Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum*
associadas à antracnose do pimentão
(*Capsicum annuum*) no Brasil

Hugo José Tozze Júnior

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba

2007

Hugo José Tozze Júnior
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à
antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**

Orientador:
Prof. Dr. NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Tozze Júnior, Hugo José

Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil / Hugo José Tozze Júnior. - - Piracicaba, 2007.
81p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Antracnose 2. Fungo fitopatogênico 3. Pimentão I. Título

CDD 635.643

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A meus pais Hugo José Tozze e Vera Lúcia Paladini Tozze,

A minha irmã Débora Jackeline Tozze,

Aos meus avós (*in memoriam*) Heleno, Sinira Tozze e Lazaro Paladini,

A Ana Carolina Firmino,

Pelo carinho e pelos exemplos de dignidade, dedicação e perseverança,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a oportunidade de concretizar minhas metas;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior pela orientação e pela amizade;

Aos funcionários da Sakata Seed Sudamerica, em especial aos pesquisadores Rômulo Kabori, Olga Suzuki, Ricardo Gioria, Renato Braga e Kátia Brunelli, pelo auxílio técnico e pelas sugestões durante a realização dos experimentos;

Aos pesquisadores Stanley Freeman (The Volcani Center, Israel), Jouji Moriwaki (National Institute Research Center, Japão) e Eiko Kuramae (CBS-Fungal Biodiversity Center, Holanda), pelo fornecimento de amostras de DNA dos isolados padrões utilizados nos experimentos;

Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia e da biblioteca da ESALQ, pelos ensinamentos e colaboração;

Ao CAPES e ao CNPq, pelo auxílio financeiro através de concessão de bolsa;

Aos colegas e amigos do Setor de Fitopatologia em especial a Alejandro Rago, Cassiara Bueno, Diogo Togni, Gleiber Furtado e Ivan Fischer, pela amizade e colaboração em trabalhos realizados durante minha graduação e mestrado;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão bibliográfica	15
2.1.1 Aspectos gerais da antracnose do pimentão	15
2.1.2 Métodos de caracterização e identificação de <i>Colletotrichum</i> spp.	17
2.1.3 Patogenicidade de espécies de <i>Colletotrichum</i> a <i>Capsicum</i> spp.	23
2.1.4 Sensibilidade a fungicidas	25
2.2 Material e métodos.....	28
2.2.1 Obtenção e preservação dos isolados	28
2.2.2 Caracterização cultural.....	31
2.2.3 Caracterização morfológica.....	32
2.2.4 Identificação molecular.....	34
2.2.4.1 Extração e padronização da concentração de DNA.....	34
2.2.4.2 Análise por PCR.....	35
2.2.5 Caracterização patogênica.....	37
2.2.5.1 Isolados utilizados nas inoculações	37
2.2.5.2 Inoculações	37
2.2.5.3 Avaliações	38
2.2.5.4 Delineamento experimental e análise estatística	39
2.2.6. Sensibilidade a fungicidas	39
2.3 Resultados e discussão.....	41
2.3.1 Caracterização cultural.....	41
2.3.2 Caracterização morfológica.....	46

2.3.3 Identificação molecular	51
2.3.4 Distribuição e frequência das espécies de <i>Colletotrichum</i> na população amostrada.....	54
2.3.5 Caracterização patogênica.....	56
2.3.6 Sensibilidade a fungicidas	62
3 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73

RESUMO

Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil

A antracnose é uma das doenças mais importantes do pimentão em vários países. Por muitos anos, somente *C. gloeosporioides* foi relatado como agente causal da antracnose desta cultura no Brasil. Entretanto, recentemente *C. acutatum* e *C. capsici* também tem sido associados a esta doença em algumas regiões do país. Neste trabalho, 56 isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão e procedentes de diferentes regiões produtoras do país foram caracterizados e identificados por meio de algumas características morfológicas e culturais, e pela análise por PCR utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos. Isolados representativos de cada espécie identificada na população amostrada também foram caracterizados quanto à patogenicidade em frutos de pimentão verdes e maduros, feridos e não feridos e quanto a sensibilidade aos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol, tebuconazol, captana, clorotalonil e cloreto de benzalcônio. Os resultados demonstram que *C. acutatum* é a espécie predominante nas principais regiões produtoras de pimentão do país, representando cerca de 72% da população amostrada. *C. capsici* foi encontrada com frequência aproximada de 14%, nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *C. gloeosporioides* representou apenas 5% da população amostrada e teve distribuição restrita ao estado de São Paulo e ao Distrito Federal. Um único isolado de *C. coccodes* foi encontrado no Rio Grande do Sul. Além dessas espécies, isolados identificados como *C. boninense* foram encontrados em São Paulo e no Rio Grande do Sul, com frequência de 7% na população amostrada. Este parece ser o primeiro relato de *C. boninense* infectando pimentão no Brasil e em outras partes do mundo. A caracterização patogênica mostrou que isolados representativos de todas as espécies foram patogênicos aos frutos maduros feridos e não feridos. Nos frutos verdes feridos, apenas os isolados de *C. acutatum* e de *C. capsici* promoveram sintomas. Não foram observados sintomas nos frutos verdes sem ferimentos durante o período de avaliação do experimento (12 dias) para nenhum dos isolados. *C. acutatum* demonstrou ser a espécie mais agressiva, apresentando os menores períodos de latência e a maior esporulação tanto em frutos verdes (feridos) como nos maduros (feridos e não feridos). Os isolados pertencentes a diferentes espécies de *Colletotrichum* apresentaram sensibilidade diferenciada para todos os fungicidas sistêmicos avaliados. Os isolados de *C. acutatum* foram mais sensíveis a azoxistrobina, enquanto os isolados de *C. gloeosporioides* demonstraram a menor sensibilidade para este fungicida. Os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. boninense* foram os mais sensíveis aos benzimidazóis (carbendazim e tiabendazol), enquanto o isolado de *C. coccodes* teve a menor sensibilidade para estes fungicidas. O fungicida tebuconazol promoveu o maior controle sobre o crescimento micelial dos isolados. Para este fungicida, *C. capsici* demonstrou ser a espécie menos sensível. Os resultados deste trabalho demonstram a presença de pelo menos cinco espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela antracnose do pimentão no país e evidenciam a presença de importantes diferenças entre essas, que devem ser consideradas durante o manejo da doença.

Palavras-chaves: *Colletotrichum acutatum*; *Colletotrichum boninense*; *Colletotrichum capsici*; *Colletotrichum coccodes*; *Colletotrichum gloeosporioides*;
Variabilidade

ABSTRACT

Characterization and identification of *Colletotrichum* species associated to anthracnose in pepper (*Capsicum annuum*) in Brazil

In several countries, anthracnose is one of the most serious diseases in pepper. *C. gloeosporioides* has, for many years, been reported as the causal agent of anthracnose in Brazil. *C. acutatum* and *C. capsici* have only recently been reported as agents of anthracnose in some regions of the country. In this study, 56 isolates of *Colletotrichum* obtained from pepper from different areas of the country were characterized and identified based on the morphological characteristics of the conidia, as well as culture characteristics and PCR analysis with species-specific pairs of primers. Isolates representative of each identified species in the sampled population were also characterized according to their pathogenicity in pepper fruits (unripe, ripe, wounded and nonwounded) and also according to their sensitivity to fungicide (azoxystrobin, carbendazim, thiabendazole, tebuconazole, captan, chlorothalonil and benzalkonium chloride). The results have showed that *C. acutatum* is the most prevalent species found in the main production areas of pepper, present in about 72% of the sampled population. *C. capsici* was equivalent to 14% of the sampled population and found in the states of São Paulo and Minas Gerais. *C. gloeosporioides* was present in only 5% of the samples and it was restricted to the state of São Paulo and Distrito Federal. Only one isolate of *C. coccodes* was found in Rio Grande do Sul. Besides these species, isolates of *C. boninense* were found in São Paulo and Rio Grande do Sul, with an occurrence of 7% in the sampled population. This seems to be the first report of *C. boninense* infecting pepper in Brazil and other parts of the world. The pathogenic characterization showed that representative isolates of all species were pathogenic in ripe, wounded, or nonwounded fruits. In wounded green fruit, only isolates of *C. acutatum* and *C. capsici* caused infection resulting in disease symptoms. No disease symptoms were observed in green nonwounded fruits inoculated with all *Colletotrichum* isolates, after 12 days of inoculation. *C. acutatum* was the most aggressive species with the shortest periods of latency and the highest rate of sporulation in either green wounded fruits or ripe fruits (wounded and nonwounded). Isolates of different species of *Colletotrichum* showed different sensitivity to the systemic fungicides evaluated. The isolates of *C. acutatum* were more sensitive to azoxystrobin, whereas *C. gloeosporioides* showed the lowest sensitivity to this fungicide. *C. gloeosporioides* and *C. boninense* isolates were the most sensitive to benzimidazoles fungicides (carbendazim and thiabendazole), whereas *C. coccodes* isolates showed the lowest sensitivity to these fungicides. The tebuconazol fungicide exerted the highest effect on mycelial growth for all *Colletotrichum* species. *C. capsici* showed to be less sensitive to this fungicide. The results of this work have shown the presence of at least five species of *Colletotrichum* responsible for anthracnose in pepper in Brazil and have made evident the importance of the differences between these species, which must be taken into account for the control of the disease.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; *Colletotrichum boninense*; *Colletotrichum capsici*; *Colletotrichum coccodes*; *Colletotrichum gloeosporioides*; Variability

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Formatos de conídios utilizados para classificação: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (4) reto, com constrição; (5) falcado, com ápices afilados..... 33
- Figura 2 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA Difco®, sob temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 12 horas: isolado padrão de *C. acutatum* (a), Col38 (b), Col18 (c), Col10 (d), isolado padrão de *C. gloeosporioides* (e), Col48 (f), Col49 (g), Col73 (h), Col45 (i), Col64 (j), Col44 (k), Col67 (l), Col31 (m), Col33 (n), Col42 (o), Col50 (p), isolado padrão de *C. coccodes* (q), Col34 (r)..... 43
- Figura 3 - Conídios de isolados identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* - Col48 (a), *C. boninense* - Col33 (b), *C. acutatum* - Col51 (c), *C. capsici* - Col45 (d) e *C. coccodes* - Col34 (e)..... 48
- Figura 4 - Fragmentos amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos Cc1F1/Cc2R1 (*Colletotrichum* spp.), CaInt2/ITS4 (*C. acutatum*), CgINT/ITS4 (*C. gloeosporioides*), CcInt/ITS4 (*C. capsici*), Col1/ITS4 (desenvolvido para espécie de *Colletotrichum* não identificada que ocorre na Colômbia) e Cc1NF1/Cc2NR1 (*C. coccodes*), observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amostras: M (marcador molecular 1 kb), Ca e TUT-137 (padrões de *C. acutatum*), Cg e AVO-37-4B (padrões de *C. gloeosporioides*), CBS335-75 (padrão de *C. capsici*), Ccc (padrão de *C. coccodes*), 144 (padrão de *C. boninense*), Man-76 (isolado de manga da Colômbia), Col15 - Col73 (isolados de *Colletotrichum* de pimentão)..... 53
- Figura 5 - Distribuição das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em pimentão no Brasil (o número entre parênteses representa o número de isolados encontrados para cada espécie)..... 56

- Figura 6 - Lesões promovidas por diferentes espécies de *Colletotrichum* em frutos maduros e verdes de pimentão, após 12 dias da inoculação: *C. capsici* - Col64 (a), *C. coccodes* - Col34 (b), *C. gloeosporioides* - Col48 (c), *C. acutatum* - Col53 (d), *C. boninense* - Col33 (e), *C. capsici* - Col64 (f), *C. acutatum* - Col53 (g)..... 62
- Figura 7 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum* (Col19, Col35, Col53), *C. gloeosporioides* (Col48, Col49, Col73), *C. capsici* (Col45, Col64, Col67), *C. boninense* (Col33, Col42, Col50) e *C. coccodes* (Col34) em diferentes concentrações dos fungicidas sistêmicos azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (as barras verticais representam o erro padrão)..... 67
- Figura 8 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA contendo azoxistrobina nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL: Col53 (*C. acutatum*), Col73 (*C. gloeosporioides*), Col64 (*C. capsici*), Col33 (*C. boninense*), Col34 (*C. coccodes*)..... 68
- Figura 9 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA contendo carbendazim nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL: Col53 (*C. acutatum*), Col73 (*C. gloeosporioides*), Col64 (*C. capsici*), Col33 (*C. boninense*), Col34 (*C. coccodes*)..... 69
- Figura 10 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA contendo tebuconazol nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL: Col53 (*C. acutatum*), Col73 (*C. gloeosporioides*), Col64 (*C. capsici*), Col33 (*C. boninense*), Col34 (*C. coccodes*)..... 70
- Figura 11 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum* (Col19, Col35, Col53), *C. gloeosporioides* (Col48, Col49, Col73), *C. capsici* (Col45, Col64, Col67), *C. boninense* (Col33, Col42, Col50) e *C. coccodes* (Col34) em diferentes concentrações dos fungicidas não sistêmicos captana, cloreto de benzalcônio e clorotalonil (as barras verticais representam o erro padrão)..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação, procedência, região da planta infectada e ano de coleta de 56 isolados do gênero <i>Colletotrichum</i> obtidos de pimentão.....	29
Tabela 2 - Ingrediente ativo, grupo químico, modo de ação e concentração do produto comercial dos fungicidas utilizados no experimento.....	40
Tabela 3 - Velocidade de crescimento micelial (VMC), coloração da colônia e presença de microescleródios em colônias de isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos de pimentão.....	44
Tabela 4 - Comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência de formato de conídios produzidos por isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos de pimentão.....	49
Tabela 5 - Período de incubação (PI), período de latência (PL), área média da lesão (cm ²) e esporulação (nº de esporos . 10 ⁶) / cm ² da lesão) em frutos de pimentão maduros feridos inoculados com isolados de <i>Colletotrichum</i> spp...	60
Tabela 6 - Período de incubação (PI), período de latência (PL), área média da lesão (cm ²) e esporulação (esporos . 10 ⁶) / cm ² da lesão) em frutos de pimentão maduros sem ferimentos inoculados com isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	61
Tabela 7 - Período de incubação (PI), período de latência (PL), área média da lesão (cm ²) e esporulação (esporos . 10 ⁶) /cm ² da lesão) em frutos de pimentão verdes feridos inoculados com isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	61

1 INTRODUÇÃO

O cultivo do pimentão é uma atividade significativa para o setor agrícola brasileiro, sendo cultivados anualmente cerca de 12 mil hectares com esta hortaliça no país, o que representa uma produção de aproximadamente 280 mil toneladas de frutos (RIBEIRO; CRUZ, 2002). Nos últimos cinco anos, o volume médio anual de pimentão comercializado somente no CEAGESP, localizado em São Paulo, foi de aproximadamente 37 mil toneladas (FNP, 2007).

Inúmeras doenças de etiologia fúngica afetam a cultura, promovendo enormes prejuízos. Entre estas, a antracnose é uma das mais importantes, ocorrendo em todas as regiões produtoras do país e causando danos de até 100% sobre a cultura (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Esta doença é relatada em muitos países como sendo causada por inúmeras espécies de *Colletotrichum*. No Brasil, por muitos anos considerou-se apenas *C. gloeosporioides* como agente causal da antracnose do pimentão (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Recentemente, *C. acutatum* e *C. capsici* também foram associadas a esta doença em algumas regiões do país (BUENO, 2005; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; SCHURT; SILVA JÚNIOR; DHINGRA, 2005; SILVA et al., 2007).

Devido às diferenças existentes entre estas espécies, de ordem patogênica, fisiológica, etc. (VINNERE, 2004; GNIFFKE, 2003; KIM; OH; YANG, 1999), o manejo da antracnose é bastante dificultado. Desta forma, é importante conhecer quais espécies ocorrem e quais predominam nas principais regiões produtoras do país. Para isso, torna-se necessário a utilização de diferentes métodos de identificação (MENEZES, 2002; BUENO, 2005; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; BEZERRA; MENEZES, 2007).

Os métodos tradicionais, baseados em características morfológicas e culturais, podem contribuir significativamente para identificação específica, visto que a taxonomia do gênero *Colletotrichum* é baseada principalmente nestes critérios (SUTTON, 1992; BEZERRA; MENEZES, 2007). Esses métodos também são úteis para o conhecimento da variabilidade do agente patogênico. Porém, por se tratar de características

fenotípicas, estes são propensos a erros, e desta forma, devem ser utilizados como uma ferramenta complementar a outros métodos mais precisos, como os moleculares.

Entre as técnicas moleculares, a PCR (“polymerase chain reaction”) têm sido frequentemente utilizada por inúmeros autores. Oligonucleotídeos foram desenvolvidos para muitas espécies de *Colletotrichum* e têm se mostrado eficazes para identificação das mesmas (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; ADASKAVEG; HARTIN, 1997; PERES et al., 2002; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR; BUENO; MASSOLA JÚNIOR, 2004; BUENO, 2005).

Além do conhecimento de quais espécies de *Colletotrichum* ocorrem no país, também é importante conhecer a variabilidade patogênica e o comportamento das mesmas frente aos fungicidas. Alguns trabalhos desenvolvidos com espécies distintas que ocorrem em pimentão demonstram haver um comportamento patogênico diferenciado entre estas (KIM; PARK; LEE, 1989; GNIFFKE, 2003). Outros trabalhos também demonstram que a sensibilidade a determinados fungicidas é distinta entre algumas espécies do gênero (THIND; JHOOTY, 1990; BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG; FOSTER, 2000; VINNERE, 2004).

Essas informações contribuem para a melhor compreensão da epidemiologia da doença e são úteis durante o desenvolvimento de medidas de controle eficazes, seja ela baseada em métodos culturais, genéticos ou químicos.

Os objetivos deste trabalho foram: (i) a caracterização morfológica, cultural e a identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão, provenientes das principais regiões produtoras do Brasil e (ii) a caracterização patogênica e a avaliação da sensibilidade “in vitro” a alguns fungicidas, de isolados representativos de cada espécie de *Colletotrichum* associada à antracnose do pimentão no país.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Aspectos gerais da antracnose do pimentão

A antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é considerada uma das principais doenças do pimentão em todos os países produtores da cultura. Esta doença é importante principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, predominando em condições de alta umidade (BLACK et al., 1991). No Brasil, a antracnose do pimentão ocorre em todas as regiões produtoras da cultura, sendo constatada desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste (SALGADO; TOKESHI, 1980).

