotrichum* foram publicados por Talhinha *et al.* (2002), em estudo sobre *C. acutatum* associados ao tremoço usando as regiões gênicas ITS, TUB2 (β -tubulin) e HIS4 (*histidinol dehydrogenase*) que apresentaram níveis satisfatórios de resolução filogenética. Than *et al.* (2008), com dados de análise filogenética utilizando as regiões ITS e TUB2 identificaram *C. acutatum*, *C. capcisi* e *C. gloeosporioides* causando antracnose em frutos de pimentão na Tailândia. Prihastuti *et al.* (2009) usaram os genes nucleares ITS, ACT (*actin*), TUB2, CAL (*calmodulin*), GS (*glutamine synthetase*) e GAPDH (*glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase*) para estudar algumas espécies de *Colletotrichum* estreitamente relacionadas dentro do complexo *C. gloeosporioides* e estabeleceram que as relações de espécies podem ser bem resolvida a partir de tais análises.

Desde então, um esforço de colaboração internacional vem reunindo inúmeros trabalhos utilizando análises filogenéticas a fim de padronizar a pesquisa que está sendo realizada no gênero com a finalidade de criar um sistema de nomenclatura unificada para os fungos, e, conseqüentemente esclarecer a identidade das espécies conhecidas e identificar de maneira correta novas linhagens pertencentes ao complexo *Colletotrichum* (Cannon *et al.* 2012). Atualmente filogenia multilocus tem se mostrado a maneira mais precisa e confiável para estabelecer as relações sistemáticas entre as espécies de *Colletotrichum* e servir como base para o diagnóstico das doenças causadas por esse patógeno (Crouch *et al.* 2009; Damm *et al.* 2009; Prihastuti *et al.* 2009; Shivas e Tan 2009).

Em estudo realizado por Canon *et al.* (2012) foi proposta a revisão das espécies de *Colletotrichum* descritas com base em filogenia multilocus, enfatizando a determinação de espécimes-tipo para grupos de indivíduos filogeneticamente relacionados com a finalidade de padronizar a nomenclatura e evitar futuros erros de identificação. A utilização de sequências de espécimes-tipo favorece a estabilidade do nome da espécie, fornecem dados de sequência

que evitam identificação errônea e é essencial para estudar as relações filogenéticas entre as espécies de *Colletotrichum* (Hyde e Zhang 2008; Canhão *et al.* 2008).

Os avanços nesses estudos moleculares têm permitido a descrição de novas espécies de *Colletotrichum*, a revalidação de nomes identificados como sinônimas dos espécimes-tipo e a reorganização das espécies estreitamente relacionadas em forma de complexos de espécies. A análise filogenética do gênero revela que ele é composto por nove grandes clados, bem como uma série de subclados e espécies isoladas, onde dentre os maiores clados, pode-se citar os complexos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. orbiculare*, *C. dematium* e *C. graminicola* (Cannon *et al.* 2012). Segundo os autores, o complexo *C. acutatum* contém mais de 29 espécies estreitamente relacionadas, o complexo *C. gloeosporioides* compreende mais de 22 espécies, o complexo *C. boninense* contém mais de 18 e o complexo *C. truncatum* é formado por apenas uma espécie principal.

Portanto, a utilização de métodos precisos de identificação de espécies de *Colletotrichum* se torna indispensável, tanto para fornecer informações confiáveis para a pesquisa científica, visando a universalização da nomenclatura do gênero, como para a adoção de medidas eficientes no controle da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos isolados

Foram obtidos isolados *Colletotrichum* spp. a partir de lesões típicas de antracnose em frutos de pimentão, pimenta cheirosa e pimenta murupi nos municípios de Iranduba, Manacapuru, Presidente Figueiredo e Rio preto da Eva – Amazonas (Tabela 2). Dados de produção agrícola fornecidos pela Secretaria de Estado de Produção Rural (SEPROR) foram utilizados como critério de escolha das áreas de coleta, sendo selecionados os municípios que apresentaram o maior número de produtores e maior produtividade por área nos últimos três anos. Cada amostra coletada foi identificada e georeferenciada utilizando o Sistema de Posicionamento Global (GPS) da marca Garmin, modelo 60CSx.

O material coletado foi levado para o Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia onde foi realizado o isolamento fúngico. O isolamento direto foi feito a partir das lesões nos frutos, onde uma porção da massa de esporos foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), sendo cada isolado obtido a partir de um único fruto doente.

Após o crescimento das colônias, uma suspensão de esporos foi preparada em 50 mL de água destilada, em seguida, uma alíquota de 50 µL dessa suspensão foi plaqueada e espalhada com alça de Drigaslki em placas de Petri contendo meio ágar-água (AA). Após 24 h de incubação a 25 °C, as placas foram observadas em microscópio estereoscópico. Apenas um conídio germinado foi transferido para placas de Petri contendo meio BDA, onde foram mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h para crescimento das colônias monospóricas.

Tabela 2. Isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos do gênero *Capsicum* no Amazonas

ISOLADO	HOSPEDEIRO	ORIGEM	COORDENADAS
PF01	pimentão	Presidente Figueiredo	S 01° 55,5' 39" W 60° 1,6' 30"
PF02	pimentão	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"
PF03	pimentão	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"
PF04	pimentão	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"
PF05	pimentão	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"
PF06	pimentão	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"
PF07	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"
PF08	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"
PF09	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,2' 66" W 60° 1,6' 77"

PF10	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,1' 44" W 60° 1,7' 13"
PF11	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,1' 44" W 60° 1,7' 13"
PF12	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,1' 44" W 60° 1,7' 13"
PF13	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,1' 44" W 60° 1,7' 13"
PF14	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 55,1' 44" W 60° 1,7' 13"
PF15	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 54,7' 10" W 60° 0,3' 02"
PF16	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 54,7' 10" W 60° 0,3' 02"
PF18	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 01° 54,7' 10" W 60° 0,3' 02"
PF19	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 3,9' 55" W 59° 48,5' 0,2"
PF20	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 35" W 59° 48,8' 84"
PF22	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 35" W 59° 48,8' 84"
PF23	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 35" W 59° 48,8' 84"
PF24	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 35" W 59° 48,8' 84"
PF25	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 35" W 59° 48,8' 84"
PF26	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 36" W 59° 48,8' 86"
PF27	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 36" W 59° 48,8' 86"
PF28	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 6,1' 36" W 59° 48,8' 86"
PF32	pimenta cheirosa	Presidente Figueiredo	S 0,2° 5,8' 64" W 59° 48,8' 68"
RPE34	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 31,8" W 59° 31' 5,2"
RPE36	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 31,8" W 59° 31' 5,2"
RPE37	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 31,8" W 59° 31' 5,2"
RPE38	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 31,8" W 59° 31' 5,2"
RPE39	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 19,4" W 59° 30' 54"
RPE40	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 19,4" W 59° 30' 54"
RPE42	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 19,4" W 59° 30' 54"
RPE43	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 19,4" W 59° 30' 54"
RPE44	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 19,4" W 59° 30' 54"
RPE45	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 48' 19,4" W 59° 30' 54"
RPE46	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 47' 14,3" W 59° 21' 59"
RPE47	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 47' 14,3" W 59° 21' 59"
RPE48	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 47' 14,3" W 59° 21' 59"
RPE49	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 47' 14,3" W 59° 21' 59"
RPE50	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 47' 14,3" W 59° 21' 59"
RPE51	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 55' 11,3" W 59° 23' 26,4"
RPE52	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 55' 11,3" W 59° 23' 26,4"
RPE53	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 55' 11,3" W 59° 23' 26,4"
RPE54	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 55' 11,3" W 59° 23' 26,4"
RPE55	pimenta cheirosa	Rio Preto da Eva	S 02° 55' 11,3" W 59° 23' 26,4"
MPU58	pimenta cheirosa	Manacapuru	S 03° 18' 11,6" W 60° 28' 47,6"
MPU59	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 25,1" W 60° 29' 22"

MPU60	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 25,1" W 60° 29' 22"
MPU61	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 25,1" W 60° 29' 22"
MPU62	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 25,1" W 60° 29' 22"
MPU63	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 25,1" W 60° 29' 22"
MPU64	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 31,6" W 60° 29' 25,8"
MPU65	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 31,6" W 60° 29' 25,8"
MPU66	pimentão	Manacapuru	S 03° 15' 31,6" W 60° 29' 25,8"
IRA67	pimentão	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA68	pimentão	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA69	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA70	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA71	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA72	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA73	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA74	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA75	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA76	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA77	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA78	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA79	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA80	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 14' 17,3" W 60° 10' 6,4"
IRA82	pimentão	Irاندوبا	S 03° 11' 41" W 60° 11' 54,5"
IRA83	pimentão	Irاندوبا	S 03° 11' 41" W 60° 11' 54,5"
IRA84	pimentão	Irاندوبا	S 03° 10' 29,2" W 60° 12' 2,1"
IRA85	pimentão	Irاندوبا	S 03° 10' 29,2" W 60° 12' 2,1"
IRA86	pimentão	Irاندوبا	S 03° 10' 29,2" W 60° 12' 2,1"
IRA88	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 15' 92" W 60° 16' 9,5"
IRA89	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 15' 92" W 60° 16' 9,5"
IRA90	pimenta murupi	Irاندوبا	S 03° 15' 92" W 60° 16' 9,5"
IRA92	pimenta cheirosa	Irاندوبا	S 03° 15' 51,5" W 60° 17' 35,2"
IRA93	pimenta cheirosa	Irاندوبا	S 03° 15' 51,5" W 60° 17' 35,2"
IRA95	pimenta cheirosa	Irاندوبا	S 03° 15' 51,5" W 60° 17' 35,2"
IRA97	pimenta cheirosa	Irاندوبا	S 03° 15' 51,5" W 60° 17' 35,2"
MPU98	pimenta cheirosa	Manacapuru	S 03° 13' 28,5" W 60° 33' 35,2"
MPU99	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 47,4" W 60° 26' 52,6"
MPU100	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 47,4" W 60° 26' 52,6"
MPU101	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 47,4" W 60° 26' 52,6"
MPU102	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 47,4" W 60° 26' 52,6"
MPU103	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 44,1" W 60° 26' 52,1"
MPU104	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 44,1" W 60° 26' 52,1"

MPU105	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 44,1" W 60° 26' 52,1"
MPU106	pimentão	Manacapuru	S 03° 13' 44,1" W 60° 26' 52,1"
MPU107	pimenta cheirosa	Manacapuru	S 030 13' 47,4" W 60° 26' 52,6"
MPU108	pimenta cheirosa	Manacapuru	S 030 09' 45,6" W 60° 17' 58,4"
MPU110	pimenta cheirosa	Manacapuru	S 030 09' 45,6" W 60° 17' 58,4"

4.2 Manutenção dos isolados

Os isolados monospóricos foram preservados pelos métodos Castellani e de criopreservação. Para preservação em água, fragmentos de micélio crescidos em meio BDA foram transferidos para microtubos contendo água esterilizada e mantidos em temperatura de 10 °C.

