



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA MUSSOI GIACOMIN

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFO-CULTURAL
DE *Colletotrichum scovillei* E ESTUDOS DE HERANÇA DA
RESISTÊNCIA EM *Capsicum* spp.**

Londrina
2019

RENATA MUSSOI GIACOMIN

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFO-CULTURAL
DE *Colletotrichum scovillei* E ESTUDOS DE HERANÇA DA
RESISTÊNCIA EM *Capsicum* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr^a. Claudete de Fátima Ruas

Co-Orientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Giacomin, Renata Mussoi.
Caracterização molecular e morfo-cultural de isolados de *Colletotrichum scovillei* e estudos de herança da resistência em *Capsicum* spp. / Renata Mussoi Giacomin. - Londrina, 2019.
108 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.
Coorientador: Leandro Simões Azeredo Gonçalves.
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Melhoramento Genético - Tese. 2. Biologia Molecular - Tese. 3. Fitopatologia - Tese. I. Ruas, Claudete de Fátima. II. Gonçalves, Leandro Simões Azeredo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

RENATA MUSSOI GIACOMIN

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFO-CULTURAL DE
COLLETOTRICHUM SCOVILLEI E ESTUDOS DE HERANÇA DA
RESISTÊNCIA EM *CAPSICUM* SPP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo
Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende
Universidade Estadual do Centro Oeste -
UNICENTRO

Prof. Dr. Hiroshi Sumida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Paula Barion Alves Nunes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rui Pereira Leite Junior
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná -
IAPAR

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Após quatro anos de UEL, mais uma etapa está chegando ao final na minha vida. É normal e esperado que ao final do doutorado muitos sentimentos estejam envolvidos, e comigo não poderia ser diferente. Durante todos esses anos eu tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis, as quais me proporcionaram amadurecer cientificamente como também crescer pessoalmente. A todos vocês que me apoiaram, me estenderam ajuda, me fizeram sorrir e passaram de alguma forma pelo meu caminho, deixo registrado aqui a minha sincera gratidão.

Às minhas verdadeiras referências, agradeço:

GIACOMIN, A.; GIACOMIN, N.T.M. Pai e Mãe. Me educaram para estudar e sempre me ensinaram a seguir em frente. Pelo esforço para que eu pudesse me dedicar exclusivamente ao doutorado, paciência na ausência, amor a toda prova. A vocês dedico.

GIACOMIN, M.M. Minha Sis. Apesar da distância, esteve sempre pronta para me orientar, aconselhar e apoiar. Minha irmã de vida e de ciência.

RUAS, C.F. Minha Orientadora. Pela orientação, compreensão, paciência, amizade, apoio na distância, e altruísmo em compartilhar novos projetos.

GONÇALVES, L.S.A. Meu Co-orientador. Exemplo de profissional. Obrigada pela recepção, pelas oportunidades, confiança, amizade e disposição de aceitar e apoiar os desafios que enfrentamos.

RUAS, P.M.; RUAS, EDUARDO, A. Obrigada pela divisão de conhecimentos e oportunidades desde o início.

LMMCP. Amigos do Laboratório, pelos incansáveis dias de muito trabalho e risadas (ou o contrário). Lucas, Bruna, Sara, Dani, Nicholas, Luana, Gabi, Jéssica, Felipe, William, Nati, Pati... novos e velhos que guardo comigo.

LEBA. Novos amigos, nova casa que ganhei durante o doutorado. Obrigada pela recepção e pelo carinho sempre que precisei de apoio.

FITOPATOLOGIA. A todos do Lab que me receberam de braços e mentes abertas, em especial ao técnico José Rocha do por toda ajuda.

UENF. Agradeço pelo apoio e parceria; a toda equipe do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em especial a Prof. Dr Rosana Rodrigues e a Dr. Claudia Pombo Sudré pelo material cedido e ajuda nas análises.

NUNES, M.P.B. Profa Maria Paula, obrigada pelo auxílio para que eu entrasse de vez nesse mundo de fitopatologia.

VIEGAS, G.B. O melhor dos meus amigos, o meu amor. Renovação de energia diária. Somado a tudo de bom que recebi no doutorado, foi o melhor dos presentes.