O patógeno é disseminado a longas distâncias por sementes infectadas e, dentro da cultura, por respingos de água de chuva ou irrigação por aspersão. A infecção e o desenvolvimento de sintomas desta doença podem ocorrer em todos os órgãos aéreos da planta, desde o início de seu desenvolvimento, podendo causar “damping-off” de pré e pós-emergência (BLACK et al., 1991). Em folhas e ramos, os sintomas são evidenciados pela presença de pequenas lesões necróticas de contornos circulares a alongados. Nos frutos, os sintomas são caracterizados por lesões necróticas deprimidas, geralmente de forma circular. No centro dessas lesões, em condições ambientais favoráveis, surge uma massa mucilaginosa rosada contendo os conídios (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Quando a doença ocorre no campo, os frutos infectados não caem e as lesões permanecem firmes, a não ser que haja invasão de organismos secundários que acelerem a sua deterioração (LOPES; ÁVILA, 2003).

Os danos causados por esta doença podem chegar a 100% na ausência de medidas de controle adequados e sob condições de temperaturas entre 23 e 27 °C coincidentes com épocas chuvosas (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Além disso, a infecção pode ocorrer no campo e permanecer quiescente até o período pós-colheita, quando desenvolverá os sintomas típicos e estenderá os prejuízos

também aos comerciantes e consumidores (ADIKARAM; BROWN; SWINBURNE, 1983; JEFFRIES et al., 1990; BLACK et al., 1991).

Entre as espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela antracnose do pimentão, já foram relatadas em alguns países *C. acutatum* Simmonds, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. coccodes* (Wallr.) Hughes, *C. capsici* (Syd.) Butler & Bisby e *C. dematium* (Pers.) Grove (KIM; PARK; LEE, 1989; PARK; KIM; LEE, 1990; ROY; KILLEBREW; RATNAYAKE, 1997; SCHURT; SILVA JÚNIOR; DHINGRA, 2005; BUENO, 2005; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

No Brasil, por muitos anos considerou-se *C. gloeosporioides* como a única espécie causadora da antracnose do pimentão (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado também a presença de outras espécies.

Tozze Júnior, Mello e Massola Júnior (2006) por meio de características morfológicas, fisiológicas e pela sensibilidade ao fungicida benomil concluíram que, além de *C. gloeosporioides*, a espécie *C. acutatum* poderia estar associada com a antracnose do pimentão, pimenta e jiló. A mesma população de isolados foi estudada por Bueno (2005), o qual constatou que dos 27 isolados obtidos de pimentão, 14 foram identificados pela técnica de PCR (“polymerase chain reaction”) como sendo *C. acutatum*, apenas dois foram positivos para *C. gloeosporioides* e o restante dos isolados não reagiu com os oligonucleotídeos desenvolvidos para essas duas espécies. Esses resultados demonstraram que pelo menos duas espécies, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, estariam relacionadas com a antracnose do pimentão no Brasil.

Uma outra espécie recentemente relatada no país é *C. capsici*, a qual foi detectada em amostras de sementes de pimentão, sendo identificada por meio de características morfológicas (SCHURT; SILVA JÚNIOR; DHINGRA, 2005).

Estas espécies também foram constatadas no país por Silva et al. (2007). Estes autores avaliaram uma população de 36 isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão e pimenta oriundos do estado do Rio Grande do Sul, e, de acordo com o formato e dimensões de conídios e apressórios, associados com características culturais, identificaram 28 isolados como *C. acutatum*, quatro como *C. gloeosporioides* e um único isolado como *C. capsici*.

O fato de várias espécies de *Colletotrichum* serem patogênicas a um mesmo hospedeiro é algo comum, assim como é comum uma mesma espécie causar sintomas em vários hospedeiros. Por exemplo, tanto *C. acutatum* como *C. gloeosporioides* são relatados causando doença em citros, maçã, morango e pêssago, entre outras frutas e hortaliças (SMITH; BLACK, 1990; AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992; HOWARD et al., 1992; BERNSTEIN et al., 1995; GOES; KIMATI, 1997).

Devido às diferenças existentes entre as espécies de *Colletotrichum*, há grande dificuldade no desenvolvimento de medidas de controle da antracnose quando esta é causada por mais de uma espécie. Gniffke (2003), ao estudar a resistência genética de acessos de *Capsicum* spp. à antracnose, observou o comportamento patogênico diferenciado de isolados de *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides*, o que poderia estar relacionado com o fato da resistência ser independente para estas espécies. Desta forma, a ocorrência dessas espécies simultaneamente pode dificultar a seleção de cultivares de pimentões resistentes à doença. Também foi demonstrado haver diferenças na sensibilidade entre algumas espécies do gênero *Colletotrichum* para vários fungicidas sistêmicos e protetores (THIND; JHOOTY, 1990; BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG; FOSTER, 2000), fato que pode prejudicar a eficiência do controle químico. Desta maneira, por se tratar de um patossistema de grande complexidade, o sucesso no controle da antracnose depende da correta identificação dos agentes causais presentes em cada região.

2.1.2 Métodos de caracterização e identificação de *Colletotrichum* spp.

A taxonomia do gênero *Colletotrichum* tem sido tradicionalmente baseada em critérios culturais e morfológicos (SUTTON, 1992; MENEZES, 2002; BEZERRA; MENEZES, 2007). Ainda hoje, inúmeros pesquisadores utilizam essas características para identificação e estudo da variabilidade de *Colletotrichum* spp., fato que pode ser constatado em muitos trabalhos recentemente publicados (ABANG et al., 2002; PERES et al., 2002; TALHINHAS et al., 2002; SANDERS; KORSTEN, 2003; SHARMA et al., 2005; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; ANDRADE et al., 2007).

Entre as características culturais mais frequentemente utilizadas, estão a taxa de crescimento micelial e a coloração da colônia. Estas características são consideradas úteis para distinção entre algumas espécies do gênero, como, por exemplo, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

A espécie *C. acutatum* apresenta um crescimento micelial lento em meio de cultura enquanto *C. gloeosporioides* tem um rápido desenvolvimento micelial, sendo esta, uma característica considerada estável, o que a torna muito útil para a distinção das mesmas (VINNERE, 2004). Associada à taxa de desenvolvimento micelial, a coloração da colônia representa uma característica complementar para separação destas espécies.

Baseados na taxa de crescimento micelial e na coloração da colônia, Agostini, Timmer e Mitchell (1992) estabeleceram três grupos designados FGG (“fast-growing gray”), SGO (“slow-growing orange”) e KLA (“key lime anthracnose”). Segundo estes autores, os isolados do grupo FGG caracterizavam-se por apresentar rápido crescimento micelial e colônias de coloração acinzentada, o grupo KLA era composto por isolados associados com limão ‘Galego’ e, igualmente ao grupo SGO, apresentava crescimento lento. Além disso, os isolados do grupo SGO também se caracterizavam pela profunda coloração alaranjada das colônias em meio de cultura. Posteriormente, foi constatado que o grupo FGG era formado por isolados de *C. gloeosporioides* e os demais grupos correspondiam à espécie *C. acutatum* (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; ZULFIQAR; LANSKY; TIMMER, 1996).

Bernstein et al. (1995) compararam setenta e dois isolados de *Colletotrichum* obtidos de abacate, maçã, morango, pecan e pêssago, entre outras culturas, e também constataram diferenças culturais entre essas duas espécies na população amostrada. De acordo com esses autores, os isolados identificados como *C. acutatum* apresentavam colônias de coloração rosada a alaranjada, enquanto os isolados identificados como *C. gloeosporioides* produziam colônias de coloração acinzentada.

A coloração da colônia também se mostrou útil para o estudo da variabilidade existente entre os isolados de *C. gloeosporioides* do mamoeiro. Os 29 isolados desta cultura e 4 isolados de outras frutíferas, puderam ser separados em sete grupos

distintos baseado nesta característica, revelando a alta variabilidade da população amostrada (ANDRADE et al., 2007).

A coloração da massa de esporos é uma outra característica utilizada para fins taxonômicos. Segundo Simmonds (1965 apud VINNERE, 2004), *C. acutatum* apresenta massa de conídios de coloração salmão, enquanto *C. gloeosporioides* produz massa de conídios levemente rosada. Esta característica, entretanto, é muito variável, sendo que apenas para *C. acutatum* é possível constatar relatos na literatura de massa de esporos de coloração amarelada, laranja e laranja a rósea (SMITH; BLACK, 1990; WALKER; NIKANDROW; MILLAR, 1991; BERNSTEIN et al., 2005; LARDNER et al., 1999; TALHINHAS et al., 2002; VINNERE, 2004). A alta variabilidade na coloração da massa de esporos entre isolados de *Colletotrichum* também foi constatada por Smith e Black (1990), os quais revelaram que esta característica freqüentemente se sobrepunha entre os isolados avaliados, e, por este motivo, não poderia servir como um critério de separação de espécies e isolados.

Uma outra característica cultural freqüentemente utilizada na taxonomia de *Colletotrichum* é a produção de estruturas, como microescleródios e setas. A presença de microescleródios é uma característica útil para classificação de espécies de *Colletotrichum* que produzem esta estrutura, como é o caso de *C. coccodes* (TOZZE JÚNIOR; MASSOLA JÚNIOR, 2007). Por outro lado, a presença de setas é muito dependente da umidade relativa do ambiente (FROST, 1964), desta forma, não deve ser utilizada para taxonomia de *Colletotrichum*.

Entre as características morfológicas, o tamanho e forma de conídios e apressórios são muito utilizados na caracterização e identificação das espécies de *Colletotrichum*.

Por meio de diferenças morfológicas dos conídios, Bernstein et al. (1995) puderam identificar isolados de *Colletotrichum* obtidos de algumas frutíferas como sendo pertencentes a duas espécies. Os isolados que produziam conídios fusiformes foram identificados como *C. acutatum* enquanto os que produziam conídios com extremidades arredondadas foram identificados como *C. gloeosporioides*. Da mesma forma Agostini, Timmer e Mitchell (1992) e também Goes e Kimati (1997), puderam

diferenciaram grupos de isolados obtidos de citros pertencentes a essas duas espécies baseados na morfologia dos conídios. Os isolados do grupo FGG (*C. gloeosporioides*), apresentaram conídios com maiores dimensões, na maioria com ápices arredondados, enquanto os isolados dos grupos SGO e KLA (*C. acutatum*) apresentavam conídios menores, predominando o formato fusiforme entre estes.

Embora os exemplos acima ilustrem a utilidade da morfologia dos conídios na identificação específica de *Colletotrichum*, outros autores demonstram a limitação desta característica para fins taxonômicos, problema que tende a ser acentuado quando os isolados são cultivados em meios artificiais (BUENO, 2005).

Adaskaveg e Hartin (1997) caracterizaram isolados de *Colletotrichum* obtidos de amêndoa e pêssago, e constataram que a morfologia de conídios produzidos por um mesmo isolado depende do substrato utilizado para a produção dos mesmos. Resultados similares foram obtidos por Bueno et al. (2005) e Bueno, Tozze Júnior e Massola Júnior (2005), os quais estudando a variabilidade morfológica de conídios de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* obtidos de pimentão, pimenta e jiló, demonstraram haver diferenças significativas nas dimensões e formato de conídios produzidos por um mesmo isolado em função das condições de cultivo, como substrato, temperatura e fonte de luz. Estes autores concluíram que, devido à alta variabilidade fenotípica, essas duas espécies não podem ser distinguidas unicamente com base no tamanho e formato dos conídios.

De maneira similar à morfologia de conídios, o formato e as dimensões de apressórios ora têm se mostrado características úteis, ora têm se mostrado pouco consistentes para a identificação das espécies do gênero *Colletotrichum*.

A morfologia dos apressórios se mostrou útil no trabalho desenvolvido por Goes e Kimati (1997), os quais diferenciaram três grupos distintos de isolados de *Colletotrichum* obtido de citros (FGG, SGO e KLA) com base no comprimento, largura, relação comprimento largura e formato dos apressórios. Os isolados do grupo FGG (*C. gloeosporioides*) produziram predominantemente apressórios lobados, com maiores dimensões, os isolados do grupo KLA (*C. acutatum*) produziram apressórios arredondados, com dimensões intermediárias, e, os isolados do grupo SGO (*C.*

acutatum) apresentaram predominância de apressórios clavados, com dimensões inferiores aos dos demais grupos. Andrade et al. (2007), também diferenciaram 29 isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de mamoeiro, os quais produziram apressórios lobados ou fracamente lobados, de um isolado de *C. acutatum* obtido de morango, que apresentou apressórios circulares e lisos.

Por outro lado, Tozze Júnior, Mello e Massola Júnior (2006) avaliaram uma população de *Colletotrichum*, obtido de algumas solanáceas, e demonstraram a presença de até três tipos distintos de apressórios (circular, ovalado e lobado) oriundos de um único conídio produzido por um isolado de *Colletotrichum* sp. obtido de pimentão. Semelhantemente, Menezes e Hanlin (1996a, 1996b), investigaram apressórios de *C. gloeosporioides* provenientes de diferentes fontes e localidades do nordeste do Brasil e observaram que o mesmo isolado podia apresentar apressórios levemente lobados e não lobados. Além desses autores, Gunnell e Glubber (1992) também encontraram uma alta variabilidade morfológica entre os apressórios de *C. gloeosporioides* obtidos de morango e não puderam distinguir esta espécie de outras do mesmo gênero baseando-se apenas neste critério.

Os trabalhos mencionados demonstram que características culturais e morfológicas apresentam valor relativo para taxonomia das espécies de *Colletotrichum* (MENEZES 2002; BUENO, 2005; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; BEZERRA; MENEZES, 2007). No entanto, mesmo quando estas não se mostram viáveis para fins de identificação, resultados úteis para o conhecimento da variabilidade do patógeno podem ser obtidos por elas. Além disso, critérios morfológicos e culturais são, e provavelmente continuarão sendo a base primária para a separação entre espécies ou grupos de espécies (KATAN, 2000). Desta forma, para trabalhos envolvendo a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*, os métodos tradicionais devem continuar a serem utilizados, porém em conjunto com métodos mais precisos, como os baseados em técnicas moleculares (BUENO, 2005; BEZZERA; MENEZES, 2007).

A existência de oligonucleotídeos espécie-específicos, baseados em seqüências de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA, tem tornado a técnica de PCR uma poderosa ferramenta de auxílio para identificação de espécies de *Colletotrichum*.

A título de exemplo, podem-se citar os oligonucleotídeos Calnt2/ITS4 e CgInt/ITS4, desenvolvidos respectivamente para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1996). Estes oligonucleotídeos já foram utilizados em inúmeros trabalhos envolvendo identificação de isolados de *Colletotrichum* nas mais variadas culturas, como citros, mamão, pêssego, maracujá, amêndoa, abacate, manga, goiaba, morango e solanáceas (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; PERES et al., 2002; ADASKAVEG; HARTIN, 1997; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR; BUENO; MASSOLA JÚNIOR, 2004; BUENO, 2005; ANDRADE et al., 2007). Oligonucleotídeos eficazes para distinção de outras espécies de *Colletotrichum* também estão disponíveis, como por exemplo, o par Cc1NF1/Cc2NR1, específico para *C. coccodes* (CULLEN et al., 2002) e CcInt/ITS4, específico para *C. capsici* (AVRDC, 2003).

Além da técnica de PCR, outros métodos moleculares têm sido empregados visando caracterizar e/ou identificar isolados de *Colletotrichum*. Entre esses outros métodos, pode-se mencionar o RAPD (“random amplified polymorphic DNA”), o qual foi usado com sucesso para caracterizar isolados de *Colletotrichum* de pimenta (SHARMA et al., 2005), cucurbitáceas (CORRELL; RHOADS; GUERBER, 1993), algodoeiro (SILVA-MANN et al., 2002) e uva (WHITELAW-WECKERT et al., 2007). O RFLP (“restriction fragment length polymorphism”) também se mostrou útil na caracterização de *Colletotrichum* obtido de várias culturas (CORRELL; RHOADS; GUERBER, 1993; ABANG et al., 2001; GUERBER et al., 2003; LIU et al., 2007; ANDRADE et al., 2007). Outro método que também tem sido usado com sucesso é a análise do teor de adenina e timina em certos trechos do DNA fúngico, denominada “A+T-rich DNA”, o qual já foi usado para caracterizar isolados representativos de 10 espécies de *Colletotrichum* (HODSON; MILLS; BROWN, 1993) e isolados de *Colletotrichum* spp. de algumas frutíferas na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). Finalmente, a análise de seqüências de nucleotídeos de distintas regiões do genoma tem facilitado a identificação e gerado inúmeras informações sobre as relações filogenéticas existentes

entre as espécies de *Colletotrichum* (BAILEY et al., 1996; JOHNSTON; JONES, 1997; SREENIVASAPRASAD; BROWN; MILLS, 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; PERES et al., 2002; DU et al., 2005; CROUCH et al, 2005).

Alguns outros métodos não moleculares também são utilizados com relativo sucesso por diferentes pesquisadores, como, por exemplo, a compatibilidade vegetativa de grupos (VCG) (CORRELL; RHOADS; GUERBER, 1993; KATAN; SHABI, 1996; FREEMAN; KATAN, 1997; LIU et al., 2007), a especificidade hospedeira e patogenicidade (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1996; FREEMAN; SHABI, 1996; PERES et al., 2002; LIU et al., 2007) e a sensibilidade a benomil (GOES; KIMATI, 1998; PERES et al., 2002; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; ADASKAVEG; HARTIN, 1997).

Os estudos de caracterização baseados na integração de métodos, 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 doença (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

2.1.3 Patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* a *Capsicum* spp.

Durante uma epidemia, a infecção e a esporulação são fatores importantes para o progresso da doença (MANANDHAR; HARTMAN, 1995). Desta forma, essas e outras características patogênicas podem estar relacionadas diretamente com a importância epidemiológica de cada uma das espécies responsáveis pela antracnose do pimentão.

