



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA TROPICAL

CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA,
MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DA
PIMENTA-DE-CHEIRO (*Capsicum chinense* Jacq.) NO ESTADO
DO AMAZONAS

ALESSANDRO MACHADO DA SILVA

MANAUS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

ALESSANDRO MACHADO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA,
MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DA
PIMENTA-DE-CHEIRO (*Capsicum chinense* Jacq.) NO ESTADO
DO AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Agronomia Tropical
da Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Agronomia Tropical,
área de concentração Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jânia Lília da Silva Bentes

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586c Silva, Alessandro Machado da
Caracterização cultural, morfológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da Pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.) no Estado do Amazonas / Alessandro Machado da Silva. 2016
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Diversidade genética. 2. Pimenta-de-cheiro. 3. Genotipagem por Ap-PCR. 4. Doenças fúngicas. I. Bentes, Jânia Lília da Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

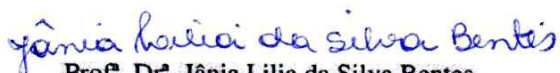
ALESSANDRO MACHADO DA SILVA

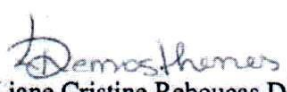
CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, MORFOLÓGICA,
MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DA
PIMENTA-DE-CHEIRO (*Capsicum chinense* Jacq.) NO
ESTADO DO AMAZONAS

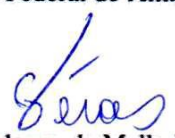
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Agronomia Tropical da
Universidade Federal do Amazonas, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Agronomia Tropical, área de
concentração Produção Vegetal.

Aprovado em 21 de outubro de 2016

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Jânia Lília da Silva Bentes
Universidade Federal do Amazonas


Prof.^a. Dr.^a. Liane Cristine Rebouças Demosthenes
Universidade Federal do Amazonas


Prof.^a. Dr.^a. Solange de Mello Vêras
Universidade Federal do Amazonas

DEDICO

A minha mãe, Glair
Machado, por ter me
ensinado a sempre acreditar
nos meus sonhos.

A minha esposa e
companheira de todas as
horas, Silmara Figueiredo,
sem a qual este trabalho não
teria sido possível.

Aos meus irmãos,
Alexsandra; Hellington e
Ednei, pelo apoio e amor
fraterno.

Aos meus tios, Glandino;
Glacilda e Maria, pelo
exemplo de vida a mim
transmitido.

Aos meus filhos, Lucas e
Sofia, pelo amor e carinho
nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por sempre me abençoar.

À Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas e ao curso de Pós-graduação em Agronomia Tropical pela oportunidade e ensino.

Ao Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente da Universidade Federal do Amazonas pela liberação concedida para finalizar o curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que possibilitaram a realização do projeto de pesquisa que originou essa dissertação.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Jânia Lilia da Silva Bentes, a quem serei eternamente grato, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência, pelos conselhos e por nunca desistir e sempre acreditar na concretização desse sonho, mesmo sob condições adversas.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia: Francy, Herodilson, Bruno, Alexsandra, Geisa, Blenda e Samuel, pela amizade, respeito e consideração.

Ao Prof^o Dr^o José Ferreira pela amizade e por ser meu melhor exemplo.

À minha amiga Dr^a Marcely Andrade, pela amizade e ajuda na extração do DNA e caracterização molecular dos isolados.

Ao meu amigo Haroldo Rodrigues por auxiliar com os dados da genotipagem no programa Genes.

À minha amiga Msc. Elisângela de Jesus da Silva Bezerra, pela qual adquiri profunda admiração e respeito, que abraçou o projeto, nunca deixou de auxiliar apesar das dificuldades, ofereceu todo seu tempo disponível, participou de todas as etapas, além de ter me dado a oportunidade de aprender inúmeras coisas que acrescentaram significativamente na minha formação. Obrigado pela confiança, amizade e apoio, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho. Muito obrigado por ter compartilhado comigo momentos valiosos e ter me dado toda a base de um conhecimento que não tem preço e nem está escrito em livros. Sinto-me honrado por ter sido treinado por você.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia Tropical, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado: Douglas, Rody, Marcelo, Rodrigo, Ednaldo e Nascimento, pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos meus amigos Técnicos Agrícolas: Aderbal, Raony, Antônio Batista, Elias, Zezinho, Sidão, Elton, Madonna, Alexandre, Cassiano, Walter, Alex Goes, Daniel, por sempre acreditarem em mim, a vitória é nossa.

A todos os membros da Família Machado, por entenderem minha ausência e pela garra que é peculiar de cada um.

A todos que porventura não foram mencionados, mas que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Obrigado.

RESUMO

No Amazonas o cultivo de pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.) está sujeito ao ataque de diversos patógenos, destacando-se as doenças fúngicas, dentre estas a antracnose causada por *Colletotrichum* spp., é uma das mais importantes, pois causa danos aos frutos e inviabiliza a comercialização. Dada a importância comercial dessa doença, esse trabalho teve por objetivo realizar a caracterização morfo cultural, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de frutos com sintomas de antracnose em pimenta-de-cheiro, coletados em municípios produtores do Estado do Amazonas (Iranduba, Itacoatiara, Presidente Figueiredo e Manaquiri). O ICM variou de 19,29 a 12,77 mm. A cor do verso das colônias variou entre branca à cinza escura. A cor do reverso da colônia variou de branca, castanha, creme, laranja, marrom escura, preta e cinza. A maior parte dos isolados apresentaram crescimento aéreo moderadamente abundante, seguido de aéreo abundante e reduzido. Os conídios observados foram do tipo oblongo/cilíndrico, com dimensões variando de 15,4 a 9,0 µm de comprimento, 5,5 a 2,9 µm de largura e 4,0 a 2,6 µm de relação comprimento largura. O formato dos apressórios foram arredondados, levemente lobado e lobado, com dimensões de comprimento variando de 14,6 a 7,3 µm, largura de 8,8 a 5,2 µm e relação comprimento/largura de 1,7 a 1,1 µm. Cinco isolados não produziram apressórios. O teste de patogenicidade cruzada possibilitou observar que os isolados oriundos de Presidente Figueiredo, Itacoatiara, Manaquiri e Iranduba apresentaram alta variabilidade quanto ao diâmetro médio das lesões (mm), índice de infecção (%) e incidência (%) quando inoculados nas diferentes espécies de *Capsicum* usadas no presente estudo. A genotipagem por Ap-PCR evidenciou alta diversidade genética dentre e entre isolados de uma mesma procedência. Os resultados demonstram, possivelmente, a existência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada à antracnose em pimenta-de-cheiro no Estado do Amazonas.

Palavras-chaves: Apressórios; Diversidade genética; Ap-PCR; DNA

ABSTRACT

In the Amazon the smell of pepper culture (*Capsicum chinense* Jacq.) Is subject to attack by many pathogens, especially fungal diseases, among these anthracnose caused by *Colletotrichum* spp., is one of the most important, because it causes damage to fruit and prevents the marketing. Given the commercial importance of this disease, this study aimed to characterize morphocultural, molecular and pathogenic isolates of *Colletotrichum* spp. from fruits with symptoms of anthracnose in pepper-of-smell, collected in producing municipalities of Amazonas state (Iranduba, Itacoatiara, President Figueiredo and Manaquiri). The mycelial growth index ranged from 19.29 to 12.77 mm. The color of colonies ranged from white to dark gray. The colony reverse color varied from white, brown, cream, orange, dark brown, black and gray. Most of the isolates were moderately abundant aerial growth, followed by abundant and reduced air. The observed conidia were the oblong/cylindrical type, with dimensions ranging from 15.4 to 9.0 mm in length, 5.5 to 2.9 mm in width and 4.0 to 2.6 μ m ratio length width. The format of appressoria were rounded, slightly lobed and lobed, with dimensions of length ranging from 14.6 to 7.3 μ m width from 8.8 to 5.2 m and length / width ratio from 1.7 to 1.1 μ m. Five isolates did not produce appressoria. The pathogenicity test possible to observe that the isolates from President Figueiredo, Itacoatiara, Manaquiri and Iranduba showed high variability in the mean diameter of lesions (mm), aggressiveness index (%) and incidence (%) when inoculated in different species of *Capsicum*. Genotyping by Ap-PCR showed genetic diversity within and among isolates of the same origin. The results show possibly the existence of more than one species of *Colletotrichum* associated with anthracnose in pepper-of-smell in the state of Amazonas.

Keywords: Appressoria; Genetic diversity; Ap-PCR; DNA

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Sintoma típico de antracnose em frutos de pimenta-de-cheiro.....	18
Figura 2 – Ciclo da antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> spp.....	20
Figura 3 – Aspectos das colônias (verso e reverso) de <i>Colletotrichum</i> spp.....	36
Figura 4 – Formato de apressórios de <i>Colletotrichum</i> spp.....	38
Figura 5 – Polimorfismo gerado pelo <i>primer</i> arbitrário GACA ₄	48
Figura 6 – Polimorfismo gerado pelo <i>primer</i> arbitrário GTG ₅	49
Figura 7 – Dendograma gerado pela análise de agrupamento UPGMA.....	51
Figura 8 – Sintoma de antracnose ao décimo dia após inoculação em pimenta-de-cheiro.....	54
Figura 9 – Sintoma de antracnose ao décimo dia após inoculação em pimentão.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Colletotrichum</i> relatadas causando antracnose em <i>Capsicum</i>	17
Tabela 2 – Isolados selecionados para a caracterização morfo cultural.....	31
Tabela 3 – Isolados selecionados para a caracterização molecular.....	32
Tabela 4 – <i>Primers</i> arbitrários utilizados na análise da diversidade genética.....	33
Tabela 5 – Isolados selecionados para a caracterização patogênica.....	33
Tabela 6 – Identificação e procedências dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	41
Tabela 7 – Variabilidade cultural e índice de crescimento micelial dos isolados.....	43
Tabela 8 – Características morfométricas de conídios.....	45
Tabela 9 – Características morfométricas de apressórios	46
Tabela 10 – Diâmetro médio de lesões (DML), índice de infecção (II) e incidência (INC)...	56
Tabela 11 – Relação procedência com DML, II e INC.....	57
Tabela 12 – Classes de infecção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	58

Sumário

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTAS DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 O gênero <i>Capsicum</i>	15
3.2 Importância econômica	16
3.3 Antracnose no gênero <i>Capsicum</i>	17
3.4 Caracterização do agente causal	21
3.5 Caracterização molecular de espécies de <i>Colletotrichum</i>	22
3.5.1 Reação de PCR /Ap-PCR ou RAPD	23
3.6 Caracterização patogênica de <i>Colletotrichum</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Obtenção dos isolados e culturas monospóricas	26
4.2 Caracterização cultural e morfológica de colônias.....	26
4.3 Morfometria de conídios e apressórios	27
4.4 Caracterização molecular de isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	28
4.5 Patogenicidade cruzada de isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	29
5. RESULTADOS	34
5.1 Caracterização Morfocultural.....	34
5.1.1 Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	34
5.1.2 Caracterização de colônias, conídios e apressórios	34
5.2 Genotipagem por Ap-PCR de <i>Colletotrichum spp.</i>	48
5.3 Patogenicidade cruzada de isolados de <i>Colletotrichum spp.</i>	51
6. DISCUSSÃO	59
6.1 Caracterização morfocultural	59
6.2. Genotipagem por Ap-PCR de <i>Colletotrichum spp.</i>	61
6.3 Caracterização patogênica.....	66
7. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

As pimentas da família Solanaceae pertencem ao gênero *Capsicum* e são cultivadas em várias regiões do mundo, sendo originárias das regiões quentes das Américas. Dentre as espécies domesticadas, estão a pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.), rocotó (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pavon), pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* Wild.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) (MOSCONE et al., 2007; BARBOZA et al., 2011).

As pimentas apresentam importância econômica, social, nutricional, medicinal e ornamental em várias regiões do mundo (SOUSA, 2012). Entretanto, a produção em grande escala tem sido limitada por problemas de ordem fitossanitária.

A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., é uma das principais doenças em todas as regiões onde se cultivam pimenta e pimentão. A doença se desenvolve principalmente em clima quente e úmido, podendo, sob tais condições, acarretar prejuízos de até 100% afetando principalmente os frutos (LOPES; ÁVILA, 2003; REIS et al., 2009). No estado do Amazonas, a antracnose da pimenta-de-cheiro tem se tornado alvo de atenção devido à sua frequente e severa ocorrência em diversas áreas produtoras (GASPAROTTO et al., 2014).

Espécies de *Colletotrichum* têm sido caracterizadas com base em caracteres morfológicos e moleculares (SUTTON, 1992; TOZZE Jr. et al., 2015). Estudos de caracterização são fundamentais para conhecer a amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno. Essas informações são essenciais para entender melhor as suas relações com o hospedeiro, realizar a correta diagnose das doenças e desenvolver estratégias de manejo.

Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização cultural, morfológica, molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a frutos de pimenta-de-cheiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da pimenta-de-cheiro quanto aos aspectos culturais, morfológicos, molecular e de patogenicidade.

2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar a morfologia de colônias, conídios e apressórios de 40 isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da pimenta-de-cheiro;

Caracterizar a diversidade genética através da genotipagem de 34 isolados de *Colletotrichum* spp. por meio da técnica Ap-PCR;

Caracterizar a patogenicidade cruzada de 20 isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos de pimenta-de-cheiro, pimenta murupi, pimentão e pimenta dedo-de-moça.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gênero *Capsicum*

Espécies do gênero *Capsicum* pertencem à divisão Spermatophyta, filo Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Solanales e família Solanaceae (ANDREWS, 1995).

O gênero *Capsicum* abrange as pimentas, pimentões e seus parentes silvestres. Aproximadamente 38 táxons compõe o gênero (MOSCONE et al., 2007; HILL et al., 2013; USDA-ARS, 2014), sendo cinco espécies domesticadas, *C. chinense* Jacq. (pimenta-de-cheiro), *C. frutescens* L. (pimenta malagueta), *C. pubescens* Ruiz & Pavon (rocotó), *C. baccatum* L. var. *pendulum* Wild. (pimenta dedo-de-moça) e *C. annuum* L. (pimentão) (MILLA, 2006; MOSCONE et al., 2007; BARBOZA et al., 2011). Novas espécies têm sido identificadas, como *C. assamicum* registrada no nordeste da Índia (PURKAYASTHA et al., 2012), sendo considerada por Ramchiary et al (2013), a sexta espécie cultivada do gênero.

No Brasil, novas espécies de *Capsicum* estão sendo descritas, como *C. pereirae*, *C. friburgense*, *C. hunzikerianum*, *C. caatingae* e *C. longidentatum*. (BARBOZA; BIANCHETTI, 2005; BARBOZA et al., 2011)

As pimenteiras são subarbustos perenes quando crescem nos seus habitats nativos, porém se desenvolvem como anuais em climas mais frios (DE WITT; BOSLAND, 2009). As flores são hermafroditas e autocompatíveis, favorecendo a autopolinização (RÊGO et al., 2012). Contudo, a polinização cruzada ocorre entre e dentro das espécies de 0,5% a 70% (COSTA et al., 2008). Estudos têm mostrado que as espécies desse gênero são diploides, com número cromossômico $2n=24$, sendo encontrado em algumas espécies silvestres $2n=26$ (TONG; BOSLAND, 2003; MOSCONE et al., 2007).

As folhas apresentam coloração, tamanho e forma variáveis. Há presença de antocianina ao longo do caule e nos nós. O fruto é uma baga, oca, tipo cápsula, caracterizado por uma infinidade de cores, tamanhos, formas e pungências, demonstrando grande variabilidade. As sementes são de cor creme, exceto as de *C. pubescens*, que são pretas. A corola é rotada ou raramente campanulada com cores altamente variáveis entre e dentro das espécies (WALSH; HOOT, 2001).

A pungência dos frutos se deve à presença de substâncias conhecidas como capsaicinoides. A capsaicina, principal capsaicinoide das pimentas, tem sido avaliada em estudos clínicos por causa de sua atividade analgésica e anti-inflamatória (SPILLER et al., 2008). A maior concentração da capsaicina ocorre na placenta dos frutos, e é ausente nas sementes (MORTENSEN; MORTENSEN, 2009).

As pimentas do gênero *Capsicum* são utilizadas como ornamentais, em razão da folhagem variegada, do porte anão e dos frutos com diferentes cores quando maduro (MOREIRA et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; STOMMEL; GRIESBACH, 2008; RÊGO et al., 2012). Sua importância nutricional é atribuída às proteínas, glicídios, lipídios, sais minerais, vitaminas e fibras (REIFSCHNEIDER, 2000). As pimentas são excelentes fontes de vitaminas C e E, carotenoides e xantofilas (PERUCKA; MATERSKA, 2007) ricas em ácido ascórbico, particularmente quando maduras (KUMAR; TATA, 2009).

3.2 Importância econômica

A produção mundial em 2012 de pimenta e pimentões foi de aproximadamente 28,54 milhões de toneladas de produtos frescos e 3,1 milhões de toneladas de produtos secos, em cerca de 3,8 milhões de hectares cultivados. China, México e Turquia são os principais países produtores de produtos frescos e Índia e China de produtos secos (FAOSTAT, 2015a). Os valores do comércio mundial entre 2000 a 2012 apresentaram crescimento na ordem de US\$ 1,6 bilhões para US\$ 4,3 bilhões referentes à produtos frescos e de US\$ 302 milhões para US\$ 1,3 bilhões de produtos secos (FAOSTAT, 2015b).

No Brasil a área cultivada anualmente é de cerca de 2.000 ha e os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. A produtividade média depende do tipo de pimenta cultivada, variando de 10 a 30 t/ha (EMBRAPA, 2007).

Segundo Almudi; Pinheiro (2015), no ano de 2013 o estado produziu 3.738 t de pimenta-de-cheiro (*C. chinense*) em 204 ha⁻¹, sendo que esta produção representa um aumento de 116% em relação ao ano de 2012 e 5.184 t de pimentão (*C. annuum*) em 240 ha⁻¹, uma alta de 20% em relação a 2012. Os municípios de Presidente Figueiredo, Iranduba, Careiro da Várzea, Coari e Maués são os maiores produtores, com média de produtividade de 18 t/ha (IDAM, 2014). No Estado do Amazonas essa hortaliça-fruto possui demanda elevada, porque faz parte da maioria dos pratos triviais da alimentação do amazonense e é cultivada por pequenos produtores que utilizam a mão de obra familiar, sendo uma alternativa no incremento da renda (MOREIRA et al. 2006).

O mercado de pimentas é muito segmentado e diverso, sendo o mais comum o das pimentas *in natura*, em pequenas quantidades, no atacado e varejo. Além do mercado para as pimentas processadas/industrializadas, como as conservas, os molhos e pimentas desidratadas (HENZ; RIBEIRO, 2008; RÊGO et al., 2012).

Os problemas fitossanitários, associados à franca expansão da cultura da pimenteira no Amazonas, têm reduzido à vida útil dos plantios, ameaçando o sucesso dos empreendimentos,

em virtude da redução da produtividade e queda na qualidade dos frutos, inviabilizando sua comercialização e impactando a receita (GASPAROTTO et al., 2014). Diversas pragas e doenças atacam os pimentais amazonenses durante o cultivo, seja em campo aberto ou em cultivo protegido. O ácaro branco, tripes, nematoides, largadas desfolhadoras, saúvas e principalmente as viroses, manchas e murchas bacterianas, oídios, mancha de cercospora, murcha de fitófitor, murcha de esclerócio e a antracnose, aparecem como as principais pragas e doenças que limitam à produção e reduzem a produtividade com perdas extremamente relevantes.

3.3 Antracnose no gênero *Capsicum*

As principais doenças em *Capsicum* spp. são causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (REIFSCHNEIDER, 2000). Entre as doenças mais importantes no Brasil, estão: o mosaico amarelo do pimentão (*Pepper yellow mosaic virus* - PepYMV), a mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.), o talo oco ou podridão mole (*Pectobacterium* spp.), a mancha de cercospora (*Cercospora capsici*), o oídio (*Oidiopsis taurica*) e a antracnose (*Colletotrichum* spp.) (CARVALHO; BIANCHETTI, 2007).

A antracnose é a doença fúngica mais severa nos cultivos de pimenta (REIS et al., 2009). Ainda segundo o autor, a mesma está presente em todo o mundo, com maior representatividade nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente em cultivos conduzidos em campo aberto durante períodos quentes e úmidos (LOBO Jr. et al., 2001). É uma doença de etiologia complexa, causada por diferentes espécies de *Colletotrichum* (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies de *Colletotrichum* relatadas causando antracnose em *Capsicum*.