GUIDONE, G.M. “Meu Estagiário”. Me fez aprender a ensinar, dividir o que já sei e querer aprender cada vez mais. Sem você não teria superado todas aquelas dificuldades. Orgulho de ver onde está.

MOREIRA, A.F.P. “Fia” obrigada pela parceria imensa nas práticas, cuidados com os campos e lab. Sem você não teria acontecido.

GODOY, S.M., , J.F. Sara e João, muito obrigada pela dedicação as pressas para que tudo acontecesse e por compartilharam o muito que aprenderam nessas análises loucas da vida.

DE ASSIS, R. Desde sempre meu amigo presente de pesquisa, eterno na parceria de vida.

AMIGOS. Serão sempre especiais. Sem palavras para agradecer a força, parceria e energia que compartilharam comigo nesses quatro anos. Em especial, Ana, Alex, Greicy, Lucas, Fernandinha, amigos da universo, amigos do massa corrida, amigos novos e velhos, obrigada pela motivação e incentivo diário.

DEAGRO. A todos os técnicos de campo, em especial ao Sr. Bieh, por toda dedicação, ajuda, e amor pelo trabalho.

CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior – Brasil – Código de Financiamento 001. Agradeço também pela bolsa concedida.

PPGGBM. Ao Programa, professores e departamento por todos os ensinamentos, apoio e oportunidades.

BANCA. Aos Professores: Dr. Paulo Maurício Ruas, Dr. Juliano T. V. de Resende, Dra. Maria Paula B. A. Nunes e Dr. Rui P. Leite, pela participação na banca de avaliação e sugestões.

À Deus, por estar sempre comigo, mesmo nos momentos de pouca fé.

GIACOMIN, Renata Mussoi. **Caracterização molecular e morfo-cultural de *Colletotrichum* spp. e estudos de herança em *Capsicum* spp.**: 2019. 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A antracnose é considerada uma das principais doenças fúngicas nas culturas do pimentão e da pimenta. Causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, esta doença pode provocar lesões em todas as partes das plantas, causando danos principalmente nos frutos em pré e pós colheita. Existem diferentes metodologias *a posteriori* para o controle e manejo da antracnose, porém a estratégia mais eficiente é o uso de cultivares resistentes, uma vez que além de minimizar as perdas, contribui também para a redução no uso de fungicidas químicos. Entretanto, a utilização de cultivares resistentes enfrenta grandes desafios em virtude da variabilidade do patógeno associado a diferentes respostas de resistência em relação a maturação dos frutos de *Capsicum*. Um dos primeiros passos para manejo da doença é a identificação e caracterização do patógeno, para a partir dessas informações definir estratégias efetivas de controle, buscar fontes de resistência e desenvolver genótipos com características desejadas. Os objetivos desse trabalho envolveram: i) identificar e caracterizar 11 isolados de *Colletotrichum* spp. coletados no estado do Rio de Janeiro; ii) avaliar a resposta de resistência à antracnose, em frutos imaturos e maduros de *Capsicum baccatum* e identificar fontes de resistência para o uso em programas de melhoramento e iii) analisar a herança de resistência a antracnose em frutos imaturos e maduros de *Capsicum annuum*. A caracterização dos isolados foi realizada por meio de caracteres morfológicos, moleculares e características de colonização. Para a identificação dos isolados foi realizado o sequenciamento de cinco regiões gênicas: ITS, gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH), actina (ACT), β -tubulina (TUB2) e calmodulina (CAL). A resposta da resistência em *C. baccatum* foi visualizada em frutos imaturos e maduros de 51 acessos que foram avaliados quanto a severidade dos sintomas da antracnose aos 35 e 50 dias após a antese, respectivamente. Para analisar a herança genética da resistência, frutos nos dois estádios de desenvolvimento de seis gerações de *C. annuum* foram inoculados com *Colletotrichum scovillei*. Os sintomas foram avaliados durante oito dias por uma escala de notas, que foram submetidas a testes estatísticos para identificar os parâmetros genéticos, o padrão de segregação e o efeito dos genes envolvidos. Os resultados da caracterização e sequenciamento multilocus permitiram identificar os isolados como pertencentes a espécie *Colletotrichum scovillei*. Os acessos de *C. baccatum* apresentaram uma ampla variabilidade na resposta à infecção e comportamento diferenciado destes frente aos estádios de maturação dos frutos. Frutos maduros apresentaram maior resistência à antracnose em relação aos frutos imaturos. Dos 51 acessos testados, quatro deles apresentaram-se resistentes nos dois estádios de maturação dos frutos. A análise da herança da resistência nas gerações de *C. annuum* mostrou expressão independente em frutos imaturos e maduros. Entretanto, em ambos os casos a resistência é controlada por dois genes principais, sendo esses associados a efeitos de poligenes de efeito menor. Estes resultados fortalecem estudos futuros e fornecem apoio ao desenvolvimento de tecnologias e estratégias que tragam benefícios a produção de pimentas e pimentões principalmente em relação ao controle da antracnose e utilização de fontes de resistência em programas de melhoramento.