O comportamento patogênico de algumas espécies de *Colletotrichum* que ocorrem nesta cultura já foi avaliado em certas regiões do mundo, revelando a existência de uma alta variabilidade inter e intra-específica.

Na Coreia, Kim, Park e Lee (1989) constataram que *C. capsici* geralmente infecta e promove sintomas somente em frutos maduros, diferindo de *C. gloeosporioides* que pode infectar e promover sintomas tanto nos frutos maduros quanto nos verdes.

Neste mesmo país, foi verificado que a espécie *C. gloeosporioides* apresenta distintas estirpes. A estirpe “G” produz sintomas tanto em frutos verdes quanto nos maduros enquanto a estirpe “R” produz sintomas apenas em frutos maduros (KIM; CHO; LEE, 1986). Essas duas estirpes também puderam ser diferenciadas através de suas atividades enzimáticas (PARK et al., 1987). Mais recentemente, foi constatado um isolado de *C. gloeosporioides*, denominado ‘KG13’, capaz de invadir e colonizar os tecidos do hospedeiro através da camada epicuticular dos frutos verdes, mas não dos frutos maduros (OH; KIM; KIM, 1998).

As interações diferenciais entre o isolado de *C. gloeosporioides* ‘KG13’ com os estádios de maturação de frutos de pimentão foram estudadas por Kim, Oh e Yang (1999). Este isolado foi capaz de causar sintomas típicos da antracnose em frutos verdes, com ou sem ferimentos, e frutos maduros, com ferimentos. Contudo, o mesmo não promoveu sintomas típicos em frutos maduros sem ferimentos, ocasionando apenas uma pequena descoloração nos tecidos dos mesmos. Quando a cera cuticular foi removida pela imersão dos frutos em clorofórmio, os frutos vermelhos sem ferimentos apresentaram sintomas mais evidentes, com lesões maiores e maior esporulação que os frutos vermelhos imersos apenas em água. Estes resultados indicam que alguns isolados de *C. gloeosporioides* podem reagir diferencialmente com frutos verdes e maduros devido às diferenças físicas e químicas existentes nas camadas cuticulares desses frutos.

Além do estágio de maturação dos frutos, um outro fator relacionado à patogenicidade que pode demonstrar a variabilidade patogênica em uma população é o período latente. O período latente caracteriza-se como o tempo decorrido entre a inoculação (contato entre o patógeno e o hospedeiro) até o aparecimento de estruturas reprodutivas do patógeno. Este é um dos parâmetros que influencia a velocidade de crescimento da epidemia. Desta forma, para um mesmo hospedeiro e uma mesma condição ambiental, longos períodos latentes indicam patógeno menos agressivo, significando em um sistema policíclico, como é o da antracnose, um menor número de gerações do patógeno por ciclo do hospedeiro (AMORIM, 1995).

Bueno (2005) estudou a patogenicidade de isolados de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *Colletotrichum* sp. obtidos de pimentão, pimenta e jiló quando inoculados em frutos feridos e não feridos desses hospedeiros. O período de latência em frutos de pimentão verdes feridos variou de 3 a 7 dias de acordo com o isolado, enquanto para frutos de pimentão verdes não feridos este período se estendeu para 10 a 20 dias. Contudo, esses resultados não permitiram distinguir os isolados quanto ao hospedeiro de origem ou a procedência.

Pereira (2005) também demonstrou que o período de latência pode ser variável em função do genótipo de *Capsicum* infectado. Este autor inoculou uma mistura de esporos de quatro isolados de *Colletotrichum* sp., calibrada para 10^6 esporos/mL, em frutos verdes feridos de diversos acessos de *Capsicum* spp., e verificou que o período de latência variou de 3 a 7 dias entre os diferentes genótipos inoculados.

A manifestação da antracnose em diferentes genótipos de *Capsicum* quando inoculados com distintas espécies de *Colletotrichum* foi estudada por Gniffke (2003). Para a maior parte dos acessos, o isolado de *C. acutatum* promoveu maiores lesões que os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. capsici*. Entretanto, para um dos acessos testados, os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. capsici* apresentaram maiores lesões que o isolado de *C. acutatum*. Segundo os autores, a resistência de um acesso à *C. acutatum* não é necessariamente um indicativo da resistência às demais espécies. Esses resultados evidenciam as diferenças patogênicas existentes entre essas espécies.

Devido à constatação recente de novas espécies responsáveis pela antracnose do pimentão no país, torna-se necessário a avaliação do comportamento patogênico das mesmas. Esta informação permite o melhor entendimento sobre a epidemiologia da doença e contribui para o desenvolvimento de medidas de controle eficazes.

2.1.4 Sensibilidade a fungicidas

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir as altas produtividades e qualidade de produção, visadas pela agricultura moderna (KIMATI, 1995). Devido à inexistência de

cultivares de pimentões resistentes à antracnose, os fungicidas têm sido freqüentemente recomendados para o manejo desta doença (VIÑALS; ORTEGA; GARCIA, 1996; FIGUEIRA, 2003; LOPES; ÁVILA, 2003; KUROSZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005).

A utilização maciça, contínua e ampla de fungicidas como único método de controle de doenças de plantas, entretanto, tem promovido a seleção de fungos resistentes aos produtos químicos utilizados para seu controle (SALES JÚNIOR; TORRES; GUIMARÃES, 2007).

Casos de resistência a fungicidas de patógenos do gênero *Colletotrichum* e de seu teleomorfo *Glomerella* são relatados em vários países. No Brasil, no ano de 1985, foi relatado o primeiro caso de resistência de *Glomerella cingulata* em maçã, frente ao composto benomil (FORTES, 1985). Posteriormente, outros casos foram constatados para o mesmo fungicida, como, por exemplo, a resistência de *C. fragariae* do morangueiro (TANAKA; PASSOS; BETTI, 1997) e a resistência de isolados de *C. lindemuthianum* a este e outros fungicidas do grupo dos benzimidazóis (MARINGONI; BARROS, 2002).

O monitoramento da sensibilidade a fungicidas em uma população de patógenos é importante para determinar a presença de isolados resistentes. Este monitoramento é necessário especialmente para os fungicidas com atividade sistêmica, que apresentam um modo de ação específico, isto é, atuam sobre um único sítio do metabolismo dos organismos (KIMATI, 1995; GHINI; KIMATI, 2000).

A resistência a fungicidas é definida como uma alteração herdável e estável em um fungo em resposta à aplicação de um fungicida, resultando em uma redução na sensibilidade ao produto (EUROPEAN, 1988). A pressão de seleção exercida pelo fungicida sobre a população do patógeno elimina a parte da população que se mostra sensível, e assim, favorece a predominância dos indivíduos resistentes (KIMATI, 1995; GHINI; KIMATI, 2000; SALES JÚNIOR; CASTRO; GUIMARÃES, 2007).

Certas espécies, entretanto, podem ser naturalmente menos sensíveis do que outras, não significando que as mesmas adquiriram resistência ao fungicida. Diferenças na sensibilidade entre algumas espécies de *Colletotrichum* já foram observadas para alguns princípios químicos. Por exemplo, *C. acutatum* é citado como sendo menos

sensível a benomil, captana e propiconazol, e mais sensível a miclobutanil e tebuconazol do que *C. gloeosporioides* (BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG; FOSTER, 2000; VINNERE, 2004). Por outro lado, *C. gloeosporioides* é citado como sendo menos sensível aos fungicidas mancozebe e captafol que *C. capsici* (THIND; JHOOTY, 1990).

Esta diferença na sensibilidade a certos fungicidas tem sido utilizada como uma ferramenta auxiliar para a identificação de certos fungos. Inúmeros autores puderam distinguir isolados das espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* baseados na sua sensibilidade ao fungicida benomil.

No Brasil, Kuramae-Izioka et al. (1997) e também Goes e Kimati (1998) puderam separar os isolados de *Colletotrichum* associados à queda prematura dos frutos cítricos em dois grupos bastante distintos com relação à sensibilidade ao fungicida benomil. Um deles foi formado por isolados altamente sensíveis, os quais apresentaram crescimento nulo em meio com 1 µg/mL deste fungicida, e o outro, por isolados que cresciam em meio com concentrações elevadas desse fungicida. Além dessa diferença na sensibilidade a benomil, esses dois grupos apresentavam outras características particulares. Assim, o grupo dos isolados sensíveis apresentava crescimento rápido em meio de cultura, com colônias de coloração cinza escura, enquanto que os isolados menos sensíveis apresentavam crescimento mais lento e colônias de coloração cinza clara a alaranjada. Utilizando outras análises, como morfologia de conídios e apressórios, testes de patogenicidade e análise molecular, identificou-se como *C. gloeosporioides* os isolados do grupo sensível a benomil e como *C. acutatum* os isolados que cresciam em meio suplementado com o fungicida.

Além da diferenciação de espécies, a sensibilidade diferencial a fungicida também tem sido utilizada como ferramenta para caracterizar a variabilidade entre isolados de uma mesma espécie fúngica. Para *C. gloeosporioides*, um estudo realizado por Badel e Kelemu (1997) no CIAT, revelou uma altíssima variabilidade na sensibilidade a benomil entre setenta e sete isolados sul-americanos, todos coletados em *Stylosanthes*. Comparando com as testemunhas, os autores encontraram redução no crescimento micelial de 21% a 96,4% quando o benomil foi incorporado ao meio de cultivo na concentração de 0,25 µg/mL. Foi possível relacionar a sensibilidade dos

isolados ao local de origem dos mesmos, indicando haver evolução adaptativa deste fungo para diferentes condições ambientais.

Embora estudos envolvendo o comportamento de isolados frente a diferentes princípios ativos sejam importantes para definição das estratégias de controle químico, podendo ser úteis também para distinção das espécies, essas informações são escassas para as espécies recentemente relatadas como causadoras da antracnose do pimentão no Brasil.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção e preservação dos isolados

Para a realização dos experimentos, utilizaram-se cinquenta e seis isolados de *Colletotrichum*, provenientes das principais regiões produtoras de pimentão do país (Tabela 1). Esses isolados foram obtidos a partir de lesões típicas da antracnose em frutos e folhas de pimentão. O isolamento foi realizado pela coleta de esporos presentes em uma única lesão, com uma agulha esterilizada, e transferência dos mesmos para meio ágar-água (1,5%). Posteriormente, através da visualização em lupa, uma única ponta de hifa produzida por cada colônia foi coletada, com auxílio de uma agulha entomológica esterilizada, e transferida para o centro de uma placa de Petri contendo meio de aveia (40g de farelo de aveia, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada). Este procedimento garantiu a pureza genética dos isolados, eliminando a possibilidade de mistura de isolados em uma mesma colônia.

Para verificar a patogenicidade de cada isolado obtido, estes foram inoculados separadamente em frutos maduros de pimentão (cultivar Magali) previamente desinfestados com hipoclorito de sódio (0,5%). Esta inoculação foi realizada pela deposição de uma gota contendo 40 μ L de suspensão de esporos (10^5 conídios/mL) na superfície de cada fruto, sob a qual foi realizado um ferimento com agulha esterilizada. Posteriormente, os frutos foram acondicionados em câmara úmida, onde foram incubados por sete dias sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Todos

os isolados que se mostraram patogênicos foram reisolados e preservados em óleo mineral, água e papel-de-filtro.

A preservação em óleo foi realizada pela repicagem dos isolados para tubos de ensaio contendo meio BDA Difco® (39g/L). Após o crescimento micelial sobre toda a superfície do meio, 5 mL de óleo mineral nujol® esterilizado foram adicionados em cada tubo. A preservação em água foi realizada pela transferência de discos de micélio com 6 mm de diâmetro para tubos contendo 9 mL de água destilada esterilizada. Para a preservação pelo método de papel-de-filtro, cada isolado foi repicado sobre fragmentos de 4 cm² de papel-de-filtro esterilizado, depositados sobre a superfície do meio de aveia contido em placas de Petri. Após o desenvolvimento da colônia, cada fragmento de papel-de-filtro contendo as estruturas do isolado foi retirado da placa de origem, sem o meio de cultura, e transferido para uma placa de Petri esterilizada. Esta placa foi mantida em dessecador até a completa secagem do material. Após este processo, o papel-de-filtro contendo as estruturas do isolado foi transferido para um tubo para microcentrifuga autoclavado contendo sílica gel esterilizada. Os tubos com os isolados preservados em óleo e em água foram armazenados sob temperatura de aproximadamente 5 °C, enquanto os tubos contendo os isolados preservados em papel-de-filtro foram armazenados sob temperatura de aproximadamente -20 °C.

Tabela 1 - Identificação, procedência, região da planta infectada e ano de coleta de 56 isolados do gênero *Colletotrichum* obtidos de pimentão (continua)

Identificação	Procedência	Região infectada	Ano de coleta
Col01	Lins-SP	Fruto	2000
Col04	Bragança Paulista-SP	Fruto	2002
Col08	Clementina-SP	Fruto	2002
Col09	Mogi das Cruzes-SP	Fruto	2003
Col10	Bragança Paulista-SP	Fruto	2003
Col11	Bragança Paulista-SP	Fruto	2003
Col12	Bragança Paulista-SP	Fruto	2003
Col13	Bragança Paulista-SP	Fruto	2003
Col14	Bragança Paulista-SP	Fruto	2003
Col15	Canoas-RS	Fruto	2003
Col18	São Miguel Arcanjo-SP	Fruto	2003

Tabela 1 - Identificação, procedência, região da planta infectada e ano de coleta de 56 isolados do gênero *Colletotrichum* obtidos de pimentão (continuação)

Identificação	Procedência	Região infectada	Ano de coleta
Col19	Elias Fausto-SP	Folha	2004
Col21	Bragança Paulista-SP	Fruto	2004
Col23	Biritiba Mirim-SP	Fruto	2004
Col26	Mogi das Cruzes-SP	Fruto	2005
Col29	Jarinu-SP	Fruto	2005
Col34	Caxias do Sul-RS	Fruto	2005
Col35	Paty de Alferes-RJ	Fruto	2005
Col36	Pouso Alegre-MG	Fruto	2005
Col37	Guaraciaba do Norte-CE	Fruto	2005
Col38	Nova Friburgo-RJ	Fruto	2005
Col40	Itapetininga-SP	Fruto	2005
Col42	Bragança Paulista-SP	Fruto	2005
Col44	Atibaia-SP	Fruto	2005
Col45	Atibaia-SP	Fruto	2005
Col46	Londrina-PR	Fruto	2005
Col47	Londrina-PR	Fruto	2005
Col48	Bragança Paulista-SP	Fruto	2005
Col49	Bragança Paulista-SP	Fruto	2005
Col50	Bragança Paulista-SP	Fruto	2005
Col51	Guaraciaba do Norte-CE	Fruto	2005
Col52	Guaraciaba do Norte-CE	Fruto	2005
Col53	Guaraciaba do Norte-CE	Fruto	2005
Col54	Primeiro de Maio-PR	Fruto	2005
Col55	Guaraciaba do Norte-CE	Fruto	2005
Col56	Guaraciaba do Norte-CE	Fruto	2005
Col57	Guaraciaba do Norte-CE	Fruto	2005
Col59	Pelotas-RS	Fruto	2005
Col60	Pelotas-RS	Fruto	2005
Col63	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col64	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col65	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col66	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col67	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col68	Brasilândia-MG	Fruto	2005

Tabela 1 - Identificação, procedência, região da planta infectada e ano de coleta de 56 isolados do gênero *Colletotrichum* obtidos de pimentão (conclusão)

Identificação	Procedência	Região infectada	Ano de coleta
Col69	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col70	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col71	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col72	Brasilândia-MG	Fruto	2005
Col73	Brasília-DF	Fruto	2002
Col74	Brasília-DF	Fruto	2002
Col75	Bragança Paulista-SP	Fruto	2002

2.2.2 Caracterização cultural

A caracterização cultural baseou-se na determinação da velocidade de crescimento micelial e na observação de algumas características morfológicas das colônias de cada isolado, quando cultivados em meio BDA.

Neste experimento, utilizou-se além dos 56 isolados de pimentão, isolados reconhecidamente pertencentes às espécies *C. gloeosporioides* (Cg), obtido de mamão, *C. acutatum* (Ca), obtido de pêssego e *C. coccodes* (Ccc), obtido de batata. Esses isolados foram utilizados anteriormente como padrões dessas espécies em um trabalho realizado por Bueno (2005).

Para cada isolado, discos de micélio com 6 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de uma colônia cultivada por sete dias em meio de cultura BDA Difco® (39g/L) e transferidos para o centro de novas placas de Petri contendo o mesmo meio. Após a repicagem, os isolados foram incubados a temperatura de 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias.

A avaliação do experimento foi realizada diariamente, através da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia com auxílio de régua milimetrada. A velocidade média de crescimento micelial, expressa em mm/dia, foi utilizada para as análises estatísticas. Ao sétimo dia de cultivo, também foram observadas a coloração de cada colônia e a presença de microescleródios.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa. Os dados correspondentes à velocidade de crescimento micelial dos isolados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, por meio do programa computacional SAS 9.1 para Windows®.

2.2.3 Caracterização morfológica

Neste experimento determinou-se o tamanho e formato de conídios produzidos por cada isolado.

A produção de esporos foi realizada em frutos destacados maduros de pimentão (cultivar Magali), inoculados separadamente com cada um dos 56 isolados obtidos de pimentão. Para isso, os frutos foram previamente desinfestados com hipoclorito de sódio (0,5%) durante dois minutos, sendo posteriormente lavados com água destilada. A inoculação foi realizada pela deposição de uma gota contendo 40 µL de suspensão de esporos (10^5 conídios/mL) na superfície de cada fruto, sob a qual foi realizado um ferimento com agulha esterilizada. Os frutos inoculados com cada isolado foram acondicionados em bandejas contendo folhas de papel-de-filtro umedecidas, as quais foram fechadas com plástico transparente e incubadas a 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Os esporos utilizados para confecção das lâminas semi-permanentes, foram obtidos no segundo dia de esporulação de cada isolado, a partir de uma única lesão oriunda a partir do ponto de inoculação.