Na criopreservação, fragmentos de micélio crescidos em meio BDA foram transferidos para microtubos contendo glicerol esterilizado e mantido em ultrafreezer em temperatura de -80 °C. Os isolados preservados são mantidos na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental.

4.3 Extração de DNA

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM. O DNA foi extraído pelo método CTAB conforme o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1987), a partir de culturas monospóricas com sete dias de crescimento em placas de Petri contendo meio BDA. Para produção de massa micelial, fragmentos de micélio foram depositados em 50 mL de meio líquido batata-dextrose (BD) em Erlenmeyers de 250 mL, e mantidos sob agitação em 115 rpm durante cinco dias em temperatura ambiente.

A massa micelial foi filtrada em papel filtro esterilizado, envolvida em papel alumínio e armazenada em ultrafreezer a -80 °C até o momento da extração do DNA. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e adicionados 600 µL de tampão CTAB [2 % (m/v) CTAB; 0,1 M Tris- HCl (pH 8,0); 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol]. A mistura foi mantida em banho-maria a 60 °C durante 30 minutos, sendo agitada a cada 10 min.

Após resfriamento por 5 minutos em condição ambiente, promoveu-se a lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v), com

homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para novo tubo, onde foram adicionados 2/3 do volume da solução de isopropanol mantido a -20 °C por, no mínimo, 30 minutos.

Os tubos foram levados à centrífuga e o material contido neles centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado. Em seguida, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol absoluto durante 3 minutos. Os tubos foram mantidos em câmara de fluxo laminar por algumas horas até a secagem do *pellet*.

Os DNAs precipitados foram ressuspensos em 1 mL de tampão TE contendo de RNase A (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg µL⁻¹ RNase A) e incubados em banho maria a 37 °C por 30 minutos. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro Nanodrop e eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio.

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado no Sistema de Fotodocumentação L-Pix Chemi. As amostras foram diluídas em água ultrapura até a concentração de 50 ng DNA/µL de suspensão e armazenadas sob temperatura de -20 °C.

4.4 Diversidade genética por meio de marcadores moleculares

A diversidade genética dos isolados de *Colletotrichum* foi analisada com base no padrão de polimorfismo gerado com a utilização dos *primers* CGRN_ACT, CGRN_CAL, CGRN_CHS, CGRN_GAPDH, CGRN_HIS e ERIC-PCR (tabela 3). As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo 1X de tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs, 0,06 U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada *primer*, 50 ng do DNA e água milli-Q (q.s.p.).

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, usando o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 min; 40 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 50 °C e 30 seg a 72 °C; foi realizada uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 min e manutenção a 10 °C. Os produtos da PCR juntamente com 3 µL de corante *Green GoTaq Flexi Buffer* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%) a 150 V durante uma hora e trinta minutos em tampão TBE (Tris-base e EDTA pH 8,0).

Os géis de agarose foram corados em solução de brometo de etídio (5 µg mL⁻¹), visualizados em transiluminador com luz ultravioleta e fotografado no equipamento Sistema

de Fotodocumentação L-Pix Chemi. Os fragmentos de DNA gerados foram avaliados mediante inspeção visual dos géis, onde bandas de mesmo peso molecular, em indivíduos diferentes, foram consideradas idênticas e designadas em função da ausência (0) e presença (1), resultando em uma matriz de caráter binário.

Com o auxílio do programa NTSys versão 2.2 (Rohlf, 2005) os dados de polimorfismos foram utilizados para realizar os agrupamentos e construir os dendrogramas pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average*) com base no índice de similaridade de Jaccard. Os dendrogramas gerados a partir das análises de diversidade serviram de triagem dos isolados mais polimórficos que, posteriormente, foram identificados com base em análise multilocus.

Tabela 3. Lista de *primers* utilizados para análise da diversidade em *Colletotrichum* spp

<i>Primer</i>	Orientação	Sequência (5' - 3')	Bases
CGRN_ACT	<i>Forward</i>	GACGATGCGCCCAGAGCTGTG	21
	<i>Reverse</i>	GAGGCTGAAGTGTTCAGAC	21
CGRN_CAL	<i>Forward</i>	GATGGCGATGGTTAGTGCC	20
	<i>Reverse</i>	GCGGTCAGATAACCTGCATTTA	22
CGRN_CHS	<i>Forward</i>	GACGGTCGTGCCAAGATCAT	20
	<i>Reverse</i>	GGACGTGTACTCGTAGATGTGC	22
CGRN_GAPDH	<i>Forward</i>	CTACCCCTCCAAGGCCATCC	20
	<i>Reverse</i>	GTATCACGTCCTACTGTGCCA	21
CGRN_HIS	<i>Forward</i>	CTGCCCGCAAGAGCGCCCCT	20
	<i>Reverse</i>	GACTGGATGGTGACACGCTTC	21
ERIC-PCR	<i>Forward</i>	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	22
	<i>Reverse</i>	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	22

4.5 Análise filogenética e identificação molecular de *Colletotrichum* spp.

A identificação dos 48 isolados de *Colletotrichum* selecionados a partir dos resultados de diversidade foi realizada por meio da amplificação e sequenciamento dos fragmentos de actina (ACT), quitina sintase (CHS), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), glutamina sintase (GS) e histona (HIS3), com a utilização dos *primers* listados na Tabela 4.

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo tampão da enzima 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs, 0,06 U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada *primer*, 50 ng do DNA diluído e água milli-Q (q.s.p.).

As PCRs foram incubadas em termociclador Veriti 96-well *Thermal Cycler, Applied Biosystems*, nas seguintes condições: ciclo inicial com desnaturação de 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, temperatura de anelamento de 60 °C para ACT e CHS, 62 °C para GS e 67 °C para HIS e GAPDH por 30 seg, 72 °C por 1 min, com um ciclo final de 72 °C por 7 min e 10 °C para manutenção. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose (1,5%) e em seguida, purificados e sequenciados no Sequenciador de DNA 3500 GENETIC ANALYZER.

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com auxílio do programa SeqAssem (Herppele 2012) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do *National Center for Biotechnological Information- NCBI*, por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), o qual permite detectar homologia de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. Uma vez que a sequência de DNA apresentou homologia com as sequências da mesma região depositadas no GenBank e pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, realizou-se a montagem do arquivo de sequências para as análises de relações filogenéticas.

Tabela 4. Lista de *primers* utilizados para o sequenciamento e análise filogenética

Região	Sigla/Orientação	Primer 5'-3'	Referência
Actina	ACT512F ACT783R	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC TACGAGTCCTTCTGGCCCAT'	Carbone e Kohn (1999)
Quitina sintase	CHS-79-F CHS-345-R	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	Carbone e Kohn (1999)
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	GDF1 GDR1	CAGGAGACTTGACACGGTCCAG CAGGAGACTTGACACGGTCCAG	Templeton <i>et al.</i> (1992)
Glutamina Sintetase	GSF1 GSR1	ATGGCCGAGTACATCTGG GAACCGTCGAAGTTCCAC	Stephenson <i>et al.</i> (1997)
Histona 3	CYLH3F CYLH3R	AGGTCCACTGGTGGCAAG AGCTGGATGTCCTTGGACTG	Crous <i>et al.</i> (2004)

As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) pelo uso da função Muscle. As árvores ultramétricas necessárias para análises filogenéticas foram construídas pelo método UPGMA utilizando o programa MEGA 6.0 e a confiabilidade dos nós obtidos foi avaliada pelo procedimento de *bootstrap* com 1000 reamostragens. As matrizes concatenadas foram geradas a partir dos conjuntos de dados individuais com o *software* FABOX.

Filogramas foram construídos a partir das análises individuais dos genes e análises concatenadas das cinco regiões gênicas usando algoritmos para máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana via Cadeia de Markov Monte Carlo (BMCMC). Os *gaps* foram tratados como dados perdidos. *Bootstrap* não paramétrico foi realizado com 1.000 *pseudoreplicates*. O *software* ModelTest 3.7 (Posada e Crandall 1998) foi usado para selecionar o melhor modelo de evolução de nucleotídeos sob o critério de informação de Akaike (AIC) para cada conjunto de dados.