Palavras-chave: Antracnose. *Colletotrichum scovillei*. Maturação de frutos. Pimenta. Pimentão. Resistencia.

GIACOMIN, Renata Mussoi. **Caracterização molecular e morfo-cultural de *Colletotrichum* spp. e estudos de herança em *Capsicum* spp.** 2019. 108 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Anthrachnose is considered one of the main fungal disease in chili and sweet pepper crops. Caused by species of the genus *Colletotrichum*, this disease can make injuries in all parts of the plants, causing damage mainly in fruits in pre and post-harvest. There are different methodologies to control and management of anthracnose, but the most efficient strategy is the use of resistant cultivars, since, in addition to minimizing losses, it also contributes to the reduction in the use of chemical fungicides. However, the use of resistant cultivars faces major challenges due to the variability of the pathogen associated with different resistance responses in relation to the stage of *Capsicum* fruit maturation. One of the first steps for handling of the disease is the correct identification and characterization of the pathogen, from this information set effective control strategies, seek sources of resistance and develop genotypes with desired characteristics. The objectives of this work involved: i) identify and characterize 11 isolates of *Colletotrichum* spp. collected in the state of Rio de Janeiro; ii) evaluate the response of anthracnose in unripe and ripe fruits of *Capsicum Baccatum* and identify sources of resistance to the use in breeding programs and iii) to analyze the inheritance of resistance to anthracnose in unripe and ripe fruits of *Capsicum annuum*. The characterization of the isolates was performed by morphological, molecular and colonization characteristics. For the identification of the isolates, we used five regions by sequencing: ITS, glyceraldehyde-3-phosphatodehydrogenase (GAPDH), actin (ACT), β -tubulin (TUB2) and calmodulin (CAL). The resistance response in *C. baccatum* was performed in unripe and ripe fruits, that were evaluated for the severity of the anthracnose symptoms at 35 and 50 days after anthesis, respectively. To analyze the genetic inheritance of resistance, fruits in the two developmental stages of six generations of *C. annuum* were inoculated with *Colletotrichum scovillei*. The symptoms were evaluated for eight days by a scale of grades, which were subjected to statistical tests to identify the genetic parameters, the pattern of segregation and the effect of the genes involved. The results of the characterization and multilocus sequencing allowed to identify the isolates as belonging to the species *Colletotrichum scovillei*. The accesses of *C. baccatum* showed a wide variability in the response to infection and differentiated behavior of these in front of the maturation stages of the fruits. Ripe fruits showed higher resistance to anthracnose in relation to the unripe fruits. Of the 51 accessions tested, four of them were resistant in the two stages of fruit development. The analysis of the inheritance of resistance in generations of *C. annuum* showed independent expression in unripe and ripe fruits. However, in both cases the resistance is controlled by two genes associated with the effects of polygenes with lower effect. These results strengthen future studies and provide support for the development of technologies and strategies that bring benefits to the production of chili and sweet peppers mainly in relation to anthracnose control and use of resistance sources in breeding programs.