Para estudos das dimensões e formatos, 30 conídios escolhidos aleatoriamente de cada isolado em estudo foram avaliados em sistema de vídeo-câmara acoplado a um microscópio óptico. As mensurações das dimensões reais de cada conídio foram realizadas indiretamente por meio da mensuração da imagem dos mesmos. A imagem de aumento de 400x do microscópio óptico (Olympus® CH2) foi projetada em monitor televisivo (Color Vídeo Monitor Panasonic® CT-2084Y) através de sistema de câmara de vídeo (Digital Color Câmera CCD 1/3" SDC-320 Samsung®) acoplado ao microscópio óptico. O valor correspondente às dimensões das imagens (cm), foi convertido para

escala real (μm), correspondente às dimensões dos conídios. Para a conversão utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®) e sua imagem no aumento de 400x foi projetada no monitor. As imagens da lâmina foram medidas com uma régua e cada 40 μm da lâmina correspondiam a 19,5 cm no monitor. Assim, por meio de regra de três simples foi possível constatar que cada 1 cm medido no monitor corresponderia a 2,05 μm . Desta forma, todas as medidas de comprimento e largura da imagem dos conídios, obtidas em centímetros, foram multiplicadas por $2,05 \cdot 10^{-4}$, resultando no valor real da dimensão dos conídios, em micrômetro. Esta metodologia, proposta por Caldari Júnior (1998), já foi utilizada por alguns autores visando a caracterização morfológica de *Colletotrichum* (BUENO, 2005; SUSSEL, 2005; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

Os valores médios de comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios de cada isolado foram utilizados para análise estatística. Para esta análise a parcela experimental foi representada por um conídio, sendo utilizado, portanto, 30 repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, por meio do programa computacional SAS 9.1 para Windows®.

Para avaliação do formato de cada conídio, realizou-se uma avaliação prévia para determinação dos formatos mais comuns encontrados. Cada formato encontrado recebeu uma denominação numérica (figura 1), a qual foi utilizada para classificação dos mesmos conídios que tiveram suas dimensões mensuradas.

Figura 1 - Formatos de conídios utilizados para classificação: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; (4) reto, com constrição; (5) falcado, com ápices afilados

A frequência de conídios correspondente a cada formato foi avaliada para cada isolado. Os resultados da classificação morfológica foram comparados com os descritos por Sutton (1992), visando à identificação das espécies.

2.2.4 Identificação molecular

2.2.4.1 Extração e padronização da concentração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se metodologia descrita por Dellaporta, Wood e Hicks (1983) adaptada.

Para isso, os isolados foram cultivados por 7 dias em placas de Petri contendo meio BDA, sob temperatura de 25 ± 1 °C, no escuro. Aproximadamente 0,1 g do micélio produzido por cada isolado foi macerado em tubos para microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 500 µL de tampão de extração (NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; β -mercapoetanol 0,2%). Após a maceração, adicionou-se 33 µL de SDS 20% a cada um dos tubos, os quais foram posteriormente agitados por 30 segundos e incubados a 65°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 160 µL de acetato de potássio 5 M e a mistura foi centrifugada a 7000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi então coletado e a este foi adicionado o equivalente à metade do volume da amostra de isopropanol gelado. Após agitação lenta da mistura, procedeu-se uma nova centrifugação a 7000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e junto ao precipitado foram introduzidos 500 µL de etanol 70% em cada tubo. Novamente os tubos foram submetidos à centrifugação a 7.000 g por 5 minutos, e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O precipitado obtido foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 150 µL de água MilliQ contendo 10 mg/mL RNase A.

A concentração de DNA foi quantificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, comparando visualmente a intensidade das bandas formadas com um padrão de peso conhecido ("High DNA mass ladder" - Invitrogen®). As amostras foram então diluídas até a concentração de 10 ng DNA/µL de suspensão e armazenadas sob temperatura de -20 °C.

2.2.4.2 Análise por PCR

Para a identificação molecular pela técnica de PCR, primeiramente utilizou-se oligonucleotídeos específicos para o gênero *Colletotrichum*, para confirmar se todos os isolados pertenciam a esse gênero. Em seguida, foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. coccodes*, e para uma espécie de *Colletotrichum* não identificada, que ocorre em frutíferas na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). As condições ótimas para cada PCR foram determinadas em testes preliminares (dados não demonstrados), a partir do protocolo original.

A identificação do gênero *Colletotrichum* foi realizada utilizando-se os pares de oligonucleotídeos Cc1F1 (5'-ACC TAA CTG TTG CTT CGG CG-3') e Cc2R1 (5'-AAA TTT GGG GGT TTT ACG GC-3') (CULLEN et al., 2002). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,3 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Cc1F1 e Cc2R1) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O regime utilizado junto ao termociclador foi de um ciclo de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 65 °C e 2 minutos a 72 °C, seguido de um ciclo de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 63 °C e 2 minutos a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 61 °C e 2 minutos a 72 °C.

A identificação de *C. acutatum* foi realizada com os oligonucleotídeos Calnt2 (5'-GGG GAA GCC TCT CGC GG-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC--3') (SREENIVASAPRASAD et al., 1996). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Calnt2 e ITS4) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Para a detecção de *C. gloeosporioides* foi utilizado o oligonucleotídeo CgInt (5'-GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG-3') em conjunto com ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por Mills, Sreenivasaprasad e Brown (1992). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (CgInt e ITS4) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C.

Para a detecção de *C. coccodes* foi utilizado o oligonucleotídeo Cc1NF1 (5'-TGC CGC CTG CGG ACC CCC CT-3') em conjunto com o oligonucleotídeo Cc2NR1 (5'-GGC TCC GAG AGG GTC CGC CA-3'), descritos por Cullen et al. (2002). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,3 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Cc1NF1 e Cc2NR1) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O regime utilizado junto ao termociclador foi de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 60 segundos a 72 °C e 75 segundos a 72 °C.

A detecção de *C. capsici* foi realizada utilizando-se o oligonucleotídeo CcInt (5'-TCT CCC CGT CCG CGG GTG G-3') em conjunto com o oligonucleotídeo ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), descritos por AVRDC (2003). A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos (CcInt e ITS4) e 0,04 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O regime utilizado junto ao termociclador foi de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 63 °C e 90 segundos a 72 °C.

Além dos oligonucleotídeos espécie-específicos descritos, também foi utilizado o par de oligonucleotídeo Col1 (5'-GCC GTC CCC TGA AAA G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), os quais foram desenvolvidos para uma espécie de

Colletotrichum não identificada que ocorre em algumas frutíferas na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003). A reação foi realizada com 20 µL de solução em água MilliQ, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,0 µL do tampão 10X para PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Col1 e ITS4) e 0,05 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). O regime utilizado junto ao termociclador foi de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 65 °C e 90 segundos a 72 °C.

Após a amplificação, os produtos das PCRs foram aplicados em gel de agarose 1% contendo 0,5 µL.mL⁻¹ de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada a corrente constante de 5 volts/cm por 1 h. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta e fotografadas.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se amostras de DNA de isolados padrões das espécies *C. acutatum* (Ca, TUT-137), *C. gloeosporioides* (Cg, AVO-33-4B), *C. capsici* (CBS-335-75), *C. coccodes* (Ccc), *C. boninense* (144) e *Colletotrichum* sp. (Man-76) como referência.

2.2.5 Caracterização patogênica

Neste experimento caracterizou-se a patogenicidade de alguns isolados em frutos verdes e maduros, feridos e não feridos.

2.2.5.1 Isolados utilizados nas inoculações

Os isolados Col19, Col33, Col34, Col35, Col42, Col45, Col48, Col49, Col50, Col53, Col64, Col67 e Col73, utilizados neste experimento, foram selecionados segundo os resultados dos itens 2.2.2, 2.2.3 e 2.2.4.

2.2.5.2 Inoculações

Os inóculos foram obtidos pelo cultivo de cada isolado em meio de aveia (40g de farelo de aveia, 15g de ágar, 1 L de água destilada), sob temperatura de 25±1 °C e luz

contínua. Essas condições foram constatadas experimentalmente por Mello et al. (2004) como sendo ideais para obtenção de inóculo de um isolado de *C. gloeosporioides* obtido de pimentão. Ao sétimo dia de cultivo, cada colônia foi lavada com 10 mL de água destilada esterilizada e cada suspensão obtida foi calibrada para 10^5 esporos/mL com auxílio de uma câmara de Neubauer. Essas suspensões foram utilizadas para as inoculações.

As inoculações foram realizadas em frutos verdes (cultivar Magali) e maduros (cultivar Amanda), feridos e não feridos. Os frutos foram previamente desinfestados em hipoclorito de sódio 0,5% durante dois minutos e, em seguida, lavados em água destilada esterilizada, sendo posteriormente mantidos por um período de 24 horas em repouso para eliminação de eventuais resíduos do hipoclorito de sódio. A inoculação foi realizada por meio da deposição de gotas contendo 40 μ L da suspensão de conídios de cada isolado ajustada para 10^5 esporos/mL, em dois pontos distintos de sua superfície, uma mais próxima à região do pedúnculo e outra próxima a região estilar, denominadas de região proximal e distal, respectivamente (Bueno, 2005). Para o tratamento dos frutos feridos, sob cada gota foi realizado um ferimento com agulha histológica estéril, a uma profundidade de aproximadamente 1 mm.

Após a inoculação, os frutos foram acondicionados em câmara úmida, sendo mantidos nas mesmas durante todo o período de avaliação do experimento. Para cada tratamento utilizou-se uma câmara, constituída de uma bandeja plástica (39 cm x 28 cm x 12 cm) fechada com plástico transparente e contendo folhas de papel-de-filtro umedecidas no seu interior. As bandejas foram mantidas sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de aproximadamente 12 horas.

O mesmo procedimento foi utilizado nas testemunhas, mas utilizando apenas água destilada esterilizada nas inoculações.

2.2.5.3 Avaliações

As avaliações foram realizadas diariamente, sendo determinado o período de incubação, correspondente ao período entre a inoculação e o aparecimento de sintomas, e o período de latência, correspondente ao período entre a inoculação e a esporulação. Aos 12 dias após a inoculação, também foram avaliadas a área da lesão e a esporulação.

A determinação do período de incubação e de latência foi realizada pela observação visual ou com auxílio de lupa com aumento de 25x, sendo considerado para estes períodos, respectivamente, o primeiro dia de constatação de sintomas e o primeiro dia em que ocorreu a esporulação, em uma ou mais repetições de cada tratamento.

A determinação da área de cada lesão foi realizada utilizando o integralizador de área LI-3000 (LI-COR®). Para verificação da quantidade de esporos produzidos, cada lesão foi lavada com 25 mL de água destilada esterilizada. Posteriormente, quantificaram-se os esporos presentes em cada suspensão em câmara de Neubauer. A quantidade de esporos produzidos por centímetro quadrado da lesão foi determinada multiplicando-se o valor obtido pela contagem na câmara de Neubauer (esporos/mL) por 25 e dividindo-se o resultado obtido pela área da lesão (cm²).

2.2.5.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado duas vezes, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. A parcela experimental foi composta por um fruto inoculado. Para as análises estatísticas foi utilizada a média dos valores obtidos nas lesões proximais e distais de cada fruto. Os resultados foram transformados para $x^{1/2} + 0,5$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas através do teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa computacional SAS 9.1 para Windows®.

2.2.6. Sensibilidade a fungicidas

Este experimento objetivou a avaliação “in vitro” da sensibilidade a alguns fungicidas (sistêmicos e não sistêmicos) dos isolados Col19, Col33, Col34, Col35, Col42, Col45, Col48, Col49, Col50, Col53, Col64, Col67 e Col73. Esses isolados foram selecionados segundo resultados dos itens 2.2.2, 2.2.3 e 2.2.4.

Todos os isolados foram testados quanto à sensibilidade aos fungicidas azoxistrobina, captana, carbendazim, cloreto de benzalcônio, clorotalonil, tebuconazol e tiabendazol, nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg i.a./mL. As características gerais de cada fungicida encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Ingrediente ativo, grupo químico, modo de ação e concentração do produto comercial dos fungicidas utilizados nos experimentos

Fungicida (ingrediente ativo)	Grupo Químico	Modo de Ação	Concentração
Azoxistrobina	Estrobilurina	Sistêmico	500 g/Kg
Carbendazim	Benzimidazol	Sistêmico	500 g/L
Tiabendazol	Benzimidazol	Sistêmico	485 g/L
Tebuconazol	Triazol	Sistêmico	200 g/L
Clorotalonil	Isoftalonitrila	Não sistêmico	720 g/L
Captana	Dicarboximida	Não sistêmico	480 g/L
Cloreto de benzalcônio	Amônio quaternário	Não sistêmico	100 g/L

Fonte: AGROFIT (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)

A metodologia utilizada foi a do fungicida incorporado ao meio de cultura (CALDARI JÚNIOR, 1998). Para isso, as diferentes concentrações dos fungicidas foram adicionadas a frascos tipo Erlenmeyer contendo meio de cultura BDA Hardy Diagnostics® (39 g/L) previamente autoclavado e resfriado a temperatura entre 40 e 50 °C. Para homogeneização, agitou-se o Erlenmeyer contendo o meio BDA adicionado do fungicida, efetuando-se, posteriormente, a distribuição do mesmo em placas de Petri.

Discos de micélio com 6 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de colônias cultivadas em meio BDA por uma semana e transferidos para o centro das placas contendo o meio com as diferentes concentrações dos fungicidas. Estas colônias foram então incubadas a 25±1 °C no escuro pelo período de sete dias.

A avaliação foi realizada ao sétimo dia de incubação pela mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia, com auxílio de régua milimetrada.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta de uma placa. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi determinada segundo Menten et al. (1976) e o erro padrão de cada fator de tratamento (concentração do fungicida) foi obtido através do programa computacional Plotit 3.2 para Windows®.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização cultural

De acordo com as características culturais avaliadas, foi possível agrupar os isolados em 5 grupos distintos, com pequenas variações entre os isolados do mesmo grupo.

O primeiro grupo foi constituído por 40 isolados (Col01, Col04, Col08, Col09, Col10, Col11, Col12, Col13, Col14, Col15, Col18, Col19, Col21, Col23, Col26, Col29, Col30, Col32, Col35, Col36, Col37, Col38, Col40, Col46, Col47, Col51, Col52, Col53, Col54, Col55, Col56, Col57, Col59, Col60, Col69, Col70, Col71, Col72, Col74 e Col75). Esses isolados apresentaram coloração da colônia variando entre branca a cinza escura com reverso variando entre creme, castanho, laranja e salmão, demonstrando massas de esporos de cor laranja (tabela 3, figura 2). Os isolados deste grupo também foram caracterizados por não produzirem microescleródios e pela velocidade média de crescimento micelial próxima a 8 mm/dia, variando entre 7,0 e 9,1 mm/dia, respectivamente para os isolados Col21 e Col37 (tabela 3).

As características encontradas para o primeiro grupo são semelhantes às obtidas pelo padrão de *C. acutatum* e às descritas para essa mesma espécie por diversos autores (GUNNELL; GLUBER, 1992; SUTTON, 1992; ADASKAVEG; HARTIN, 1997).

O segundo grupo foi formado pelos isolados Col48, Col49 e Col73, os quais produziram colônias de coloração cinza clara ou cinza, com reverso cinza claro ou cinza escuro (tabela 3, figura 2). Para os isolados Col48 e Col49 também foram observadas a presença de massas de conídios de coloração alaranjada. De maneira similar ao grupo anterior, nenhum dos isolados deste grupo produziu microescleródios. Em relação à velocidade de crescimento micelial, os três isolados deste grupo apresentaram valores acima de 10,0 mm/dia, mais próximos aos obtidos para o padrão de *C. gloeosporioides* que para o padrão de *C. acutatum* (tabela 3).

Embora a coloração da colônia não tenha sido um critério consistente na separação desses dois primeiros grupos, devido à sobreposição dessa característica entre os isolados desses grupos, os isolados do segundo grupo apresentaram velocidade de crescimento micelial significativamente maior do que os do primeiro. A

maior velocidade de desenvolvimento de *C. gloeosporioides* em relação à *C. acutatum* é citada por muitos autores (GUNNELL; GLUBER, 1992; SUTTON, 1992; ADASKAVEG; HARTIN, 1997), sendo considerada uma característica cultural estável e que pode gerar resultados reproduzíveis, auxiliando na distinção das duas espécies (VINNERE, 2004). Desta forma, os resultados contribuem com a hipótese que o primeiro grupo é formado por isolados pertencentes à espécie *C. acutatum*, enquanto os do segundo grupo correspondem à espécie *C. gloeosporioides*.

No terceiro grupo ficaram oito isolados (Col44, Col45, Col63, Col64, Col65, Col66, Col67 e Col 68), que foram caracterizados pela produção de colônias densas, de coloração castanha escura ou cinza escura, com reverso marrom escuro a negro, sem a presença de microescleródios (tabela 3, figura 2). Essas características são semelhantes às citadas por Sutton (1992) para *C. capsici*. Neste grupo, foi possível distinguir os isolados quanto à origem. Os isolados Col44 e Col45, do estado de São Paulo, apresentaram crescimento micelial próximo a 10 mm/dia, diferindo significativamente dos isolados Col64, Col64, Col65, Col66, Col67 e Col68, originários de Minas Gerais, cuja velocidade de desenvolvimento foi próxima a 8 mm/dia (tabela 3).

O quarto grupo foi constituído somente pelo isolado Col34, que apresentou micélio esparso de cor branca, reverso da colônia cinza escuro, e uma grande quantidade de microescleródios pretos e globosos (tabela 3, figura 2). Essas características foram semelhantes às constatadas para o padrão de *C. coccodes* e correspondem às descrições de Sutton (1992) para esta mesma espécie.

Finalmente, os isolados Col31, Col33, Col42 e Col50 compuseram o quinto grupo, sendo caracterizados pela produção de colônias densas, de coloração branca a creme, com reverso laranja ou salmão, sem a presença de microescleródios (tabela 3, figura 2). Além dessas características, os isolados Col31 e Col50 também foram caracterizados pela produção de um pigmento de coloração salmão difundido no meio de cultura. Para este grupo, a velocidade de crescimento micelial variou entre 8,5 e 10,0 mm/dia (tabela 3). Essas características não correspondem às descrições de Sutton (1992) para nenhuma das espécies de *Colletotrichum* citadas pelo autor.