A análise BMCMC foi executada usando MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck 2003) com o modelo ideal selecionado previamente. Para os conjuntos de dados individuais e combinados, a *probabilidade a posteriori* (PP) também conhecida como Inferência Bayesiana foi gerada com 3.107 e 1.108 gerações, respectivamente, com amostragem a cada 1000 gerações. A análise foi executada três vezes, uma “*cold*” e três gradativamente “*heated*” usando o algoritmo *Metropolis-coupled* MCMC também conhecido como (MC)³ começando a partir de árvores aleatórias. Um total de 1.106 gerações foi descartado como “*burn-in*”.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Distribuição geográfica dos isolados

Neste estudo, foi constituída uma coleção com 94 isolados de *Colletotrichum* cuja distribuição por hospedeiro e local de origem encontra-se na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição dos isolados de *Colletotrichum* por local de coleta e hospedeiro

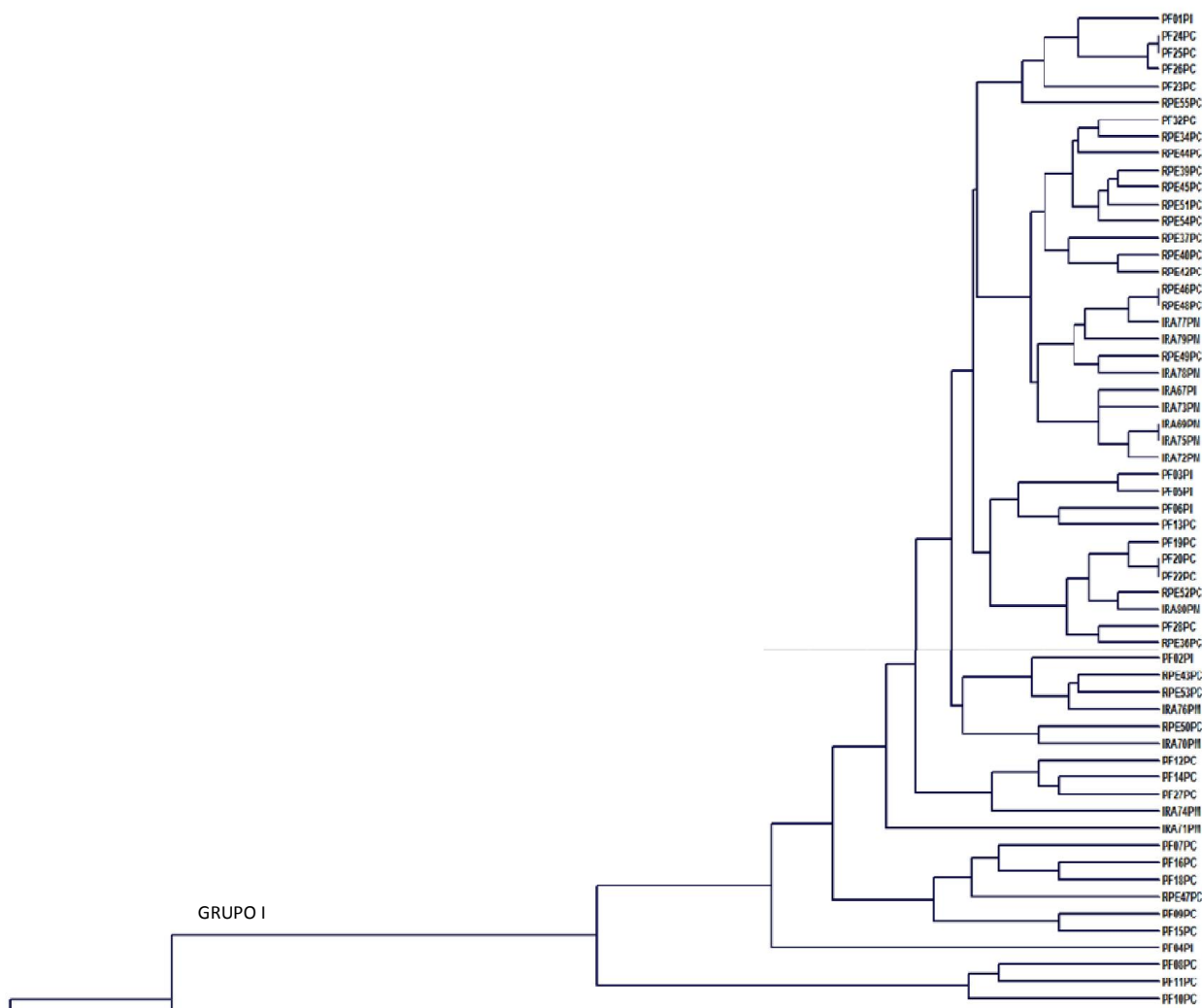
Hospedeiro	Irاندuba	Manacapuru	Presidente Figueiredo	Rio Preto da Eva	TOTAL
Pimenta cheirosa	4	5	21	20	50
Pimentão	7	16	6	-	29
Pimenta murupi	15	-	-	-	15
TOTAL	26	21	27	20	94

5.2 Diversidade genética

Com base nos perfis de bandas gerados para cada isolado, cada marcador molecular foi analisado individualmente e em conjunto. Os marcadores em conjunto geraram 157 bandas polimórficas que foram utilizadas para construção de um dendrograma (Figura 1). Todos os pares de *primers* utilizados mostraram-se eficientes para evidenciar o polimorfismo entre os grupos de espécies de *Colletotrichum*.

Através da análise do dendrograma gerado, foi possível verificar a formação de nove grupos principais ao nível de 70% de similaridade (Figura 1). O grupo I foi composto por 27 isolados de Presidente Figueiredo, 19 de Rio Preto da Eva e 13 isolados de Irاندuba; o grupo II reuniu cinco isolados de Irاندuba e o terceiro grupo foi formado por um isolado de Rio Preto da Eva, cinco de Irاندuba e 12 de Manacapuru.

Os grupos IV, V, VI, VII, VIII e IX apresentaram três (Irاندuba), um (Manacapuru), dois (Manacapuru), um (Manacapuru), um (Manacapuru) e quatro (Manacapuru) isolados, respectivamente. Distribuição semelhante foi observada quando se avaliou o agrupamento com os marcadores isoladamente, mostrando a habilidade tanto individualmente quanto em conjunto em diferenciar a população estudada.

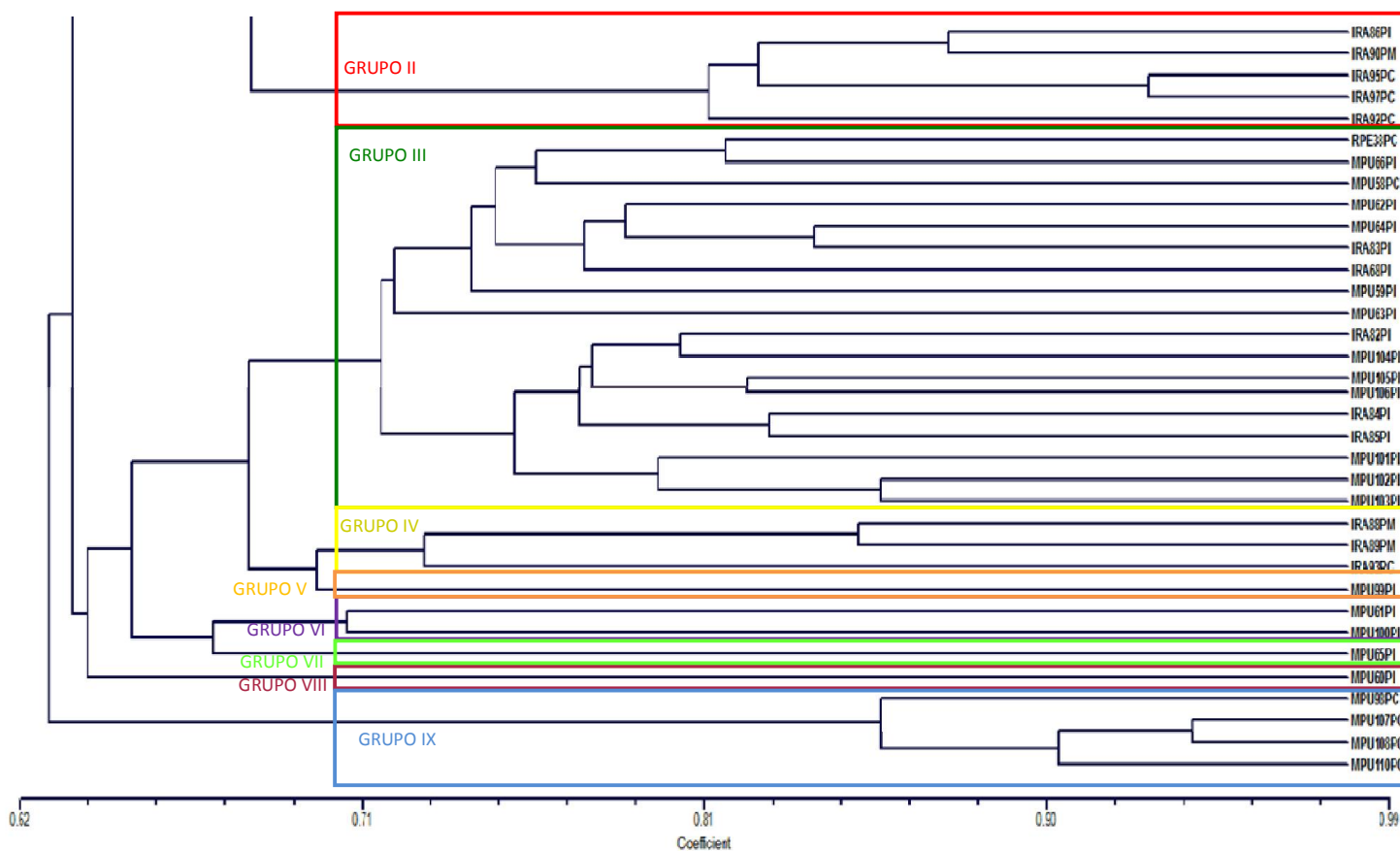


Continua.

Figura 1. Dendrograma gerado pelos marcadores CGRN_ACT, CGRN_CAL, CGRN_CHS, CGRN_GAPDH, CGRN_HIS e ERIC-PCR, com base na similaridade genética entre os 94 isolados de *Colletotrichum* obtida pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Nomeou-se os isolado com uma sigla, as primeiras letras referem-se à origem geográfica: Iranduba (IRA), Manacapuru (MPU), Presidente Figueiredo (PF) e Rio Preto da Eva (RPE). As duas últimas letras referem-se ao hospedeiro: pimentão (PI), pimenta cheirosa (PC) e pimenta murupi (PM). O número corresponde à ordem no isolamento

Quanto à origem geográfica, foi possível agrupar 100% dos isolados provenientes de Presidente Figueiredo e 99% dos isolados de Rio Preto da Eva no grupo I, compondo o grupo que apresentou maior similaridade genética entre os isolados. Este mesmo grupo foi formado por isolados de três dos quatro municípios de coleta, entretanto, verificou-se baixa variabilidade entre os isolados, indicando que apesar dos mesmos terem sido coletados em diferentes regiões, podem pertencer a uma mesma população.

A formação de grupos entre isolados das mesmas origens geográficas ocorreu em sete dos nove agrupamentos analisados. Os grupos II e IV foram compostos apenas por isolados de Iranduba. O mesmo foi observado com os grupos V, VI, VII, VIII e IX que agrupam somente isolados de Manacapuru.



Continuação Figura 1.