Key words: Anthracnose. *Colletotrichum scovillei*. Fruit ripening. Sweet and chili pepper. Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Esquema simplificado das estruturas de infecção de *Colletotrichum* spp. Fonte: MENDGEN; DEISING, 1993)..... 24
- Figura 2:** Microscopia eletrônica mostrando as características da infecção de *Colletotrichum* spp. C) Conídio; A) Apressório; IV) Vesícula; PH) Hifa de penetração (Fonte: DEAN et al., 2012). 24
- Figura 4:** Representação da escala de notas proposta por Montri et al., (2009), na escala de 0 a 9, para caracterização da severidade dos sintomas da antracnose em diferentes espécies de frutos de *Capsicum*. (A) *C. annuum* Bang-chang; (B) *C. annuum* Jinda; (C) *C. frutescens* Kheenoo Suan; (D) *C. baccatum*; (E) *C. chinense* C04714; e (F) *C. chinense* PBC932. 26

ARTIGO A

- Figura 1:** Aspecto e coloração do micélio dos 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Vista frontal e do verso da placa em meio de cultura BDA A) UEL01; B) UEL09; C) UEL8.1U; D) UEL8.1F; E) UEL12; F) UEL22; G) UEL27; H) UEL42; I) UEL53; J) UEL71; K) UEL72. 45
- Figura 2:** Filograma criado apartir das regiões gênicas GAPDH, B-TUB, ACT e ITS com espécies dos complexos acutatum, gloeosporioides e truncatum e outras espécies do gênero. O modelo evolutivo utilizado para todos os genes foi GTR+I+G. Os valores de probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em fonte maior. O * indica o acesso de *C. scovillei* compilado do GenBank. A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o *outgroup* *Monilochaetes infuscans*..... 48
- Figura 3:** A) Neighbor-Net construída a partir da distância P não corrigida utilizando as cinco regiões gênicas para as espécies de *Colletotrichum* e B) Clusters formados a partir da análise Bayesiana das cinco regiões gênicas e espécies do gênero. 49

- Figura 4:** Análises de agrupamento indicando a variabilidade presente nos 11 isolados de *Colletotrichum scovillei* A) Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o outgroup para enraizar a árvore *Fusarium* sp. B) Clusteres formados pela análise Bayesiana; C) Análise das Coordenadas Principais (PCoA)..... 51
- Figura 5:** Superfície da epiderme de fruto imaturo de *C. annuum* inoculado com *C. scovillei*. As imagens foram obtidas diariamente durante sete dias. Na coluna A imagens do corte paradérmico d região inoculada em microscopia eletroscópica. Na coluna B corte paradérmico da região inoculada em microscopia de varredura. Em C corte transversal em microscopia ótica e em D corte transversal e microscopia de varredura..... 53
- Figura 6:** Imagens de microscopia da colonização de *C. scovillei* em *C. annuum*. A) Conídio germinado com apressório na superfície do hospedeiro. B e C) Conídios germinando. e D) Formação de conídio a partir de hifas secundárias em processo de re-infecção. 54
- Figura 7:** Patogenicidade de *Colletotrichum scovillei* em frutos de *Capsicum* spp. após sete dias de inoculação. As imagens mostram os sintomas em frutos imaturos e maduros. A) GB-131; B) GB-189; C) Frutos imaturos com sintomas de GB-104 D) Frutos maduros com ausência de sintomas de GB-104. 56
- Figura 8:** Correlação de Spearman entre duas variáveis: nota da severidade da antracnose e área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD em 51 acessos de *Capsicum* spp. em dois estádios de desenvolvimento do fruto (FI: frutos imaturos, e FM: frutos maduros). 59

Material Suplementar

- Figura Suplementar 1:** Filogramas da região gênica ACT contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp.. Os valores de probabilidade a

posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em fonte destaque (rosa). A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o *outgroup Monilochaetes infuscans*. **Error! Bookmark not defined.**

Figura suplementar 2: Filograma da região gênica GAPDH contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Os valores da probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em destaque (roxo). A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o *outgroup Monilochaetes infuscans*. 77

Figura suplementar 3: Filograma da região gênica ITS contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Os valores da probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em destaque (verde). A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o *outgroup Monilochaetes infuscans*. 78