Figura 2 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA Difco[®], sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas: Isolado padrão de *C. acutatum* (a), Col38 (b), Col18 (c), Col10 (d), isolado padrão de *C. gloeosporioides* (e), Col48 (f), Col49 (g), Col73 (h), Col45 (i), Col64 (j), Col44 (k), Col67 (l), Col31 (m), Col33 (n), Col42 (o), Col50 (p), isolado padrão de *C. coccodes* (q), Col 34 (r)

Tabela 3 - Velocidade de crescimento micelial (VMC), coloração da colônia e presença de microescleródios em colônias de isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão

(continua)

Isolado	VCM (mm/dia)		Cor da colônia	Cor do reverso da colônia	Microescleródios
Col01	8,5	ghijklmno	Cinza no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col04	8,6	fghijkl	Cinza no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col08	8,4	hijklmno	Cinza no centro, extremidades brancas	Laranja	Ausente
Col09	8,5	ghijklmno	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col10	8,5	ghijklmno	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col11	8,0	lmnop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col12	8,7	fghijkl	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col13	8,5	ghijklmno	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col14	8,6	ghijklmn	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Castanha a laranja	Ausente
Col15	8,4	hijklmnop	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col18	7,8	opq	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col19	8,3	hijklmnop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col21	7,0	qr	Cinza no centro, extremidades brancas	Salmão	Ausente
Col23	8,2	jklmnop	Cinza no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col26	8,6	ghijklm	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col29	8,5	ghijklmno	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col30	8,3	ijklmnop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Laranja	Ausente
Col31	9,4	cdef	Branca	Salmão	Ausente
Col32	8,4	hijklmnop	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col33	9,2	defg	Creme	Laranja	Ausente
Col34	7,7	pq	Micélio branco, microescleródios pretos	Cinza escura	Abundante
Col35	8,0	lmnop	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha a laranja	Ausente
Col36	8,5	ghijklmn	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col37	9,1	efgh	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col38	8,1	jklmnop	Cinza no centro, extremidades brancas	Laranja	Ausente
Col40	8,4	hijklmnop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col42	10,0	c	Branca	Laranja	Ausente
Col44	9,5	cde	Cinza escura	Marrom escura	Ausente
Col45	10,0	c	Cinza escura	Marrom escura	Ausente
Col46	8,2	jklmnop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col47	7,9	lmnop	Cinza clara	Laranja	Ausente

Tabela 3 - Velocidade de crescimento micelial (VMC), coloração da colônia e presença ou ausência de microescleródios em colônias de isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão

(conclusão)

Isolado	VCM (mm/dia)		Cor da colônia	Cor do reverso da colônia	Microescleródios
Col48	10,9	b	Cinza clara	Cinza clara	Ausente
Col49	10,8	b	Cinza	Cinza clara	Ausente
Col50	8,5	ghijklmno	Creme	Salmão	Ausente
Col51	9,0	efghi	Cinza no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col52	8,1	klmnop	Cinza no centro, extremidades brancas	Laranja a salmão	Ausente
Col53	8,6	ghijklm	Cinza no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col54	8,1	klmnop	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha a laranja	Ausente
Col55	8,0	lmnop	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha a laranja	Ausente
Col56	8,8	fghijk	Cinza no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col57	8,8	fghijk	Cinza no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col59	7,8	nop	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col60	8,3	jklmnop	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Col63	8,5	ghijklmno	Cinza escura	Marrom escura a negra	Ausente
Col64	8,1	lmnop	Cinza escura	Marrom escura a negra	Ausente
Col65	8,5	ghijklmno	Cinza escura	Marrom escura a negra	Ausente
Col66	8,0	lmnop	Cinza escura	Marrom escura a negra	Ausente
Col67	8,3	ijklmnop	Castanha escura	Marrom escura a negra	Ausente
Col68	8,2	jklmnop	Cinza escura	Marrom escura a negra	Ausente
Col69	8,4	hijklmno	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col70	7,9	nop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme a laranja	Ausente
Col71	8,1	jklmnop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Laranja	Ausente
Col72	8,2	jklmnop	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Laranja	Ausente
Col73	10,0	cd	Cinza clara	Cinza escura	Ausente
Col74	6,8	r	Cinza clara no centro, extremidades brancas	Creme	Ausente
Col75	8,6	fghijkl	Cinza escura no centro, extremidades brancas	Castanha	Ausente
Ca	7,9	lmnop	Cinza clara	Laranja	Ausente
Cg	12,0	a	Cinza clara	Cinza	Ausente
Ccc	8,8	fghij	Micélio branco, microescleródios pretos	Cinza escura a negra	Abundante

Isolados: Ca (padrão de *C. acutatum*), Cg (padrão de *C. gloeosporioides*), Ccc (padrão de *C. coccodes*), Col01-Col75 (isolados de pimentão).

Dados não transformados. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Coefficiente de variação: 2,93.

2.3.2 Caracterização morfológica

A exemplo da caracterização cultural, a caracterização morfológica permitiu a diferenciação dos isolados em cinco grupos.

A predominância de conídios retos, cilíndricos e com ápices obtusos, citados como típicos de *C. gloeosporioides* (SUTTON, 1992), foi constatada para a maior parte da população amostrada, formada por um grupo de 33 isolados (Col04, Col08, Col09, Col13, Col14, Col15, Col18, Col21, Col23, Col26, Col29, Col30, Col32, Col36, Col37, Col38, Col40, Col46, Col47, Col48, Col49, Col54, Col55, Col56, Col57, Col59, Col60, Col69, Col70, Col71, Col73, Col74 e Col75) (figura 3, tabela 4). Contudo, a frequência deste tipo de conídios foi muito variável, com valor mínimo de 43% para o isolado Col09 e máximo de 90% para o isolado Col56.

Em relação às dimensões dos conídios, também foi constatada uma alta variabilidade dentro desse grupo. Dez isolados (Col09, Col37, Col46, Col48, Col49, Col54, Col60, Col73, Col74 e Col75) apresentam dimensões médias dos conídios compreendidas dentro da faixa proposta para *C. gloeosporioides*, que, segundo Sutton (1992) varia entre 12,0 e 17,0 µm de comprimento por 3,5 a 6,0 µm de largura. Os demais isolados deste primeiro grupo morfológico (Col04, Col08, Col13, Col14, Col15, Col18, Col21, Col23, Col26, Col29, Col30, Col32, Col36, Col38, Col40, Col47, Col55, Col56, Col57, Col59, Col69, Col70, Col71) apresentaram conídios com pelo menos uma das dimensões médias inferior a faixa de tamanho estabelecida para *C. gloeosporioides* e correspondente à faixa proposta para *C. acutatum* por Sutton (1992). De acordo com este autor, *C. acutatum* apresenta conídios com dimensões variando entre 8,5 e 16,5 µm de comprimento e entre 2,5 e 4,0 µm de largura.

Desta forma, devido à alta variabilidade encontrada para esses isolados e a sobreposição nas dimensões dos conídios descritas para as espécies acima citadas, baseando-se apenas nas características morfológicas avaliadas, não foi possível identificar os isolados deste grupo como sendo pertencentes a uma única espécie. Dentro deste grupo poderiam estar presentes isolados de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*.

Um segundo grupo para o qual também houve predominância de conídios retos, cilíndricos e com ápices obtusos, foi formado pelos isolados Col31, Col33, Col42 e

Col50 (figura 3, tabela 4). A frequência deste tipo de conídios foi alta, variando entre 83% para o isolado Col50 e 100% para o isolado Col31. Esses isolados diferiram significativamente dos do primeiro grupo por apresentarem conídios com maior largura, variando entre 4,6 e 5,1 μm , os quais também apresentaram as menores relações comprimento/largura, variando entre 2,8 e 3,0. Adicionalmente, alguns conídios produzidos por estes isolados apresentaram uma pequena cicatriz na região do hilo. Essas características assemelham-se às descrições de Moriwaki; Sato e Tsukiboshi (2003) para *C. boninense*. Esta espécie apresenta conídios com morfologia semelhante aos de *C. gloeosporioides*, caracterizados pelo formato cilíndrico e pelas dimensões compreendidas entre 11,5 e 17,0 μm de comprimento por 4,0 a 7,0 μm de largura. Entretanto, algumas características adicionais estão descritas na taxonomia de *C. boninense*, como a presença de cicatriz no hilo e a relação entre comprimento e largura dos conídios, compreendida entre 2,0 e 3,0 (MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003).

O terceiro grupo morfológico constatado, composto por dez isolados (Col01, Col10, Col11, Col12, Col19, Col35, Col51, Col52, Col53, Col72), produziu predominantemente conídios com formato reto, fusiforme e afilado abruptamente em cada extremidade (figura 3, tabela 4), citados como sendo típicos de *C. acutatum* (SUTTON, 1992). Embora este formato de conídio tenha sido predominante, sua frequência foi baixa, variando entre 40% e 53%, o que poderia gerar dúvida a respeito da identidade desses isolados. Porém, as dimensões médias dos conídios produzidos pelos mesmos também permitiu identifica-los como sendo *C. acutatum*. Estas dimensões variaram entre 12,8 e 15,7 μm de comprimento e entre 3,0 e 3,5 μm de largura, estando compreendidas dentro da faixa de tamanho de conídios proposta por Sutton (1992) para a espécie.

O quarto grupo morfológico constatado foi constituído por oito isolados (Col44, Col45, Col63, Col64, Col65, Col66, Col67, Col68) os quais apresentaram 100% de conídios falcados, fusiformes e gradualmente afilado para cada lado, com dimensões médias variando entre 22,8 e 26,7 μm de comprimento e 2,8 a 3,2 μm de largura (figura 3, tabela 4). Apesar do formato dos conídios desses isolados ser similar ao citado por Sutton (1992) para *C. capsici*, as dimensões apresentadas pelos mesmos não se enquadraram nas descrições desta espécie por este autor, o qual estabelece uma faixa

de tamanho compreendida entre 18 e 23 μm de comprimento por 3,5 a 4,0 μm de largura para a mesma.

Em um trabalho realizado por Sharma et al. (2005), 37 isolados de *C. capsici* oriundos da Índia foram caracterizados morfolologicamente, quanto ao comprimento e largura dos conídios. Neste trabalho ficou demonstrado não haver diferenças estatísticas significativas entre os isolados para essas características. Entretanto, as dimensões médias de conídios produzidos pelos mesmos variaram entre 26,0 e 31,5 μm de comprimento e entre 6,5 e 6,9 μm de largura, valores muito superiores à faixa de tamanho proposta por Sutton (1992) para *C. capsici* e aos obtidos para os isolados do quarto grupo morfológico. Este fato indica haver uma alta variabilidade no tamanho dos conídios produzidos por esta espécie, apresentando uma amplitude superior à descrita por Sutton (1992). Essa diferença morfológica pode estar relacionada com a origem dos isolados, fato deve ser mais bem estudado, estabelecendo-se condições de cultivo similares aos isolados procedentes das diferentes regiões.

O quinto e último tipo morfológico foi constatado apenas para o isolado Col34. Para este isolado houve predominância de conídios retos, fusiformes, às vezes apresentando leve constrição, com dimensões médias de 20,0 μm de comprimento por 3,4 μm de largura (figura 3, tabela 4). Essas características estão perfeitamente compreendidas entre as descrições de Sutton (1992) para a espécie *C. coccodes*. Adicionalmente, o isolado Col34 pôde ser diferenciado estatisticamente dos demais que produziram conídios retos, devido ao maior comprimento e relação entre comprimento e largura dos seus conídios.

Figura 3 - Conídios de isolados identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* - Col48 (a), *C. boninense* - Col33 (b), *C. acutatum* - Col51 (c), *C. capsici* - Col45 (d) e *C. coccodes* - Col34 (e)

Tabela 4 - Comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência de formato de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão (continua)

Isolado	Comprimento (µm)			Largura (µm)		Relação (comprimento/largura)		Formato* (%)						
	Média	Amplitude		Média	Amplitude	Média	Amplitude	1	2	3	4	5		
Col01	14,6	ghijklmnop	(12,3-16,8)	3,2	hijklmnopqr	(2,9-3,9)	4,6	efghijkl	(3,2-5,4)	53	13	20	14	0
Col04	13,8	ijklmnopqrs	(10,7-16,4)	3,2	ghijklmnopqr	(2,5-3,9)	4,3	fghijklmno	(2,7-5,6)	17	60	23	0	0
Col08	12,5	stu	(8,8-15,6)	3,2	ghijklmnopqr	(2,5-4,1)	3,9	klmnopqr	(2,7-5,7)	10	63	24	3	0
Col09	13,8	ijklmnopqrs	(8,0-15,6)	3,8	cde	(3,1-4,9)	3,8	nopqr	(2,5-5,1)	7	43	43	7	0
Col10	15,0	fghijk	(10,3-17,4)	3,5	defghij	(3,1-4,1)	4,3	fghijklmno	(2,9-5,3)	40	33	27	0	0
Col11	12,8	rstu	(11,5-14,8)	3,3	ghijklm	(2,9-4,1)	3,9	klmnopqr	(3,1-4,8)	44	43	10	3	0
Col12	13,3	noprstu	(11,9-15,2)	3,1	lmnopqrs	(2,5-3,7)	4,4	fghijklmn	(3,3-5,9)	50	13	20	17	0
Col13	14,6	ghijklmno	(9,2-19,5)	3,3	ghijklmno	(2,7-4,1)	4,5	fghijklm	(2,6-6,3)	17	56	27	0	0
Col14	14,8	ghijklmn	(11,9-18,0)	3,3	ghijklmn	(2,9-3,7)	4,5	fghijklmn	(3,3-5,9)	23	64	13	0	0
Col15	11,8	uv	(9,2-14,4)	3,6	defgh	(2,7-4,9)	3,4	pqrst	(2,0-4,6)	23	64	13	0	0
Col18	13,4	lmnoprstu	(10,5-16,8)	3,2	hijklmnopqr	(2,7-3,7)	4,2	ghijklmno	(3,2-4,9)	7	63	27	3	0
Col19	15,0	fghijk	(13,1-17,4)	3,2	hijklmnopqr	(2,7-3,9)	4,8	efghi	(3,7-5,8)	47	33	17	3	0
Col21	12,0	tuv	(7,6-15,0)	3,3	ghijklm	(2,5-4,3)	3,7	nopqrs	(2,6-5,0)	33	53	14	0	0
Col23	13,2	opqrstu	(10,3-16,6)	3,3	ghijklmn	(2,9-4,1)	4,0	ijklmnopq	(2,8-5,1)	17	67	16	0	0
Col26	15,0	fghijk	(13,1-19,7)	3,2	ijklmnopqr	(2,7-4,1)	4,8	efg	(3,2-6,4)	10	70	20	0	0
Col29	14,3	ghijklmnopqr	(11,3-17,4)	3,3	ghijklmnopq	(2,5-3,9)	4,4	fghijklmn	(3,3-6,1)	23	63	14	0	0
Col30	14,7	ghijklmno	(11,1-17,4)	3,3	ghijklmno	(2,7-3,9)	4,4	fghijklmn	(3,3-5,4)	17	63	17	3	0
Col31	14,0	hijklmnopqrs	(10,7-16,0)	5,0	a	(4,3-6,2)	2,8	t	(2,2-3,5)	0	100	0	0	0
Col32	13,8	ijklmnopqrs	(11,1-17,4)	3,2	ijklmnopqr	(2,7-4,1)	4,4	fghijklmn	(3,2-5,7)	23	60	17	0	0
Col33	14,1	hijklmnopqrs	(12,3-18,2)	4,9	ab	(4,1-5,5)	2,9	t	(2,4-4,2)	0	96	4	0	0
Col34	20,0	e	(14,6-22,6)	3,4	efghijklm	(2,7-5,3)	6,0	d	(3,0-7,8)	47	7	13	33	0
Col35	15,7	fg	(12,9-20,1)	3,0	mnopqrs	(2,3-3,7)	5,3	e	(3,6-7,5)	50	23	24	3	0
Col36	14,8	ghijklmn	(11,1-17,6)	3,3	ghijklm	(2,9-3,9)	4,5	fghijklmn	(3,3-5,6)	10	77	13	0	0
Col37	13,4	klmnoprst	(9,4-16,0)	3,5	defghi	(2,9-4,1)	3,8	lmnopqr	(2,9-4,9)	13	63	24	0	0
Col38	14,4	ghijklmnopqr	(10,3-18,0)	3,1	lmnopqrs	(2,3-3,7)	4,7	efghij	(3,3-6,3)	37	46	17	0	0
Col40	13,9	ijklmnopqrs	(12,1-16,2)	3,4	defghijkl	(3,1-4,1)	4,1	hijklmnopq	(3,1-5,2)	33	50	17	0	0
Col42	15,5	fgh	(12,5-17,4)	5,1	a	(4,5-5,9)	3,0	st	(2,2-3,8)	0	90	10	0	0
Col44	25,2	bc	(20,5-29,7)	2,9	opqrs	(2,5-3,7)	8,6	abc	(4,6-11,0)	0	0	0	0	100
Col45	25,0	bc	(20,5-28,7)	2,9	rs	(2,5-3,5)	8,7	abc	(7,1-10,7)	0	0	0	0	100
Col46	13,3	mnopqrstu	(11,3-15,4)	3,5	defghij	(2,9-4,3)	3,8	mnopqr	(2,8-5,3)	20	63	17	0	0

Tabela 4 - Comprimento, largura, relação comprimento/largura e frequência de formato de conídios produzidos por isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão (conclusão)