Países	Agente causal	Referências
Austrália	<i>C. acutatum</i> , <i>C. atramentarium</i> , <i>C. dematium</i> , <i>C. gloeosporioides</i> var. <i>minor</i> e <i>C. gloeosporioides</i> var. <i>gloeosporioides</i>	SIMMONDS, 1965
Brasil	<i>C. acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. coccodes</i> , <i>C. boninense</i> e <i>C. capsici</i>	TOZZE Jr., 2007
Coreia do Sul	<i>C. acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> e <i>C. coccodes</i>	OH et al., 1999
Estados Unidos	<i>C. acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. coccodes</i> e <i>C. capsici</i>	ROY et al., 1997
Índia	<i>C. acutatum</i> e <i>C. capsici</i>	SAXENA et al., 2014
Japão	<i>C. scovillei</i>	KANTO et al., 2014
Tailândia	<i>C. acutatum</i> e <i>Glomerella cingulata</i>	THAN et al., 2008
Vietnã	<i>C. acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. nigrum</i> e <i>C. capsici</i>	DON et al., 2007

FONTE: Compilação de vários autores.

Na Coréia do Sul, foram identificadas *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. coccodes*, em Taiwan, *C. capsici* (OH et al., 1999) e nos Estados Unidos *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. coccodes* e *C. capsici* (ROY et al., 1997). No Brasil foram identificadas as espécies *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. boninense* e *C. capsici* associadas à antracnose em pimentão, pimenta e jiló (TOZZE Jr., 2007; TOZZE Jr. et al., 2009). *C. acutatum* foi apontada como a espécie predominante, responsável por mais de 70% das ocorrências dessa doença em nosso país (TOZZE Jr., 2007).

Alguns relatos referentes à identificação filogenética de *Colletotrichum* afetando *C. chinense* no estado do Amazonas, podem ser observados nos trabalhos 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. Recentemente, Almeida (2015), identificou sete espécies de *Colletotrichum* associadas às lesões de antracnose em frutos de plantas de *Capsicum* (*C. scovillei*, *C. truncatum*, *C. brevisporum*, *C. siamense*, *C. fruticola*, *C. theobromicola* e *C. gloeosporioides*), a identificação foi realizada com base no sequenciamento e análise multilocus de regiões parciais dos genes ACT, CHS, GAPDH, HIS e GS.

Nos frutos infectados são observados os sintomas típicos da doença (Figura 1), que consistem em lesões escuras, circulares e deprimidas, que progridem tornando o centro cinza escuro a negro, com círculos concêntricos de diâmetro variável, em que são observados pontos negros correspondentes aos acérvulos do fungo, estruturas nas quais se forma uma massa rosácea a alaranjada constituída pelos esporos (GASPAROTTO et al., 2014).



Figura 1 – Sintoma típico de antracnose em frutos de pimenta-de-cheiro.

FONTE: O autor, 2014.

O ciclo da doença (Figura 2) inicia-se com o processo de disseminação, através da liberação dos conídios que ocorre necessariamente com a presença de um filme de água, devido os conídios serem envolvidos por uma massa mucilaginosa, aglutinando-os e inibindo a sua germinação (BAILEY; JEGGER, 1992). Os esporos produzidos na superfície do tecido do hospedeiro são disseminados principalmente por chuvas associadas com ventos, sendo, portanto, esses fatores primordiais para a disseminação dentro e entre culturas e para a iniciação do ciclo do patógeno. Restos culturais, sementes infectadas, frutos mumificados, hospedeiros alternativos infectados, auxiliam na sobrevivência do patógeno, implicando no aumento da exposição de plantas saudáveis à doença de um ano para outro (BAILEY et al., 1992; KUROSZAWA; PAVAN, 1997; MICHEREFF; BARROS, 2001; GASPAROTTO et al., 2014). A longa distância e em áreas livres da doença, sementes infectadas constituem-se na principal fonte de inóculo (KUROSZAWA; PAVAN, 1997; GASPAROTTO et al., 2014). A partir da disseminação, a doença se inicia de forma ativa pela germinação dos esporos e penetração da hifa. Em alguns patossistemas, a penetração da hifa se dá através de ferimentos causados por insetos ou injúria mecânica nos frutos, que pode ser causada tanto pelo manejo como por fatores climáticos, sendo indispensáveis para o desenvolvimento da doença (AGRIOS, 2005).

O controle químico utilizando fungicidas tem mostrado pouca eficiência no controle das doenças. Além disso, o incremento dos custos, a perda de eficiência de alguns produtos e os problemas ambientais advindos, indicam a necessidade da adoção de práticas mais sustentáveis de manejo (LOPES, 2002).

Estudos de caracterização são fundamentais para que se identifique corretamente e se conheça a amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de métodos de controle, seja químico, genético ou cultural, os quais tornam possível o manejo adequado da cultura (TOZZE Jr. et al., 2006).

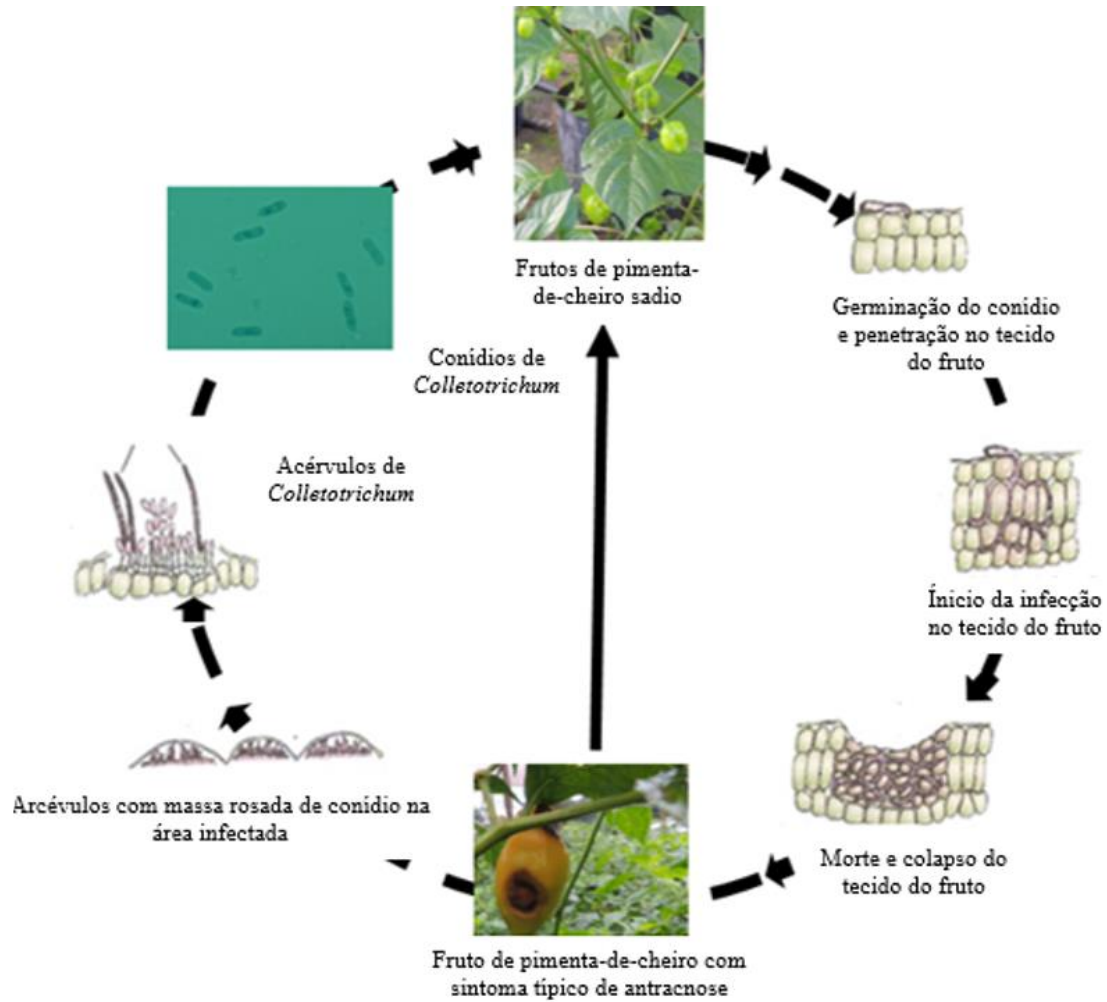


Figura 2 - Ciclo da antracnose causada por *Colletotrichum* spp.

FONTE: Adaptado de Agrios, 2005.

3.4 Caracterização do agente causal

O gênero *Colletotrichum* engloba os fungos imperfeitos pertencentes à divisão Deuteromycota da classe Coelomicetes, ordem Melaconiales e família Melanconiaceae (PAKDEEVARAPORN et al., 2005; THAN et al., 2008), associados a fase teleomórfica dos ascomicetos do gênero *Glomerella* (SUTTON, 1980).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* é tradicionalmente baseada em características morfológicas e morfométricas de conídios e apressórios, coloração, crescimento micelial das colônias, patogenicidade (SUTTON, 1992), presença de peritécios (SMITH; BLACK, 1990), além da sensibilidade à benomil (TOZZE Jr. et al., 2006). Essas características culturais, morfológicas e fisiológicas são utilizadas com a finalidade de diferenciar e/ ou caracterizar, *in vitro*, espécies morfológicamente próximas (SUTTON, 1992; THAUNG, 2008).

Trabalhos utilizando técnicas de caracterização morfológica podem ser encontrados com frequência na literatura. Goes; Kimati (1997), diferenciaram três grupos de *Colletotrichum* associados à queda prematura das frutas cítricas pelo tamanho dos conídios e apressórios. Andrade et al (2007), caracterizaram 29 culturas monospóricas de *Colletotrichum* isoladas de frutas e pecíolos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Os autores basearam seus estudos nas características morfológicas de conídios e apressórios, coloração e crescimento micelial das colônias. Os isolados apresentaram conídios cilíndricos e/ou obclavados e apressórios lobados ou fracamente lobados. Quando a coloração os autores verificaram que as colônias de todos os isolados de *Colletotrichum* obtidos de mamoeiro variaram de branca a cinza-escuro e concluíram que os isolados poderiam ser de *C. gloeosporioides*.

Analogamente, Tozze Jr. et al (2006), realizaram a caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. agente causal da antracnose em solanáceas, utilizando técnicas tradicionais de taxonomia. Os isolados foram caracterizados quanto ao tamanho e formato de conídios e apressórios, crescimento micelial sob diferentes temperaturas, utilização de diferentes fontes de carbono e sensibilidade a benomil. Os autores observaram que isolados provenientes de jiló possuíam características semelhantes a *C. acutatum*, enquanto que aqueles provenientes de pimentão e pimenta se enquadravam melhor nas características de *C. gloeosporioides*.

Utilizando o crescimento micelial das colônias como técnica de diferenciação de espécies, Talhinhos et al (2002), identificaram as espécies *C. gloeosporioides* oriundos de citros e *C. acutatum* obtidos de várias espécies de trevoceiro (*Lupinus* L.). Os autores

observaram que isolados de *C. gloeosporioides* tiveram crescimento mais rápido que isolados de *C. acutatum*.

Outro método que permite diferenciar espécies é a caracterização patogênica. Nascimento (2009), estudou o comportamento patogênico de 155 isolados de *Colletotrichum* obtidos de mamoeiro procedentes de várias áreas produtoras do Brasil e diferenciou os sintomas (típicos e atípicos) de antracnose correlacionando com as espécies envolvidas.

Muitos autores apontam dificuldades na identificação das espécies de *Colletotrichum* fundamentada exclusivamente em critérios clássicos de taxonomia (aspectos morfológicos, culturais, fisiológicos, bioquímicos e de patogenicidade) devido à grande variabilidade desse fungo em diferentes ambientes (SUTTON, 1992; LOPEZ, 2001; WEIR et al., 2012).

Atualmente, técnicas moleculares têm sido empregadas em conjunto na identificação e caracterização das espécies do gênero (TOZZE Jr. et al., 2004), devido à limitada presença de caracteres morfológicos distinguíveis entre as espécies, assim como a raridade da ocorrência da fase teleomórfica (HYDE et al., 2009).

3.5 Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum*

Outras técnicas têm sido utilizadas com vistas à caracterização e identificação das espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, com destaque ao emprego de técnicas moleculares (THAN et al., 2008; BARGUIL et al., 2009; NGUYEN et al., 2010; BENTES; COSTA NETO, 2011; RAMPERSAD, 2011; LIAO et al., 2012; ANDERSON et al., 2013;; KILAMBO et al., 2013; TORRES-CALZADA, 2013; SAXENA et al., 2014; SILVA et al., 2014; TOZZE Jr., et al., 2015), principalmente, o uso de marcadores moleculares, como: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (FREEMAN et al., 2001; ANDRADE et al., 2007), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou Ap-PCR (*Arbitrarily-primed PCR*) (AFANADOR-KAFURI et al., 2003; WHITELAW-WECKERT et al., 2007; ROJAS-MARTÍNEZ et al., 2008; NGUYEN et al., 2009; ANDERSON, et al., 2013); microsatélite (ABANG et al., 2006; NGUYEN et al., 2010) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (ANSARI et al., 2004; SILVA-MANN et al., 2005; HEILMANN et al., 2006; KIM et al., 2009). Estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares em *Colletotrichum* vêm sendo avaliados para diversas espécies, incluindo *C. graminicola* (VALÉRIO et al., 2005), *C. gossypii* (SILVA-MANN et al., 2005), *C. acutatum* (FREEMAN et al., 2001) e *C. gloeosporioides* (WEEDS et al., 2003), dentre outras.

O emprego conjunto de caracteres morfológicos, técnicas moleculares e teste de patogenicidade possibilitaram identificar as espécies *C. acutatum*, *C. capsici* e *C.*

gloeosporioides, como patógenos de frutos comerciais de pimenta na Tailândia (THAN et al., 2008). A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o uso de *primers* arbitrários pela técnica Ap-PCR oferecem muitas vantagens como rapidez, sequências com baixo número de erros, requer pequenas quantidades de DNA e é um método compatível com sequenciadores automáticos (FREEMAN et al., 1998; FREEMAN et al., 2001; TALHINHAS et al., 2005; MAYMON et al., 2006; BARGUIL et al., 2009; ANDERSON et al., 2013)

3.5.1 Reação de PCR /Ap-PCR ou RAPD

A reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida por Kary Mullis na década de 1980, representou um grande avanço na área da genômica de fitopatógenos. A técnica possibilitou a produção, *in vitro*, de múltiplas cópias de sequências específicas de DNA, sem a necessidade de se clonar estes segmentos (ALBERTS et al., 1994).

A técnica de PCR baseia-se na desnaturação do DNA genômico em altas temperaturas, permitindo que as fitas simples originadas sejam duplicadas. Para ocorrer a reação é necessário um par de oligonucleotídeos ou iniciadores (*primers*), os quais são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares a sequências que flanqueiam a região alvo. Estes *primers* irão hibridar às fitas simples do DNA em suas extremidades 3'OH. O estudo de Saiki e colaboradores em 1985, contribuiu consideravelmente para a expansão da técnica de PCR através da automatização do processo. Estes pesquisadores isolaram uma DNA polimerase (*Taq polimerase*) da bactéria *Thermus aquaticus* que vive em fontes térmicas, e cuja enzima polimeriza a 72 °C (WATSON et al., 1992).

Uma das limitações da técnica PCR, é a necessidade do conhecimento prévio da sequência que flanqueia o segmento a ser amplificado para que os nucleotídeos possam ser construídos (ALBERTS et al., 1994; WATSON et al., 1992). Para resolver este problema foi desenvolvido uma técnica denominada, mais comumente, de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

A técnica foi desenvolvida independentemente e simultaneamente por dois grupos de pesquisadores na década de 90 nos Estados Unidos, Williams et al (1990) e Welsh; McClelland (1990). Williams et al (1990), patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA polimórfico amplificado ao acaso. Neste trabalho clássico, este grupo descreveu a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento.

Por sua vez, Welsh; Mcclelland (1990), propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de Ap-PCR (*Arbitrarily primer-PCR*) uma vez que os "*primers*" possuem sequência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma. O experimento deste grupo foi essencialmente a geração de "*fingerprints*" (impressões digitais) genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução juntamente com "*primers*" um pouco mais longos. Com um atraso de alguns meses na publicação, mas de forma independente, um terceiro grupo também desenvolveu o mesmo método. O nome DAF ("*DNA Amplification Fingerprinting*") foi proposto por este grupo para detectar diferenças genéticas entre organismos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O RAPD ou Ap-PCR é uma técnica que promove perfis de amplificação DNA bastante sensíveis e eficientes, capazes de distinguir diferenças entre linhagens da mesma espécie (BERG-DOUGLAS et al., 1994) e baseia-se na amplificação de segmentos do DNA, utilizando o mesmo princípio da PCR (SAIKI et al., 1985). A principal diferença entre a PCR usual e o RAPD está na reação de amplificação que utiliza apenas um único *primer*, com uma sequência arbitrária de 10 a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este *primer* arbitrário for complementar a um sítio em uma das fitas, e complementar a um mesmo sítio (com orientação invertida) na outra de DNA. Os fragmentos amplificados apresentam de 4 a 10kb, dependendo do limite máximo de amplificação da DNA polimerase empregada (WILLIAMS et al., 1990).

Independentemente do nome utilizado e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR utilizando "*primers*" de sequência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômicas de indivíduos e populações. A tecnologia Ap-PCR trouxe uma verdadeira "democratização" da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD ou Ap-PCR na análise genética e no melhoramento de plantas tem tido uma difusão extremamente rápida. As aplicações incluem: a obtenção de "*fingerprints*" (impressões digitais) genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômicas e a localização de genes de interesse econômico (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Em estudos com *Colletotrichum* spp. a técnica Ap-PCR melhorou a velocidade e precisão de identificação e caracterização de isolados (TALHINHAS et al., 2002; PHOTITA et al., 2005). Nesses estudos a técnica vem sendo empregada principalmente com a finalidade de avaliar a variabilidade genética intra e interespecífica deste gênero (FREEMAN et al., 2001; TALHINHAS et al., 2005; BARGUIL et al., 2009); identificação e caracterização de populações resistentes e sensíveis a benomil (MAYMON et al., 2006); relações filogenéticas e patogenicidade de isolados (WHITELAW-WECKERT et al., 2007).

3.6 Caracterização patogênica de *Colletotrichum*

É importante estabelecer se uma espécie de *Colletotrichum* em particular é hospedeiro-específica, apresentando assim alta seletividade, ou possui uma grande gama de hospedeiros. Geralmente, fungos que são hospedeiro-específicos podem apresentar uma distribuição geográfica limitada, o que pode ter uma grande importância em relação à biossegurança. No entanto, se o patógeno tiver muitos hospedeiros, a espécie pode ser cosmopolita e possivelmente oportunista. Testes de patogenicidade fornecem dados úteis na classificação e futura delimitação das espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009). Estudos de patogenicidade cruzada mostraram que um isolado de *C. acutatum* isolado de morango foi patogênico quando inoculado em abacate, goiaba, mamão, manga e maracujá, porém não foi patogênico para frutos de banana. Foi verificado ainda que frutos de banana e de abacate expressaram sintomas típicos de antracnose apenas quando inoculados com um isolado de *C. musae* (PERES et al., 2002).

Than et al (2008), mostraram que as espécies *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides*, isoladas de pimentão (*Capsicum annuum*), são patogênicas para essa cultura, assim como isolados de *C. acutatum* obtidos de morango. Dessa forma, embora várias técnicas modernas contribuam na caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp., os testes de patogenicidade são essenciais para a comprovação da afinidade fisiológica dos isolados por possíveis hospedeiras (CAI et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos isolados e culturas monospóricas

Os isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos a partir de frutos de pimenta-de-cheiro com lesões típicas de antracnose, coletados nos municípios de Iranduba, Itacoatiara (Ramal do Engenho), Presidente Figueiredo e Manaquiri no estado do Amazonas. Para obtenção dos isolados, os frutos com sintomas e sinais da doença foram acondicionados em sacos de papel e transportados para o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias/ UFAM, onde foi realizado o isolamento indireto do fungo, segundo Alfenas et al (2007), em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

Para a obtenção de culturas monospóricas os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em temperatura de laboratório ($\pm 26^\circ\text{C}$) sob luz continua durante 15 dias para induzir a produção de conídios. Para cada isolado foi preparada uma suspensão de esporos adicionando 20 mL de água destilada na placa e com um pincel de cerdas macia foram feitos suaves movimentos sobre a colônia para a liberação dos conídios dos conidióforos na suspensão. Em seguida foram feitas diluições seriadas até 10^{-3} conídios.mL⁻¹ da concentração inicial, com o intuito de se garantir a uniformidade genética para fins de identificação. Uma alíquota de 100 µl de suspensão de inóculo de cada isolado foi depositada em placas de Petri contendo meio AA (Ágar-Água) e espalhada na superfície do meio com auxílio da alça de Drigalsky, seguida de incubação em temperatura de laboratório ($\pm 26^\circ\text{C}$) sob luz contínua. Esporos recém-germinados foram transferidos para meio BDA em placas de Petri. As culturas foram mantidas, por repicagens periódicas, em tubos com BDA inclinado (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) e em água estéril (CASTELLANI, 1939) e armazenadas para serem utilizadas quando necessário.

4.2 Caracterização cultural e morfológica de colônias

Foram selecionados 40 isolados para serem avaliados quanto ao índice de crescimento micelial (ICM), cor e topografia de colônia e morfometria de conídios e apressórios (Tabela 2).