Figura suplementar 4: Filograma da região gênica TUB2 contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Os valores da probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em destaque (rosa escuro). A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o *outgroup Monilochaetes infuscans*. 79

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1:** Análise não-paramétrica e valores médios para os efeitos da inoculação de *Colletotrichum scovillei* em frutos de 51 acessos de *Capsicum* spp., em dois estádios de desenvolvimento do fruto. 55
- Tabela 2:** Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e Nota de Severidade para os efeitos da inoculação de *Colletotrichum scovillei* em frutos de 51 acessos de *Capsicum* spp., em dois estádios de desenvolvimento do fruto..... 57

Material Suplementar

- Tabela suplementar 1:** Caracterização morfológica e cultural de 11 isolados de *Colletotrichum* spp. 69
- Tabela Suplementar 2:** Cinco regiões gênicas utilizadas na análise multilocus dos isolados de *Colletotrichum* spp. com seus respectivos primers 71
- Tabela Suplementar 3:** Espécies do gênero *Colletotrichum* utilizadas neste trabalho com detalhes dos isolados e números de acessos ao GenBank das cinco regiões gênicas..... 72
- Tabela Suplementar 4:** Distância genética de Nei (1972) entre os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. 75

ARTIGO B

- Table 1:** Phenotypic segregation of resistance and susceptibility to *C. scovillei* in the P1, P2, F1 and F2 generations and chi-square test (χ^2) for segregation in the two stages of fruit development..... 96

Table 2: Genetic parameters of the F2 population obtained from the AUDPC in unripe and ripe <i>Capsicum annuum</i> fruits inoculated with <i>Colletotrichum scovillei</i>	97
Table 3: Estimation of genetic effects and significance test of the hypothesis of nullity of genetic parameters (t) in the complete model of unripe and ripe <i>Capsicum annuum</i> fruits inoculated with <i>Colletotrichum scovillei</i>	98
Table 4: Hypothesis tests for the hierarchical genetic models of the genetic inheritance of <i>Colletotrichum scovillei</i> in unripe and ripe <i>Capsicum annuum</i> fruits.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACPD	Área Abaixo Da Curva Do Progresso Da Doença
ACT	Actina
ADD	Average Dominance Degree
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polimorfism</i>
ANOVA	Análise de Variância
AUDPC	<i>Area Under Disease Progress Curve</i>
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CAL	Calmodulina
CTAB	<i>cetyltrimethylammonium bromide</i>
DAA	Dias Após a Antese
DAI	Dias Após a Inoculação
DBC	Delineamento em Blocos Casualizados
DF	Desenvolvimento de Fruto
DMSO	<i>dimetilsufoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GAPDH	Gliceraldeído – 3 – fosfato desidrogenase
GS	Glutamina sintetase
ICNAFP	Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia óptica
PCR	Reação da Polimerase em Cadeira (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDA	<i>Potato Dextrose ágar</i>
PePYMV	<i>Pepper Yellow Mosaic Virus</i>
PP	Probabilidade Priori
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SAM	Seleção Assistida por Marcadores