Isolado	Comprimento (µm)			Largura (µm)			Relação (comprimento/largura)			Formato* (%)				
	Média	Amplitude		Média	Amplitude		Média	Amplitude		1	2	3	4	5
Col47	14,1	hijklmnopqrs	(11,5-16,4)	3,2	hijklmnopqr	(2,5-4,7)	4,4	fghijklmn	(3,0-5,6)	30	53	14	3	0
Col48	16,4	f	(13,7-20,1)	3,7	cdef	(2,9-5,1)	4,5	fghijklmn	(3,2-6,8)	0	67	33	0	0
Col49	15,3	fghi	(11,9-21,5)	4,0	c	(3,1-5,1)	3,9	klmnopqr	(3,0-5,0)	0	67	30	3	0
Col50	13,5	nopqrstu	(10,3-17,4)	4,6	b	(3,1-5,7)	2,9	st	(2,1-3,9)	0	83	17	0	0
Col51	14,9	fghijklmn	(11,5-17,0)	3,5	defghijk	(3,1-4,1)	4,3	fghijklmno	(3,1-5,5)	53	20	27	0	0
Col52	14,2	ghijklmnopqr	(11,9-16,4)	3,2	jklmnopqrs	(2,9-3,9)	4,6	efghijkl	(3,9-5,7)	53	17	27	3	0
Col53	15,1	fghij	(11,5-19,7)	3,1	klmnopqrs	(2,5-3,7)	4,9	ef	(3,8-6,4)	43	23	27	7	0
Col54	13,0	pqrstu	(10,5-14,8)	3,6	cdefg	(2,9-4,5)	3,7	opqrs	(2,5-4,8)	7	83	10	0	0
Col55	14,2	ghijklmnopqr	(11,1-16,4)	3,3	ghijklmnop	(2,9-4,1)	4,4	fghijklmno	(3,6-5,3)	27	60	13	0	0
Col56	10,6	v	(7,0-16,4)	3,3	ghijklmno	(2,7-4,3)	3,3	rst	(2,2-5,0)	10	90	0	0	0
Col57	13,6	jklmnopqrst	(10,3-16,4)	3,3	ghijklmn	(2,5-3,9)	4,2	ghijklmno	(3,1-5,1)	20	50	20	10	0
Col59	13,6	jklmnopqrst	(11,3-15,4)	3,2	hijklmnopqr	(2,9-3,7)	4,3	fghijklmno	(3,2-5,4)	17	60	23	0	0
Col60	14,6	ghijklmno	(11,9-16,6)	3,6	cdefg	(3,1-4,1)	4,1	ghijklmnopq	(3,3-5,1)	17	76	7	0	0
Col63	24,6	bc	(20,5-29,7)	2,9	qrs	(2,5-3,7)	8,6	abc	(6,7-10,8)	0	0	0	0	100
Col64	22,8	d	(19,5-28,7)	2,8	s	(2,5-3,1)	8,3	bc	(6,3-10,9)	0	0	0	0	100
Col65	23,9	cd	(19,5-28,9)	2,9	rs	(2,5-3,5)	8,4	bc	(5,6-10,8)	0	0	0	0	100
Col66	26,7	a	(23,6-32,8)	2,9	nopqrs	(2,5-3,7)	9,2	a	(6,4-12,9)	0	0	0	0	100
Col67	25,7	ab	(20,5-29,7)	3,2	ijklmnopqr	(2,7-3,7)	8,2	c	(6,6-10,4)	0	0	0	0	100
Col68	25,9	ab	(22,6-29,8)	2,9	pqrs	(2,5-3,5)	9,0	ab	(7,3-11,0)	0	0	0	0	100
Col69	14,9	fghijklm	(11,7-17,4)	3,4	fghijklm	(2,7-4,1)	4,5	fghijklm	(3,3-6,4)	30	50	20	0	0
Col70	13,1	opqrstu	(11,3-16,4)	3,2	hijklmnopqr	(2,5-3,7)	4,1	ghijklmnop	(3,2-5,0)	13	80	7	0	0
Col71	14,5	ghijklmnopq	(11,9-17,2)	3,1	lmnopqrs	(2,5-3,9)	4,8	efgh	(3,2-7,0)	20	80	0	0	0
Col72	13,5	jklmnoprst	(11,3-17,4)	3,0	nopqrs	(2,7-3,5)	4,6	efghijk	(3,6-5,8)	43	40	17	0	0
Col73	12,9	qrstu	(10,5-16,0)	3,8	cd	(3,3-4,3)	3,4	qrst	(2,7-4,1)	0	80	20	0	0
Col74	13,8	ijklmnoprs	(11,3-18,2)	3,5	defghijk	(2,5-4,5)	4,0	jklmnopq	(3,1-5,6)	7	70	23	0	0
Col75	13,7	ijklmnoprs	(10,0-16,4)	3,5	defghijk	(2,8-4,3)	4,0	klmnopqr	(2,8-5,0)	26	57	17	0	0
C.V.	10,2			10,5			14,9							

* Formato: (1) reto, fusiforme, com ápices afilados; (2) reto, oblongo, com ápices arredondados; (3) reto, afilado em uma extremidade e arredondado em outra; (4) reto, com constrição; (5) falcado, com ápices afilados. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

2.3.3 Identificação molecular

O par de oligonucleotídeo Cc1F1 e Cc2R1, específicos para o gênero *Colletotrichum*, amplificou um fragmento de 447 pb para todos os isolados (figura 4). Este resultado mostrou que todos os isolados testados pertencem ao gênero *Colletotrichum*. Os demais oligonucleotídeos espécie-específicos utilizados também amplificaram fragmentos de DNA para determinados isolados e, dessa forma, permitiram a identificação molecular de espécies. A figura 4 ilustra alguns exemplos de fragmentos de DNA amplificados pelos diferentes pares de oligonucleotídeos.

Para a maior parte da população amostrada, representada por 40 isolados (Col01, Col04, Col08, Col09, Col10, Col11, Col12, Col13, Col14, Col15, Col18, Col19, Col21, Col23, Col26, Col29, Col30, Col32, Col35, Col36, Col37, Col38, Col40, Col46, Col47, Col51, Col52, Col53, Col54, Col55, Col56, Col57, Col59, Col60, Col69, Col70, Col71, Col72, Col74, Col75) e para os padrões de *C. acutatum* (Ca, TUT-137), observou-se amplificação de um fragmento de 490 pb quando utilizado o oligonucleotídeo Caint2 em conjunto com o ITS4, o que os identificam molecularmente como *C. acutatum*. Essa identificação corrobora a identificação baseada em características culturais. Esses resultados também correspondem aos obtidos pela identificação morfológica para 10 isolados (Col01, Col10, Col11, Col12, Col19, Col35, Col51, Col52, Col53 e Col72). Por outro lado, para os demais isolados positivos para *C. acutatum* foi verificado a predominância de conídios com formato típico ao descrito para *C. gloeosporioides* e com dimensões intermediárias entre *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Desta forma, os resultados obtidos pelos oligonucleotídeos Calnt2 e ITS4 revelam que a morfologia dos conídios não foi um critério útil para identificação específica desses isolados.

Constatação semelhante foi feita por Bueno (2005), o qual estudando uma população de *Colletotrichum* obtida de pimentão, pimenta e jiló, também verificou que a maior parte dos isolados positivos em reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos Calnt2 e ITS4 apresentavam predominância de conídios com formato semelhante ao descrito para *C. gloeosporioides*. Este autor discutiu amplamente sobre a falta de consistência das características morfológicas quando se visa à diferenciação entre *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Para 11 isolados de pimentão (Col44, Col45, Col48, Col49, Col63, Col64, Col65, Col66, Col67, Col68, Col73), além dos isolados padrões de *C. gloeosporioides* (Cg, AVO-33-4B) e de *C. capsici* (CBS-335-75), um fragmento de 450 pb foi amplificado pelo par de oligonucleotídeos CgInt/ITS4, específicos para *C. gloeosporioides* (figura 4). Entretanto, apenas 3 dos isolados de pimentão (Col48, Col49 e Col73) apresentaram características culturais e morfológicas compatíveis com esta espécie. Os demais demonstraram características culturais e morfológicas muito distintas às citadas para *C. gloeosporioides* e semelhantes a *C. capsici* (SUTTON, 1992). Esses resultados revelam a baixa especificidade dos oligonucleotídeos CgInt e ITS4 para isolados de pimentão, como já relatado em Taiwan (AVRDC, 2003).

O par de oligonucleotídeo CcInt/ITS4, específico para *C. capsici*, amplificou um fragmento de 460 pb para oito isolados de pimentão (Col44, Col45, Col63, Col64, Col65, Col66, Col67, Col68) e para o padrão de *C. capsici* (CBS-335-75) (figura 4). Para esses mesmos isolados, foram observadas características culturais e morfológicas típicas de *C. capsici* (SUTTON, 1992).

Apenas o isolado Col34 e o padrão de *C. coccodes* (Ccc) tiveram um fragmento de 349 pb amplificado pelos oligonucleotídeos Cc1NF1 e Cc2NR1, específicos para a espécie *C. coccodes*. As características culturais e morfológicas observadas para o isolado Col34 também estão de acordo com as descritas para esta espécie.

Finalmente, quatro isolados de pimentão (Col31, Col33, Col42 e Col50) e os isolados Man-76 (*Colletotrichum* sp. obtido de manga na Colômbia) e 144 (padrão de *C. boninense*), tiveram um fragmento de 520 pb amplificado pelos oligonucleotídeos Col1 e ITS4, desenvolvidos para uma espécie não identificada de *Colletotrichum* que ocorre na Colômbia. Para esses mesmos isolados, nenhum produto de amplificação foi observado com os demais oligonucleotídeos espécie-específicos testados.

A amplificação do fragmento de DNA do isolado padrão de *C. boninense* apenas com os oligonucleotídeos Col1/ITS4 é um indicativo da semelhança genética desta espécie com os isolados para os quais esses mesmos oligonucleotídeos foram desenvolvidos.

Figura 4 - Fragmentos amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos Cc1F1/Cc2R1 (*Colletotrichum* spp.), Calnt2/ITS4 (*C. acutatum*), CgInt/ITS4 (*C. gloeosporioides*), CcInt/ITS4 (*C. capsici*), Col1/ITS4 (desenvolvido para espécie de *Colletotrichum* não identificada que ocorre na Colômbia) e Cc1NF1/Cc2NR1 (*C. coccodes*), observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amostras: M (marcador molecular 1 kb), Ca e TUT-137 (padrões de *C. acutatum*), Cg e AVO-37-4B (padrões de *C. gloeosporioides*), CBS335-75 (padrão de *C. capsici*), Ccc (padrão de *C. coccodes*), 144 (padrão de *C. boninense*), Man-76 (isolado de manga da Colômbia), Col15 - Col73 (isolados de *Colletotrichum* de pimentão)

2.3.4 Distribuição e frequência das espécies de *Colletotrichum* na população amostrada

Analizando conjuntamente os resultados das caracterizações cultural e morfológica e da identificação molecular por PCR, verificou-se a presença de cinco espécies dentro da população amostrada, cuja distribuição e frequência podem ser observadas na figura 5.

A maior parte dos isolados, representada por aproximadamente 72% da população amostrada, foi identificada por meio de características culturais e por PCR como *C. acutatum*, sendo encontrada em todos os estados amostrados. Dentro dessa espécie foi possível distinguir dois grupos de isolados quanto à morfologia dos conídios. O primeiro grupo é típico da espécie, apresentando morfologia dos conídios semelhantes às descrições de Sutton (1992) para *C. acutatum*. Este grupo foi formado por 10 isolados (Col01, Col10, Col11, Col12, Col19, Col35, Col51, Col52, Col53 e Col72). O segundo grupo representa os isolados cujos conídios não são típicos da espécie. Este grupo foi o mais freqüente na população amostrada, sendo formado por 30 isolados (Col04, Col08, Col09, Col13, Col14, Col15, Col18, Col21, Col23, Col26, Col29, Col30, Col32, Col36, Col37, Col38, Col40, Col46, Col47, Col54, Col55, Col56, Col57, Col59, Col60, Col69, Col70, Col71, Col74 e Col75).

A predominância de *C. acutatum* em campos de cultivo de pimentão e pimenta já havia sido constatada no estado do Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2007). De maneira similar, a prevalência de *C. acutatum* sobre as demais espécies de *Colletotrichum* patogênicas ao pimentão também já foi relatada em Taiwan (GNIFFKE, 2003).

A segunda espécie mais frequentemente encontrada foi *C. capsici*, que correspondeu a 14% da população amostrada, sendo representada por oito isolados (Col44, Col45, Col63, Col64, Col65, Col66 e Col67) procedentes dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Estes isolados foram identificados em todas as caracterizações como sendo pertencentes a esta espécie, a qual já havia sido relatada associada a sementes de pimentão no país por Schurt, Silva Júnior e Dhingra (2005), sendo também constatada no estado do Rio Grande do Sul por Silva et al. (2007).

A espécie *C. gloeosporioides* considerada até o ano de 2005 como a única responsável pela antracnose do pimentão no Brasil (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-

SAKATE, 2005) constituiu apenas 5% da população amostrada, e foi representada pelos isolados Col48, Col49 e Col73, provenientes do estado de São Paulo e do Distrito Federal. Os resultados de todas as caracterizações realizadas com estes isolados permitiram classificá-los como sendo pertencentes a esta espécie.

Um único isolado (Col34), oriundo do Rio Grande do Sul, foi identificado em todas as caracterizações como sendo *C. coccodes*. Esta espécie já havia demonstrado ser patogênica ao pimentão no Brasil em um estudo conduzido por meio de inoculações artificiais com isolados obtidos de outras solanáceas (COSTA et al., 2005). Dessa forma, este constitui o primeiro relato deste patógeno causando antracnose em pimentão em condições naturais no Brasil.

Além dessas espécies, já conhecidas como agentes causais da antracnose do pimentão em alguns países, 4 isolados (Col31, Col33, Col42 e Col50) oriundos do estado de São Paulo e Rio Grande do Sul, distinguiram-se dos demais nas caracterizações culturais e morfológicas e pela identificação por PCR. Esses isolados produziram conídios com características morfológicas semelhantes às descritas para a espécie *C. boninense* (MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003). Adicionalmente, amostras de DNA desses isolados e do isolado padrão da espécie *C. boninense* reagiram positivamente somente com os oligonucleotídeos Col1/ITS4, desenvolvidos para uma espécie não conhecida de *Colletotrichum* que ocorre na Colômbia (AFANADOR-KAFURI et al., 2003), a qual também apresenta algumas características morfológicas semelhantes a *C. boninense*. Esses resultados, por si só, representam um grande indicativo de que estes isolados pertencem à espécie *C. boninense*. A análise de seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA desses isolados, revelou ainda, que os mesmos apresentam alta identidade apenas com isolados reconhecidamente pertencentes à espécie *C. boninense* (CÂMARA¹ informação pessoal). Este resultado confirma a identidade dos isolados Col31, Col33, Col42 e Col50 como sendo *C. boninense*, espécie que representou 7% da população amostrada. Esta parece ser a primeira constatação da espécie causando antracnose em pimentão no Brasil e em outros países do mundo.

¹ CÂMARA, M.P.S. Mensagem recebida por <nmassola@esalq.usp.br> em 22 de ago. de 2007.

Figura 5 - Distribuição das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em pimentão no Brasil (o número entre parênteses é o número de isolados encontrados para cada espécie)

2.3.5 Caracterização patogênica

Baseado na identificação dos isolados conforme resultados dos itens 2.3.1, 2.3.2 e 2.3.3, para estes experimentos foram selecionados três isolados de *C. acutatum* (Col19, Col35 e Col53), três isolados de *C. gloeosporioides* (Col48, Col49 e Col73), três isolados de *C. capsici* (Col45, Col64 e Col67), três isolados de *C. boninense* (Col33, Col42 e Col50) e um isolado de *C. coccodes* (Col34). Estes isolados foram avaliados em relação a sua patogenicidade em frutos verdes e maduros, feridos e não feridos.

Os frutos inoculados apenas com água destilada esterilizada, utilizados como tratamento controle, não apresentaram sintomas em nenhum dos experimentos.

Para os experimentos envolvendo a inoculação em frutos maduros feridos, todos os isolados foram patogênicos, apresentando período de incubação entre 2 e 4 dias e período de latência entre 3 e 7 dias (tabela 5). O isolado Col53 apresentou os menores períodos de incubação e de latência, em ambos os experimentos, enquanto os maiores

períodos foram constatados para o isolado Col42, no primeiro experimento e para os isolados Col34 e Col73, no segundo experimento.

As maiores áreas lesionadas nos frutos maduros feridos foram ocasionadas pelo isolado Col49, contudo, não foi possível diferenciá-lo estatisticamente de alguns outros isolados segundo esta característica. Em relação à esporulação, os isolados de *C. acutatum* produziram uma quantidade média de esporos superior aos das demais espécies, variando entre $16,4 \cdot 10^6$ e $32,6 \cdot 10^6$ conídios/cm² da lesão. Entretanto, no primeiro experimento, o isolado Col35 não diferiu significativamente dos isolados Col64 e Col67, de *C. capsici*, e no segundo experimento nenhum dos isolados de *C. acutatum* diferiram significativamente desses dois isolados de *C. capsici*.

Nos experimentos envolvendo frutos maduros não feridos, o período de incubação variou de 4 a 9 dias, enquanto o período de latência ocorreu entre 5 e 10 dias (tabela 6). Estes períodos foram superiores aos obtidos na inoculação envolvendo frutos feridos. Semelhantemente, Bueno (2005) já havia constatado que frutos feridos inoculados com *Colletotrichum* spp. tendem a demonstrar sintomas em um menor período que os frutos sem ferimentos.

Os isolados de *C. acutatum* apresentaram menor variabilidade em relação aos isolados das demais espécies nos frutos maduros não feridos. Esses isolados mostraram-se agressivos, sendo caracterizados por produzirem lesões grandes, acima de 8 cm², e pela alta esporulação, superior a $13,5 \cdot 10^6$ conídios/cm² da lesão. Alguns isolados de *C. capsici* e *C. gloeosporioides* promoveram lesões com áreas e esporulação estatisticamente semelhantes aos de *C. acutatum*. Entretanto, tanto para *C. gloeosporioides* como para *C. capsici* foi constatada uma alta variabilidade entre os isolados e entre os experimentos. Este fato demonstra que o comportamento patogênico dessas duas espécies não é uma característica estável e comum a todos os seus representantes, havendo isolados com níveis muito distintos de agressividade dentro das mesmas.

Considerando ainda os experimentos envolvendo frutos maduros não feridos, foi possível constatar a maior agressividade do isolado Col53, o qual promoveu as maiores áreas lesionadas e teve períodos de latência mais curtos que os demais isolados. Este isolado também promoveu uma alta esporulação, superior aos demais isolados no

primeiro experimento. Por outro lado, os isolados Col73 e Col34 foram os menos agressivos, promovendo sintomas apenas no segundo experimento, expressos na forma de lesões pequenas, necróticas e deprimidas.