Figura 2. Dendrograma gerado pelos marcadores CGRN_ACT, CGRN_CAL, CGRN_CHS, CGRN_GAPDH, CGRN_HIS e ERIC-PCR, com base na similaridade genética entre os 94 isolados de *Colletotrichum* obtido pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Nomeou-se os isolado com uma sigla, as primeiras letras referem-se à origem geográfica: Iranduba (IRA), Manacapuru (MPU), Presidente Figueiredo (PF) e Rio Preto da Eva (RPE). As duas últimas letras referem-se ao hospedeiro: pimentão (PI), pimenta cheirosa (PC) e pimenta murupi (PM). O número corresponde à ordem no isolamento

Entre os quatro municípios, os isolados de Manacapuru foram os que apresentaram maior variabilidade, com isolados presentes na maioria dos grupos e com maiores distâncias genéticas. A variabilidade genética observada entre os isolados pode ser decorrente de diversos mecanismos geradores de variabilidade em fungos mitospóricos, como mutação e recombinação parassexual que podem ocorrer em condições naturais (Agrios 2005; Azevedo 2009). Além disto, a formação de diferentes grupos possivelmente deve-se ao fato desta população apresentar diferentes espécies filogenéticas.

A análise de agrupamento com base no hospedeiro de origem revelou a ocorrência de cinco grupos conforme o material de isolamento. Os indivíduos que compõem os grupos V, VI, VII e VIII foram isolados de frutos de pimentão, enquanto os isolados pertencentes ao grupo IX foram obtidos

de frutos de pimenta cheirosa. Foi possível verificar este tipo de agrupamento apenas por isolados de Manacapuru.

Com base nos resultados de diversidade, foram selecionados 48 isolados representativos dos agrupamentos e que apresentaram maiores polimorfismos entre si para a identificação molecular por meio de análise multilocus (tabela 6).

Tabela 6. Isolados identificados através de sequenciamento e análises filogenéticas

ISOLADO	HOSPEDEIRO	GRUPO	ESPÉCIE
PF01	pimentão	I	<i>C. scovillei</i>
PF02	pimentão	I	<i>C. scovillei</i>
PF09	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
PF10	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
PF11	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
PF12	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
PF14	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
PF15	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
PF23	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
PF32	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE36	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE38	pimenta cheirosa	III	<i>C. siamense</i>
RPE39	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE40	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE44	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE45	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE47	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE50	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE51	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
RPE55	pimenta cheirosa	I	<i>C. scovillei</i>
MPU58	pimenta cheirosa	III	<i>C. siamense</i>
MPU59	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
MPU60	pimentão	VIII	<i>C. siamense</i>
MPU61	pimentão	VI	<i>C. theobromicola</i>
MPU62	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
MPU63	pimentão	III	<i>C. fruticola</i>
MPU66	Pimentão	III	<i>C. siamense</i>
IRA68	Pimentão	III	<i>C. siamense</i>
IRA73	pimenta murupi	I	<i>C. scovillei</i>
IRA75	pimenta murupi	I	<i>C. scovillei</i>
IRA85	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
IRA88	pimenta murupi	IV	<i>C. siamense</i>
IRA90	pimenta murupi	II	<i>C. truncatum</i>
IRA92	pimenta cheirosa	II	<i>C. truncatum</i>
IRA93	pimenta cheirosa	IV	<i>C. brevisporum</i>
IRA95	pimenta cheirosa	II	<i>C. truncatum</i>
IRA97	pimenta cheirosa	II	<i>C. truncatum</i>
MPU98	pimenta cheirosa	IX	<i>C. brevisporum</i>
MPU99	pimentão	V	<i>C. gloesporioides</i>

MPU100	pimentão	VI	<i>C. theobromicola</i>
MPU101	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
MPU102	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
MPU104	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
MPU105	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
MPU106	pimentão	III	<i>C. siamense</i>
MPU107	pimenta cheirosa	IX	<i>C. brevisporum</i>
MPU108	pimenta cheirosa	IX	<i>C. brevisporum</i>
MPU110	pimenta cheirosa	IX	<i>C. brevisporum</i>

5.3 Análise filogenética

Os resultados da identificação molecular com base nas sequências parciais concatenadas dos genes ACT, CHS, GAPDH, HIS e GS através de Inferência Bayesiana permitiram a identificação dos 48 isolados analisados. Foram identificadas espécies de quatro complexos diferentes: 21 do complexo *C. acutatum*, 18 do *C. gloeosporioides*, quatro do *C. truncatum* e cinco da espécie *C. brevisporum* Noireung, a qual ainda não foi inserida em um complexo.

De acordo com a distribuição geográfica das espécies, no município de Presidente Figueiredo foi identificado apenas a espécie *C. scovillei* Damm (Figura 3), assim como a espécie *C. truncatum* (Schwein.) que foi observada apenas em propriedades no município de Iranduba. A espécie *C. siamense* Prihastuti foi predominante no município de Manacapuru, com ocorrência em número reduzido no município de Iranduba e Rio Preto da Eva. As espécies *C. theobromicola* Delarc., *C. fruticola* Prihastuti e *C. gloeosporioides* foram observadas somente no município de Manacapuru.

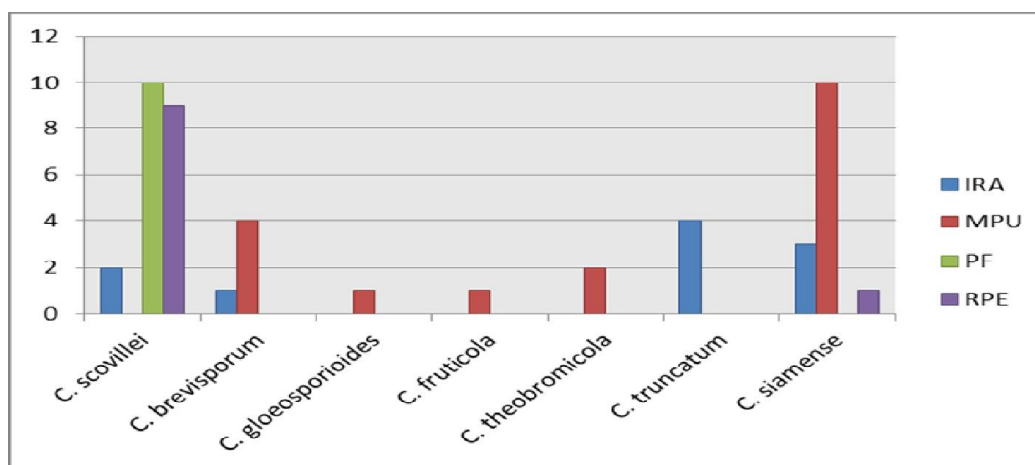


Figura 3. Distribuição geográfica das espécies de *Colletotrichum* identificadas, onde IRA (Irlanduba), MPU (Manacapuru), PF (Presidente Figueiredo) e RPE (Rio Preto da Eva)

5.3.1 Complexo *Colletotrichum acutatum*

Após a concatenação das sequências parciais das cinco regiões gênicas, obteve-se um alinhamento de 2093 nucleotídeos dos quais 1655 foram conservados, 398 sítios variáveis e 321 informativos para parcimônia. Como *outgroup* utilizou-se dois isolados de *C. orchidophilum* (CBS 63180 e CBS 63280).

A análise bayesiana resultou no agrupamento de 21 isolados distribuídos em subclados dentro de um clado monofilético com os isolados de *C. scovillei* (CBS 126530 e CBS 120708) apresentando valores de *probabilidade a posteriori* (PP) igual a 1 (Figura 3). O alto valor estatístico dá suporte para a identificação das espécies, onde segundo Weir *et al.* (2012) quanto maior o valor de inferência Bayesiana, maior será a confiabilidade na topologia do clado e menor a distância de ramificação do nó que estabelecem a relação da distância genética dos isolados com as espécies comparadas.

Todos os dez isolados de Presidente Figueiredo foram identificados como *C. scovillei*, além de nove, dos dez de Rio Preto da Eva e mais dois isolados de Iranduba. Em relação ao hospedeiro de origem, não foi observado especificidade patogênica por parte da espécie, uma vez que sua ocorrência foi relatada em frutos de pimentão (PF01 e PF02), pimenta murupi (IRA73 e IRA75) e pimenta cheirosa (PF09, PF10, PF11, PF12, PF14, PF15, PF23, PF32, RPE36, RPE39, RPE40, RPE44, RPE45, RPE47, RPE50, RPE51 e RPE55).

A espécie *C. scovillei* teve seu primeiro relato na Indonésia causando sintomas de antracnose em frutos de pimentão. Também foi encontrada em Laos (Phoulivong *et al.* 2010), Tailândia (Than *et al.* 2008), Coreia do Sul (Sang *et al.* 2011), Taiwan (Guerber *et al.* 2003), Japão (Kanto *et al.* 2013) e Brasil (Caires *et al.* 2014), causando essa doença nas plantas de pimentão e pimentas do gênero *Capsicum*.