SNP	<i>Single Nucleotide Polimorfism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
TUB	B-tubulina
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UENF	Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VCC	Velocidade de Crescimento da Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15	
2	OBJETIVOS	17	
2.1	Objetivo Geral	17	
2.2	Objetivos Específicos	17	
3	REVISÃO DE LITERATURA	18	
3.1	Gênero <i>Colletotrichum</i>	18	
3.1.1	Características e classificação.....	18	
3.1.2	Taxonomia.....	18	
3.2	Gênero <i>Capsicum</i>	20	
3.3	Antracnose - Interação entre <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Capsicum</i> spp.	22	
3.3.1	Estratégias de infecção de <i>Colletotrichum</i> spp.....	23	
3.3.2	Sintomas da Antracnose em <i>Capsicum</i> spp.	24	
3.3.3	Estratégias de Controle da Doença.....	26	
3.4	Melhoramento Genético de <i>Capsicum</i> spp.	27	
3.4.1	Bancos de Germoplasma.....	27	
3.4.2	Principais Doenças em <i>Capsicum</i> spp.	27	
3.4.2	Melhoramento visando a resistência de <i>Capsicum</i> spp. a antracnose.....	28	
3.4.3	Estudos de herança.....	29	
3.4.4	Marcadores Moleculares e o Melhoramento.....	30	
3.4.4	Filogenia baseada no sequenciamento de regiões conservadas.....	31	
ARTIGO A: Caracterização fenotípica, molecular e patogenicidade em			
<i>Capsicum</i> spp. de isolados de <i>Colletotrichum scovillei</i> provenientes			
do Estado do Rio de Janeiro – Brasil.			32
Introdução			33
Material e Métodos			35
Coleta e Manutenção dos Isolados.....			35
Caracterização Morfológica e Cultural.....			35
Extração do DNA.....			36
Reação de amplificação das regiões parciais dos genes GAPDH, ACT, CAL, β -TUB e ITS-DNAr.....			36
Análise dos Dados - Filogenia.....			37
Amplificação dos marcadores AFLP.....			38

Análises dos Dados AFLP	39
Microscopia da colonização de <i>Colletotrichum</i> spp. (isolado UEL8.1U) em <i>Capsicum annuum</i>	40
Microscopia eletrônica de varredura – MEV	41
Patogenicidade isolado UEL8.1U em acessos de <i>C. baccatum</i>	42
Resultados	44
Caracterização morfo-cultural dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	44
Filogenia e identificação dos isolados	45
Variabilidade dos isolados de <i>Colletotrichum scovillei</i> por meio de marcadores moleculares AFLP	50
Análise microscópica da colonização de <i>Colletotrichum scovillei</i> (Isolado UEL8.1U) em frutos imaturos de <i>Capsicum annuum</i> L.	52
Patogenicidade de <i>Colletotrichum scovillei</i> (isolado UEL8.1) em <i>Capsicum</i> spp.	55
Discussão	59
Referências Citadas	63
Material Suplementar	69

ARTIGO B: Inheritance of anthracnose resistance caused by *Colletotrichum scovillei* in unripe and ripe *Capsicum annuum* fruits (Plant Disease)

Introduction	81
Material and methods	83
Population development	83
Disease inoculation and evaluation	84
Data analysis	84
Results and discussion	87
Literature cited	92

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
-------------------------------------	-----

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
---	-----

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* compreende em torno de 200 espécies de fungos causadores de doenças em plantas. Possui uma gama de hospedeiros, como espécies altamente cultivadas, hortaliças, espécies frutíferas e ornamentais. Além disso também é considerado um modelo de estudos fitopatológicos, bioquímicos e moleculares. Por apresentar estas características, *Colletotrichum* compõe a lista dos dez fungos mais importantes para a agricultura mundial. A doença causada por estes agentes patogênicos é conhecida popularmente como antracnose. Esta patologia tem a capacidade de causar podridões em praticamente todas os órgãos das plantas, tanto no pré quanto na pós colheita, o que justifica a vasta importância científica e econômica do gênero. Apesar de ser uma doença de entrave mundial, as condições climáticas das regiões tropicais e subtropicais, como elevadas temperaturas e umidade constante, são extremamente favoráveis ao crescimento desta doença, já que a disseminação e contágio se dão principalmente na presença de água.

Entre as hortaliças hospedeiras de *Colletotrichum*, as pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) estão entre as plantas que mais sofrem danos de produção. Estas hortícolas estão entre os constituintes mais importantes da cozinha de países tropicais e subtropicais, principalmente pela versatilidade de consumo e importância nutricional. Porém, apesar dos avanços tecnológicos na produção a antracnose tem sido reportada como a doença que mais prejudica a produção, já que danifica principalmente os frutos que são o rendimento mais lucrativo da cultura. Tipicamente, os sintomas nos frutos são caracterizados por pequenas lesões depressivas embebidas em água, subcirculares ou angulares com margens castanho-claros. Nos estágios iniciais da infecção, as lesões formam anéis concêntricos de acérvulos úmidos, geralmente de cor salmão.