Nos experimentos envolvendo a inoculação em frutos verdes feridos, apenas os isolados Col19, Col35 e Col53, pertencentes à espécie *C. acutatum*, e os isolados Col64 e Col67, pertencentes à espécie *C. capsici*, promoveram sintomas (tabela 7). Para esses isolados, o período de incubação e de latência foram próximos aos obtidos para os frutos maduros feridos. Os isolados de *C. acutatum* tiveram período de incubação variando entre 2 e 3 dias e período de latência compreendido entre 3 e 4 dias. Para os isolados de *C. capsici* que se mostraram patogênicos, o período de incubação foi de 3 dias, enquanto o período de latência variou de 5 a 6 dias.

Os isolados de *C. acutatum* foram mais agressivos também aos frutos verdes feridos, promovendo lesões e esporulação geralmente maiores que os isolados de *C. capsici*. O isolado Col53 demonstrou uma esporulação significativamente superior aos demais isolados e os menores períodos de incubação e latência, enquanto o isolado Col35 mostrou-se como o menos agressivo da sua espécie, apresentando menor esporulação e maiores períodos de incubação e de latência.

Nos frutos verdes não feridos, nenhum isolado promoveu sintomas. A ausência de sintomas nesses frutos, contudo, não significa que o patógeno não iniciou o processo de infecção. Segundo Adikaram, Brown e Swinburne (1983), a infecção pode iniciar pela germinação do esporo e formação de apressórios sobre os frutos verdes, os quais podem permanecer quiescentes e continuar o processo de infecção e colonização do hospedeiro somente após a maturação dos frutos. Bueno (2005), também constatou que frutos de pimentão verdes sem ferimentos, inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp., apresentavam longo período de incubação, variando entre 8 e 19 dias, e só demonstravam sintomas no final do processo de maturação. Desta forma, o período de avaliação do experimento após a inoculação pode não ter sido suficiente para a manifestação de sintomas de isolados que tenham iniciado o processo de infecção, mas que se mantiveram latentes.

Analisando conjuntamente os resultados dos experimentos foi possível constatar alguns aspectos interessantes sobre a patogenicidade das diferentes espécies de *Colletotrichum* presentes no Brasil.

Primeiramente, foi observado que os isolados de *C. acutatum* são mais agressivos, fato evidenciado pelos curtos períodos de latência, alta esporulação, e capacidade de promover sintomas tanto em frutos maduros (feridos e sem ferimentos) como nos verdes (feridos). Esta alta agressividade pode estar relacionada com a predominância da espécie nos campos produtores da cultura no país.

Um outro ponto que deve ser ressaltado é que, com exceção de *C. acutatum* e *C. capsici*, os isolados das demais espécies só promoveram sintomas em frutos maduros. O fato desses isolados não terem promovido sintomas nos frutos verdes pode estar relacionado a muitos motivos, como por exemplo, a menor capacidade dos mesmos produzirem enzimas ou toxinas relacionadas com o processo de infecção e colonização dos frutos verdes, a maior sensibilidade a compostos químicos presentes nos frutos verdes e ausentes nos maduros, a permanência em estado latente, etc. (ADIKARAM; BROWN; SWINBURNE, 1983; PARK et al., 1987; KIM; OH; YANG, 1999).

O comportamento patogênico diferenciado das espécies de *Colletotrichum* em frutos verdes e maduros também foi verificado por Kim, Park e Lee (1989). Segundo esses autores, *C. capsici* geralmente infecta e promove sintomas somente nos frutos maduros, enquanto *C. gloeosporioides* pode infectar e promover sintomas tanto em frutos maduros quanto nos verdes. A afirmação desses autores, entretanto, não corresponde totalmente aos resultados obtidos neste trabalho, pois dois isolados de *C. capsici* (Col64 e Col67) foram capazes de promover sintomas tanto em frutos verdes como nos maduros. Por outro lado, todos os isolados de *C. gloeosporioides* promoveram sintomas somente em frutos maduros.

Kim, Cho e Lee (1986) constataram, ainda, a existência de duas estirpes para a espécie *C. gloeosporioides* na Coreia. De acordo com estes autores, a estirpe “G” produz sintomas tanto em frutos verdes quanto nos maduros, enquanto a estirpe “R” produz sintomas apenas em frutos maduros. Desta forma, os isolados de *C. gloeosporioides* avaliados poderiam ser agrupados dentro da estirpe “R”, pois só promoveram sintomas em frutos maduros.

Um outro aspecto revelado pelos experimentos da caracterização patogênica e que pode ser útil para distinção das espécies de *Colletotrichum* que ocorrem em pimentão, especialmente em condições de campo, foi a diferença nos sintomas promovidos pelas mesmas. Nos frutos verdes e maduros os isolados de *C. capsici* promoveram lesões escuras, recobertas por uma camada mucilaginosa de esporos de coloração creme a alaranjada, diferenciando-se dos demais isolados, que promoveram lesões claras, recobertas por uma massa mucilaginosa de esporos de coloração alaranjada a salmão. O isolado de *C. coccodes* também pôde ser diferenciado dos demais pela produção de microescleródios sobre as lesões, observadas a partir do 10º dia de inoculação nos frutos maduros feridos (figura 6).

Os resultados obtidos na caracterização patogênica contribuem para a melhor compreensão da epidemiologia da doença, sendo úteis também para distinção dos agentes causais e para o desenvolvimento e/ou recomendação de medidas de controle.

Tabela 5 - Período de incubação (PI), período de latência (PL), área média da lesão (cm²) e esporulação (esporos . 10⁶) / cm² da lesão) em frutos de pimentão maduros feridos inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Espécie	Experimento 1				Experimento 2			
		PI	PL	Área da Lesão	Esporulação	PI	PL	Área da Lesão	Esporulação
col19	<i>C. acutatum</i>	2	3	8.3 abc	19.5 a	3	4	13.4 ab	18.2 ab
col35	<i>C. acutatum</i>	3	4	10.0 ab	16.4 ab	3	4	11.5 abc	19.7 ab
col53	<i>C. acutatum</i>	2	3	8.3 abc	30.5 a	2	3	12.8 ab	32.6 a
col48	<i>C. gloeosporioides</i>	3	5	5.8 cde	5.8 cd	3	4	12.7 ab	3.8 b
col49	<i>C. gloeosporioides</i>	2	4	11.0 a	2.4 cd	2	4	15.3 a	4.3 b
col73	<i>C. gloeosporioides</i>	3	6	7.9 abcd	2.6 cd	4	7	8.1 abc	2.4 b
col45	<i>C. capsici</i>	4	6	4.7 e	3.7 cd	3	5	7.1 abc	2.0 b
col64	<i>C. capsici</i>	3	6	4.5 e	7.7 bc	2	4	11.0 abc	15.3 ab
col67	<i>C. capsici</i>	3	4	7.2 bcde	8.0 bc	3	4	7.3 abc	13.7 ab
col33	<i>C. boninense</i>	3	5	6.9 bcde	1.2 d	3	5	5.3 bc	3.9 b
col42	<i>C. boninense</i>	4	7	4.6 e	2.3 cd	3	6	4.3 c	2.4 b
col50	<i>C. boninense</i>	4	6	5.1 de	1.9 cd	3	7	8.5 abc	1.4 b
col34	<i>C. coccodes</i>	3	6	6.7 bcde	1.3 d	4	7	5.7 bc	3.5 b
CV				7.5	19.35			15.3	36.75

Nota - Os valores expressos representam dados não transformados, enquanto a análise estatística foi realizada com dados transformados para $x^{1/2} + 0,5$. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 6 - Período de incubação (PI), período de latência (PL), área média da lesão (cm²) e esporulação (esporos . 10⁶) / cm² da lesão) em frutos de pimentão maduros sem ferimentos inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Espécie	Experimento 1				Experimento 2			
		PI	PL	Área da Lesão	Esporulação	PI	PL	Área da Lesão	Esporulação
col19	<i>C. acutatum</i>	5	7	8.2 ab	14.4 abc	6	7	8.3 a	27.4 a
col35	<i>C. acutatum</i>	6	8	9.0 ab	15.2 ab	7	8	9.1 a	13.5 bc
col53	<i>C. acutatum</i>	4	5	11.7 a	22.6 a	5	6	11.3 a	20.2 ab
col48	<i>C. gloeosporioides</i>	6	8	7.6 ab	8.0 abcd	7	8	7.1 ab	4.1 def
col49	<i>C. gloeosporioides</i>	5	6	10.6 a	9.3 bcd	6	9	6.8 ab	5.0 de
col73	<i>C. gloeosporioides</i>	-	-	0.0 d	0.0 e	8	10	2.1 bc	2.3 defg
col45	<i>C. capsici</i>	6	9	6.3 abc	2.5 cde	6	8	5.0 abc	1.2 gh
col64	<i>C. capsici</i>	4	6	9.2 a	18.9 ab	8	9	5.7 abc	6.8 cd
col67	<i>C. capsici</i>	4	7	10.0 a	13.7 abc	4	7	5.9 abc	13.5 bc
col33	<i>C. boninense</i>	5	8	3.4 bc	1.2 de	7	9	1.2 c	0.4 gh
col42	<i>C. boninense</i>	6	8	2.0 c	1.6 de	5	8	2.2 bc	1.5 efgh
col50	<i>C. boninense</i>	6	9	1.8 c	1.0 de	6	9	4.0 abc	1.2 fgh
col34	<i>C. coccodes</i>	-	-	0.0 d	0.0 e	9	-	1.3 c	0.0 h
CV				15.5	26.4			15.4	16.3

Nota - Os valores expressos representam dados não transformados, enquanto a análise estatística foi realizada com dados transformados para $x^{1/2} + 0,5$. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 7 - Período de incubação (PI), período de latência (PL), área média da lesão (cm²) e esporulação (esporos . 10⁶) /cm² da lesão) em frutos de pimentão verdes feridos inoculados com isolados de *Colletotrichum* spp.

Isolado	Espécie	Experimento 1				Experimento 2			
		PI	PL	Área da Lesão	Esporulação	PI	PL	Área da Lesão	Esporulação
col19	<i>C. acutatum</i>	3	4	13.8 a	14.7 b	2	3	14.3 ab	17.2 b
col35	<i>C. acutatum</i>	3	4	13.7 a	8.4 bc	3	4	13.8 ab	8.7 c
col53	<i>C. acutatum</i>	2	3	12.9 a	24.2 a	2	3	15.1 a	30.6 a
col48	<i>C. gloeosporioides</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
col49	<i>C. gloeosporioides</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
col73	<i>C. gloeosporioides</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
col45	<i>C. capsici</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
col64	<i>C. capsici</i>	3	5	7.3 b	12.2 b	3	5	8.77 c	8.4 c
col67	<i>C. capsici</i>	3	5	8.8 b	6.4 c	3	6	9.8 bc	7.2 c
col33	<i>C. boninense</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
col42	<i>C. boninense</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
col50	<i>C. boninense</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
col34	<i>C. coccodes</i>	-	-	0.0 c	0.0 d	-	-	0.0 d	0.0 d
CV				12.8	20.9			11.9	23.2

Nota - Os valores expressos representam dados não transformados, enquanto a análise estatística foi realizada com dados transformados para $x^{1/2} + 0,5$. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Figura 6 - Lesões promovidas por diferentes espécies de *Colletotrichum* em frutos maduros e verdes de pimentão, após 12 dias da inoculação: *C. capsici* - Col64 (a), *C. coccodes* - Col34 (b), *C. gloeosporioides* - Col48 (c), *C. acutatum* - Col53 (d), *C. boninense* - Col33 (e), *C. capsici* - Col64 (f), *C. acutatum* - Col53 (g)

2.3.6 Sensibilidade a fungicidas

Baseado na identificação dos isolados conforme os itens 2.3.1, 2.3.2 e 2.3.3, para estes experimentos foram selecionados três isolados de *C. acutatum* (Col19, Col35 e Col53), três isolados de *C. gloeosporioides* (Col48, Col49 e Col73), três isolados de *C. capsici* (Col45, Col64 e Col67), três isolados de *C. boninense* (Col33, Col42 e Col50) e um isolado de *C. coccodes* (Col34). Estes isolados foram avaliados em relação a sua sensibilidade a fungicidas sistêmicos (azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol) e não sistêmicos (captana, cloreto de benzalcônio e clorotalonil).

Para o fungicida azoxistrobina a maior sensibilidade foi observada para os isolados de *C. acutatum* (figura 7 e 8). Na concentração de 1 µg/mL, esses isolados tiveram redução no crescimento micelial superior a 63% quando comparados à testemunha, atingindo reduções de até 90% na concentração de 1000 µg/mL. A menor sensibilidade a este fungicida ocorreu para *C. gloeosporioides*, sendo constatada ED₅₀

(concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial) superior a 1000 µg/mL para os isolados Col48 e Col73, e redução máxima de 51% no crescimento micelial do isolado Col49 na concentração de 1000 µg/mL. Para os demais isolados foram constatados níveis intermediários de sensibilidade.

No caso do fungicida carbendazim, a menor sensibilidade foi observada para o isolado de *C. coccodes*, o qual apresentou ED₅₀ compreendida entre 100 e 1000 µg/mL (figura 7 e 9). Para as demais espécies a ED₅₀ ocorreu em concentrações menores que 1 µg/mL. Os três isolados de *C. gloeosporioides* e os isolados Col33 e Col42, de *C. boninense*, demonstraram maior sensibilidade a este fungicida, com inibição superior a 95% no crescimento micelial a partir da concentração de 1 µg/mL. Os isolados de *C. acutatum* e *C. capsici* tiveram sensibilidade intermediária, demonstrando, em todas as concentrações, redução no crescimento micelial superior ao isolado de *C. coccodes* e inferior aos isolados de *C. gloeosporioides* e *C. boninense*.

Para o tiabendazol, outro fungicida do grupo dos benzimidazóis, resultados semelhantes ao carbendazim foram obtidos. O isolado de *C. coccodes* foi o menos sensível, com ED₅₀ compreendida entre 100 e 1000 µg/mL, seguido dos isolados de *C. capsici*, com ED₅₀ entre 1 e 10 µg/mL. Para *C. acutatum*, a ED₅₀ ocorreu em concentrações inferiores a 1 µg/mL para o isolado Col19 e Col53, e entre 1 e 10 µg/mL para o isolado Col35. Os isolados de *C. gloeosporioides* e de *C. boninense*, foram mais sensíveis em diferentes concentrações deste fungicida. Reduções acima de 90% no crescimento micelial foram constatadas para todos os isolados de *C. gloeosporioides* a partir da concentração de 10 µg/mL e para os isolados Col33 e Col42 de *C. boninense*, respectivamente a partir da concentração de 10 e 1000 µg/mL.

O fungicida tebuconazol promoveu o maior controle sobre o desenvolvimento micelial da maioria dos isolados (figura 7 e 10). Para os isolados das espécies *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. coccodes*, a ED₅₀ ocorreu em concentrações inferiores a 1 µg/mL. A inibição total no crescimento micelial foi obtida a partir da concentração de 10 µg/mL para maioria dos isolados. Esta alta eficácia do tebuconazol sobre o desenvolvimento micelial de isolados de *Colletotrichum*, obtidos de pimentão e jiló, também foi constatada por Pereira (1995).

A concentração de 1 µg/mL de tebuconazol permitiu diferenciar *C. acutatum* das demais espécies. Todos os isolados desta espécie foram mais sensíveis nesta concentração do fungicida, sendo constatada uma inibição superior a 97% sobre o desenvolvimento micelial desses isolados. Este resultado corresponde ao obtido por Adaskaveg e Foster (2000), os quais também verificaram que *C. acutatum* foi mais sensível a este fungicida que *C. gloeosporioides*. Os isolados de *C. capsici* demonstraram menor sensibilidade ao tebuconazol. Enquanto, os isolados Col64 e Col67 apresentaram ED₅₀ compreendida entre 1 e 10 µg/mL, o isolado Col45 demonstrou uma ED₅₀ compreendida entre 10 e 100 µg/mL.

Em relação aos fungicidas não sistêmicos, foi observado uma menor eficiência no controle do crescimento micelial em relação aos fungicidas sistêmicos.

Para o fungicida captana, a ED₅₀ ocorreu entre as doses de 10 e 100 µg/mL para todos os isolados avaliados (figura 11). Resultados satisfatórios com este fungicida só foram obtidos a partir da concentração de 100 µL/mL. Nesta concentração a inibição do desenvolvimento micelial variou entre 63% e 95%, respectivamente para os isolados Col45 e Col34. Na concentração de 1000 µL/mL, a inibição do crescimento micelial variou entre 82% para o isolado Col49 e 98% para o isolado Col34.

A baixa eficiência “in vitro” do fungicida captana já havia sido constatada por Freeman et al. (1997) para um isolado de *C. acutatum*. Por outro lado, Adaskaveg e Foster (2000) observaram que *C. acutatum* foi menos sensível a este fungicida que *C. gloeosporioides*, fato que não foi evidente neste experimento.

O fungicida cloreto de benzalcônio também demonstrou uma baixa eficiência no controle dos fungos estudados. Para os isolados Col19, Col35, Col45, Col64 e Col73 a ED₅₀ ocorreu entre 10 e 100 µg/mL, enquanto para os demais isolados a ED₅₀ esteve compreendida entre 100 e 1000 µg/mL (figura 11). Na concentração de 1 e 10 µg/mL, os isolados de *C. acutatum* mostraram-se como os mais sensíveis a este fungicida. Entretanto, esse comportamento não foi observado nas demais concentrações.

O fungicida clorotalonil foi o menos eficiente entre os fungicidas testados. A ED₅₀ para maior parte dos isolados ocorreu entre 100 e 1000 µg/mL, exceto para os isolados Col42 e Col34, cuja ED₅₀ foi compreendida entre 10 e 100 µg/mL (figura 11). Na

concentração de 1000 µg/mL os isolados menos sensíveis foram os das espécie *C. acutatum* e o isolado Col50, da espécie *C. boninense*, os quais apresentaram redução no crescimento micelial inferior a 70%. Nesta mesma concentração, o isolado de *C. coccodes* foi o mais sensível, tendo o desenvolvimento micelial totalmente inibido.