Para determinação do ICM e da coloração e topografia das colônias, os isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp., foram repicados para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) acrescido do antibiótico cloranfenicol

(250 mg.L⁻¹) e incubadas em ambiente de laboratório com temperatura de ± 26 °C. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 40 tratamentos (isolados) e quatro repetições (placas), cada placa constituiu uma unidade experimental. A avaliação do ICM foi realizada diariamente por meio da mensuração do diâmetro ortogonal da colônia, até que um dos tratamentos atingisse a borda da placa. O ICM foi calculado como descrito por Salgado et al (2003).

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_N}{N_N},$$

ICM = índice de crescimento micelial;

C= crescimento micelial da colônia na primeira, segunda e última avaliação e

N= número de dias necessários para o crescimento micelial atingir a borda da placa.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Anova) e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa Assistat 7.7 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Encerrada as coletas de dados do ICM foi realizada a análise quanto à coloração, utilizando para isso o sistema de notação de cores de Munsell Color Company (1975). Concomitante à observação da coloração foi avaliada a topografia micelial das colônias de forma visual, segundo Pereira (2009), onde: micélio aéreo reduzido (colônias com crescimento micelial rente ao meio de cultura); micélio aéreo moderadamente abundante (colônias com crescimento micelial de até 2 mm de altura) e micélio aéreo abundante (colônias com crescimento micelial aéreo acima de 2 mm de altura).

4.3 Morfometria de conídios e apressórios

A caracterização morfométrica de conídios e apressórios foram baseadas no tamanho e no formato de 50 conídios e 50 apressórios de cada isolado, escolhidos aleatoriamente, em colônias com 15 e 30 dias de crescimento, respectivamente. Para a caracterização morfológica e morfométrica dos conídios, foi preparado uma suspensão na concentração de 10⁵ conídios.mL⁻¹ para cada isolado e confeccionadas lâminas de microscopia semipermanentes para observação em microscópio óptico Zeiss, sob objetiva de 40 vezes.

Para a caracterização morfométrica dos apressórios, três gotas de 20 µL de suspensão de esporos na concentração de 10⁵ conídios.mL⁻¹, foram depositadas sobre uma lâmina de microscopia esterilizada, previamente forrada com papel celofane transparente, com auxílio de outra lâmina de microscopia esterilizada as gotas de suspensão foram suavemente

espalhadas. As lâminas foram acondicionadas em placas de Petri forrada com papel de filtro esterilizado, umedecido com água destilada e autoclavada (ADA). Após 24 horas, a germinação foi interrompida com solução de lactofenol com azul de algodão e os apressórios foram observados em microscópio óptico Zeiss, sob objetiva de 40 vezes. Foram mensurados o comprimento e a largura de 50 conídios e 50 apressórios de cada isolado e avaliados seus formatos.

As medidas de comprimento e largura de conídios e apressórios, foram obtidas através de imagens capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico Zeiss, utilizando o software ZEN (Zeiss®). Os valores de ICM e os valores de tamanhos e formatos de conídios e apressórios observados foram comparados com as descrições das espécies de *Colletotrichum*, propostas por Sutton (1992).

4.4 Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp.

Para a genotipagem foram selecionados 34 isolados de *Colletotrichum* spp., sendo sete do município de Itacoatiara; onze de Iranduba; sete de Presidente Figueiredo e nove de Manaquiri (Tabela 3).

Para obtenção do DNA genômico, culturas monospóricas dos isolados foram cultivados em erlenmayer de 250 mL contendo meio de cultura BD (Batata-Dextrose), sob agitação contínua a 120 rpm durante cinco dias a ± 26 °C. O micélio produzido foi coletado por filtração a vácuo em filtro Milipore® com membrana de 0,45 μ m de porosidade, em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), e em seguida, foi armazenado a temperatura -4 °C até o momento da extração.

Para a extração do DNA foi utilizado o método fenol/clorofórmio conforme descrito por Raeder; Broda (1985), com modificações descritas por Bentes; Costa Neto (2011). A avaliação da concentração e qualidade do DNA foi determinada utilizando espectrofotômetro (ND – 1000, Nanodrop) e em gel de agarose 0,8% determinado por espectroscopia ultravioleta (UV) usando marcador de 50 pb (New England Biolabs).

Para análise de PCR com oligonucleotídeos arbitrários (Ap-PCR), foram utilizados três oligonucleotídeos derivados de marcadores microssatélites: GAGA₄ (5'GACAGACAGACAGACA3'), GTG₅ (5'GTGGTGGTGGTGGTG3') e M₁₃ (5'GAGGGTGGCGGTTCT3') (Biosearch Biotechnologies) (Tabela 4). As PCRs foram realizadas em volume total de 25 μ L, utilizando o Kit pureTaq™ Ready-To-Go PCR Beads de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biosystem, nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C durante 5 minutos seguido por 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 60 °C para o (GTG)₅ e M13 e 30s a 48 °C para (GACA)₄, e 90s a 72 °C, seguido por uma extensão final de 5min a 72 °C e 15min a 4 °C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese num gel de agarose a 1,8%, colorido com 2 µl de brometo de etídio, usando um marcador de 50 pb (New England Biolabs).

Os dados obtidos a partir da amplificação com os marcadores foi construída uma matriz binária com base na presença ou ausência de bandas. A frequência de bandas foi submetida à análise pelo Programa Genes (CRUZ, 2006). A similaridade genética entre os isolados foi estimada usando o coeficiente de NEI & LI. A matriz de similaridade foi analisada pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average*) (SNEATH; SOKAL, 1973). O programa Genes foi empregado para gerar a matriz dos valores cofenéticos e testar a adequação da análise de agrupamento aos dados originais.

4.5 Patogenicidade cruzada de isolados de *Colletotrichum* spp.

Para o teste de patogenicidade cruzada 20 isolados de *Colletotrichum* spp., anteriormente caracterizados, foram selecionados (Tabela 5) e repicados para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) acrescido do antibiótico cloranfenicol (250 mg.L⁻¹) e incubadas a ± 26 °C sob luz continua por 10 dias.

Frutos de pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense*), pimenta murupi (*Capsicum chinense*), pimentão (*Capsicum annum*) e pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var *pendulum*) sadios na fase inicial de maturação (início da mudança de coloração do fruto), foram adquiridos junto a produtores locais. Os frutos foram lavados em água corrente e desinfestados em álcool 70% durante 5 minutos e em hipoclorito de sódio 2% durante 2 minutos, seguido de três lavagens em água destilada esterilizada por 1 minuto. Para a inoculação os frutos foram depositados em recipientes descartáveis de plástico transparente, medindo 24x16x4 cm, forrados com papel de filtro umedecido. A inoculação foi feita na parte central do pericarpo de cada fruto, sem ferimento, pela deposição de uma gota de 20 µL de suspensão de inóculo, na concentração de 10⁵ conídios.mL⁻¹, de cada isolado, obtida a partir de colônias com 10 dias de idade, utilizando uma pipeta automática. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 20 x 4 (vinte isolados x quatro tipos de *Capsicum*), com cinco repetições. A testemunha constou de 5 frutos de cada espécie não inoculados com patógeno e tratados com água destilada e esterilizada.

A avaliação da patogenicidade cruzada foi realizada em dias alternados entre 2º e o 10º dia após a inoculação (DAI) de acordo com a escala de descrição de sintomas proposta por Mahasuk et al (2009a), com modificações, onde: 1- fruto não lesionado; 3 – fruto apresentando 1% a 2% da superfície com lesão necrótica ou lesão aquosa em torno do local da infecção; 4 – fruto apresentando 2% a 5% da superfície com lesão necrótica e presença de acérvulo, ou até 5 % com lesão aquosa; 6 – fruto apresentando 5% a 15 % da superfície com lesão necrótica e presença de acérvulo, ou até 15 % com lesão aquosa; 8 – fruto apresentando 15% a 25 % da superfície com lesão necrótica e presença de acérvulo; 10 – fruto apresentando mais de 25 % da superfície com lesão necrótica e presença de acérvulo.

Com base nesta escala de notas e com as leituras dos sintomas efetuadas 10 dias após a inoculação foi calculado o Índice de Infecção dos isolados (II), segundo MacKinney (1923), com modificações.

$$II = \frac{(f.v)}{(n.x)} ,$$

II = índice de infecção;

f= frequência de frutos com determinada nota de severidade;

v= nota da escala de severidade;

n= nº total de frutos e

x= grau máximo de infecção.

Os valores obtidos para o II foram utilizados para classificar os isolados de *Colletotrichum* spp. nas seguintes classes de infecção: Baixa (BI) $0,0 < II \leq 0,05$; Média (MI) $0,05 < II \leq 0,15$; Alta (AI) $0,15 < II \leq 0,25$; Muito Alta (MAI) $II > 0,25$.

O diâmetro médio da lesão nos frutos foi avaliado, por meio da medição diária do comprimento e largura até o décimo dia após a inoculação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa ASSISTAT 7.7 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Tabela 2 – Isolados selecionados para caracterização morfo cultural.

Isolados	Procedências	Coordenadas	Isolados	Procedências	Coordenadas
PFPD01	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD01	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD03	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD02	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD04	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD07	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD05	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD08	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD08	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD09	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD10	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD10	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD11	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD11	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD16	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	REPD12	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD18	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	REPD14	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD22	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	REPD15	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD03	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD03	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD04	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD06	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD05	Irاندوبا	S03°12'44" W60°10'0,2"	MQPD07	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD06	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD08	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD08	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD09	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD09	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD10	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD10	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"	MQPD11	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD18	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD14	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD22	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD19	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD30	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD25	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"

FONTE: O autor, 2014.

Tabela 3 – Isolados selecionados para a caracterização molecular.

Isolados	Procedências	Coordenadas	Isolados	Procedências	Coordenadas
PFPD03	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD30	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
PFPD04	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD01	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD08	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD02	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD10	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	REPD07	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD16	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	REPD09	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD18	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	REPD10	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
PFPD22	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	REPD11	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD03	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD12	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD04	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD03	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD05	Irاندوبا	S03°12'44" W60°10'0,2"	MQPD06	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD06	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD08	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD08	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD09	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD09	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD10	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD10	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"	MQPD11	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD18	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD14	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD22	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD19	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
IRPD28	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	MQPD25	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"

FONTE: O autor, 2016.

Tabela 04 – *Primers* arbitrários utilizados na análise da diversidade genética.

Primers	Sequência (5' – 3')	Marcador molecular	Referências
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	ISSR	Lieckfeldt et al., 1993
(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA	ISSR	Meyer; Mitchel, 1995
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	ISSR	Lieckfeldt et al., 1993

FONTE: Compilação de vários autores.

Tabela 5 – Isolados selecionados para a caracterização patogênica.

Isolados	Procedências	Coordenadas
PFPD03	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"
PFPD04	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"
PFPD08	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"
PFPD10	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"
PFPD22	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"
IRPD03	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
IRPD04	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
IRPD06	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
IRPD10	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
IRPD18	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
REPD01	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD02	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD07	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD10	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD11	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
MQPD03	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
MQPD08	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
MQPD09	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
MQPD14	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
MQPD19	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"

FONTE: O autor, 2016.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização Morfocultural

5.1.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Foram obtidos 107 isolados de *Colletotrichum* spp., de pimenta-de-cheiro, sendo 38 isolados oriundos do município de Itacoatiara, 36 isolados de Iranduba, 18 isolados de Manaquiri e 15 isolados de Presidente Figueiredo (Tabela 6).

Por questões práticas, os isolados foram identificados pelas iniciais do município de origem e do hospedeiro dos quais cada isolado foi obtido. Foi adicionado um número a identificação, visando facilitar a diferenciação entre os isolados. Os isolados procedentes do município de Itacoatiara receberam à nomenclatura REPD, por terem sido coletados na Comunidade Ramal do Engenho. A nomenclatura IRPD foi adotada para os isolados procedentes do município de Iranduba, PFPD para os isolados oriundos do município de Presidente Figueiredo e MQPD para os isolados coletados no município de Manaquiri.

5.1.2 Caracterização de colônias, conídios e apressórios

As características do índice de crescimento micelial (ICM), coloração e topografia das colônias dos 40 isolados avaliados podem ser observadas na tabela 7.

A avaliação do ICM quando aplicado o teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância, evidenciou a formação de nove grupos, que diferiram estatisticamente entre si.

O grupo I foi representado por um isolado de Manaquiri (MQPD03), que apresentou o maior ICM, 19,29 mm. O grupo II foi formado por quatro isolados (IRPD03, IRPD22, PFPD16, REPD01), com média de ICM de 18,75 mm. No grupo III foram inseridos seis isolados (PFPD04, PFPD11, PFPD18, IRPD06, MQPD08 e REPD11), apresentaram média de ICM de 18,03 mm. O grupo IV foi representado por cinco isolados (MQPD07, MQPD11, PFPD01, PFPD08, REPD07), com média de ICM de 17,44 mm. No grupo V foi formado por 17 isolados (IRPD04, IRPD05, IRPD08, IRPD09, IRPD10, IRPD18, MQPD09, MQPD10, MQPD19, MQPD25, PFPD03, PFPD05, PFPD10, REPD02, REPD09, REPD10 e REPD15), apresentando média de ICM de 16,15 mm.

O grupo VI foi formado por três isolados (MQPD14, PFPD22 e REPD14), apresentaram ICM de 14,66 mm. Um isolado de Iranduba (IRPD30) apresentou características distintas dos demais e formou o grupo VII, com ICM de 13,73 mm. Dois isolados de Itacoatiara (REPD08 e REPD12) formaram o grupo VIII e apresentaram o mesmo ICM, 13,03 mm. O grupo IX apresentou o menor ICM, com 12,77 mm e foi representado por um isolado

de Manaquiri (MQPD06), representando desta forma a alta variabilidade dos isolados em relação ao índice de crescimento micelial.

A cor das colônias variou entre branca a cinza escura. A cor do reverso da colônia variou de branca, laranja, marrom escura, preta e cinza (Figura 3). Com base na coloração das colônias os isolados foram separados em quatro classes (A, B, C e D).

A classe de coloração A foi formada por 15 isolados (IRPD03, IRPD22, MQPD03, MQPD07, MQPD10, MQPD14, MQPD19, PFPD01, PFPD03, PFPD08, PFPD18, PFPD22, REPD02, REPD09 e REPD11), correspondendo a 37,5% dos isolados avaliados, os quais apresentaram coloração da colônia cinza com reverso variando entre branca, cinza e laranja.

Treze isolados (IRPD04, IRPD06, IRPD08, IRPD09, IRPD10, MQPD08, MQPD09, MQPD11, PFPD04, PFPD10, PFPD16, REPD01 e REPD07), correspondendo a 32,5%, constituíram a classe B de coloração. Os isolados dessa classe apresentaram cor da colônia cinza clara com reverso variando entre cinza, laranja, marrom escura e preta.

Os isolados IRPD05, IRPD18, MQPD06, MQPD25, PFPD05, PFPD11 e REPD15, apresentaram cor da colônia cinza escura, com reverso variando entre laranja, marrom escura, preta e cinza, sendo incluídos na classe de coloração C. Na classe D foram inseridos os isolados IRPD30, REPD08, REPD10, REPD12 e REPD14, os quais apresentaram cor da colônia branca com reverso variando entre branca e laranja.

Em relação a topografia das colônias, três padrões distintos de micélio foram observados: micélio aéreo reduzido, micélio aéreo moderadamente abundante e micélio aéreo abundante. A maioria dos isolados (77,5%) apresentou micélio aéreo moderadamente abundante, micélio aéreo abundante ocorreu em 12,5% dos isolados e micélio aéreo reduzido em 10%.

Os isolados de Iranduba apresentaram micélio aéreo moderadamente abundante (IRPD03, IRPD04, IRPD06, IRPD08, IRPD09, IRPD10 e IRPD22), aéreo abundante (IRPD05 e IRPD18) e aéreo reduzido (IRPD30).

A maioria dos isolados de Manaquiri apresentaram micélio aéreo moderadamente abundante (MQPD03, MQPD07, MQPD08, MQPD09, MQPD10, MQPD11, MQPD14, MQPD19 e MQPD25) e apenas um isolado apresentou micélio aéreo abundante (MQPD06). A mesma frequência de micélio aéreo moderadamente abundante (PFPD01, PFPD03, PFPD04, PFPD05, PFPD08, PFPD10, PFPD11, PFPD16 e PFPD22) e aéreo abundante (PFPD18) observados para os isolados de Manaquiri foi observado nos isolados de Presidente Figueiredo. Nos isolados de Itacoatiara foi observado micélio aéreo moderadamente

abundante (REPD01, REPD02, REPD07, REPD09, REPD11 e REPD15), aéreo abundante (REPD10) e aéreo reduzido (REPD08, REPD12 e REPD14).

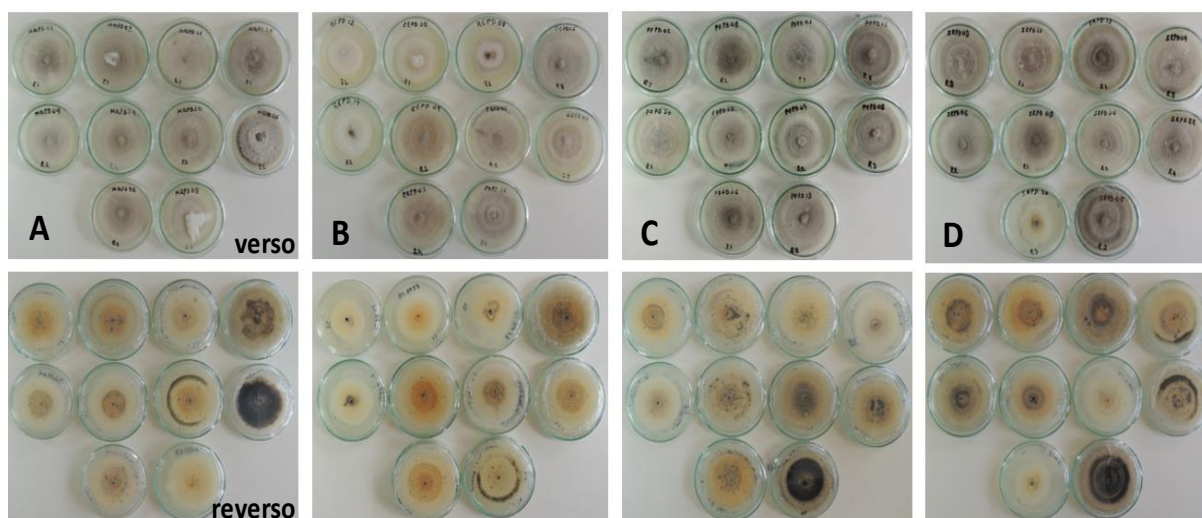


Figura 3 – Aspectos das colônias (verso e reverso) de *Colletotrichum* spp. Isolados de Manaquiri (A), Itacoatiara (B), Presidente Figueiredo (C) e Iranduba (D).

FONTE: O autor, 2014.

Não houve relação entre a procedência dos isolados e as características das colônias avaliadas (ICM, coloração e topografia), havendo variação nos caracteres entre indivíduos coletados na mesma e diferentes localidades.

Todos os isolados apresentaram conídios de formato oblongo e/ou cilíndrico. Houve diferença significativa entre os isolados ao nível de 5% de significância quando aplicado o teste Scott-Knott às médias das dimensões dos conídios (Tabela 8).

Em relação ao comprimento dos conídios o teste estatístico distinguiu sete grupos. O primeiro grupo foi formado por quatro isolados (IRPD04, IRPD10, MQPDO6 e REPD08), estes isolados apresentaram as maiores médias de comprimento, variando de 14,9 a 15,4 μm . O segundo agrupamento foi formado por seis isolados (PFPD05, PFPD08, IRPD06, IRPD30, REPD09 e REPD14), com médias de comprimento na faixa de 14,2 a 14,5 μm .

No terceiro grupo foram inseridos treze isolados (IRPD08, IRPD18, MQPD11, MQPD14, MQPD19, MQPD25, PFPD01, PFPD10, PFPD16, PFPD22, REPD02, REPD10 e REPD12), apresentaram médias de comprimento variando entre 13,6 a 14,1 μm . O quarto grupo foi formado por oito isolados (IRPD09, IRPD22, MQPD08, MQPD09, PFPD04, REPD01, REPD07 e REPD15), com médias de comprimento variando de 13,0 a 13,5 μm .

O quinto agrupamento foi formado por sete isolados (MQPD03, MQPD07, MQPD10, IRPD03, IRPD05, PFPD18 e REPD11), estes isolados apresentaram médias de

comprimento na faixa de 11,8 a 12,9 μm . Os isolados PFPD03 e PFPD11 apresentaram médias de comprimento de conídio estatisticamente inferior aos demais grupos e formaram o sexto e o sétimo agrupamento, com média de comprimento de 10,9 e 9,0 μm , respectivamente.

Quanto a largura dos conídios foi observada alta variabilidade e a formação de nove grupos. Um isolado de Itacoatiara (REPD14) obteve média de largura, estatisticamente superior aos demais, de 5,5 μm e formou o grupo I. O agrupamento II foi formado por dois isolados (IRPD30 e REPD08), com médias de largura variando de 5,0 a 5,1 μm .