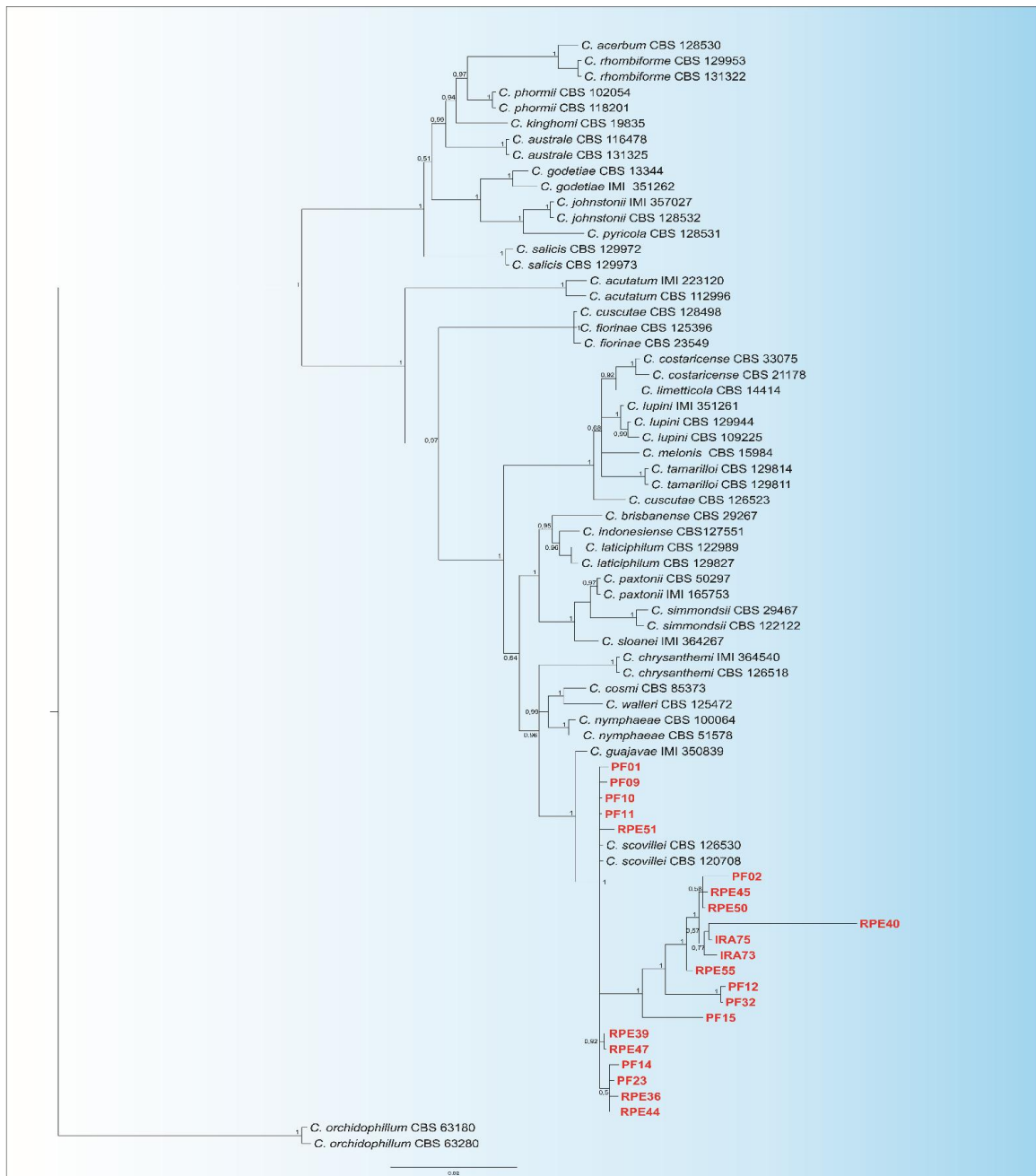


Figura 3. Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS concatenadas contendo isolados do complexo *Colletotrichum acutatum*. Como *outgroup* foi utilizado os isolados *C. orchidophilum* (CBS 63180 e CBS 63280). Valores de *probabilidade a posteriori* são mostrados nos nós dos ramos da árvore

5.3.2 Complexo *Colletotrichum gloeosporioides*

O alinhamento concatenado resultou em 2272 nucleotídeos, dos quais 1377 foram conservados, 799 sítios variáveis e 508 informativos para parcimônia. Como *outgroup* utilizou-se *C. boninense* (MAFF 305972). A análise bayesiana resultou no agrupamento de 14 isolados com *C. siamense*, dois com *C. theobromicola*, um com *C. fruticola* e um com a espécie tipo de *C. gloeosporioides* conforme figura 4.

Desse total, 14 isolados foram de Manacapuru, três de Iranduba e um de Rio Preto da Eva. As espécies do complexo *C. gloeosporioides* s.lat. foram predominantes em Manacapuru, onde *C. theobromicola* (MPU61 e MPU100), *C. fruticola* (MPU63) e *C. gloeosporioides* (MPU99) foram exclusivos dessa região.

Em relação ao hospedeiro de origem, em frutos de pimentão de Manacapuru foram identificadas quatro espécies associadas às lesões, *C. theobromicola*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides* e *C. siamense*, todas pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*.

Colletotrichum siamense foi primeiramente relatado em plantas de café (*Coffea arabica* L.) na Tailândia ele foi citado como patógeno de ampla distribuição geográfica e vasta gama de espécies hospedeiras, além de ser considerado o agente causal da antracnose em maçã (*Malus domestica*), abacate (*Persea americana* Mill), pimentão, uva (*Vitis vinifera* L.), café, morango e plantas ornamentais em regiões tropicais e subtropicais (Prihastuti *et al.* 2009; Weir *et al.* 2012). Após a proposta de revalidação dos nomes das espécies de *Colletotrichum*, as espécies *C. jasmini-sambac* Wikee e *C. hymenocallidis* Yan foram definidas com sinonímias de *C. siamense* (Weir *et al.* 2012).

Com base na análise molecular, os isolados MPU58, MPU59, MPU60, MPU62, MPU66, MPU101, MPU102, MPU104, MPU105, MPU106, IRA68, IRA85, IRA88 e RPE38 foram agrupados em subclados dentro de um clado monofilético com *C. siamense* com valores de PP igual a 0,97. Esta espécie foi observada causando sintomas da doença em frutos de pimenta cheirosa (MPU59 e RPE38) e pimentão (demais isolados).

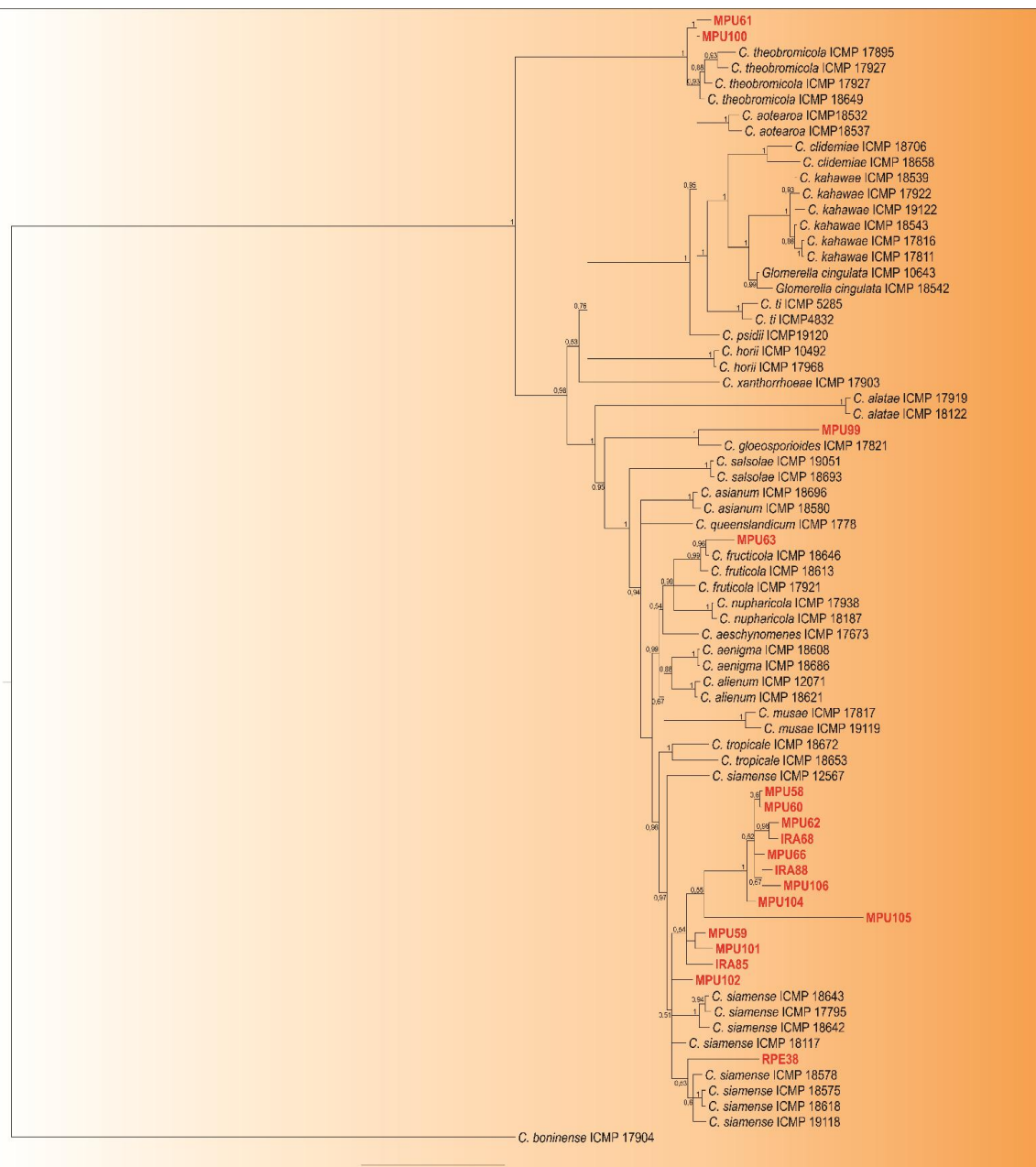


Figura 4. Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS concatenadas contendo isolados do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*. Como *outgroup* foi utilizado *C. boninense* (MAFF 305972). Valores de *probabilidade a posteriori* são mostrados nos nós dos ramos da árvore

Colletotrichum fruticola foi descrito afetando bagas de café na Tailândia e também possui extensa distribuição geográfica e patogênica, relatado como patógeno de maçã, morango, abacate, pimentão e cacau (*Theobroma cacao* L.) em diversas localidades do mundo. Apenas o isolado MPU63, de pimentão, foi identificado como esta espécie, com valor de PP igual a 0,99.

Colletotrichum gloeosporioides foi definido como a espécie epitífica e representa um complexo de espécies que estão associados aos citruses em muitas partes do mundo, mas

também ocorre em outros hospedeiros, incluindo figo (*Ficus carica* L.), manga (*Mangifera indica* L.), uva, pimentão, puerária (*Pueraria phaseoloides* Benth) e amora do papel (*Broussonetia papyrifera* L.) (Yan *et al.* 2011; Weir *et al.* 2012). O isolado MPU99, de pimentão, foi agrupado com a espécie tipo do complexo com suporte estatístico igual a 1.

Colletotrichum theobromicola foi descrito causando sintomas em plantas de cacau, bem como agente patogênico de ampla distribuição em regiões tropicais em diversos hospedeiros. Como sinônimas dessa espécie, foram relatados patógenos importantes como *C. fragariae* Brooks que causa antracnose em morango, e *C. gloeosporioides* f. sp. *stylosanthis* Munaut. agente causal dessa doença em forrageiras Estilosante.

Os isolados MPU61 e MPU100, ambos isolados de frutos de pimentão, foram agrupados em um clado monofilético com *C. theobromicola* com valores de PP igual a 1.