Por meio dos resultados obtidos foi possível constatar que as espécies de *Colletotrichum* avaliadas apresentam sensibilidade diferenciada para maioria dos fungicidas testados, fato mais evidente para os fungicidas sistêmicos. Contudo, para os isolados de uma mesma espécie, foi verificada uma pequena variabilidade. Desta forma, o comportamento diferenciado entre as espécies provavelmente representam características próprias das mesmas, não estando relacionadas a casos de resistência aos fungicidas estudados.

O comportamento diferenciado entre algumas espécies de *Colletotrichum* já havia sido constatada para determinados fungicidas (BERNSTEIN et al., 1995; ADASKAVEG; FOSTER, 2000; VINNERE, 2004; THIND; JHOOTY, 1990). A sensibilidade diferenciada de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* ao benomil, por exemplo, é considerada uma característica comum aos representantes dessas espécies, e, por este motivo, tem sido muito utilizada para distinção entre elas (ADASKAVEG; HARTIN, 1997; PERES et al., 2002; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006).

A exemplo do que ocorre com o fungicida benomil, o comportamento diferenciado entre algumas espécies de *Colletotrichum* frente aos fungicidas pode ser útil para distinção das mesmas, podendo também ser útil para o desenvolvimento de um meio semi-seletivo que possa auxiliar o processo de identificação dessas espécies. Entretanto, para comprovar se esta é uma característica estável, é necessário a realização de novos experimentos. Nesses novos estudos, é interessante utilizar um número maior de isolados de cada espécie, com diferentes procedências.

Um outro ponto que precisa ser esclarecido é se o comportamento encontrado para os isolados de pimentão é comum para todos os integrantes da espécie ou apenas para o grupo de isolados associados com este hospedeiro. Algumas diferenças, provavelmente associadas ao hospedeiro de origem, podem ser constatadas comparando-se os resultados obtidos para os isolados de *C. gloeosporioides* do

pimentão com os obtidos por Tavares e Souza (2005) para um isolado de *C. gloeosporioides* do mamoeiro. Dos quatro fungicidas estudados em ambos os trabalhos, apenas para o tebuconazol os resultados foram semelhantes, sendo verificada uma ED_{50} inferior a 1 $\mu\text{g/mL}$ para os isolados desses dois hospedeiros. No caso do fungicida azoxistrobina, Tavares e Souza (2005) constataram ED_{50} inferior a 1 $\mu\text{g/mL}$ para o isolado de mamoeiro, diferindo dos resultados obtidos para os isolados de *C. gloeosporioides* do pimentão, que tiveram ED_{50} próxima ou superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para o fungicida clorotalonil o isolado de mamoeiro também apresentou alta sensibilidade, com ED_{50} inferior a 1 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pimentão apresentaram ED_{50} superior a 100 $\mu\text{g/mL}$. De maneira oposta, os isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pimentão demonstraram alta sensibilidade ao fungicida tiabendazol, com ED_{50} inferior a 10 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o isolado de mamoeiro foi menos sensível, tendo uma ED_{50} de 33 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados deste trabalho, comparados com os resultados obtidos por Tavares e Souza (2005), indicam que a sensibilidade diferenciada dos isolados desta espécie ocorre em função do seu hospedeiro de origem. A causa deste comportamento distinto pode ser interpretada de diferentes formas. A primeira hipótese é que há certa especialização desses isolados a seus hospedeiros, fato já observado para certas culturas, como algumas solanáceas (KUROZAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005). A segunda hipótese é que esses isolados tenham sido expostos em frequência e intensidade distintas a esses fungicidas, o que gerou uma resistência diferenciada entre os isolados de pimentão e de mamoeiro. As duas hipóteses podem, ainda, ser verdadeiras e ocorrer simultaneamente.

Além da diferenciação de espécies e do conhecimento da variabilidade dos isolados, os resultados obtidos nos experimentos também são úteis para o desenvolvimento de estratégias de manejo químico da antracnose do pimentão. Esses resultados demonstram a necessidade de novos estudos, sob condições de campo, para determinação da eficiência de diferentes fungicidas sobre cada espécie envolvida com a doença.

Figura 7 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum* (Col19, Col35, Col53), *C. gloeosporioides* (Col48, Col49, Col73), *C. capsici* (Col45, Col64, Col67), *C. boninense* (Col33, Col42, Col50) e *C. coccodes* (Col34) em diferentes concentrações dos fungicidas sistêmicos azoxistrobina, carbendazim, tiabendazol e tebuconazol (as barras verticais representam o erro padrão)

Figura 8 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA contendo azoxistrobina nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL: Col53 (*C. acutatum*), Col73 (*C. gloeosporioides*), Col64 (*C. capsici*), Col33 (*C. boninense*), Col34 (*C. coccodes*)

Figura 9 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA contendo carbendazim nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL: Col53 (*C. acutatum*), Col73 (*C. gloeosporioides*), Col64 (*C. capsici*), Col33 (*C. boninense*), Col34 (*C. coccodes*)

Figura 10 - Colônias de isolados de *Colletotrichum* cultivados por sete dias em meio BDA contendo tebuconazol nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL: Col53 (*C. acutatum*), Col73 (*C. gloeosporioides*), Col64 (*C. capsici*), Col33 (*C. boninense*), Col34 (*C. coccodes*)

Figura 11 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum* (Col19, Col35, Col53), *C. gloeosporioides* (Col48, Col49, Col73), *C. capsici* (Col45, Col64, Col67), *C. boninense* (Col33, Col42, Col50) e *C. coccodes* (Col34) em diferentes concentrações dos fungicidas não sistêmicos captana, cloreto de benzalcônio e clorotalonil (as barras verticais representam o erro padrão)

3 CONCLUSÕES

1. Pelo menos cinco espécies são responsáveis pela antracnose do pimentão no Brasil: *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides*.
2. *C. acutatum* é a espécie mais freqüente e mais disseminada nas principais regiões produtoras de pimentão no país.
3. Há diferenças patogênicas entre as diferentes espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela antracnose do pimentão.
4. *C. acutatum* é a espécie mais agressiva, especialmente em frutos verdes de pimentão.
5. As espécies *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. coccodes* e *C. gloeosporioides* apresentam sensibilidade diferenciada aos fungicidas azoxistrobina, tiabendazol, carbendazim e tebuconazol.

REFERÊNCIAS

- ABANG, M.M.; WINTER, S.; GREEN, K.R.; HOFFMANN, P.; MIGNOUNA, H.D.; WOLF, G.A. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 9, p. 63-71, 2002.
- ADASKAVEG, J.E.; FÖSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen Interaction**. St. Paul: APS Press, 2000. chap. 19, p. 317-335.
- ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 9, p. 979-987, 1997.
- ADIKARAM, N.K.B.; BROWN, A.E.; SWINBURNE, T.R. Observations on infection of *Capsicum annuum* fruit by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum capsici*. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 80, n. 3, p. 395-401, 1983.
- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, 2003.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 11, p. 1377-1382, 1992.
- AMORIM, L. Colonização e reprodução. In: BERGAMIM FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 16 , p. 309-323.
- ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ASIAN VEGETABLE RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER. Evaluation of phenotypic and molecular criteria for the identification of *Colletotrichum* species causing pepper anthracnose in Taiwan. **AVRDC Progress Report**. 2003. p. 92-93. Disponível em: <<http://www.avrdc.org/pdf/PR2003.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2007.

BADEL, J.L.; KELEMU, S. Variación en crecimiento, esporulación y sensibilidad a benlate de aislamientos suramericanos de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 19, n. 1, p. 2-9, 1997.

BAILEY, J.A.; NASH, C.; MORGAN, L.W.; CONNELL, R.J.O; TEBEEST, D.O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 10, p. 1076-1083, 1996.

BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 5, p. 478-482, 1995.

BEZERRA, J.L.; MENEZES, M. Taxonomia tradicional do gênero *Colletotrichum*. In: WORKSHOP REGIONAL SOBRE *Colletotrichum*, 1., 2007, Recife. **Colletotrichum' 2007 ...** Recife: UFRPE, 2007. 1 CD-ROM.

BLACK, L.L.; GREEN, S.K.; HARTMAN, G.L.; POULOS, J.M. **Pepper diseases: a field guide**. Tainan: AVRDC, 1991. 98 p.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.

BUENO, C.R.N.C. **Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas**. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes temperaturas e espectros de radiação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Anais ...** São Paulo: SBM, 2005. p. 61.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JÚNIOR, H.J. ; RAGO, A.M.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes substratos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. S134-S134, 2005. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília.

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998.

CORRELL, J.C.; RHOADS, D.D.; GUERBER, J.C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms, DNA fingerprints, and randomly amplified polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 11, p. 1199-1204, 1993.

COSTA, M.H.D.; MONTEIRO, J.H.A.; POZZA, E.A.; PFENNING, L.H.. Patogenicidade de *Colletotrichum coccodes* em frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e pimentão (*Capsicum annuum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 140, 2005. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília.

CROUCH, J.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. Phylogenetic relationships and fungicide sensitivities of *Colletotrichum graminicola* isolates from turfgrass in North America. **International Turfgrass Society Research**, Washington, v. 10, p. 186-195, 2005.

CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 281-292, 2002.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 1, p. 19-21, 1983.

DU, M.; SCHARDL, C.L.; NUCKLES, E.M.; VAILLANCOURT, L.J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 3, p. 641-658, 2005.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION. Fungicide resistance: definitions and use of terms. **Bulletin of OEPP / EPPO Bulletin**, Paris, v. 18, n. 4, p. 569-571, 1988.

FIGUEIRA, F.A.R. **Solanáceas**: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão pimenta, berinjela e jiló. Lavras: UFLA, 2003. 333 p.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. 520 p.

FORTES, J.F. *Glomerella cingulata* e *Penicillium* sp: surgimento de cepas resistentes ao benomyl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 2, p. 280, 1985.

FREEMAN, S.; KATAN, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 5, p. 516-521, 1997.

FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 6, p. 395-404, 1996.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 1014-1020, 1996.

FREEMAN, S.; NIZANI, Y.; DOTAN, S.; EVEN, S.; SANDO, T. 1997. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions. **Plant Disease**, v. 81, n. 7, p. 749-752, 1997.

FROST, R.R. Setae formation in *Colletotrichum* spp. **Nature**, London, v. 201, p. 730-731, 1964.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GNIFFKE, P. Host resistance to pepper anthracnose. Progress Report. Shanhua, Taiwan: **AVRDC – The World Vegetable Center**. 2003. Disponível em: <<http://www.avrdc.org/pdf/03anthracnose.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2005.

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

_____. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos de citros: resistente ou insensível a benomyl? **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, n. 3/4, p. 246-253, 1998.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J.C.; JOHNSTON, P.R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, Lancaster, v. 95, n. 5, p. 872-895, 2003.

GUNNEL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, Lancaster, v. 84, n. 2, p. 157-165, 1992.

HODSON, A.; MILLS, P.R.; BROWN, A.E. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from fruits. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 3, p. 329-335, 1993.

HOWARD, C.M.; MAAS, J.L.; CHANDLER, C.K.; ALBREGTS, E.E. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 976-981, 1992.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEEGER, M.J.; PUMBLEY, R.A. *Colletotrichum* species on tropical fruits. **Plant Pathology**, London, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

JOHNSTON, P.R.; JONES, D. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 3, p. 420–430, 1997.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.E.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host-pathogen Interaction. St. Paul: APS Press, 2000. chap. 4, p. 45-56.

KATAN, T.; SHABI, E. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from almond in Israel. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, n. 6, p. 597-600, 1996.

KIM, B.S.; PARK; LEE, W.S. Resistance to anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in pepper. In. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INTEGRATED MANAGEMENT PRACTICES: TOMATO AND PEPPER PRODUCTION IN THE TROPICS, 1989, Tainan. **Proceedings ...** Tainan: AVRDC, 1989. p. 184-188.

KIM, K.D.; OH, B.J.; YANG, J. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 27, n. 2, p. 1-10, 1999.

KIM, W.G.; CHO, E.K.; LEE, E.J. Two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose on pepper fruits. **Korean Journal of Plant Pathology**, Suwon, v. 2, p. 107-113, 1986.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 38, p. 761-785.

KURAMAE-IZIOKA, E.E.; LOPES, C.R.; SOUZA, N.L.; MACHADO, M.A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 4, p. 323-329, 1997.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 65, p. 592-593.

LARDNER, R.; JOHNSTON, P.R.; PLUMMER, K.M.; PEARSON, M.N. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 3, p. 275-285, 1999.

LIU, B.; WASILWA, L.A.; MORELOCK, T. E.; O'NEILL, N.R.; CORRELL, J.C. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility, and host specificity. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 10, p. 1305-1314, 2007.

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

MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 4, p. 380-383, 1995.

MARINGONI, A.C.; BARROS, E.M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 28, n. 2, p. 197-200, 2002.

MELLO, A.F.S.; MACHADO, A.C.Z.; BEDENDO, I.P. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures, and light regimes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 542-544, 2004.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 523-524, 2002. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife.

MENEZES, M.; HANLIN, R.T. Appressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnoses diseases. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 247-251, 1996a.

_____. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from Northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 228-236, 1996b.

MENTEN, J.O.M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina Phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98, n. 1/3, p. 137-144, 1992.

MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 47-53, 2003.

OH, B.J.; KIM, K.D.; KIM, Y.S. A microscopic characterization of the infection of green and red pepper fruits by an isolate of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, n. 5/6, p. 301-303, 1998.

PARK, H.K.; KIM, B.S.; LEE, W.S. Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in pepper (*Capsicum annum* L.). II. Genetic analyses of resistance to *Colletotrichum dematium*. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Suwon, v. 31, n. 3, p. 207-212, 1990.

PARK, W.N.; PARK, S.H.; LEE, Y.S.; KO, Y.H.; CHO, E.K. Differentiation of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on *Capsicum annuum* L. by electrophoretic method. **Korean Journal of Plant Pathology**, Suwon, v. 3, n. 1, p. 85-92, 1987.

PEREIRA, M.J.Z. **Reação de acessos de *Capsicum* spp. a *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose das solanáceas.** 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PEREIRA, R.M.F.V. **Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de *Colletotrichum gloeosporioides* "Sensu" Arx, isolados de pimentão (*Capsicum annuum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Raddi), e seu controle químico.** 1995. 151 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

RIBEIRO, C.S.C.; CRUZ, D.M.R. Comércio de sementes de pimentão está em expansão. Apenas o mercado nacional movimenta US\$ 1,5 milhão. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**, n. 21, set. 2003. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigo.asp?id=475>>. Acesso em: 15 jun. 2005.

ROY, K.W.; KILLEBREW, J.F.; RATNAYAKE, S. First report of *Colletotrichum capsici* on bell pepper in Mississippi. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 693, 1997.

SALES JÚNIOR, R.; TORRES, G.R.C.; GUIMARÃES, I.M. Panorama da resistência a fungicidas no gênero *Colletotrichum*. In: WORKSHOP REGIONAL SOBRE *Colletotrichum*, 1., 2007, Recife. ***Colletotrichum' 2007*** ... Recife: UFRPE, 2007. 1 CD-ROM.

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

SANDERS, G.M.; KORSTEN, L. A comparative morphological study of the South Africa avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, n. 8, p. 877-885, 2003.

SCHURT, D.A.; SILVA JÚNIOR, G.J.; DHINGRA, O.D. Ocorrência de *Colletotrichum capsici* em sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 136, 2005. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38. , 2005, Brasília.

- SHARMA, P.N.; KAUR, M.; SHARMA, O.P.; SHARMA, P.; PATHANIA, A. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici* the cause of fruit rot of chilies in the subtropical region of north-western. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 4, p. 232-237, 2005.
- SILVA, L.P.; UENO, B.; DEGENHARDT, J.; MOURA, A.B. Caracterização morfológica e cultural de isolados de *Colletotrichum* spp. de pimenta e pimentão do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 291, 2007. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40., 2007, Maringá.
- SILVA-MANN, R.; SALGADO, K.C.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Genetic variability of *Colletotrichum* complex associated with cotton seeds, by using molecular markers and plant inoculation. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2002.
- SIMMONDS, J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agriculture and Animal Science**, Brisbane, v. 22, p. 437-459, 1965.
- SMITH, B.J.; BLACK, L.L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, n. 1, p. 69-76, 1990.
- SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 265-281, 1992.
- SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 650-655, 1996.
- SUSSEL, A.A.B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium* agente causal da antracnose das curcubitáceas**. 2005. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J.) ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, 1992. p. 1-26.
- TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 9, p. 986-996, 2002.
- TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A.; BETTI, J.A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* ao benomyl na cultura do morango no estado de São Paulo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 139-146, 1997.

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

THIND, T.S.; JHOOTY, J.S. Studies of variability in two *Colletotrichum* species causing anthracnose and fruit rot of chillies in Punjab. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 43, n. 1, p. 53-58, 1990.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização tradicional de espécies de *Colletotrichum*. In: WORKSHOP REGIONAL SOBRE *Colletotrichum*, 1., 2007, Recife. **Colletotrichum' 2007 ...** Recife: UFRPE, 2007. 1 CD-ROM.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; BUENO, C.R.N.C.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* sp. de hortaliças solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 73, 2004. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27., 2004, Campinas.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

VIÑALS, F.N.; ORTEGA, R.G.; GARCIA, J.C. **El cultivo de pimientos, chiles y ajíes**. Madrid: Mundi-Prensa, 1996. 607 p.

VINNERE, O. **Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases**. Uppsala: Faculty of Science and Technology, 2004. 72 p. Disponível em: < www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-3902-1__fulltext.pdf >. Acesso em: 14 mar. 2007.

WALKER, J.; NIKANDROW, A.; MILLAR, G.D. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 10, p. 1175-1193, 1991.

WHITELAW-WECKERT, M.A.; CURTIN, S.J.; HUANG, R.; STEEL, C.C.; BLANCHARD, C.L.; ROFFEY, P.E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 3, p. 448-463, 2007.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 1, p. 121-128, 1996.