O grupo III foi formado pelo isolado MQPD06 de Manaquiri com média de largura de 4,7 μm . O agrupamento IV foi formado por dez isolados (IRPD04, IRPD08, IRPD10, IRPD18, MQPD09, MQPD19, PFPD04, PFPD22, REPD12 e REPD15), os quais apresentaram médias de largura na faixa de 3,8 a 3,9 μm . O grupo V reuniu quinze isolados (IRPD06, MQPD08, MQPD14, MQPD25, PFPD01, PFPD05, PFPD08, PFPD10, PFPD16, REPD01, REPD02, REPD07, REPD09, REPD10 e REPD11), os quais apresentaram média de largura variando de 3,6 a 3,7 μm .

O grupo VI foi formado por cinco isolados ((MQPD03, MQPD10, MQPD11, IRPD05 e IRPD22), os isolados deste grupo apresentaram média de largura de 3,4 μm . No agrupamento VII foram inseridos quatro isolados (PFPD03, MQPD07, IRPD03 e IRPD09), os quais apresentaram média de largura variando de 3,2 a 3,3 μm . O grupo VIII foi formado por um isolado de Presidente Figueiredo (PFPD18) com média de largura de 3,1 μm . Um isolado procedente de Presidente Figueiredo (PFPD11) apresentou o menor valor de média da largura (2,9 μm) e formou o grupo IX.

O teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância, possibilitou o agrupamento dos isolados em cinco grupos quanto a relação comprimento/largura. O grupo I foi formado por 50% dos isolados (REPD02, REPD09, REPD10, IRPD03, IRPD04, IRPD06, IRPD09, IRPD10, IRPD22, IRPD30, PFPD01, PFPD05, PFPD08, PFPD10, PFPD16, PFPD18, MQPD07, MQPD11, MQPD14 e MQPD25), os quais apresentaram os maiores valores de média, variando de 3,7 a 4,0 μm .

O grupo II foi formado por 35% dos isolados (IRPD05, IRPD08, IRPD18, MQPD03, MQPD08, MQPD09, MQPD10, MQPD19, REPD01, REPD07, REPD12, REPD15, PFPD04 e PFPD22), estes apresentaram média de largura na faixa de 3,5 a 3,7 μm . O agrupamento III foi formado por dois isolados, sendo um de Presidente Figueiredo (PFPD03) e outro de Itacoatiara (REPD11), os quais apresentaram média de largura de 3,4 μm .

No grupo IV foram inseridos três isolados, sendo um de Manaquiri (MQPD06), um de Presidente Figueiredo (PFPD11) e um de Itacoatiara (REPD08), com média de largura variando de 3,1 a 3,2 μm . O isolado REPD14 procedente de Itacoatiara formou o grupo V e apresentou o menor valor de média para a largura (2,6 μm).

Houve alta variabilidade na morfometria dos apressórios (Tabela 9). Os isolados apresentaram três tipos de formato de apressórios: arredondado, levemente lobado e lobado (Figura 4).

O formato arredondado foi observado em 34 dos 40 isolados estudados, correspondendo a 85% do total. Este formato foi observado em dez isolados procedentes de Iranduba (IRPD03, IRPD04, IRPD05, IRPD06, IRPD08, IRPD09, IRPD10, IRPD18, IRPD22 e IRPD30), sete isolados de Manaquiri (MQPD03, MQPD08, MQPD09, MQPD10, MQPD14, MQPD19 e MQPD25), oito isolados de Presidente Figueiredo (PFPD03, PFPD05, PFPD08, PFPD10, PFPD11, PFPD16, PFPD18 e PFPD22) e nove isolados de Itacoatiara (REPD01, REPD02, REPD07, REPD08, REPD09, REPD10, REPD11, REPD14 e REPD15), com frequência variando de 64 a 100%; 92 a 100%; 94 a 100% e 34 a 100%, respectivamente.

O formato levemente lobado foi observado em 50% dos isolados. Formaram este tipo de apressório: cinco isolados procedentes de Manaquiri (MQPD06, MQPD08, MQPD09, MQPD10 e MQPD14), seis isolados de Iranduba (IRPD05, IRPD06, IRPD09, IRPD10, IRPD22 e IRPD30), cinco isolados de Itacoatiara (REPD02, REPD07, REPD08, REPD11 e REPD14) e quatro de Presidente Figueiredo (PFPD05, PFPD08, PFPD10 e PFPD18), com frequência variando de 2 a 70%; 2 a 34%; 2 a 64% e 2 a 6%, respectivamente.

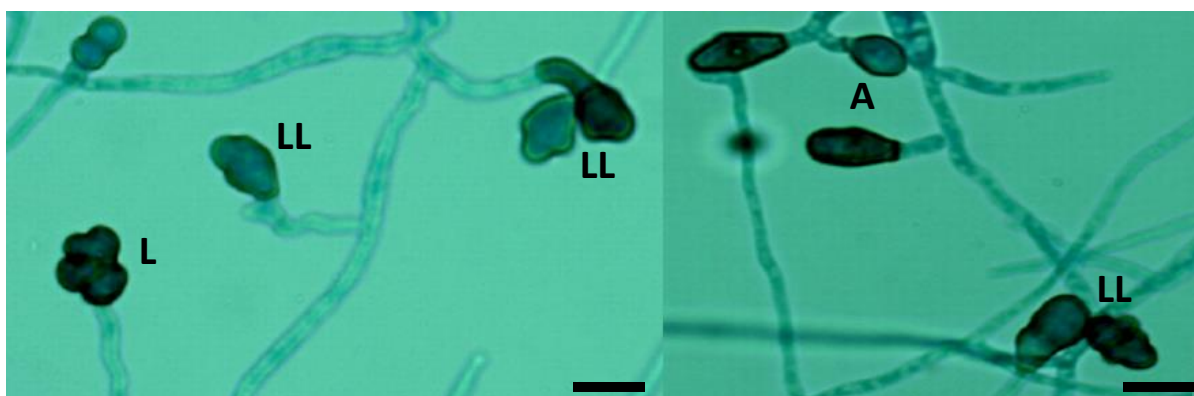


Figura 4 - Formato de apressórios de *Colletotrichum* spp. As letras maiúsculas indicam o formato dos apressórios. A (arredondado), LL (levemente lobado) e L (lobado). Barra: 15 μm .

FONTE: O autor, 2015.

O formato lobado foi observado em seis isolados, sendo dois de Iranduba (IRPD05 e IRPD09), com frequência de 2%; três de Itacoatiara (REPD02, REPD08 e REPD14), com frequência variando de 2 a 18% e um isolado de Manaquiri (MQPD03), o qual apresentou frequência de 30%.

Em relação às dimensões de comprimento, largura e relação comprimento/largura, foi observado alta variabilidade, com diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de significância pelo teste Scott-Knott.

O teste estatístico a formação de sete grupos em relação ao comprimento dos apressórios. O isolado de Manaquiri (MQPD06), com média de 14,6 μm e o isolado de Itacoatiara (REPD14), com média de 12,0, formaram os grupos I e II, respectivamente. O grupo III foi formado por dois isolados (IRPD10 e PFPD05), com média de comprimento de 10,6 μm . No grupo IV foram inseridos cinco isolados (REPD08, REPD09, REPD15, PFPD18 e IRPD06), com média de comprimento de 9,7 μm . O grupo V foi formado por nove isolados (MQPD08, MQPD09, MQPD19, IRPD10, IRPD22, PFPD08, PFPD16, REPD02 e REPD11), com média variando de 8,6 μm .

O grupo VI foi formado por seis isolados (REPD07, PFPD11, IRPD03, IRPD30, MQPD03 e MQPD14), com média de comprimento de 8,2 μm . O grupo VII formou o maior agrupamento e apresentou os menores valores de médias de comprimento. Este grupo foi formado por onze isolados (IRPD04, IRPD05, IRPD08, IRPD18, PFPD03, PFPD10, PFPD22, MQPD10, MQPD25, REPD01 e REPD10), com média de comprimento de 7,6 μm .

Quanto a largura dos apressórios, os isolados formaram sete grupos. O grupo V formou o maior agrupamento, com doze isolados (MQPD03, MQPD08, MQPD09, MQPD14, MQPD19, MQPD25, PFPD08, PFPD11, PFPD16, PFPD18, IRPD22 e REPD15), com média de largura de 6,5 μm . O grupo VIII foi formado por seis isolados e apresentaram as menores médias de largura. Foram inseridos neste grupo três isolados de Presidente Figueiredo (PFPD03, PFPD10 e PFPD22), dois de Itacoatiara (REPD01 e REPD07) e um isolado de Iranduba (IRPD05), com média de largura de 5,5 μm .

O isolado MQPD06 procedente de Manaquiri apresentou a maior média de largura (8,8 μm) e formou o grupo I. Os demais isolados formaram o grupo II (REPD02, média de 8,0 μm); grupo III (PFPD05, REPD08 e REPD14, com média variando de 7,5 a 7,8 μm); grupo IV (IRPD06, IRPD09 e REPD09, com média na faixa de 6,9 a 7,2 μm) e o grupo VI (IRPD03, IRPD04, IRPD08, IRPD10, IRPD18, IRPD30, MQPD10, REPD10 e REPD11, com média variando de 5,8 a 6,1 μm).

A relação comprimento/largura, da mesma forma que as outras características, apresentou alta variabilidade. Os isolados formaram seis grupos. O grupo I foi formado pelo isolado MQPD06, que apresentou a maior média de relação comprimento/largura (1,7 μm). O isolado REPD14 formou o grupo II com 1,5 μm de relação comprimento/largura. O grupo III foi formado pelos isolados IRPD06, IRPD09, IRPD10, IRPD22, MQPD09, PFPD05, PFPD08, PFPD10, PFPD18, REPD01, REPD07, REPD11 e REPD15, os quais apresentaram média de relação comprimento/largura de 1,4 μm . Treze isolados formaram o grupo IV (IRPD03, IRPD05, IRPD08, IRPD30, MQPD08, MQPD14, MQPD19, PFPD03, PFPD16, PFPD22, REPD08, REPD09 e REPD10) e apresentaram média de 1,3 μm . Os isolados IRPD04, IRPD18, MQPD03, MQPD10 e PFPD11 apresentaram média de 1,2 μm e foram inseridos no grupo V. Dois isolados, sendo um de Itacoatiara (REPD02) e outro de Manaquiri (MQPD25), formaram o grupo VI, representantes desse grupo apresentaram a menor média, 1,1 μm .

Os isolados MQPD07, MQPD11, PFPD01, PFPD04 e REPD12 não produzirão apressórios.

Tabela 6 – Identificação e procedências dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de pimenta-de-cheiro.

(Continua)

Nomenclaturas	Procedências	Coordenadas	Nomenclaturas	Procedências	Coordenadas
PFPD01	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD17	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD02	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD18	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD03	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD20	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD04	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD21	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD05	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD22	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD08	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD23	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD10	Pres. Figueiredo	S01°55'56" W60°01'59"	IRPD24	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD11	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD25	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD13	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD26	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD14	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD27	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
PFPD15	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD28	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
PFPD16	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD29	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
PFPD18	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD30	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
PFPD19	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD31	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
PFPD22	Pres. Figueiredo	S01°54'56" W60°01'46"	IRPD32	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
IRPD01	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	IRPD33	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"
IRPD02	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	IRPD35	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
IRPD03	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	IRPD36	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
IRPD04	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	IRPD37	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
IRPD05	Irاندوبا	S03°12'44" W60°10'0,2"	IRPD38	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"
IRPD06	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD01	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD07	Irاندوبا	S03°12'44" W60°10'0,2"	REPD02	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD08	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD04	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD09	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD05	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD10	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD06	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD11	Irاندوبا	S03°13'19" W60°10'03"	REPD07	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD12	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD08	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD13	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD09	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD14	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD10	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD15	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD11	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
IRPD16	Irاندوبا	S03°12'46" W60°10'1,7"	REPD12	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"

Tabela 6 – Identificação e procedências dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de pimenta-de-cheiro.

(Conclusão)

Nomenclaturas	Procedências	Coordenadas	Nomenclaturas	Procedências	Coordenadas
REPD13	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	REPD50	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD14	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	REPD51	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD15	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	REPD52	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD16	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	REPD53	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD17	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	REPD54	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD18	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	REPD55	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"
REPD19	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD01	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD20	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD03	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD21	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD05	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD22	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD06	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD23	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD07	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD24	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD08	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD27	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD09	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD28	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD10	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD32	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD11	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD33	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD12	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD34	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD14	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD35	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD19	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD36	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD20	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD37	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD21	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD38	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD22	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD39	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD23	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD40	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD24	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD42	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"	MQPD25	Manaquiri	S06°25'24" W60°29'19"
REPD43	Itacoatiara	S06°14'17" W60°10'10"			

FONTE: O autor, 2014.

Tabela 7 - Variabilidade cultural e índice de crescimento micelial dos isolados.

(Continua)

Isolados	Cor da colônia	Borda	Cor do reverso da	Topografia	¹ ICM (mm)	Classes de coloração
IRPD03	Cinza	branca e/ ou cinza clara	laranja	aéreo moderadamente abundante	18,37 ab	A
IRPD04	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	16,55 abcde	B
IRPD05	cinza escura	branca	preta	aéreo abundante	16,98 abcde	C
IRPD06	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,69 abc	B
IRPD08	cinza clara	branca e/ ou cinza clara	laranja	aéreo moderadamente abundante	15,78 abcde	B
IRPD09	cinza clara	branca e/ ou cinza	laranja	aéreo moderadamente abundante	16,91 abcde	B
IRPD10	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	15,01 abcde	B
IRPD18	cinza escura	branca	laranja	aéreo abundante	15,85 abcde	C
IRPD22	cinza	branca	cinza	aéreo moderadamente abundante	19,07 ab	A
IRPD30	branca	branca e/ ou cinza escura	branca	aéreo reduzido	13,73 cde	D
MQPD03	cinza	branca e/ ou cinza clara	laranja	aéreo moderadamente abundante	19,29 a	A
MQPD06	cinza escura	branca	preta	aéreo abundante	12,77 e	C
MQPD07	cinza	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,43 abcd	A
MQPD08	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,98 abc	B
MQPD09	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	15,42 abcde	B
MQPD10	cinza	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	16,98 abcde	A
MQPD11	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,53 abcd	B
MQPD14	cinza	branca e/ ou amarela	laranja	aéreo moderadamente abundante	14,66 bcde	A
MQPD19	cinza	branca e/ ou cinza clara	laranja	aéreo moderadamente abundante	15,67 abcde	A
MQPD25	cinza escura	branca	cinza escura	aéreo moderadamente abundante	15,92 abcde	C

²C.V.% 9,75

Tabela 7 - Variabilidade cultural e índice de crescimento micelial dos isolados.

(Conclusão)

Isolados	Cor da colônia	Borda	Cor do reverso da	Topografia	¹ ICM (mm)	Classes de coloração
PFPD01	cinza	cinza escura e/ ou branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,43 abcd	A
PFPD03	cinza	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	16,38 abcde	A
PFPD04	cinza clara	branca	cinza	aéreo moderadamente abundante	18,22 abc	B
PFPD05	cinza escura	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,23 abcde	C
PFPD08	cinza	branca e/ ou cinza	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,47 abcd	A
PFPD10	cinza clara	branca	cinza clara	aéreo moderadamente abundante	14,95 abcde	B
PFPD11	cinza escura	branca	cinza clara	aéreo moderadamente abundante	18,20 abc	C
PFPD16	cinza clara	branca	preta	aéreo moderadamente abundante	18,53 ab	B
PFPD18	cinza	branca e/ ou cinza	laranja	aéreo abundante	18,23 abc	A
PFPD22	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	14,68 bcde	A
REPD01	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	19,05 ab	B
REPD02	cinza escura	branca	preta	aéreo abundante	12,77 e	C
REPD07	cinza	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,43 abcd	A
REPD08	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,98 abc	B
REPD09	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	15,42 abcde	B
REPD10	cinza	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	16,98 abcde	A
REPD11	cinza clara	branca	laranja	aéreo moderadamente abundante	17,53 abcd	B
REPD12	cinza	branca e/ ou amarela	laranja	aéreo moderadamente abundante	14,66 bcde	A
REPD14	cinza	branca e/ ou cinza clara	laranja	aéreo moderadamente abundante	15,67 abcde	A
REPD15	cinza escura	branca	cinza escura	aéreo moderadamente abundante	15,92 abcde	C

²C.V.% 9,75¹Índice de crescimento micelial (ICM), ao longo de 10 dias, dos isolados de *Colletotrichum* spp.²C.V.% = Coeficiente de Variação.

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade

FONTE: O autor, 2014.

Tabela 8 - Características morfométricas de conídios.

Isolados	Tamanho (µm)			Isolados	Tamanho (µm)		
	Comprimento ¹	Largura ¹	Relação C/L ²		Comprimento ¹	Largura ¹	Relação C/L ²
IRPD03	12,6 e (7,9-16,8)	3,3 g (2,1-4,3)	3,7 a (2,2-5,7)	PFPD01	13,8 c (11,3-19,8)	3,7 e (2,2-5,6)	3,8 a (2,6-6,1)
IRPD04	14,9 a (10,9-18,7)	3,8 d (3,1-5,1)	3,9 a (3,0-5,0)	PFPD03	10,9 f (6,5-15,5)	3,2 g (2,4-4,0)	3,4 c (2,2-4,5)
IRPD05	12,0 e (9,4-15,7)	3,4 f (2,4-4,4)	3,5 b (2,7-5,2)	PFPD04	13,5 d (8,0-24,9)	3,8 d (3,0-4,6)	3,6 b (2,2-7,0)
IRPD06	14,2 b (10,3-26,7)	3,6 e (2,7-4,8)	3,8 a (2,6-6,7)	PFPD05	14,4 b (9,9-22,1)	3,7 e (2,3-4,7)	3,9 a (2,2-5,1)
IRPD08	14,1 c (9,9-20,8)	3,8 d (2,9-4,6)	3,7 b (2,3-5,3)	PFPD08	14,4 b (10,1-28,4)	3,6 e (3,0-4,5)	3,9 a (2,7-7,0)
IRPD09	13,5 d (10,6-23,6)	3,3 g (2,9-4,0)	4,0 a (2,7-5,9)	PFPD10	14,0 c (10,4-17,8)	3,6 e (2,7-4,6)	3,9 a (2,8-5,0)
IRPD10	15,1 a (10,1-24,0)	3,9 d (2,9-4,9)	3,9 a (2,3-8,2)	PFPD11	9,0 g (3,7-13,6)	2,9 i (1,9-4,5)	3,2 d (1,3-4,8)
IRPD18	13,6 c (11,0-15,9)	3,8 d (2,8-9,9)	3,7 b (1,3-5,0)	PFPD16	13,7 c (10,6-21,2)	3,6 e (2,9-4,1)	3,8 a (2,6-5,3)
IRPD22	13,1 d (10,5-16,2)	3,4 f (2,7-4,1)	3,8 a (3,0-4,6)	PFPD18	11,8 e (8,7-14,5)	3,1 h (2,3-6,6)	3,8 a (2,0-5,0)
IRPD30	14,2 b (10,9-16,8)	5,0 b (4,2-5,7)	2,8 a (2,1-3,5)	PFPD22	14,0 c (9,5-21,3)	3,9 d (2,9-5,2)	3,6 b (2,5-6,1)
MQPD03	12,5 e (8,7-21,3)	3,4 f (2,3-4,7)	3,6 b (2,4-5,0)	REPD01	13,0 d (10,8-17,3)	3,6 e (2,4-4,9)	3,7 b (2,8-4,5)
MQPD06	15,4 a (12,2-18,5)	4,7 c (3,1-8,0)	3,2 d (1,8-4,7)	REPD02	13,9 c (8,5-26,2)	3,7 e (2,3-5,2)	3,8 a (2,3-6,1)
MQPD07	12,9 e (7,9-14,9)	3,3 g (2,3-3,9)	3,9 a (2,7-5,5)	REPD07	13,1 d (8,7-17,0)	3,6 e (3,0-4,2)	3,7 b (2,3-4,7)
MQPD08	13,2 d (8,4-16,3)	3,7 e (2,7-5,1)	3,6 b (2,2-5,4)	REPD08	15,2 a (11,5-19,6)	5,1 b (3,6-6,5)	3,1 d (1,9-4,9)
MQPD09	13,4 d (8,9-22,0)	3,8 d (3,0-5,1)	3,5 b (2,3-5,8)	REPD09	14,5 b (10,1-22,0)	3,7 e (2,9-4,9)	3,9 a (2,4-5,8)
MQPD10	12,7 e (9,5-16,9)	3,4 f (2,6-4,6)	3,6 b (2,8-4,7)	REPD10	13,8 c (10,3-16,7)	3,6 e (3,0-6,2)	3,9 a (2,3-5,2)
MQPD11	13,7 c (9,6-21,2)	3,4 f (2,6-4,3)	4,0 a (2,9-5,3)	REPD11	12,4 e (8,6-15,1)	3,6 e (2,8-4,3)	3,4 c (2,0-4,4)
MQPD14	14,1 c (6,8-21,6)	3,6 e (2,8-4,4)	3,9 a (2,4-5,9)	REPD12	13,8 c (8,5-17,6)	3,9 d (3,2-5,5)	3,6 b (2,1-4,6)
MQPD19	13,9 c (8,7-24,4)	3,8 d (2,9-4,3)	3,7 b (2,1-5,6)	REPD14	14,4 b (11,9-17,8)	5,5 a (4,5-7,1)	2,6 e (1,9-3,3)
MQPD25	14,1 c (11,7-18,9)	3,7 e (2,9-4,4)	3,8 a (2,6-5,1)	REPD15	13,1 d (3,8-17,3)	3,8 d (3,4-4,8)	3,5 b (1,0-5,0)
C.V. (%) ³	15,40	15,84	16,72	C.V. (%) ³	15,40	15,84	16,72

¹Média de 50 conídios produzidos em BDA, aos 10 dias de cultivo a $\pm 26^\circ\text{C}$ sob luz continua.