5.3.3 Complexo *Colletotrichum truncatum*

O alinhamento concatenado resultou em 2241 nucleotídeos, dos quais 1545 foram conservados, 558 sítios variáveis e 475 informativos para parcimônia. Como *outgroup* utilizou-se *C. lindemuthianum* (CBS 15128). A análise bayesiana resultou no agrupamento dos isolados IRA90, IRA92, IRA95 e IRA97 com *C. truncatum* com valores de PP igual a 1 (Figura 5).

Todos os isolados identificados como *C. truncatum* foram procedentes de Iranduba, sendo restrito a esta região. Esta espécie foi descrita causando sintomas de antracnose em feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus* L.) e epitificada para este complexo que é composto apenas pela espécie principal.

Como sinônimo, já foram citadas as espécies *C. capsici* (Syd.) E.J. Butler que era apontada como uma das principais causadoras de antracnose em frutos de *Capsicum* em todo o mundo, além de *C. dematium* f. sp. *truncatum* e *C. curvatum* Briant. (Damm *et al.* 2009).

No presente estudo, *C. truncatum* foi associado aos sintomas de antracnose em frutos de pimenta murupi (IRA90) e pimenta cheirosa (IRA92, IRA95 e IRA97). Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato de espécies de *Colletotrichum* causando doença em frutos de pimenta murupi e o primeiro relato de *C. truncatum* causando sintomas de antracnose em frutos de pimenta cheirosa em todo o mundo.

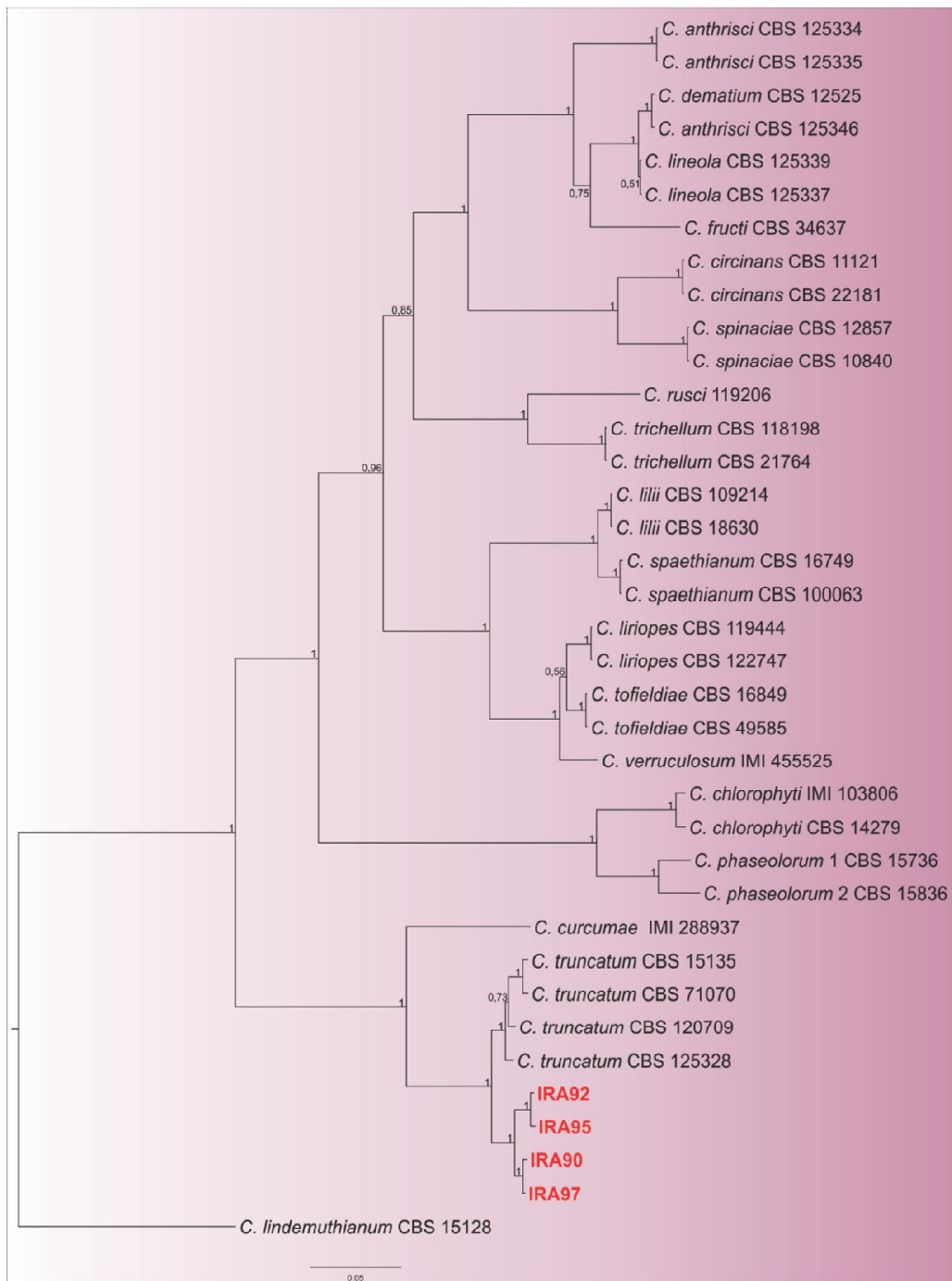


Figura 5. Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS contendo isolados do complexo *Colletotrichum truncatum*. Como *outgroup* foi utilizado o isolado *C. lindemuthianum* (CBS 15128). Valores de *probabilidade a posteriori* são mostrados nos nós dos ramos da árvore

5.3.4 *Colletotrichum brevisporum*

O alinhamento concatenado resultou em 2222 nucleotídeos, dos quais 1589 foram conservados, 555 sítios variáveis e 434 informativos para parcimônia. Como *outgroup* utilizou-se os isolados de *C. chlorophyti* (IMI 103806 e CBS 14279). A análise bayesiana resultou no agrupamento dos isolados MPU98, MPU107, MPU108, MPU110 e IRA93 com *C. brevisporum* com suporte estatístico igual a 1 (Figura 6).

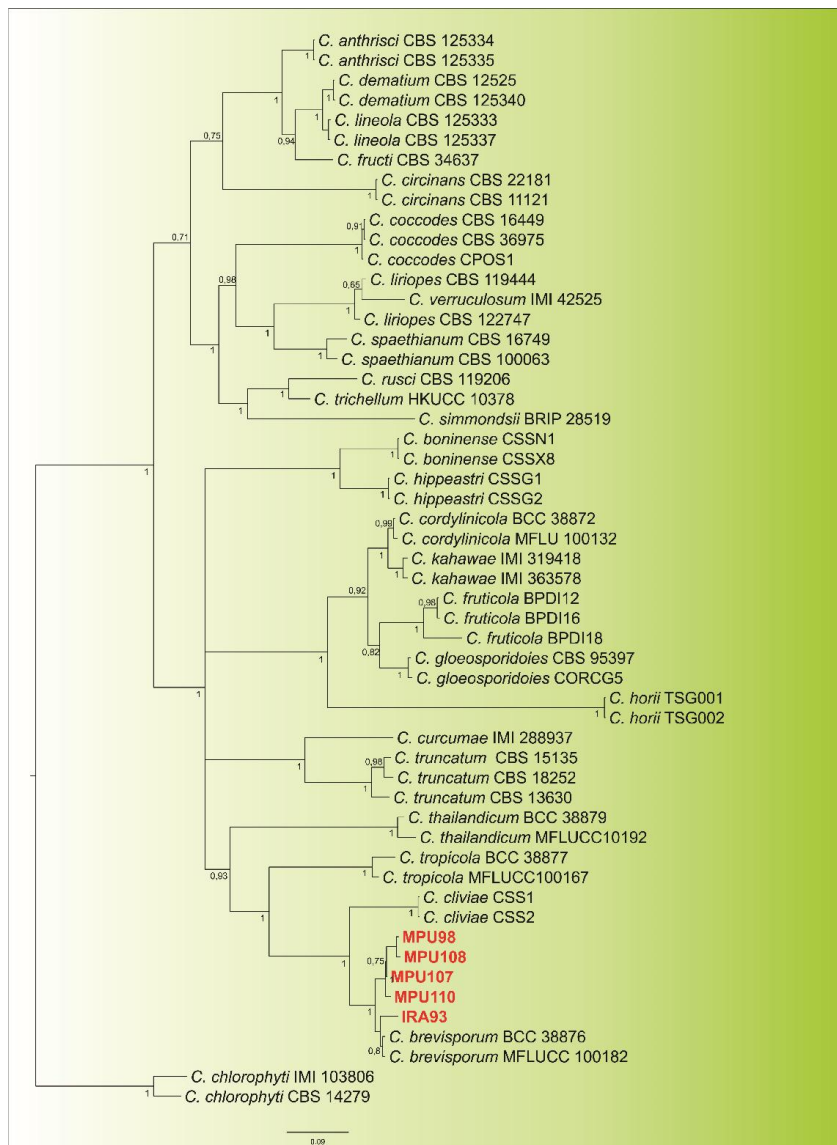


Figura 6. Análise de Inferência Bayesiana das regiões gênicas ACT, CHS, HIS, GAPDH e GS concatenadas contendo isolados de *Colletotrichum brevisporum* e outras espécies do gênero. Como *outgroup* foi utilizado os isolados de *C. chlorophyti* (CBS 14279 e IMI 103806). Valores de *probabilidade a posteriori* são mostrados nos nós dos ramos da árvore

Colletotrichum brevisporum foi descrito em 2012 causando antracnose em bromélias do gênero *Neoregalia* na Tailândia (Noireung *et al.* 2012) e posteriormente, foi relatado como endofítico em plantas de *Lycium chinense* na Coréia (Paul *et al.* 2014). No Brasil, o patógeno foi relatado recentemente associado a esta doença em frutos de mamão (*Carica papaya* L.) no Nordeste do país (Vieira *et al.* 2013) e em frutos de chuchu (*Sechium edule* Swartz) em Santa Catarina (Bezerra *et al.* 2015).

Neste estudo, foi constatada a ocorrência de *C. brevisporum* como agente causal da antracnose em frutos de pimenta cheirosa nos municípios de Iranduba (um isolado) e Manacapuru (quatro isolados). Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato de *C. brevisporum* causando sintomas de antracnose em frutos de pimenta cheirosa em todo o mundo.