Diferentes espécies de *Colletotrichum* podem causar antracnose em pimentas. Atualmente são relatadas pelo menos 24 espécies que possuem *Capsicum* spp. como hospedeiro. A correta identificação do patógeno é o passo inicial e fundamental para a aplicação direcionada de práticas de manejo. O conhecimento e caracterização do patógeno em questão permite relacionar informações sobre o desenvolvimento da doença, as interações entre doença e hospedeiro, a relação com as condições ambientais e principalmente traçar estratégias efetivas para o manejo, visando a redução de danos, tanto de produção quanto ambientais.

Até o surgimento das análises moleculares, a identificação das espécies de *Colletotrichum* spp. tinha como base a morfologia dos fungos, como morfologia dos

conídios, presença ou ausência de cerdas e esclerócios, e características da cultura micelial. Entretanto, ao utilizar apenas características morfológicas aumentam as chances de erro na identificação, já que estas são influenciadas pela grande variação dentro das espécies. Com o advento de técnicas de sequenciamento de DNA e filogenéticas, a taxonomia do gênero *Colletotrichum* tem sido constantemente reavaliada. Para a identificação correta dos táxons sugere-se desenvolver análises filogenéticas multilocus, baseadas em sequências conservadas.

A correta caracterização e identificação do patógeno permite traçar diferentes estratégias de manejo da doença além de fundamentar estudos a respeito da evolução da doença, bem como resistência do hospedeiro. Em *Capsicum* spp. existem diferentes estratégias de manejo para o controle da antracnose que incluem as metodologias tradicionais como a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, aplicação de fungicidas químicos e o controle biológico. Contudo, a abordagem que traz maiores benefícios econômicos e sustentáveis é o uso de cultivares resistentes, uma vez que além de minimizar as perdas, contribui também para a redução no uso de fungicidas químicos no controle da doença.

O desenvolvimento de cultivares resistentes enfrenta grandes desafios e envolvem o conhecimento de acessos de *Capsicum* que carreguem essa característica, além das diferentes interações entre patógeno, hospedeiro e estágio de desenvolvimento do fruto. No entanto, esta é uma tarefa difícil, pois no patossistema *Colletotrichum/Capsicum* existe a associação de mais de um patógeno com espécies hospedeiras diferentes, somado a sua capacidade de virulência e de infecção em diferentes estádios de maturação dos frutos. No gênero *Capsicum* já foram identificadas algumas fontes de resistência a antracnose, porém os investimentos estão restritos a algumas espécies de *Colletotrichum* e *Capsicum*.

Portanto, a associação de diversas metodologias de caracterização que serão apresentadas neste trabalho – conhecimento e identificação de isolados de *Colletotrichum* spp., análise visual da infecção e colonização da antracnose, busca de fontes de resistência em diferentes espécies de *Capsicum*, e análise da herança da resistência a doença – pode fortalecer futuros estudos e subsidiar o desenvolvimento de tecnologias que tragam benefícios a produção de pimentas e pimentões e controle da antracnose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar isolados de *Colletotrichum* spp. e conhecer a herança da resistência em *Capsicum* spp.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar morfológicamente e culturalmente isolados de *Colletotrichum* spp. coletados no estado do Rio de Janeiro.
- b) Identificar as espécies dos isolados por meio do sequenciamento de regiões multilocus específicas.
- c) Estimar as relações filogenéticas dos isolados dentro do gênero *Colletotrichum*.
- d) Estimar a variabilidade genética entre os isolados por meio de marcadores AFLP.
- e) Visualizar por meio de diferentes técnicas de microscopia o processo de infecção e colonização de *Colletotrichum* spp. em *Capsicum annuum*.
- f) Testar a patogenicidade de *Colletotrichum* spp. em espécies de *Capsicum* spp.
- g) Procurar fontes de resistência a antracnose entre acessos de *Capsicum baccatum* do Banco de Germoplasma da UEL.
- i) Analisar a herança da resistência de *Capsicum annuum* a antracnose, causada por *Colletotrichum scovillei*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Colletotrichum*