²Média de 50 valores da relação C/L, calculado pela divisão do comprimento pela largura de conídio de cada isolado.

³C.V.% = Coeficiente de Variação.

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

FONTE: O autor, 2014.

Tabela 9 - Características morfométricas de apressórios.

(Continua)

Isolados	Tamanho (µm)			Formato (%) ³		
	Comprimento ¹	Largura ¹	Relação C/L ²	Lobado	Levemente lobado	Arredondado
PFPD01	Nfa ³			Nfa		
PFPD03	7,6 g (9,9-5,8)	5,7 g (7,0-4,7)	1,3 d (1,7-1,0)	0	0	100
PFPD04	Nfa			Nfa		
PFPD05	10,4 c (18,8-6,7)	7,5 c (12,2-5,0)	1,4 c (3,0-0,9)	0	6	94
PFPD08	8,9 e (16,8-6,1)	6,2 e (9,9-4,6)	1,4 c (2,3-0,9)	0	2	98
PFPD10	7,6 g (10,5-5,2)	5,5 g (6,8-2,2)	1,4 c (3,9-0,8)	0	2	98
PFPD11	8,0 f (11,9-6,3)	6,5 e (8,4-4,6)	1,2 e (1,6-1,0)	0	0	100
PFPD16	8,7 e (11,8-6,6)	6,5 e (8,7-5,2)	1,3 d (1,8-1,0)	0	0	100
PFPD18	9,8 d (13,6-7,1)	6,7 e (8,8-4,6)	1,4 c (2,3-1,0)	0	4	96
PFPD22	7,6 g (9,7-6,1)	5,7 g (6,8-4,6)	1,3 d (1,8-1,0)	0	0	100
REPD01	7,3 g (11,6-5,1)	5,2 g (7,0-4,1)	1,4 c (2,0-0,9)	0	0	100
REPD02	9,1 e (11,9-7,0)	8,0 b (12,5-5,8)	1,1 f (1,5-0,8)	2	64	34
REPD07	8,1 f (10,9-5,4)	5,6 g (6,8-4,6)	1,4 c (2,0-0,8)	0	6	94
REPD08	9,8 d (14,4-6,1)	7,6 c (14,6-4,7)	1,3 d (2,3-0,7)	6	4	90
REPD09	9,4 d (16,0-6,1)	7,0 d (10,1-5,1)	1,3 d (2,0-0,8)	0	0	100
REPD10	7,8 g (10,1-5,9)	5,8 f (7,3-4,4)	1,3 d (1,7-1,0)	0	0	100
REPD11	8,7 e (11,8-6,6)	6,1 f (8,3-4,2)	1,4 c (1,7-1,1)	0	2	98
REPD12	Nfa			Nfa		
REPD14	12,0 b (17,8-7,0)	7,8 c (10,3-4,4)	1,6 b (2,7-0,7)	18	36	46
REPD15	9,7 d (15,4-5,1)	6,7 e (8,8-4,6)	1,4 c (2,3-1,0)	0	0	100
C.V. (%) ⁴	15,40	15,84	16,72			

Tabela 9 - Características morfométricas de apressórios.

(Conclusão)

Isolados	Tamanho (μm)			Formato (%) ³		
	Comprimento ¹	Largura ¹	Relação C/L ²	Lobado	Levemente lobado	Arredondado
IRPD03	8,2 f (5,9-9,7)	6,1 f (5,1-7,1)	1,3 d (1,0-1,7)	0	0	100
IRPD04	7,7 g (5,3-12,2)	6,0 f (4,5-8,7)	1,2 e (0,9-2,3)	0	0	100
IRPD05	7,5 g (5,3-11,1)	5,5 g (3,9-7,3)	1,3 d (0,9-2,1)	2	34	64
IRPD06	9,9 d (6,9-17,5)	6,9 d (5,4-9,5)	1,4 c (1,0-3,1)	0	10	90
IRPD08	7,8 g (5,4-9,7)	5,8 f (4,6-7,3)	1,3 d (1,1-1,7)	0	0	100
IRPD09	10,8 c (4,3-15,6)	7,2 d (4,0-11,6)	1,5 c (0,8-2,3)	2	14	84
IRPD10	8,6 e (6,4-11,1)	6,1 f (5,1-7,2)	1,4 c (1,0-1,8)	0	2	98
IRPD18	7,4 g (5,2-9,1)	5,9 f (2,9-8,5)	1,2 e (1,0-1,7)	0	0	100
IRPD22	8,8 e (5,0-13,4)	6,2 e (3,7-8,3)	1,4 c (0,9-2,4)	0	4	96
IRPD30	8,2 f (6,1-10,5)	6,0 f (4,8-8,0)	1,3 d (1,0-1,8)	0	2	98
MQPD03	8,1 f (5,9-11,7)	6,5 e (4,9-11,3)	1,2 e (0,9-1,7)	0	0	100
MQPD06	14,6 a (6,5-35,2)	8,8 a (5,6-15,2)	1,7 a (0,4-4,3)	30	70	0
MQPD07	Nfa ⁴			Nfa		
MQPD08	9,1 e (5,9-12,3)	6,7 e (4,6-8,7)	1,3 d (1,0-2,1)	0	8	92
MQPD09	9,1 e (5,5-12,6)	6,5 e (4,5-8,5)	1,4 c (0,9-2,1)	0	4	96
MQPD10	7,6 g (6,0-9,5)	6,1 f (4,2-9,8)	1,2 e (0,8-1,7)	0	2	98
MQPD11	Nfa			Nfa		
MQPD14	8,4 f (6,4-12,1)	6,3 e (4,6-7,4)	1,3 d (0,9-1,9)	0	2	98
MQPD19	8,8 e (6,0-11,1)	6,5 e (4,3-8,5)	1,3 d (0,9-2,0)	0	0	100
MQPD25	7,8 g (4,3-11,5)	6,7 e (4,1-8,2)	1,1 f (0,9-1,6)	0	0	100
C.V. (%) ⁵						
	15,40	15,84	16,72			

¹Média de 50 apressórios produzidos pelo método de microcultura, aos 10 dias de cultivo a $\pm 26^\circ\text{C}$ e 12 h de fotoperíodo.²Média de 50 valores da relação C/L, calculado pela divisão do comprimento pela largura de apressório de cada isolado.³Distribuição da frequência de formatos de apressórios.⁴Nfa = não formou apressórios.⁵C.V. (%) = Coeficiente de variação.

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor, 2015.

5.2 Genotipagem por Ap-PCR de *Colletotrichum* spp.

5.2.1 Extração e quantificação de DNA

O protocolo de extração de DNA utilizado para os 34 isolados foi satisfatório para a obtenção de amostras de DNA para análise em PCR. A quantidade de DNA obtida variou entre 48,5 a 3.239,5 ng/ μ L, sendo que as amostras apresentaram boa qualidade para utilização deste tipo de marcador molecular.

5.2.2 Análise Ap-PCR

A partir de três *primers* arbitrários foram realizadas as análises por Ap-PCR de 34 isolados. O número de bandas amplificadas por *primers* foi de 17 (GACA)₄ e 18 (GTG)₅. O *primer* M13 não amplificou bandas. Foram analisados 35 fragmentos polimórficos, de peso molecular variando entre 150 a 1500pb. A Figura 5 mostra o polimorfismo gerado pelo *primer* (GACA)₄ em 16 dos 34 isolados estudados.

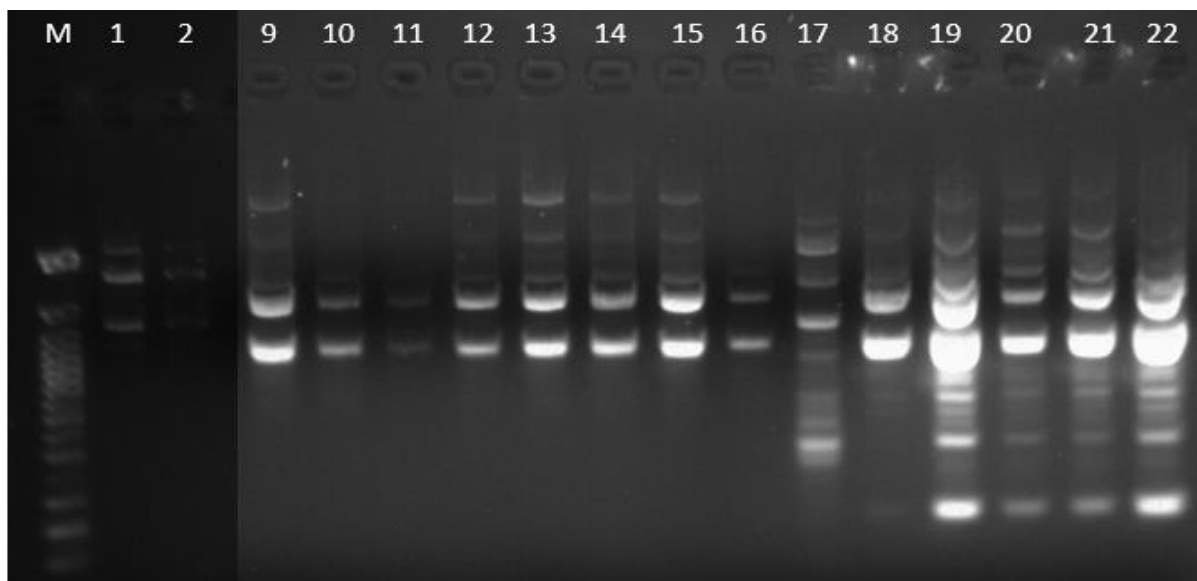


Figura 5. Polimorfismo gerado pelo *primer* arbitrário GACA₄. Na pista M encontra-se o marcador de peso molecular de 50 pb. Nas pistas 9 a 22 encontram-se os DNAs dos isolados IRPD10, IRPD22, IRPD06, PFPD16, PFPD22, PFPD10, PFPD08, PFPD04, MQPD06, MQPD08, MQPD09, MQPD11, MQPD10 e MQPD25.

FONTE: O autor, 2016.

O *primer* (GACA)₄ gerou o menor número de bandas polimórficas, formando três grupos. O primeiro agrupamento compreendeu 70,58% dos isolados com mesmo perfil de bandas e foi formado por 24 dos 34 isolados avaliados (REPD01, REPD10, REPD07, IRPD03, IRPD04, IRPD05, IRPD06, IRPD08, IRPD09, IRPD10, IRPD18, IRPD22, IRPD28,

IRPD30, PFPD03, PFPD04, PFPD08, PFPD10, PFPD16, PFPD18, PFPD22, MQPD03, MQPD14 e MQPD19).

O segundo agrupamento foi formado por 23,52% dos isolados (REPD11, REPD12, MQPD06, MQPD08, MQPD09, MQPD11, MQPD10 e MQPD25). Os isolados REPD02 e REPD09 formaram um terceiro agrupamento.

O *primer* arbitrário (GTG)₅ propiciou o maior número de bandas polimórficas e dividiu os isolados em quatro grupos distintos, sendo o grupo I formado por 61,76% dos isolados (PFPD08, PFPD10, PFPD03, PFPD04, PFPD16, PFPD22, PFPD18, IRPD03, IRPD04, IRPD05, IRPD06, IRPD08, IRPD09, IRPD10, IRPD18, IRPD22, MQPD03, MQPD14, MQPD19, REPD07 e REPD09).

O grupo II foi formado por 17,64% dos isolados (REPD01, REPD02, REPD10, REPD11, REPD12 e MQPD06). Cinco isolados procedentes de Manaquiri (MQPD08, MQPD09, MQPD11, MQPD10 e MQPD25) formaram o grupo III e dois isolados de Iranduba (IRPD30 e IRPD28) o grupo IV.

Os primers arbitrários aqui testados foram capazes de distinguir geneticamente isolados que se mostraram diferentes uns dos outros em relação a algumas características culturais e morfológicas e patogenicidade, onde os isolados mais agressivos são facilmente distinguidos dos demais (Figura 6).

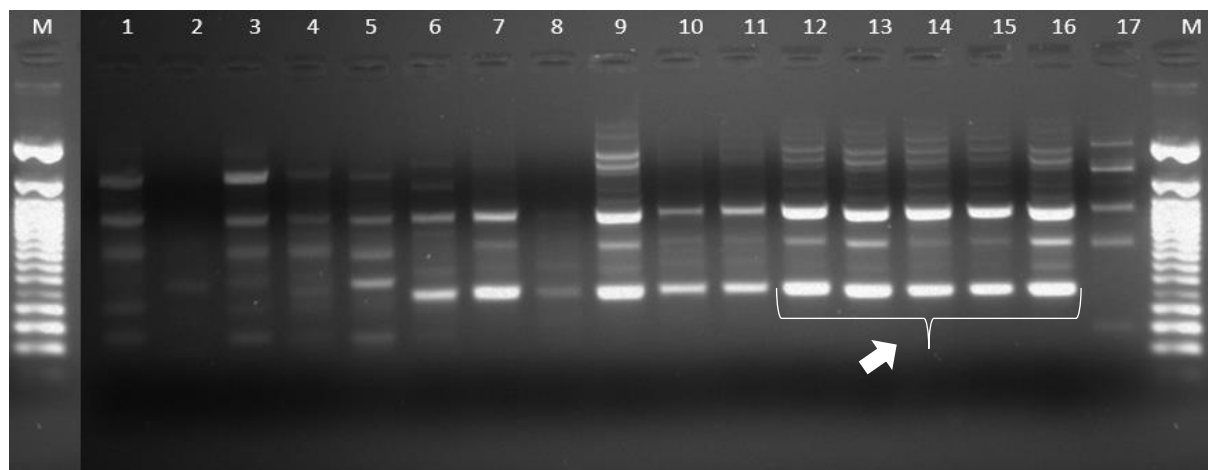


Figura 6. Polimorfismo gerado pelo *primer* GTG₅. A seta mostra os isolados nas pistas 12 (PFPD16), 13 (PFPD22), 14 (PFPD10), 15 (PFPD08) e 16 (PFPD04) mais agressivos no teste de patogenicidade em pimenta-de-cheiro com bandas monomórficas.

FONTE: O autor, 2016.

A partir das bandas amplificadas foi gerada uma matriz binária e calculada à similaridade genética entre os isolados e gerado um dendograma, obtido pelo método UPGMA, utilizando o Coeficiente de Nei & Li como medida de dissimilaridade (Figura 7).

A análise de agrupamento, com base no dendograma produzido, revelou a existência de sete grupos (I, II, III, IV, V, VI e VII). O grupo I foi formado pelo isolado REPD02 e o grupo II pelo isolado REPD09, ambos procedentes de Itacoatiara. O grupo III foi formado por três isolados de Iranduba (IRPD03, IRPD18 e IRPD05). Um isolado de Manaquiri (MQPD14) formou o grupo IV.

O grupo V foi formado por sete isolados (IRPD30, IRPD28, IRPD09, MQPD03, MQPD19, PFPD04 e PFPD03). O grupo VI apresentou dois subgrupos, A e B. No subgrupo A foram inseridos oito isolados (IRPD22, IRPD06, IRPD10, PFPD22, PFPD10, PFPD18, PFPD08 e PFPD16), no subgrupo B os isolados (MQPD06, MQPD08, MQPD11, MQPD10, MQPD09 e MQPD25). O grupo VII formou dois subgrupos, A e B. No subgrupo A três isolados foram inseridos (IRPD08, IRPD04 e REPD07), no subgrupo B os isolados (REPD11, REPD12, REPD01 e REPD10).

O coeficiente de correlação cofenética apresentou valor de $r = 0,84$. A dissimilaridade genética variou com a procedência dos isolados, evidenciando variação intraespecífica, onde isolados de uma mesma procedência foram distribuídos em diferentes grupos e subgrupos, corroborando com os dados obtidos neste estudo quanto a caracterização morfo cultural dos isolados, demonstrando assim, a alta variabilidade genética existente entre e dentro os isolados provenientes de uma mesma localidade.

Foi observado a formação de grupos entre isolados da mesma procedência em quatro dos sete agrupamentos formados e em dois dos quatro subgrupos analisados. Nos grupos I e II estão os isolados REPD02 e REPD09, respectivamente, ambos procedentes de Itacoatiara. O grupo III foi formado por três isolados procedentes de Iranduba. No grupo IV está o isolado MQPD14 oriundo de Manaquiri. O subgrupo VI B agrupou seis isolados de Manaquiri, no subgrupo VII B quatro isolados de Itacoatiara. Os demais grupos e subgrupos foram compostos por isolados de diferentes localidades.

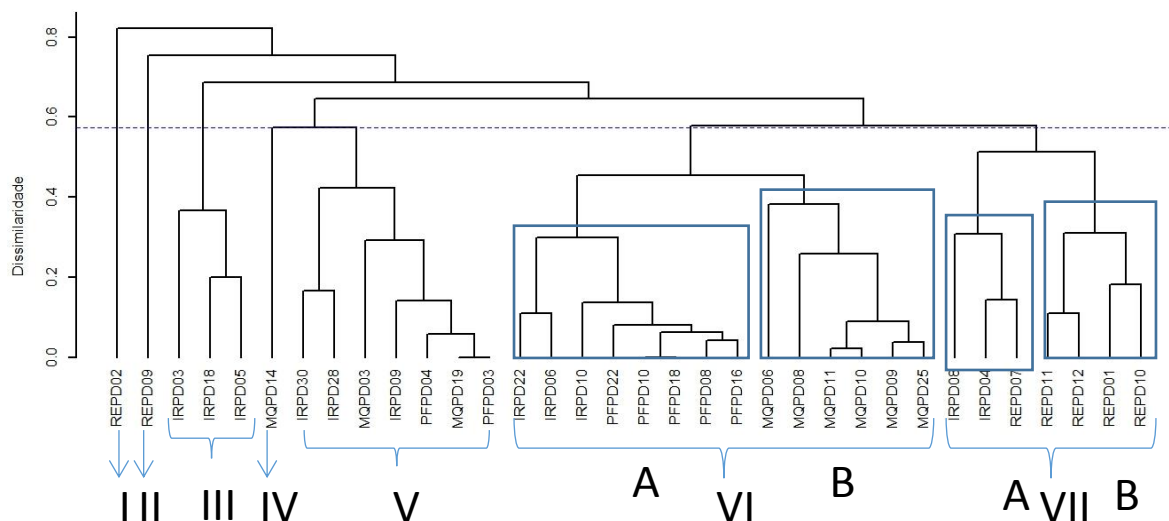


Figura 7 – Dendrograma gerado pela análise de agrupamento UPGMA. A linha pontilhada representa o nível de fusão entre os grupos, estimada pelo método Mojema (1997). A escala à esquerda informa o valor de dissimilaridade. Os números romanos indicam os grupos formados e as letras maiúsculas os subgrupos.

FONTE: O autor, 2016.

5.3 Patogenicidade cruzada de isolados de *Colletotrichum* spp.

Sintomas típicos de antracnose foram observados após três dias da inoculação. Inicialmente foram observados pequenos pontos de coloração marrom, evoluindo para manchas pretas, com halo de tecido aquoso, diferente da coloração observada no restante do tecido sintomático. Posteriormente, as lesões apresentaram pequenas pontuações (acérvulos) com a presença de massas de esporos de coloração alaranjada. Nos tratamentos testemunha dos quatro tipos de *Capsicum* não foram observados sintomas da doença (Figura 8 e 9).

A severidade máxima ocorreu no décimo dia após a inoculação enquanto a incidência atingiu o valor máximo a partir do terceiro dia após a inoculação.

Houve diferença significativa entre os isolados, para o diâmetro médio da lesão (mm) e para o índice de agressividade (%). Em relação a incidência da doença (%) houve diferença significativa quando os isolados foram inoculados em pimenta murupi, pimentão e pimenta dedo-de-moça, quando inoculados em pimenta-de-cheiro não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste Scott-Knott (Tabela 11).