6. CONCLUSÃO

Os marcadores moleculares utilizados foram eficientes para analisar a alta diversidade genética entre as espécies de *Colletotrichum* estudadas.

A análise filogenética dos isolados permitiu a identificação de sete espécies de *Colletotrichum* pertencentes a complexos distintos como agentes causais da antracnose em frutos do gênero *Capsicum* no Amazonas.

Foi possível verificar a predominância de complexos espécies de acordo com a região de coleta estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afanador-Kafuri, L.; Minz, D.; Maymon, M.; Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, Colômbia, v.9, n.5, p. 579-874.
- Ahmad, S., Iqbal, S.H., and Khalid, A.N. 1997. Fungi of Pakistan. Sultan Ahmad *Mycological Society of Pakistan*, 248 p.
- Alvarez, M.G. 1976. Primer catalogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 1-169p.
- Alves, K. F. 2008. *Controle alternativo da antracnose do pimentão com extratos vegetais*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 47p.
- Arnold, G.R.W. 1986. Lista de Hongos Fitopatogenos de Cuba. Ministerio de Cultura Editorial Cientifico-Tecnica, 207p.
- Atkins, S.D.; Clark, I.M. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*, v.45, n.1, p. 3-15.
- Azevedo, C.P. 2006. *Epidemiologia e Controle da Antracnose em Capsicum spp. e Identificação de Colletotrichum spp. associados às Solanaceas Cultivadas*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, Distrito Federal. 102p.
- Bailey, J.A. and Jeger, M.J. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International. Wallingford, UK. 757p.
- Baroncelli, R., Sarrocco, S., Zapparata, A., Tavarini, S., Angelini, L.G., and Vannacci, G. 2015 [2014]. Characterization and epidemiology of *Colletotrichum acutatum sensu lato* (*C. chrysanthemi*) causing *Carthamus tinctorius* anthracnose. *Plant Pathology* 64: 375-384p.
- Beirn, L.A., Moy, M., Meyer, W.A., Clarke, B.B., and Crouch, J.A. 2011. Molecular analysis of turfgrass rusts reveals the widespread distribution of *Puccinia coronata* as a pathogen of Kentucky bluegrass in the United States. *Plant Disease*. 95: 1547-1557p.
- Bernstein, B.; Zehr, E.I.; Dean, R.A.; Shabi, E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease*, v. 79, p. 478-482.
- Black, J. S. e Gregersen, H. B. 1991. Antecedents to cross-cultural adjustment for expatriates on Pacific Rim assignments. *Human Relations*, v. 44, p. 497-515.
- Bobev, S. 2009. Reference Guide for the Diseases of Cultivated Plants. Unknown journal or publisher, 466p.
- Buso, G. S. C.; Ciampi, A. Y.; Moretzsohn, M. C.; Amaral, Z. P. S. e Brondani, R. V. 2003. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, ed. 30, 46-50p.

- Carvalho, F.M.S.; Leite Jr., R.P.; Bueno, B. 2000. Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, n. 1, p. 72-78.
- Cannon, P. F.; Buddie, A. G.; Bridge, P. D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, Ithaca, v. 104, n. 1, p. 189-204.
- Cannon, P.F.; Damm, U.; Johnston, P.R.; Weir, B.S. 2012. *Colletotrichum*- current status and future directions. *Studies in Mycology*, v.73, p. 181–213.
- Cai L.; Hyde, K.D.; Taylor, P.W.J.; Weir, B.S.; Waller, J.; Abang, M.M.; Zhang, J.Z.; Yang, Y.L.; Phoulivong, S.; Liu, Z.Y.; Prihastuti, H.; Shivas, R.G.; McKenzie, E.H.C.; Johnston, P.R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, v.39, p. 183– 204.
- Chardon, C.E. e Toro, R.A. 1934. *Mycological Explorations of Venezuela*. Monographs of the University of Puerto Rico, B 2: 1-351p.
- Cho, W.D., and Shin, H.D., Eds. 2004. List of plant diseases in Korea. Fourth edition. *Korean Society of Plant Pathology*, 779 p.
- Connors, I.L.1967. An Annotated Index of Plant Diseases in Canada and Fungi Recorded on Plants in Alaska, Canada and Greenland. *Research Branch Canada Department of Agriculture*. 1251: 1-381p.
- Crouch, J. A.; Clarke, B. B.; Hillman, B. I. 2009. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored, *graminiculous Colletotrichum* group. *Mycologia*, New York, v. 101, p. 648-656.
- Corda, A. C. I. 1831. Deutschlands flora in abbildungen nach der natur mit beschreibungen. Nürnberg: Sturm, v. 3, n. 12, p. 1-144.
- Costa R.C.; Verzignassi J.R.; Poltronieri; Benchimol R.L.; Carvalho E.A. 2013. *Colletotrichum gloeosporioides* causando manchas foliares em plantas de canela-da-índia no Estado do Pará. *Summa phytopathol.* Botucatu. vol.39 no.3
- Dade, H.A. 1940. A revised list of Gold Coast fungi and plant diseases. XXIX. *Bulletin of Miscellaneous Information*. Kew 6: 205-247p.
- Dahal, G., Amatya, P., and Manandhar, H. 1992. Plant diseases in Nepal. *Plant Pathology*. 71: 797-807p.
- Damm, U.; Woudenberg, J. H. C.; Cannon, P. F.; Crous, P. W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, Kunming, v. 39, n. 1, p. 45-87.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., and Crous, P.W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73: 37-113p.

- Deighton, F.C. 1936. Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone and list of fungi collected in Sierra Leone. *Bulletin of Miscellaneous Information*. Kew 6: 205-247p.
- DeWitt, D.; Bosland, P. W. 1993. A brief history of pepper growing. In: DeWitt, D.; Bosland, P.W. (Eds.). *The pepper garden*. Berkeley: Ten Speed, p. 5-21.
- Dean, T.R.; Van Kan J.A.L.; Pretorius Z.A.; Hammond-Kosack K.E; Di Pietro A.; Spanu P.D.; Rudd J.J; Dickman M.; Kahmann R.; Ellis J.; Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v.13, p. 414–430.
- Diao, Y.Z., Fan, J.R., Wang, Z.W., and Liu, X.L. 2013. First Report of *Colletotrichum boninense* Causing Anthracnose on Pepper in China. *Plant Disease*. 97: 138p.
- Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, São Paulo, v. 82, n. 6, p. 596-605.
- Garg, R.; Kumar, S.; Kumar, R.; Loganathan, M.; Saha, S.; Kumar, S.; Rai, A. B.; Roy, B. K. 2013. Novel source of resistance and differential reactions on chilli fruit infected by *Colletotrichum capsici*. *Australasian Plant Pathology*, v. 42, p. 227–233.
- Ghini, R.; Kimati, H. 2000. Resistência de fungos a fungicidas. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, v. 1, p. 58-65
- Godoy P, Cano J, Gene J, Guarro J, Hofling-Lima AL, Colombo AL. 2004. Genotyping of 44 Isolates of *Fusarium solani*, the Main Agent of Fungal Keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(10): 4494–4497p.
- Greene, H.C. 1949. Notes on Wisconsin parasitic fungi. XIII. *The American Midland Naturalist*. 41: 740-758p.
- Grodzicker, T.; Willians, J.; Sharp, P.; Sambrook, J. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*, ed. 39, 439-446p.
- Gupta, P., and Madaan, R. 1982. Some parasitic fungi on solanaceous plants from North India. *Indian Phytopathology*. 35: 726-728p.
- Hanada, R. E.; Gasparotto, L.; Pereira, J. C. R.; Assis, L. A. G. 2011. Ocorrência de *Colletotrichum* sp. em pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) no Amazonas. EMBRAPA Amazônia Ocidental, 1p.
- Hulton C. S. J.; Higgins, C. F.; Sharp, P. M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria, *Molecular Microbiology*, ed.5 825-834p.
- Hyde, K.D. e Zhang, Y. 2008. Epitypification: should we epitypify? *Journal of Zhejiang University, Science*, v. 9, p. 842-846.

- Jelev, Z. J., Bobev, S. G., Minz, D., Maymon, M., and Freeman, S. 2008. First Report of Anthracnose Fruit Rot Caused by *Colletotrichum acutatum* on Pepper and Tomato in Bulgaria. *Plant Disease*. 92: 172p.
- Junqueira, N. T. V.; Costa, H. 2002. Controle das doenças da goiabeira in: Zambolim, L; Vale, F. X. R.; Monteiro, A. J. A.; Costa, H. *Controle de doenças de plantas: Fruteiras*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 2, p. 1247-1277.
- Kurozawa, C.; Pavan, M.A. 2005. Doenças das solanáceas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Eds). *Manual de fitopatologia*. 4ed. São Paulo: Editora agronômica Ceres, v.2, p. 589-596.
- Larter, L.N.H., and Martyn, E.B. 1943. A preliminary list of plant diseases in Jamaica. *Mycological Paper*. 8: 1-16p.
- Lopes, C. A. e Ávila, A. C. 2003. *Doenças do pimentão: Diagnose e controle*. EMBRAPA Hortaliças, Brasília, 96p.
- Lopes, R.; Lopes, M. T. G.; Oliveira, A. V.; Camargo, L. E. A.; Fungaro, M. H. P.; Carneiro, M. S e Vieira, M. L. C. 2002. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia ciência e desenvolvimento*, ed. 29, 56-60p.
- Lins, S.R.O.; Coelho, R.S.B. 2004. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p. 332-335.
- Litzenberger, S.C., Farr, M.L., and Lip, H.T. 1962. A preliminary list of Cambodian plant diseases. Division Agriculture National Research., USAID, Ministerio of Agriculture. Phnom-Penh, Cambodia, 29 p.
- Liu, F., Cai, L., Crous, P.W., and Damm, U. 2013. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. *Mycologia* 105: 844-860p.
- McGuire Jr., J.U., and Crandall, B.S. 1967. Survey of insect pests and plant diseases of selected food crops of Mexico, Central America and Panama. *International Agriculture Development*, AID, 157 p.
- McKay, S. F., Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., Sedgley, M., Collins, G. C., and Scott, E. S. 2009. Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond in Australia. *Phytopathological*, ed. 99:985-995p.
- Maneval, W.E. 1937. A List of the Missouri Fungi. University of Missouri Studies, *Science Series*. 12p.
- Mathur, R.S. 1979. The Coelomycetes of India. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Delhi, India., 460 p.
- Mehta, A.; Mehta, Y.R., Rosato, Y.B. 2002. ERIC- and REP_PCR amplify non-repetitive fragments from the genome of *Drechslera avenae* and *Stemphylium solani*. *FEMS Microbiology Letters*, Birmingham, v. 211, 51-55p.