Os isolados de *Colletotrichum* spp. quando inoculados em frutos de pimenta-de-cheiro apresentaram incidência entre 95 a 55%, índice de agressividade variando de 39,60 a 22,00% e diâmetro médio das lesões na faixa de 25,48 a 7,30 mm, sendo um isolado de Presidente Figueiredo (PFPD10) e outro de Iranduba (IRPD03) os mais agressivos, diferindo estatisticamente dos demais. Nos frutos de pimenta murupi apenas os isolados IRPD03, PFPD22, REPD07, MQPD03 e MQPD08 foram patogênicos e apresentaram incidência de

20%, com índice de agressividade na faixa de 16,60 a 6,00% e diâmetro médio da lesão variando de 1,32 a 0,50 mm. Em relação aos frutos de pimentão, dois isolados IRPD03 e REPD01 não foram patogênicos. Os demais isolados apresentaram incidência variando de 100 a 85%, com índice de agressividade na faixa entre 42,40 a 22,40% e diâmetro médio da lesão variando de 40,22 a 9,79 mm.

Os isolados PFPD08, REPD01, REPD02, REPD10 e REPD11 não foram patogênicos quando inoculados em frutos de pimenta dedo-de-moça. Os demais isolados apresentaram incidência variando de 90,00 a 80,00%, índice de agressividade variando de 32,00 a 22,80% e diâmetro médio da lesão na faixa entre 10,48 a 3,48 mm.

Quanto a procedência dos isolados houve variação pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância para o diâmetro médio da lesão, índice de agressividade e incidência quando os isolados foram inoculados em pimenta dedo-de-moça. Em pimenta-de-cheiro houve variação na incidência. Entretanto, quando inoculados em pimenta murupi e pimentão não houve diferença significativa (Tabela 12).

Os isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de Iranduba, quando inoculados em frutos de pimenta-de-cheiro apresentaram incidência de 90%, diâmetro médio das lesões de 12,36 mm e índice de agressividade de 28,20%. Isolados de Presidente Figueiredo apresentaram incidência de 94%, diâmetro médio das lesões de 17,10 mm e índice de agressividade de 33,52%. Isolados oriundos da Comunidade Ramal do Engenho, localizada no município de Itacoatiara, apresentaram incidência de 79%, diâmetro médio das lesões de 11,99 mm e índice de agressividade de 28,48%. Isolados do município de Manaquiri apresentaram incidência de 78%, diâmetro médio das lesões de 14,95 mm e índice de agressividade de 28,40%.

Em frutos de pimenta murupi os isolados de Iranduba formaram lesões com diâmetro médio de 0,13 mm, índice de agressividade de 3,12% e incidência de 4%, mesma incidência apresentada pelos isolados de Presidente Figueiredo, os quais apresentaram diâmetro médio das lesões de 0,21 mm e índice de agressividade de 1,52%. Isolados oriundos da Comunidade Ramal do Engenho apresentaram incidência de 4%, diâmetro médio das lesões de 0,26 mm e índice de agressividade de 1,52%. Os isolados do município de Manaquiri apresentaram incidência de 8%, diâmetro médio das lesões de 0,28 mm e índice de agressividade de 2,64%.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de Iranduba, Presidente Figueiredo, Itacoatiara e Manaquiri, quando inoculados em frutos de pimentão apresentaram incidência de 73, 94, 75 e 91%, respectivamente. Os isolados de Iranduba formaram lesões com diâmetro médio de 17,01 e índice de agressividade de 26,16%. O maior valor para o índice de

agressividade foi observado para os isolados de Presidente Figueiredo com 35,76% e diâmetro médio das lesões de 23,22 mm. Isolados oriundo de Itacoatiara formaram lesões com diâmetro médio de 20,43 mm e índice de agressividade de 27,84%. O maior valor do diâmetro médio das lesões foi observado para os isolados de Manaquiri com 25,63 mm e índice de agressividade de 33,68%.

Inoculados em pimenta dedo-de-moça os isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de Iranduba apresentaram incidência de 86%, diâmetro médio das lesões de 4,99 mm e índice de agressividade de 26,26%. Os isolados de Presidente Figueiredo formaram lesões com diâmetro médio de 6,1 mm, índice de agressividade de 21,84% e incidência de 67%. Os isolados oriundos de Itacoatiara apresentaram incidência de 16%, formaram lesões com diâmetro médio de 1,52 mm e índice de agressividade 5,28%. Os isolados de Manaquiri apresentaram índice de agressividade de 24,80%, lesões com diâmetro médio de 6,96 mm e incidência de 85%.

Quanto as espécies de *Capsicum* spp. utilizados neste trabalho, foi observado que os isolados de *Colletotrichum* spp. quando inoculados em frutos de pimenta murupi formaram lesões com menores diâmetros e apresentaram índice de agressividade e incidência inferiores à outras espécies. Em frutos de pimenta dedo-de-moça 75% dos isolados foram patogênicos, porém foi observado que apenas um isolado oriundo de Itacoatiara foi capaz de causar lesão (REPD07) e outros cinco isolados não foram patogênicos (PFPD04, REPD01, REPD02, REPD10 e REPD11). Em frutos de pimenta-de-cheiro 100% dos isolados foram patogênicos. Em frutos de pimentão foi observado que 90% dos isolados foram patogênicos e que os isolados IRPD03 e REPD01 não formaram lesões. O isolado REPD01 foi patogênico apenas quando inoculado em frutos de pimenta-de-cheiro.

Em relação a classe de agressividade (Tabela 13) os isolados de *Colletotrichum* spp. quando inoculados em frutos de pimenta-de-cheiro foram distinguidas duas classes, onde 15 isolados apresentaram índice de agressividade variando de 39,60 a 26,00% e foram inseridos na classe MAA (Muito Alta Agressividade), 5 isolados formaram a classe AA (Alta Agressividade) com índice de agressividade variando de 24,40 a 22,00%.

Em pimenta murupi os isolados formaram três classes de agressividade, sendo que 15 isolados foram inseridos na classe BA (Baixa Agressividade) e não produziram sintomas, quatro isolados foram inseridos na classe MA (Média Agressividade) com índice de agressividade variando de 7,60 a 6,00%. O isolado IRPD03 formou a classe AA com índice de agressividade de 15,60%.

Os isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em pimentão formaram três classes de agressividade, sendo que 16 isolados foram inseridos na classe MAA e apresentaram índice de agressividade de 42,40 a 26,40%. A classe AA foi formada pelos isolados PFPD04 e MQPD08 com índice de agressividade de 22,40% para ambos. Na classe BA foram inseridos dois isolados, IRPD03 e REPD01, que não produziram sintomas.

Inoculados em pimenta dedo-de-moça os isolados de *Colletotrichum* spp. formaram três classes de agressividade, sendo que a classe MAA foi formada por 11 isolados com índice de agressividade variando de 32,00 a 25,20%. Na classe AA foram inseridos quatro isolados com índice de agressividade variando de 24,80 a 22,80%. Na classe BA foi formada por cinco isolados, os quais não produziram sintomas.



Figura 8 – Sintoma típico de antracnose ao décimo dia após inoculação em pimenta-de-cheiro. Testemunha (A). Lesão causada pelos isolados: IRPD03 (B); PFPD03(C); PFPD22 (D); MQPD19 (E); MQPD14 (F); PFPD10 (G); MQPD09 (I) e REPD11 (J).

FONTE: O autor, 2016.



Figura 9 – Sintoma típico de antracnose ao décimo dia após inoculação em pimentão. Testemunha (A). Lesão causada pelos isolados: IRPD04 (B); PFPD22 (C); PFPD08 (D); REPD10 (E) e MQPD09 (F).

FONTE: O autor, 2016.

Tabela 10 - Diâmetro médio de lesões (mm), índice de infecção (%) e incidência (%) de isolados de *Colletotrichum* spp. em frutos de pimenta-de-cheiro, pimenta murupi, pimentão e pimenta dedo-de-moça.

Isolados	Hospedeiras											
	Pimenta-de-cheiro			Pimenta murupi			Pimentão			Pimenta dedo-de-moça		
	DML	II	INC	DML	II	INC	DML	II	INC	DML	II	INC
IRPD03	25,20 a	32,40 a	90,00 a	0,65 a	15,60 a	20,00 a	0,00 m	0,00 c	0,00 b	3,52 f	23,60 a	80,00 a
IRPD04	7,40 l	26,00 b	95,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	31,26 d	37,20 a	95,00 a	5,86 e	29,60 a	85,00 a
IRPD06	7,30 l	22,00 b	85,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	11,04 j	28,40 b	90,00 a	3,48 f	23,60 a	85,00 a
IRPD10	8,44 j	29,20 a	90,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	10,50 j	26,40 b	85,00 a	6,44 d	30,40 a	90,00 a
IRPD18	13,48 f	31,60 a	90,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	32,26 d	38,80 a	95,00 a	5,68 e	25,60 a	90,00 a
PFPD03	15,96 e	39,60 a	100,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	10,66 j	34,80 a	90,00 a	5,42 e	26,40 a	85,00 a
PFPD04	12,56 g	32,80 a	95,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	9,72 l	22,40 b	85,00 a	6,92 d	25,60 a	80,00 a
PFPD08	11,00 h	24,40 b	90,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	33,12 c	42,00 a	100,00 a	0,00 g	0,00b	0,00 b
PFPD10	25,48 a	35,60 a	100,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	34,14 c	39,20 a	95,00 a	10,48 a	32,00 a	90,00 a
PFPD22	20,54 c	35,20 a	85,00 a	1,05 a	7,60 a	20,00 a	28,48 e	40,40 a	100,00 a	7,58 c	25,20 a	80,00 a
REPD01	12,72 g	29,60 a	85,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 m	0,00 c	0,00 b	0,00 g	0,00 b	0,00 b
REPD02	9,54 i	26,80 b	80,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	15,42 i	30,40 b	90,00 a	0,00 g	0,00 b	0,00 b
REPD07	13,58 f	30,00 a	75,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	25,48 f	35,20 a	95,00 a	0,00 g	0,00 b	0,00 b
REPD10	12,54 g	32,00 a	90,00 a	1,32 a	7,60 a	20,00 a	40,22 a	41,60 a	100,00 a	7,58 c	26,40 a	80,00 a
REPD11	11,60 g	24,00 b	65,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	21,06 h	32,00 a	90,00 a	0,00 g	0,00 b	0,00 b
MQPD03	10,50 h	22,00 b	90,00 a	0,50 a	7,20 a	20,00 a	23,76 g	30,00 b	90,00 a	8,70 b	25,20 a	90,00 a
MQPD08	7,44 l	22,00 b	75,00 a	0,94 a	6,00 a	20,00 a	9,70 l	22,40 b	85,00 a	7,54 c	24,80 a	85,00 a
MQPD09	22,46 b	38,80 a	75,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	37,24 b	42,40 a	100,00 a	6,40 d	25,20 a	80,00 a
MQPD14	15,96 e	28,40 b	65,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	25,16 f	38,80 a	95,00 a	5,42 e	22,80 a	85,00 a
MQPD19	18,42 d	30,80 a	85,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	32,32 d	34,80 a	85,00 a	5,76 e	26,00 a	85,00 a
CV (%)	2,45	24,13	22,31	470, 29	42,8	193,22	2,63	26,32	19,06	17,21	19,77	26,51

DML = Diâmetro médio da lesão.

II = Índice de Infecção.

INC = Incidência.

CV (%) = Coeficiente de Variação.

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

FONTE: O autor, 2016.

Tabela 11 – Relação da procedência dos isolados de *Colletotrichum* spp. com o diâmetro médio de lesões (mm), índice de infecção (%) e incidência (%) em frutos de pimenta-de-cheiro, pimenta murupi, pimentão e pimenta dedo-de-moça.

Isolados Procedências	Hospedeiras											
	Pimenta-de-cheiro			Pimenta murupi			Pimentão			Pimenta dedo-de-moça		
	DML	II	INC	DML	II	INC	DML	II	INC	DML	II	INC
Irاندوبا	12,36 a	28,20 a	90,00 a	0,13 a	3,12 a	4,00 a	17,01 a	26,16 a	73,00 a	4,99 a	26,26 a	86,00 a
Pres. Figueiredo	17,10 a	33,52 a	94,00 a	0,21 a	1,52 a	4,00 a	23,22 a	35,76 a	94,00 a	6,1 a	21,84 a	67,00 a
Itacoatiara	11,99 a	28,48 a	79,00 b	0,26 a	1,52 a	4,00 a	20,43 a	27,84 a	75,00 a	1,52 b	5,28 b	16,00 b
Manaquiri	14,95 a	28,40 a	78,00 b	0,28 a	2,64 a	8,00 a	25,63 a	33,68 a	91,00 a	6,96 a	24,80 a	85,00 a
CV (%)	40,73	17,6	9,13	204,66	209,56	189,74	60,06	40,58	35,75	55,91	44,73	41,14

DML = Diâmetro médio da lesão.

II = Índice de Infecção.

INC = Incidência.

CV (%) = Coeficiente de Variação.

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

FONTE: O autor, 2016.

Tabela 12 – Classes de infecção dos isolados de *Colletotrichum* spp. inoculados em pimenta-de-cheiro, pimenta murupi, pimentão e pimenta dedo-de-moça.

Isolados	Hospedeiras							
	Pimenta-de-cheiro		Pimenta murupi		Pimentão		Pimenta dedo-de-moça	
	II ¹	CI ²	II	CI	II	CI	II	CI
IRPD03	32,40 a	MAI	15,60 a	AI	0,00 c	BI	23,60 a	AI
IRPD04	26,00 b	MAI	0,00 a	BI	37,20 a	MAI	29,60 a	MAI
IRPD06	22,00 b	AI	0,00 a	BI	28,40 b	MAI	23,60 a	AI
IRPD10	29,20 a	MAI	0,00 a	BI	26,40 b	MAI	30,40 a	MAI
IRPD18	31,60 a	MAI	0,00 a	BI	38,80 a	MAI	25,60 a	MAI
PFPD03	39,60 a	MAI	0,00 a	BI	34,80 a	MAI	26,40 a	MAI
PFPD04	32,80 a	MAI	0,00 a	BI	22,40 b	AI	25,60 a	MAI
PFPD08	24,40 b	AI	0,00 a	BI	42,00 a	MAI	0,00 b	BI
PFPD10	35,60 a	MAI	0,00 a	BI	39,20 a	MAI	32,00 a	MAI
PFPD22	35,20 a	MAI	7,60 a	MI	40,40 a	MAI	25,20 a	MAI
REPD01	29,60 a	MAI	0,00 a	BI	0,00 c	BI	0,00 b	BI
REPD02	26,80 b	MAI	0,00 a	BI	30,40 b	MAI	0,00 b	BI
REPD07	32,00 a	MAI	7,60 a	MI	41,60 a	MAI	26,40 a	MAI
REPD10	24,00 b	AI	0,00 a	BI	32,00 a	MAI	0,00 b	BI
REPD11	30,00 a	MAI	0,00 a	BI	35,20 a	MAI	0,00 b	BI
MQPD03	22,00 b	AI	7,20 a	MI	30,00 b	MAI	25,20 a	MAI
MQPD08	22,00 b	AI	6,00 a	MI	22,40 b	AI	24,80 a	AI
MQPD09	38,80 a	MAI	0,00 a	BI	42,40 a	MAI	25,20 a	MAI
MQPD14	28,40 b	MAI	0,00 a	BI	38,80 a	MAI	22,80 a	AI
MQPD19	30,80 a	MAI	0,00 a	BI	34,80 a	MAI	26,00 a	MAI
CV (%)	24,13		42,8		26,32		19,77	

¹II = Índice de Infecção dos isolados, calculada pelo índice de Machinney (1923), com modificações, utilizando as frequências de classes de agressividade da escala de notas proposta por Mahasuk et al, (2009a), com modificações.

²CI = Classes de Infecção: Baixa (BI) 0,0 <II ≤ 0,05; Média (MI) 0,05 <II ≤ 0,15; Alta (AI) 0,15 <II ≤ 0,25; Muito Alta (MAI) II > 0,25.

CV% = Coeficiente de Variação.

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

FONTE: O autor, 2016.

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização morfocultural

Muitos autores apontam dificuldades na identificação das espécies de *Colletotrichum* fundamentada exclusivamente em critérios clássicos de taxonomia (aspectos morfológicos, culturais, fisiológicos, bioquímicos e de patogenicidade) devido à grande variabilidade desse gênero (SUTTON, 1992; LOPEZ, 2001; WEIR et al., 2012).

Houve variação quanto a coloração, topografia e índice de crescimento micelial das colônias, tendo essas características morfológicas se mostrado incipientes para identificação de espécies de *Colletotrichum*. A ocorrência de variabilidade na coloração, topografia e no crescimento micelial das colônias de *Colletotrichum* também foi verificada por Mafacioli et al (2005); Gunawardhana et al (2009); Tozze Jr. (2009); Bonett et al (2010); Tozze Jr. et al (2015).

Recentemente, Tozze Jr et al (2015), com objetivo de caracterizar e identificar 93 isolados de *Colletotrichum* obtidos de abacate, manga, maracujá e pêssgo cultivadas no Estado de São Paulo, Brasil, por meio de morfometria de conídios e colônias e análise molecular (amplificação por PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos e análise de sequências de nucleotídeos das regiões ITS e β -tubulina), verificaram alta variabilidade cultural e presença de características comuns a mais de uma espécie ou complexo de espécies de *Colletotrichum* descritas na literatura (SUTTON, 1992), como coloração das colônias e massas de esporos, impossibilitou a clara identificação específica dos isolados com base exclusivamente nas características avaliadas.

Apesar de alguns grupos apresentarem características típicas de algumas espécies de *Colletotrichum* spp., a princípio, baseados apenas nas características descritivas das colônias, não é possível afirmar qual espécie pertencem os isolados, devido a ampla variação nestas características entre e dentro do mesmo isolado. Inúmeros autores levantam a inconsistência dessas características para fins taxonômicos (PERES et al., 2002; ANDRADE et al., 2007; TOZZE Jr., 2007; THAN et al., 2008; BENTES; COSTA NETO, 2011; SAXENA et al., 2014). Vários fatores podem influenciar as características das colônias, tais como: meio de cultura utilizado, fotoperíodo de exposição e período de incubação. Mesmo padronizando tais fatores, o patógeno está sujeito a intensa variabilidade governada tanto por pressão do ambiente quanto por características intrínsecas ao patógeno, como a variabilidade genética

dos isolados, tornando muito difícil a definição do conceito morfológico de espécie (MENEZES, 2006).

Quanto a morfologia de conídios e apressórios, foi observado variabilidade nos formatos e dimensões, onde foi observado sobreposições. A variabilidade no formato de conídios e apressórios de *Colletotrichum* é bem documentada, sendo um mesmo isolado capaz de apresentar tipos morfológicos distintos, o que dificulta a delimitação precisa entre espécies (MAFACIOLI et al., 2006; TOZZE Jr. et al., 2006; TOZZE JR. et al., 2015).

A morfometria dos conídios e apressórios também não permitiu a identificação de espécies de *Colletotrichum*. Embora os formatos de conídios e apressórios tenham permitido agrupar os isolados em sete grupos, sugerindo a existência de pelo menos sete espécies ou complexos de espécies, as dimensões dos conídios mostraram-se sobrepostas entre esses grupos, dificultando a interpretação dos resultados. Corroborando com o estudo de Andrade et al (2007), os quais ao caracterizarem isolados de *Colletotrichum* de mamão, também constatarem que a diferenciação entre espécies com base nas dimensões de conídios e apressórios foi dificultada pela sobreposição dos valores descritos por Sutton (1992), pois a maioria dos isolados de mamão apresentou dimensões dentro da faixa de variação descrita para as duas espécies, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Tozze Jr. et al (2007) observaram que isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* oriundos de pimentão, apresentaram alta variabilidade e que a sobreposição nas dimensões dos conídios descritas para as espécies, baseando apenas nas características morfológicas, não foi possível identificar alguns isolados como sendo pertencentes a uma única espécie. Dentro deste grupo não identificado poderiam estar presentes isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Durante os estudos da morfometria dos apressórios foi observado que um mesmo isolado é capaz de apresentar tipos morfológicos distintos de apressórios. Segundo Tozze Jr. et al (2006), há casos em que um mesmo isolado apresenta diferentes formas de apressórios, assim como um mesmo conídio formar apressórios diferentes um do outro. Em vista disso, denota-se, para o caso dessa característica, uma grande dificuldade no estabelecimento de agrupamentos para a espécie.

Cinco isolados não produziram apressórios. Considerando que os isolados foram mantidos por repicagem periódicas, é possível que estes isolados tenham perdido a capacidade de formar apressórios em função deste método de preservação, que favorece a perda de características selvagens. Segundo Alfenas; Mafia (2007), repicagens periódicas tendem a induzir o patógeno ao hábito saprofítico, à alteração de sua morfologia, à diminuição ou perda

de sua capacidade de esporular, à diminuição de sua agressividade e à perda de patogenicidade.

Dificuldades na caracterização taxonômica de fungos do gênero *Colletotrichum*, quando do emprego de dados morfológicos, já foram apontadas por Castilho et al (2007), quando do estudo de isolados obtidos de plantas solanáceas, os quais concluíram acerca da necessidade de estudos complementares visando uma caracterização taxonômica mais segura e de maior confiabilidade. Atualmente, técnicas moleculares têm sido empregadas em conjunto na identificação e caracterização das espécies do gênero neste patossistema (TOZZE Jr. et al., 2004).

As características que melhor distinguiram os isolados de pimenta-de-cheiro foram o formato dos conídios (cilíndrico e/ou oblongo), a relação comprimento/largura inferior a 3,9 e a produção de apressórios arredondados. As características observadas de cor e topografia da colônia fúngicas são passíveis de serem confundidas com as características da espécie *C. gloeosporioides* que apresenta em sua descrição micélio aéreo, coloração branca acinzentada a cinza escuro, fundo da placa branco a cinza escuro, massa conidial de coloração salmão pálido (SUTTON, 1980; 1992). No entanto não é possível determinar com segurança a identidade dos isolados em nível de espécie com base nas características morfológicas avaliadas. As dificuldades encontradas na identificação das espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos, além da sobreposição de características entre espécies distintas (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998; CANNON et al., 2000; LOPEZ, 2001; CANNON et al., 2012; WEIR et al., 2012).

Os resultados encontrados neste estudo apontam para a possibilidade de que mais de uma espécie de *Colletotrichum* esteja associada à antracnose em frutos de pimenta-de-cheiro no Estado do Amazonas, devido à grande variabilidade observada nos caracteres morfológicos e culturais analisados.

6.2. Genotipagem por Ap-PCR de *Colletotrichum* spp.

A complexidade do patossistema no caso da antracnose da pimenta-de-cheiro requer estudos essenciais relacionados com a variabilidade genética entre a população patogênica de uma dada região.

A análise da genotipagem dos isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de pimenta-de-cheiro, pela técnica Ap-PCR permitiu evidenciar alta variabilidade genética. Resultados

semelhantes foram encontrados por vários autores em estudos de diversidade genética de *Colletotrichum* em outros hospedeiros utilizando a mesma técnica (TALHINHAS et al., 2005; BARGUIL et al., 2009; ANDERSON et al., 2013 e TORRES-CALZADA et al., 2013).

Embora tenha se observado que isolados oriundos de um mesmo local ficaram agrupados mais próximos uns dos outros do que dos oriundos de outros locais, não se pode dizer que estes apresentem divergência a tal ponto de se isolarem reprodutiva ou geograficamente, visto que o coeficiente de dissimilaridade genética entre eles foi alto, variando entre 0 a 84%. Essa alta divergência encontrada entre isolados de *Colletotrichum* já vem sendo relatada em outros patossistemas como em morango, em que se observou que na espécie *C. acutatum*, a dissimilaridade genética entre os isolados variou entre 0 e 80% (DENOYES-ROTHAN et al., 2003), em seringueira (*Hevea brasiliensis*) onde se observou que isolados de *C. acutatum* possuíam alta dissimilaridade genética, superior a 90% (SAHA et al., 2002) e em *Citrus* onde isolados de *C. acutatum* apresentaram dissimilaridades genéticas de até 96% (KURAMAE-IZIOKA et al., 1997). Entretanto, isolados de *C. acutatum* oriundos de macieira mostraram-se muito similares entre si, com similaridade genética de 91 a 99% em trabalho realizado por Carvalho (1997).

O dendograma gerado pela análise de agrupamento UPGMA evidenciou a formação de sete grupos e quatro subgrupos, indicando a possibilidade de existir pelo menos sete ou mais espécies ou complexo de espécies associadas à antracnose em pimenta-de-cheiro no Estado do Amazonas, concordando com as observações morfoculturais encontrados neste estudo e com os estudos recentes de Almeida (2015), a qual com o objetivo de identificar as espécies de *Colletotrichum* responsáveis por causar antracnose em frutos de plantas do gênero *Capsicum* no Estado do Amazonas, analisou 94 isolados obtidos de frutos de pimentão, pimenta cheirosa e pimenta murupi, com base no sequenciamento e análise multilocus de regiões parciais dos genes ACT, CHS, GAPDH, HIS e GS e identificou 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*). A hipótese de que várias espécies podem estar associadas à antracnose em frutos de pimenta-de-cheiro no Estado do Amazonas torna mais difícil o manejo e eleva a importância da doença para os empreendimentos futuros e os já implantados.

Os grupos formados através da análise genotípica dos isolados aproximam-se mais dos formados pela caracterização patogênica, em relação aos formados pelas características

culturais e morfológicas. Saha et al (2002), no patossistema *Colletotrichum* – *Hevea brasiliensis*, encontrou relação entre os grupos formados pela análise através de marcadores RAPD e os grupos formados pelo tipo de sintoma ocasionado pelos isolados.

Ao analisar isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de sintomas de antracnose em morango, Denoyes-Rothan et al (2003), relataram a ausência de correlação entre o polimorfismo genético e a origem geográfica dos isolados, sugerindo que houve uma disseminação mundial dos mesmos, provavelmente por meio de trocas internacionais de órgãos de propagação vegetativa. Da mesma maneira, um estudo envolvendo caracterização molecular de isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de grãos de café com sintomas de antracnose, de diferentes locais do Vietnã, revelou uma alta diversidade genética entre os isolados segundo análises com marcadores RAPD e microssatélites, e relatou que os mesmos foram, em sua maioria, agrupados de acordo com sua origem geográfica, regiões Norte e Sul do país (NGUYEN et al., 2009). Porém, segundo esses investigadores, não foi possível a diferenciação entre isolados provenientes de localidades dentro das regiões Norte e Sul, e não houve uma correlação entre os agrupamentos obtidos e o potencial patogênico dos isolados (NGUYEN et al., 2009). Por sua vez, marcadores AFLP indicaram uma alta diversidade genética entre isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* obtidos de caqui e pimenta, porém, não foi possível agrupá-los segundo a sua procedência (KIM et al., 2009).

Diferente do observado por Torres-Calzada et al (2013), que caracterizaram isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose em mamão (*Carica papaya* L.), usando caracteres morfológicos e marcadores moleculares, observaram concordância entre os resultados obtidos para identificação das espécies e indicaram uma ligação entre o genótipo, distribuição geográfica e morfológica dos isolados.

Este tipo de relação entre o mesmo local de origem e alta dissimilaridade genética já vem sendo observado por alguns autores em outros patossistemas, como por exemplo, Valério et al (2005), que estudaram o patossistema *C. graminicola* – sorgo e não encontraram congruência entre os grupos formados por RAPD e pelos formados através da análise de virulência, mas inferem que isolados oriundos de um local de origem comum são agrupados em um mesmo grupo através da análise molecular. Munaut et al (2002), estudaram o patossistema *C. gloeosporioides* - *Stylosanthes* spp., e encontraram relação entre origem geográfica dos isolados e distâncias genéticas entre estes, sendo que isolados oriundos de uma mesma região mostraram-se mais próximos geneticamente do que isolados oriundos de regiões diferentes.

Entretanto, é possível que futuramente essa similaridade diminua e os isolados se constituam em populações distintas de acordo com cada região, como o observado por Valerio et al (2005), em trabalho com isolados de *Colletotrichum graminicola* provenientes de várias regiões do Brasil, sendo que o fato de a principal forma de disseminação dos conídios de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* ser através de respingos de água (LOPEZ, 2001) possa influenciar em grande parte a formação de populações distintas, visto que dessa maneira os esporos são disseminados a curtas distâncias.

Nos isolados provenientes de Iranduba foi observado maior variabilidade, demonstrado pela presença dos isolados na maioria dos grupos e com maiores distâncias genéticas. Este resultado pode ser devido à maior quantidade de isolados analisados desta procedência, evidenciando maior número de *loci* polimórficos. Os isolados de Presidente Figueiredo apresentaram menor variabilidade. A variabilidade genética observada entre os isolados pode ser decorrente ainda de diversos mecanismos geradores de variabilidade em fungos mitospóricos, como mutação e recombinação parassexual que podem ocorrer em condições naturais (AGRIOS, 2005; AZEVEDO, 2009).

Vários trabalhos relatam a alta variabilidade genética entre populações de *Colletotrichum* e pressupõem motivos pelos quais esse fungo possui tal capacidade. Por exemplo, uma alta variabilidade genética e heterogeneidade entre populações de isolados de *C. gloeosporioides* de manga e maracujá na Colômbia, foram encontradas por meio de análises morfológicas e moleculares com marcadores Ap-PCR e RAPD (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). Os autores sugeriram que se essa população de isolados pertence a uma única espécie, a complexidade genética e heterogeneidade podem ser explicadas pela presença de um estágio perfeito do fungo (FREEMAN et al., 1998).

Santos et al (2015), estudaram a diversidade genotípica e patogênica de *Colletotrichum musae* no Estado de Pernambuco. Os autores avaliaram sessenta isolados de *Colletotrichum* oriundos de campos de produção de banana dos Municípios de Vicência, São Vicente Férrer e Machados, no Estado de Pernambuco, os isolados foram avaliados quanto a características morfológicas, moleculares, culturais, de virulência e de diversidade genética. Os índices de diversidade genotípica indicaram a ocorrência de fluxo gênico, provavelmente, devido ao fungo ser transportado via material de propagação e não haver fiscalização sanitária entre regiões. Tal argumento sustenta os resultados apresentados pelos isolados de Iranduba quanto a existência de alta variabilidade apresentada no presente estudo.

Poderia se esperar que houvesse algum tipo de separação entre os isolados amostrados no presente estudo pela origem geográfica. Isolados de origens geográficas distintas também apresentaram o mesmo padrão de bandas na Ap-PCR. Isolados provenientes dos municípios de Manaquiri, apresentaram perfis de bandas similares a isolados coletados no município de Presidente Figueiredo, distantes cerca de 290km. A variabilidade aqui observada pode estar relacionada com a inespecificidade dos isolados, que também foi encontrada em isolados coletados em maracujás cultivados na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003).

Devido à alta variabilidade das características morfoculturais e patogênica apresentada pelos isolados, não foi possível observar relação entre as características estudadas e a análise molecular. Peres et al (2003), ao avaliaram a variabilidade morfocultural e genética por meio de marcadores AFLP, de fungos associados à podridão peduncular em mamoeiro (*Carica papaya* L.), incluindo *C. gloeosporioides*, evidenciaram uma ampla variabilidade morfológica entre os isolados, não havendo relação entre as características morfológicas e as análises moleculares. Isolados com padrões similares de bandas se comportem de forma diferente na patogenicidade (XIAO et al., 2004).

A análise genética da população pode contribuir para o entendimento do potencial evolutivo do gênero *Colletotrichum* neste patossistema, possibilitando o desenvolvimento de estratégias de manejo e controle apropriadas. É sabido que espécies de *Colletotrichum* possui limitada dispersão a longas distâncias e que o material vegetal infectado é a principal via de dispersão. Portanto, infere-se que a troca de material vegetal infectado dentre e entre os municípios possam ser responsáveis pela disseminação de isolados desse patógeno. O provável movimento de indivíduos entre regiões contribui para a não correlação entre distância genética e geográfica, reforçando a probabilidade de fluxo do patógeno via material vegetal infectado, em que o mesmo padrão de formação de bandas pôde ser encontrado em isolados provenientes de municípios distantes.

Este é o primeiro estudo relatando a diversidade genética em populações de *Colletotrichum* associadas à antracnose da pimenta-de-cheiro via Ap-PCR no Estado do Amazonas. Essa técnica pode ser uma alternativa viável para estudos de variabilidade de *Colletotrichum*, visto que fungos desse gênero, quando analisados em relação à morfologia, testes bioquímicos e fisiologia, são bastante variáveis e mostram-se bastante influenciados pelas condições ambientais.

6.3 Caracterização patogênica

Os tipos de *Capsicum* testados mostraram reação de sensibilidade diferenciada aos isolados inoculados. Por outro lado, os isolados apresentaram grande variação na agressividade, com base no diâmetro da lesão, quando inoculados nos quatro tipos de *Capsicum*. Os isolados apresentaram maior agressividade aos frutos de seu hospedeiro de origem. O mesmo já foi detectado por Fernandes et al (2002). Essas variações nos níveis de infecção dos isolados demonstram diversidade patogênica inter e intra-específica. Os isolados de pimenta-de-cheiro apresentaram maior agressividade em frutos de pimentão enquanto que em frutos de pimenta murupi foram pouco agressivos ou não patogênicos.

Esta variação na patogenicidade poderia estar ligado a variação geográfica da população patogênica, fato observado em estudos de Than et al (2008). A variação na patogenicidade também foi observada no trabalho de Fernandes et al (2002) e Gunawardhana et al (2009), os autores confirmaram o potencial de infecção cruzada de alguns isolados de *C. gloeosporioides* e identificaram a presença de hospedeiros específicos. De acordo com Freeman et al (1998), o sucesso da infecção cruzada é devido a capacidade de adaptação genética do fungo, quando em contato com um novo hospedeiro.

A maioria dos isolados foram patogênicos a pelo menos três dos quatro tipos de *Capsicum* utilizados neste estudo, produzindo sintomas característicos de antracnose aos dez dias após a inoculação (DAI). Os primeiros sintomas apareceram aos dois DAI. O tempo para aparecimento de sintomas está relacionado com o comportamento hemibiotrófico do gênero *Colletotrichum* (MÜNCH et al., 2008; SHARMA; KULSHRESTHA, 2015), resistência do hospedeiro e agressividade do isolado (CHONGO et al., 2002).

De acordo com Münch et al (2008), a fase necrotrófica do ciclo do fungo começa entre 48 a 72 horas após a inoculação dependendo das condições ambientais. O processo de infecção das espécies de *Colletotrichum* envolve uma sequência comum de eventos composta por adesão do conídio, germinação, alongação do tubo germinativo, formação do apressório, desenvolvimento do *peg* de infecção, penetração de células epidérmicas, crescimento de hifas intracelularmente, necrose celular e desenvolvimento de lesões (JEFFRIES et al., 1990).

Foi observado variações no crescimento de lesões nos frutos testados. Essas variações no tamanho das lesões da antracnose são explicadas por Freeman; Katan (1998) ao relatarem a ocorrência de alto grau de variabilidade genética do *C. gloeosporioides* o que determina diferenças comportamentais quanto a agressividade. Fernandes et al (2002), relatam que o gênero *Colletotrichum* apresenta grande variabilidade de agressividade.

Embora tenha-se tido o cuidado de padronizar o estágio de maturação dos frutos utilizados neste trabalho. Foi observado que alguns isolados não provocaram lesões ou formaram lesões com menores diâmetros em frutos imaturos das espécies de *Capsicum* utilizadas na pesquisa. Esta diferença indica a variação na agressividade do agente patogênico em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto. Reações diferenciais influenciadas pelo estágio de desenvolvimento dos frutos de *Capsicum* spp. inoculados com diferentes espécies de *Colletotrichum* foram observados por Mongkolporn et al (2010); Garg et al (2013) e Silva et al (2014).

Sabe-se que frutos de *Capsicum* são climatéricos. Frutos climatéricos apresentam composição muito variável, passando por várias modificações no decorrer de seu amadurecimento, a qual algumas delas podem influenciar no desenvolvimento do patógeno. Segundo Barkai-Golan (2001), durante as etapas de amadurecimento os carboidratos insolúveis são convertidos em açúcares solúveis necessários ao desenvolvimento do fungo, que sai do seu período de incubação e entra em atividade patogênica. Um dos principais constituintes dos frutos, são as pectinas, carboidratos insolúveis, que formam barreiras mecânicas nos frutos, ajudando estes na defesa contra os microrganismos, o que pode explicar a baixa incidência e severidade nos diferentes tratamentos onde a inoculação foi feita sem ferimentos.

Outro fator intrínseco às espécies de *Capsicum* spp. que pode ter influenciado na agressividade dos isolados de *Colletotrichum* é a presença de genes de resistência que controlam a antracnose. Estudos realizados por Pakdeevaporn et al (2005) e Mahasuk et al (2009b), mostraram que genes de resistência distintos controlam a resistência à antracnose em frutos imaturos e maduros. A resistência de *Capsicum* spp. ao *Colletotrichum capsici* está relacionada a três diferentes genes (*co1*, *co2* e *co3*), todos recessivos, identificados a partir de *Capsicum chinense* acesso PBC932, que resultam em reação de hipersensibilidade (RH), mas sendo expressos em diferentes estádios de crescimento da planta (plântulas; frutos verdes e maduros; fruto vermelhos maduros). Especificamente no estágio de fruto vermelho do pimentão, o gene *PepEST* teve uma alta expressão, inibindo a formação de apressórios pelo fungo. A identificação de genes diferentes, atuando em diferentes estádios de crescimento, é importante para o melhoramento de *Capsicum* visando à resistência à antracnose e também o fato de que as estratégias de manejo devem ser implementadas na fase adequada do desenvolvimento do fruto para o máximo controle da doença.

Quanto a incidência (%) e severidade (%) foi observado que frutos de pimenta murupi apresentaram porcentagens menores para ambas características. A ausência de sintomas em alguns frutos não significa que o patógeno não iniciou o processo de infecção. Conforme Amorim (1995), caracteriza-se como período latente o tempo decorrido entre a inoculação (contato entre patógeno e o hospedeiro) até o aparecimento de estruturas reprodutivas do patógeno. Existe variabilidade quanto a latência dentro de um mesmo patossistema. Latência maior indica maior resistência da planta à colonização. Esta é uma variável importante para estabelecer o grau de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro. Período latente longo significa menor número de ciclos do patógeno sobre determinada variedade, num sistema policíclico. Consequentemente, deverá haver menor quantidade de doença ao final do ciclo da cultura. Este é um dos parâmetros que mais influencia a velocidade de crescimento da epidemia. Em um patossistema em particular, o período latente reflete o comportamento do patógeno em interação com o hospedeiro e o ambiente. Longos períodos latentes indicam hospedeiro resistente e/ou menos agressivos e/ou ambiente desfavorável. É bem evidente que as espécies de *Capsicum* utilizados no estudo com maior período latente também apresentaram menor incidência, agressividade e diâmetro da lesão.

Analisando os dados obtidos com incidência (%), foi observado um aumento gradativo da primeira avaliação aos 2 DAI para a última avaliação aos 10 DAI. Somente os frutos de pimenta murupi apresentaram incidência inferior a 20% aos 10 DAI. Isso significa haver associação com outros parâmetros que reduzem a expressão da resistência como menor velocidade de crescimento da lesão e período latente prolongado. Santos et al (2004), estudaram a severidade da antracnose em frutos verdes e maduros de *C. baccatum*. Foi verificado que os maiores diâmetros das lesões aos 8 DAI foram 27,1 e 29,1 mm, respectivamente. Bueno (2005), constatou que frutos de pimentão verde sem ferimentos, inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp. apresentavam longo período de incubação variando de 8 a 19 dias, e só demonstravam sintomas no final do processo de maturação. Demonstrando que o tempo de avaliação utilizado neste estudo pode ter relação direta com a incidência e severidade apresentada pelos isolados.

Esta diferença na agressividade e incidência pode ser explicada pelas diferenças existentes nas propriedades bioquímicas dos frutos de *Capsicum*. Kim et al (1999), demonstraram que frutos verdes possuem elevada atividade de peroxidases e polifenol-oxidases em relação a frutos vermelhos, mas baixos níveis de fenólicos totais, aminoácidos e carboidratos, os quais tem sido relatado na resistência do hospedeiro. Frutos de plantas

resistentes à antracnose produzem altas concentrações de capsaicinóides e ácido ascórbico e baixas concentrações de açúcares em comparações às plantas suscetíveis (PEREIRA, 2005). Já as plantas suscetíveis, por sua vez, têm inibição de ácido ascórbico, resultando no acúmulo de H_2O_2 e aceleração da morte celular (DO, 2003).

Os isolados quando inoculados em frutos de pimenta dedo-de-moça, formaram lesões de menor diâmetro se comparado com as lesões formadas em pimentão e pimenta-de-cheiro, respectivamente. Essas divergências podem ser explicadas pela diferença entre as estratégias de patogenicidade, visto que as espécies de *Colletotrichum* produzem uma faixa ampla de enzimas capazes de destruir os componentes estruturais dos tecidos das plantas (BAILEY et al., 1992). O fungo atua na busca por nutrientes, degradando várias substâncias como celulose, lipoproteínas, e entre outras o amido, para atender aos requerimentos exigidos às suas atividades fisiológicas. É nesta fase que as espécies podem se diferenciar no requerimento de amido, durante o desenvolvimento da patogênese. Esta explicação também se aplica ao crescimento micelial, porque o meio utilizado continha amido de batata.

O isolado REPD01 só foi patogênico quando inoculado no seu hospedeiro de origem, não sendo capaz de infectar outros frutos, confirmando com o que citam Bonett et al (2010), que o gênero *Colletotrichum* apresenta grande variabilidade no seu potencial de agressividade e Gunawardhana et al (2009) que confirmaram o potencial de infecção cruzada de alguns isolados de *C. gloeosporioides* e identificaram a presença de hospedeiros específicos. Estrada et al (2000), também sugeriram existir ecotipos em *C. gloeosporioides*, mesmo havendo semelhanças genéticas entre eles.