Mehta, Y. R. e Mehta, A. 2010. Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro. *Summa phytopathology*, v. 36, n. 1, p. 40-44.

Mendes, M.A.S., da Silva, V.L., Dianese, J.C., and et al. 1998. Fungos em Plantas no Brasil. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, 555 p.

Moreno, M., Stenglein, S., Balatti, P., and Perelló, A. E. 2008. Pathogenic and molecular variability among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* causal agent of tan spot of wheat in Argentina. *Eur. J. Plant Pathology*, ed. 122:239-252p.

Menezes, M. 2006. Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do Gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônômica*. Recife, Pernambuco. v.3, p. 170-179.

Michereff, S. J. 2007. Desenvolvimento de sistemas de amostragem aplicados ao manejo de doenças de plantas. XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Pernambuco, p. 17 -18.

Moreira, G.R.; Caliman, F.R.B.; Silva, D.J.H.; Ribeiro, C.S.C. 2006. Espécies e variedades de pimentas. *Informe Agropecuário*, v. 108, p. 16-29.

Mulenko, W., Majewski, T., and Ruszkiewicz-Michalska, M. 2008. A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. *W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences* 9: 752p.

Mullis, K. e Fallona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods of Enzymology*, ed. 55, 335-350p.

Nascimento, R. J., Mizubuti, E. S. G., Câmara, M. P. S., Ferreira, M. F., Maymon, M., Freeman, S., and Michereff, S. J. 2010. First report of papaya fruit rot caused by *Colletotrichum magna* in Brazil. *Plant Disease*, ed. 94:1506p.

Noda, S. N.; Ribeiro, G. A.; Noda, H.; Soares, J. E. C.; Castelo Branco; Mendonca Neto, M. F. 2007. Principais características dos sistemas de produção agrícola das comunidades ribeirinhas e do abastecimento do município de Pauini. In: Sandra do Nascimento Noda. (Org.). Agricultura familiar na agricultura familiar das águas. 1 ed. Manaus: Editora da Universidade do Amazonas, Manaus, v. 1, p. 167-207.

Pantidou, M.E. 1973. Fungus-host index for Greece. *Benaki Phytopathological*. Institute of Kiphissia, Athens., 382 p.

Parreira, D. F.; Zambolim, L.; Gomes, E. A.; Costa, R. V.; Silva, D. D.; Cota, L. V.; Lana, U. G.P. e Silva, E. C. F. 2010. Estimativa da diversidade genética de *Colletotrichum graminicola* com marcadores ISSR. Congresso nacional de milho e sorgo, ed. 25, p. 731-739.

Peregrine, W.T.H. e Ahmad, K.B. 1982. Brunei: A first annotated list of plant diseases and associated organisms. *Phytopathological Paper*. 27: 1-87p.

Peres, N.A.R.; Kuramae, E.E.; Dias, M.S.C.; Souza, N.L. 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology*, v.150, p. 128-134.

Pereira, W. V. 2009. *Caracterização e identificação molecular de espécies de Colletotrichum associadas à antracnose da goiaba no estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo. 79p.

Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., and Hyde, K.D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, v. 44, p. 33-43.

Piccinin, E.; Pascholati, S.F.; Di Piero, R.M. 2005. Doenças do abacateiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 1-7.

Piepenbring, M. 2006. Checklist of fungi in Panama. Preliminary version. *Puente Biology*. 1: 1-190p.

Prihastuti H.; Cai, L.; Chen H.; Mckenzie E. H. C.; Hyde K. D. 2009. Characterisation of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* v. 39, p. 89-109.

Rampersad, S.N. 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with Anthracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Disease*. 10: 1244-1254p.

Rampersad, S. N. 2012. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, v. 12, n. 9, p. 12347- 12360.

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

Richardson, M.J. 1990. *An Annotated List of Seed-Borne Diseases*. Fourth Edition. International Seed Testing Association, Zurich, 387p.

Riley, E.A. 1960. A revised list of plant diseases in Tanganyika Territory. *Mycological Paper*. 75: 1-42.

Roberts, R.G., and Snow, J.P. 1990. Morphological and pathological studies of *Colletotrichum capsici* and *C. indicum*. *Mycologia* 82: 82-90p.

Ruggiero, C.; São-Jose, A.R.; Volpe, C. A.; Oliveira, J. C.; Durigan, J. F.; Baumgartner, J. G.; Silva, J.R.D.A.; Nakamura, K.I.; Ferreira, M.E.; Kavati, R.; Pereira, V.P. 1996. *Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção*. Brasília: MAARA/ SDR-FRUPLEX, Embrapa-SPI, 64p.

Sarbhoy, A.K., and Agarwal, D.K. 1990. Descriptions of Tropical Plant Pathogenic Fungi. Set 1. Malhotra Publ. House, New Delhi,

Sawada, K. 1959. Descriptive catalogue of Taiwan (Formosan) fungi. XI. *Special Publication, College of Agriculture*, National Taiwan University. 8 268 p.

- Schneider, H. 2007. *Métodos de análise filogenética: Um guia prático*. Ed. Holos, Belém, 200p.
- Simmonds, J.H. 1966. *Host index of plant diseases in Queensland*. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane 111p.
- Singh, S.C. 1968. Some parasitic fungi collected from Kathmandu Valley (Nepal). *Indian Phytopathological*. 21: 23-30p.
- Shenoy, B.D., Jeewon, R., Lam, W. H., Bhat, D.J., Than, P. P., Taylor, P.W.J., and Hyde, K.D. 2007. Morpho-molecular characterisation and epitypification of *Colletotrichum capsici* (Glomerellaceae, Sordariomycetes) the causative agent of anthracnose in chilli. *Fungal Diversity* 27: 197-211p.
- Shivas, R.G., and Tan, Y.P. 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity* 39: 111-122p.
- Stangarlin, J.R. 1999. Plantas Mediciniais. *Biocologia: Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v.2, n.11, p.16-24.
- Stevenson, J.A. 1975. Fungi of Puerto Rico and the American Virgin Islands. *Contributions from the Reed Herbarium*. Baltimore, 23: 743p.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Kew, Surrey. Commonwealth Mycological Institute. 696p.
- Tai, F.L. 1979. Sylloge Fungorum Sinicorum. *Science Press Academia Sinica*, Peking, 1527 p.
- Talamini, V., Souza, E.A., Pozza, E.A., Silva, G.F., Ishikawa, F.H. e Camargo júnior, O.A. 2006. Genetic divergence among and within *Colletotrichum lindemuthianum* Races assessed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira* ed. 31, 545-550p.
- Talhinha, S. P. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum* sp. Causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 32, n. 1, p. 77-79.
- Teodoro, N.G. 1937. An Enumeration of Philippine Fungi. Forest Service, *Bulletin Department of Agriculture Community*. Manila 4: 1-585p.
- Teng, S.C. 1996. Fungi of China. *Mycotaxon*, Ithaca, NY, 586 p.
- Thaung, M.M. 2008. Biodiversity survey of coelomycetes in Burma. Australas. *Mycological*. 27: 74-110p.
- Thompson, A., and Johnston, A. 1953. A host list of plant diseases in Malaya. *Mycological Paper*. 52: 1-38.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O.; Taylor, P.W.J. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with

anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology* v.57, p. 562-572.

Tozze Junior H.J.; Mello M.B.A., Massola Junior N.S. 2006. Caracterização morfológica e fisiológica de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathol.* Botucatu, v.32, n.1, p. 77-79.

Tozze Jr., H.J., Massola Jr., N.M., Camara, M.P.S., Gioria, R., Suzuki, O., Brunelli, K.R., Braga, R.S., and Kobori, R.F. 2009. First report of *Collectotrichum boninense* causing Anthracnose on pepper in Brazil. *Plant Disease*. 93: 106p.

Tozze Junior, H.J. 2007. *Caracterização e identificação de espécies Colletotrichum associadas à antracnose do pimentão (Capsicum annum) no Brasil*. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, São Paulo, 81p.

Turner, G.J. 1971. Fungi and Plant Disease in Sarawak. *Phytopathol. Pap.* 13: 1-55p.

Urtiaga, R. 1986. Índice de enfermedades en plantas de Venezuela y Cuba. *Impresos Nuevo Siglo*. S.R.L., Barquisimeto, Venezuela, 202p.

Tozze Júnior, H.J.; Massola Júnior, N.S.; Câmara, M.P.S. ; Gioria, R. ; Suzuki, O.; Brunelli, K.R.; Braga, R.S.; Kobori, R.F. 2008. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose on pepper in Brazil. *Plant Disease*, Brasil, v.23, p 106.

Viana, F.M.P.; Freire, F.C.O.; Parente, G.B. 2007. *Controle das principais doenças do pimentão cultivado nas Regiões Serranas do Ceará*. Embrapa Agroindústria Tropical, (Série Embrapa - Comunicado Técnico). Fortaleza, 4 p.

Von Arx, J.A. 1957. *Die Arten der Gattung Colletotrichum Cda*. Ed. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.29, p. 413-468.

Weir, B.S., Johnston, P.R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180p.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, ed. 18, 6531-6535p.

Winstead, N.N., Strider, D.L., and Person, L.H. 1960. Vegetable diseases in North Carolina during 1958 and 1959. *Plant Disease*. Reporter 44: 491-495p.

Yang, Y.L., Liu, Z.Y., Cai, L., Hyde, K.D., Yu, Z.N., and McKenzie, E.H.C. 2009. *Colletotrichum anthracnose* of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity* 39: 123-146p.

Zhuang, W.-Y., Ed. 2001. Higher Fungi of Tropical China. *Mycotaxon*, Ltd., Ithaca, NY, 485p.

Zhuang, W.-Y., Ed. 2005. Fungi of northwestern China. *Mycotaxon*, Ltd., Ithaca, NY, 430p.