Testes de patogenicidade *in vitro* mostraram que isolados de *C. acutatum* da Austrália, de pessegueiro, *blueberry*, pimentão, uva, manga, azeitona, morango e tomate foram capazes de ocasionar sintomas em uva, *blueberry* e morango, indicando a ausência de especificidade fisiológica (WHITELAW-WECKERT et al., 2007). Da mesma forma, isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pessegueiro, maçã, abacate, manga e noz-pecã e isolados de *C. acutatum* obtidos de maçã, pêssego e noz-pecã ocasionaram sintomas em todas as frutas com níveis variáveis de infecção (FREEMAN; SHABI, 1996), reforçando a inespecificidade apontada. Em outro estudo, isolados de *C. acutatum* mostraram-se patogênicos para abacate, goiaba, mamão, manga e maracujá (PERES et al., 2002). Por sua vez, isolados de *C. gloeosporioides* de manga não foram capazes de ocasionar sintomas típicos de antracnose em pimentão (THAN et al., 2008).

De modo geral, devido às grandes variações do teste de patogenicidade, os grupos formados pela análise estatística do diâmetro médio das lesões não estão diretamente relacionados ao agrupamento construído com os *primers* arbitrários pela técnica Ap-PCR. Porém, com base nos resultados, supõe-se que o subgrupo VI-B do dendograma seja considerado o mais agressivo.

Em vista dos resultados ora apresentados, estudos complementares são necessários para auxiliarem no esclarecimento da identidade taxonômica do agente causal da antracnose da pimenta-de-cheiro, como trabalhos voltados à histologia da interação patógeno-hospedeiro, de estrutura populacional através de uma amostragem mais ampla entre as regiões produtoras, busca da existência de raças através de cultivares diferenciadas, até estudos utilizando marcadores moleculares que atuem no DNA ribossomal, para melhor compreensão e posteriores avanços nos estudos e no controle da doença.

7. CONCLUSÕES

Existe uma ampla variabilidade morfológica e cultural dentro e entre os isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose em frutos de pimenta-de-cheiro no estado do Amazonas, o que dificulta a identificação morfológica do agente etiológico.

A genotipagem dos isolados pela técnica Ap-PCR possibilitou a observação de alta diversidade genética, indicando que pode haver um complexo de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose da pimenta-de-cheiro.

Os isolados de *Colletotrichum* causaram lesões em frutos de pimenta-de-cheiro, pimentão e pimenta dedo-de-moça.

Somente os isolados IRPD03, PFPD22, REPD10, MQPD03 e MQPD08 foram patogênicos a pimenta murupi, sugerindo que esta espécie possui mecanismos de defesas eficientes contra isolados de *Colletotrichum* spp.

O isolado REPD01 foi patogênico somente em sua hospedeira de origem, sugerindo a ocorrência de especificidade fisiológica neste patossistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANG, M. M., et al. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Journal of Phytopathology*, Berlin, 2006, v.154, p.51-61.

ALBERTS, B., et al. *Molecular biology of the cell*. New York. 1994, 1294 p.

AFANADOR-KAFURI, L., et al. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, New York, 2003, v.93, n.5, p.579-587.

AGRIOS, G. N., *Plant pathology*. 5ª Ed. Academic Press, San Diego. 2005, 922 p.

ALFENAS, A. C., et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. *Métodos em Fitopatologia*. Ed UFV, 2007, p. 53-90.

ALMEIDA, L. B de, Diversidade e identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* associados ao gênero *Capsicum* no Amazonas. 2015. 55f. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus.

ALMUDI, T.; PINHEIRO, J. O. C. *Dados Estatísticos da Produção Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas: Ano 2013*. 1. ed. Manaus / Amazonas / Brasil: Embrapa Amazônia Ocidental, 2015, v. 1. 108 p.

AMORIM L. Colonização e reprodução. In: BERGAMIN FILHO A; KIMATI H; AMORIM L (eds). *Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos*. 3ed São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995, p. 308-309.

ANDERSON, J. M., et al. Morphological and molecular diversity of *Colletotrichum* spp. causing pepper spot and anthracnose of lychee (*Litchi chinensis*) in Australia. *Plant Pathology*, 2013, v. 62, p. 279-288.

ANDRADE, E. M., et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 2007, v. 32, n. 1, p. 21-31.

ANDREWS, J. *Peppers: the domesticated Capsicum*. Austin: University of Texas Press, 1995, 170 p.

ANSARI, K. I., et al. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. Plant Pathology, Oxford, 2004, v.53, p.635-642.

AZEVEDO, J. L. Microorganisms Genetics. Editora UFG, Goiânia-GO, 2009, 536 p.

BAILEY, J. A.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology control. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992, 388 p.

BAILEY, J. A., et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Londres: CAB International, 1992, p.88-120.

BARBOZA, G. E., et al. New Endemic Species of *Capsicum* (Solanaceae) from the Brazilian Caatinga: Comparison with the Re-Circumscribed *C. parvifolium*. Systematic Botany, 2011, v. 36, n. 3, p. 768-781.

BARBOZA, G. E.; BIANCHETTI, L.B. Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. Systematic Botany, 2005, v. 30, n. 4, p. 863-871.

BARGUIL, B. M., et al. Identificação e variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais. Ciência Rural, Santa Maria, 2009, v. 39, n. 6, p. 1639-1646.

BARKAI-GOLAN, R. Postharvest diseases of fruit and vegetables: development and control. Elsevier, Amsterdam, 2001, p. 27-32.

BENTES, J. L. S.; COSTA NETO, P. Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. Acta Amazônia, 2011, v. 41, n. 2, p. 251-256.

BERG-DOUGLAS, E; AKOPYANTS, N. S.; KERSULYTE-DANGERUTA. Fingerprinting Microbial Genomes Using the RAPD or AP-PCR Method. Methods-in-Molecular-and-Cellular-Biology, 1994, v.5, n. 1, p.13-24.

BONETT, L.P., et al. Caracterização morfo cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. Ambiência, 2010, v.6, n. 3, p. 451-463.

BUENO, C.R.N.C. Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas. 2005. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – ESALQ, Piracicaba.

CAI, L., HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity, 2009, v. 39, p. 183–204.

CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology and Host-pathogen Interaction. St. Paul: APS Press, 2000, p.1-20.

CANNON, P.F, et al. *Colletotrichum* – current status and future durections. Studies in Mycology, Utrecht, 2012, v.73, p. 181-213.

CARVALHO, S. I. C. BIANCHETTI, L. B. Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp.). Embrapa Hortaliças. 2007. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/doencas.html>. Acesso em: 19 junho 2014.

CARVALHO, S. I. C., et al. Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2008, 4 p.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1939, v. 42, p. 225-226.

CHONGO, G.; GOSSEN, B. D.; BERNIER, C. C. Infection by *Colletotrichum truncatum* in resistant and susceptible lentil genotypes. Canadian Journal Plant Pathology, 2002, v.24, p. 81-85.

COSTA, L. V., et al. Polinização e fixação de frutos em *Capsicum chinense* Jacq. Acta Amazonica;vol, 2008, v. 38, n. 2, p. 361 – 364.

CRUZ, C.D. Program Genes: multivariate analysis and simulation. UFV, Viçosa-MG. 2006. 175 p.

DENOYES-ROTHAN, B., Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. Phytopathology, 2003, v. 93, n. 2, p. 219-228.

DE WITT, D.; BOSLAND, P. W. The complete Chile pepper book. A gardener's guide to choosing, growing, preserving and cooking. London: Portland, 2009.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Rota: CRC Press Inc, 1995, 434 p.

DO, H. M., et al. Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, v. 16, n. 3, p. 196–205.

DON, L.D., *Colletotrichum* spp. Attacking on Chilli Pepper Growing in Vietnam. Country Report. In: OH, D.G., KIM, K.T. (Eds.), Abstracts of the First International Symposium on Chilli Anthracnose. National Horticultural Research Institute, Rural Development of Administration, Republic of Korea, 2007, p. 24.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA HORTALIÇAS. Sistemas de Produção de Pimentas (*Capsicum* spp.), 2007. Disponível em: <[http://www.cnpq.embrapa.br/sistprod/pimenta/sistema de produção.htm](http://www.cnpq.embrapa.br/sistprod/pimenta/sistema_de_producao.htm)>. Acesso em: 15 junho 2016.

ESTRADA, A. B.; DODD, J. C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Pathology, Oxford, 2000, v. 49, n. 5, p. 608-618.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220 p.

FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, R. L. D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. Summa Phytopathologica, Botucatu, 2002, v.28, n.4, p. 325-330.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT. Agricultural production. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 13 janeiro 2015a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT. Agricultural trade. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>> . Acesso em: 13 janeiro 2015b.

FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, v. 49, p. 395-404.

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

FREEMAN, S., et al. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. *Phytopathology*, New York, 2001, v.91, p. 586–592.

GARG, R., et al. Novel source of resistance and differential reactions on chilli fruit infected by *Colletotrichum capsici*. *Australasian Plant Pathology*, 2013, v. 42, p. 227-233.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; BERNI, R. F. A antracnose da pimenta de cheiro. EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL. Manaus, 2014. Comunicado Técnico nº 104, p. 1-3.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. *Summa Phytopathologica*. Jaboticabal, 1997, v. 23, n. 1, p. 4-10.

GUNAWARDHANA, P. L. T., et al. A phenetic analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from selected host plants. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, Sri Lanka, 2009, v. 38, n. 2, p. 57-66.

HANADA, R. E., et al. Ocorrência de *Colletotrichum* sp. em pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense*) no Amazonas. EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL. Manaus, 2011. 1 p.

HEILMANN, L. J., et al. Genetic variability in the potato pathogen *Colletotrichum coccodes* as determined by amplified fragment length polymorphism and vegetative compatibility group analyses. *Phytopathology*, New York, 2006, v.96, p. 1097-1107.

HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C. Mercado e comercialização. In: RIBEIRO, C.S.C, LOPES, C.A., CARVALHO, S.I.C., HENZ, G.P. REIFSCHNEIDER, F.J.B (eds.). *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008, p. 15-24.

HILL, T. A., et al. Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene pepper genechip. *plos one*, 2013, v. 8, p. 1-16.

HYDE, K. D., et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal diversity*, Chiang Mai, 2009, v.39, p.1-17.

INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO E FLORESTAL SUSTENTÁVEL DO ESTADO DO AMAZONAS – IDAM. Relatório de Atividades. Manaus, 2014. 57 p.

JEFFRIES, G.I., et al. *Colletotrichum* species on tropical fruits. Plant Pathology, London, 1990, v.39, n.3, p. 343-366.

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

KILAMBO D. L., et al. Characterization of *Colletotrichum kahawae* Strains in Tanzania. International Journal of Microbiology Research, 2013, v. 5, p. 382-389.

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

KIM, H., et al. Potential of crossinfection of *Colletotrichum* species causing anthracnose in persimmon and pepper. The Plant Pathology Journal, Suwon, 2009, v.25, n.1, p.13-20.

KUMAR, O. A.; TATA, S. S. Ascorbic acid contents in chili peppers (*Capsicum* L.). Notulae Scientia Biologicae, 2009, v. 1, n. 1, p. 50-52.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. Revista Unimar, Marília, 1997, v. 19, p. 683-689.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das Solanáceas. In: KIMATI, H., AMORIN, L. BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997, v.2. p.665-675.

LIAO, C. Y., et al. Characterization of tree *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. Plant Pathol, 2012, v. 133, p. 599-608.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. Journal of Basic Microbiology, 1993, v. 33, p. 413-426.

LOBO JR., M; SILVA-LOBO, V. L; LOPES, C. A. Reação de genótipos de *Capsicum* spp. (pimentas e pimentão) à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Fitopatologia Brasileira 26 (suplemento), 2001, p. 373

LOPES, C. A. Uso da diversidade genética de pimentas e pimentão para o desenvolvimento de genótipos de interesse do agronegócio brasileiro. Embrapa hortaliças. (2002). Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/projetos/capsicum/Indexf-3sub1.htm>>. Acesso em: 02 outubro 2014.

LOPEZ, A. M. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 2001, v. 9, p. 291-337.

MAFACIOLI, R., et al. Caracterização morfofisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. Summa Phytopathologica, 2006, v. 32, p. 113-117.

MAHASUK, P., et al. Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) at seedling and fruiting stages in chili pepper (*Capsicum* spp.). Plant Breeding, 2009a, v.128, p. 701-706p.

MAHASUK, P.; TAYLOR, P. W. J. E. O.; MONGKOLPORN, O. Identification of Two New Genes Conferring Resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Capsicum baccatum*. Phytopathology, 2009b, n. 99, p. 1100-1104.

MAYMON, M., et al. Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). Phytopathology, 2006, v. 96, n. 5, p. 542-548.

MACKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research, Washington, 1923, v. 26, p. 195-217.

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

MEYER, W.; MITCHELL, T. G. Polimerase chain reation fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. Electrophoresis, 1995, v. 16, p. 1648-1656.

MICHEREFF, S.; BARROS, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. UFRPE, Imprensa Universitária, 2001, 368 p.

MILLA, A. *Capsicum* de capsas, cápsulas e pimentos. Pimentos. Compêndios de Horticultura. 2006. Capítulo 2, p. 21-31.

MONGKOLPORN, O., et al. Differential reactions on mature green and ripe chili fruit infected by three *Colletotrichum* spp., 2010, v. 94, n. 3, p. 306-310.

MOREIRA, G. R., et al. Espécies e variedades de pimenta. Informe Agropecuário, Belo Horizonte: EPAMIG, 2006, v. 27, n. 235, p. 16-29.

MORTENSEN, J. M.; MORTENSEN, J. E. The Power of capsaicin. Journal of Continuing Education: Topics & Issues, 2009, v. 11, n. 1, p. 8-13.

MOSCONE, E. A., et al. The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. Acta Horticulturae, 2007, v. 745, p. 137-169.

MÜNCH, S., et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. Journal of Plant Physiology, 2008, v. 165, p. 41-51.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARAITE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp. and taxonomic implications. Mycology Research, 2002, v. 106, n. 5, p. 579-593.

MUNSELL COLOR COMPANY. Munsell soil color charts. Baltimore, 1975. 13 p.

NASCIMENTO, R.J. Caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas às podridões em frutos de mamoeiro. 2009. 86f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NGUYEN, P. T. H., et al. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, 2010, v.127, p.73-87.

NGUYEN, P. T. H., et al. Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. Plant Pathology, Oxford, 2009, v.58, p. 898-909.

OH, B. J.; KIM, K. D.; KIM, Y. S. Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Phytopathology, 1999, v. 147, p. 547-552.

PAKDEEVARAPORN, P., et al. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. Plant Breeding, 2005, v. 124, n. 2, p. 206-208.

PEREIRA, W. V. Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no estado de São Paulo. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ. Piracicaba, São Paulo.

PEREIRA, M. J. Z. Reação de acessos de *Capsicum* spp. a *Colletotrichum* sp. agente causal da antracnose das solanáceas. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ. Piracicaba, São Paulo.

PERES, N. A. R., et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. Journal of Phytopathology, Berlin, 2002, v. 150, n. 1, p. 128-134.

PERES, A. P., et al. Variabilidade morfo cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. Ciência Agrotécnica, Lavras, 2003, v. 27, n. 5, p. 1053-1062.

PERUCKA, I.; MATERSKA, M. Antioxidant vitamin contents of *Capsicum annuum* fruit extracts as affected by processing and varietal factors. Acta Scientiarum Polonorum. Technol Aliment, 2007, v. 6, n. 4, p. 67-74.

PHOTITA, W., et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. Fungal Diversity, 2005, v. 18, p. 117-133.

PURKAYASTHA, J., et al. *Capsicum assamicum* sp. (Solanaceae), from Assam, northeastern India. Ozean Journal of Applied Sciences, 2012, v. 5, n. 1, p. 55-66.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology, 1985, v. 1, p. 17-20.

RAMCHIARY, N., et al. Application of genetics and genomics towards *Capsicum* translational research. Plant Biotechnology Reports, 2013, p. 1-23.

RAMPERSAD, S.N. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Disease*, 2011, v. 95, p. 1244-1254

RÊGO, E. R., et al. Testing methods for producing self-pollinated fruits in ornamental peppers. *Horticultura brasileira*, 2012, v. 30, p. 669-672.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. *Capsicum* - pimentas e pimentões no Brasil. Brasília. Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças, 2000, 113 p.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; HENZ, G. P. Antracnose em hortaliça da família Solanaceae. Embrapa Hortaliças, 2009. Circular Técnica nº 79, p. 1-9.

ROJAS-MARTÍNEZ, R. I.; ZAVALA-MEJÍA, E.; NIETO-ÁNGEL, D. Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Obregón, 2008, v. 26, p. 21-26.

ROY, K. W.; KILLEBREW, J. F.; RATNAYAKE, S. First report of *Colletotrichum capsici* on bell pepper in Mississippi. *Plant Disease*, 1997, v. 81, p. 693.

SAHA, T., et al. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphism. *Mycology Research*, 2002, v. 106, n. 2, p. 215-221.

SAIKI, R. K., et al. Enzymic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 1985, v. 230, p. 1350- 1354.

SALGADO, A. P. S. P., et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolares sorokiniana*. *Ciência e Agrotecnologia*, 2003, v. 27, p. 249-254.

SANTOS, M. R. dos, et al. Reação de frutos verdes e maduros de *Capsicum* spp. a antracnose. *Fitopatologia Brasileira*, 2004, v. 29, p. 58.

SANTOS, P. C. das M., et al. Diversidade genotípica de *Colletotrichum musae* no Estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP, 2015, v. 37, n. 2, p. 355-366.

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI, R.; SINGH, H. B. Molecular, phenotypic and pathogenic variability in *Colletotrichum* isolates of subtropical region in north-eastern India, causing fruit rot of chillies. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, p. 1-13.

SHARMA, M.; KULSHRESTHA, S. *Colletotrichum gloeosporioides*: An Anthracnose Causing Pathogen of Fruits and Vegetables. *Biosciences biotechnology research asia*, 2015, v. 12, n. 2, p. 1233-1246.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: *WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE*, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, S. A. M., et al. Resistance in *Capsicum* spp. to anthracnose affected by diferente stages of fruit development during pre-and pos-harvest. *Tropical Plant Pathology*, 2014, v. 39, n. 4, p. 335-341.

SILVA-MANN, R., et al. AFLP markers differentiate *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 2005, v.30, p.169-172.

SIMMONDS, J. H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal Agriculture and Animal Science*, 1965, v.22. p. 437-459.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological cultural, and phatogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*, Saint Paul, 1990, v. 74, n. 1, p. 69-76.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco, USA. 1973, 573 p.

SPILLER, F., et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan and antigen-induced inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2008, v. 60, n. 4, p. 473-478.

STOMMEL, J. R.; GRIESBACH, R. J. *Capsicum annuum* L. Lil' Pumpkin™ and Pepper Jack™. *HortScience*, 2008, v. 43, n. 3, p. 935-938.

SUTTON, B. C. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980, 690 p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford: Redwood, 1992, 388 p.

TALHINHAS, P., et al. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 2005, v. 71, n. 6, p. 2987-2998.

TALHINHAS, P., et al. Genetic and morphological characterisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, Saint Paul, 2002, v. 92, n. 9, p. 986-996.

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

THAUNG, M. M. Coelomycete systematic with special reference to *Colletotrichum*. *Mycoscience*, Tokyo, 2008, v. 49, n. 9, p. 345-350.

TONG, N.; BOSLAND, P. W. Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of *Capsicum buforum* and *C. lanceolatum*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2003, v. 50, p. 193-199.

TORRES-CALZADA, C., et al., Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *Plant Pathol*, 2011, v. 135, p. 67-69.

TOZZE JR., H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA JR., N. S. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. Isolates from solanaceous crops. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 2006, v. 32, n. 1, p. 71-79.

TOZZE JR., H. J. Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Piracicaba, São Paulo.

TOZZE JR., H. J.; BUENO, C. R. N.; MASSOLA, JR., N. S. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* sp. de hortaliças solanáceas. *Summa Phytopathologica*, 2004, v. 30, n. 1, p. 73.

TOZZE JR., H. J., et al. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose on pepper in Brazil. Plant Disease, 2009, v. 93, p. 106.

TOZZE JR, H. J., et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica, 2015, v. 41, n. 4, p. 270-280.

USDA-ARS. Grin species records of *Capsicum*. Beltsville, Maryland: National Germplasm Resources Laboratory. 2014. Disponível em: <<http://www.arsgrin.gov/cgi-bin/npgs/html/exsplist.pl>>. Acesso em: 14 novembro 2014.

VALÉRIO, H. M., et al. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. Mycopathologia, 2005, v. 159, p. 449-459.

WALSH, B. M.; HOOT, S. B. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: The chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy introns. Int. J. Plant Sci., 2001, v. 162, n. 6, p. 1409-1418.

WATSON, J. D., et al. Recombinant DNA. 2^a ed. NeW York: Freeman and Company. 1992.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, Oxford, 1990, v.18, p.7213-7218.

WEEDS, P. L., et al. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. Phytopathology, 2003, v. 93, n. 2, p. 176-185.

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

WHITELAW-WECKERT, M. A., et al. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. Plant Pathology, Oxford, 2007, v.56, p. 448-463.

WILLIAMS, J. G. K., et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 1990, v. 18, p. 6531-6535.

XIAO, C. L.; MACKENZIE, S. J.; LEGARD, D. E. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. Phytopathology, 2004, v. 94, p. 446-453.