3.1.1 Características e classificação

Colletotrichum Corda é um dos gêneros mais comuns e importantes de fungos capazes de causar doenças em plantas, sendo classificado como o oitavo mais patogênico no mundo, justamente pela sua ampla gama de hospedeiros e pela sua agressividade. As espécies do gênero podem afetar a maioria das espécies de plantas cultivadas no mundo (O'CONNELL, et al., 2008; DEAN, et al., 2012), causando manchas e podridões em praticamente todas os órgãos das plantas, no pré e no pós-colheita. As perdas por infecções com *Colletotrichum* spp. se estendem desde espécies altamente cultivadas como feijão, soja e milho, a hortaliças como as pimentas e tomate, além de espécies frutíferas como mamão, maracujá e uva (MONGKOLPORN; TAYLOR, 2018).

A antracnose é a doença causada por espécies do gênero de *Colletotrichum* de fase assexuada que pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Coeleomycetes de fungos imperfeitos, que produzem conídios em acérvulos (DEAN et al., 2012). É uma doença de entrave mundial, apesar de ter maior incidência em regiões tropicais e subtropicais, onde elevadas temperaturas e umidade constante proporcionam as condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (ROBERTS et al., 2001). O contágio e a disseminação da doença podem ocorrer por sementes infectadas, pelo vento e pela água, que podem espalhar facilmente os conídios do fungo de plantas infectadas para não infectadas (SAXENA et al., 2016).

Devido sua grande importância como agente causador de doenças em plantas, o gênero *Colletotrichum* é considerado um modelo de estudos em fitopatologia, como estudos bioquímicos, fisiológicos e genéticos (DEAN et al., 2012). Além disso, as espécies do gênero possuem uma estratégia de infecção chamada hemibiotrófica, ou seja, capacidade de possuir duas fases distintas para a infecção e colonização (PERFECT et al., 1999). Espécies deste gênero exibem diferentes mecanismos de infecção dependendo do hospedeiro, do órgão a ser colonizado e do estágio de desenvolvimento do fruto. Geralmente, o processo infeccioso se dá na presença de água.

3.1.2 Taxonomia

Apesar dos desenvolvimentos significativos, a taxonomia

Colletotrichum permanece em estado de fluxo. Para a classificação das espécies do gênero são considerados quatro critérios principais: i) reconhecimento de espécies biológicas, ii) reconhecimento de espécies morfológicas, iii) reconhecimento de espécies ecológicas e iv) reconhecimento de espécies filogenéticas (TAYLOR et al., 2000; GIRAUD et al., 2008; CAI et al., 2011). Até os anos 1990s a identificação das espécies de *Colletotrichum* tinha como base as características morfológicas, como forma e tamanho dos conídios, presença de cerdas e apressórios, juntamente com a especificidade do hospedeiro. Seguindo estes critérios, cerca de 900 espécies foram designadas erroneamente (SUTTON, 1980, 1992). No entanto, a identificação de uma espécie fúngica, com base exclusivamente em caracteres morfológicos não é completamente confiável, já que além de não levar em consideração o conceito biológico de espécie, também não considera a alta influência ambiental sobre o fenótipo analisado e nem sempre são realizados estudos de patogenicidade (CANNON et al., 2012).

Com o desenvolvimento e facilidade de acesso a análises moleculares, como as tecnologias de sequenciamento de DNA e estudos de diversidade realizados com base em marcadores moleculares, a identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* tem se tornado mais popular. Os estudos moleculares iniciais tiveram como base a análise de polimorfismos obtidos por meio de marcadores RFLP e de sequências do DNA ribossômico 5.8s e espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WHITE et al., 1990; SREENIVASPRASAD et al., 1996). Porém, apesar das regiões ITS fornecerem excelentes informações para identificação de espécies em alguns gêneros de fungos, sozinhas não oferecem uma boa resolução para identificação de espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009; CROUCH et al., 2009; DAMM et al., 2009, 2010; GAZIS et al., 2011; CANNON et al., 2012; SHARMA et al., 2013b). Assim, estudos recentes sugerem a abordagem de mais de um critério para a identificação de *Colletotrichum* spp. (SHARMA et al., 2013a e 2015). Desde então, sequências de genes do DNA dos fungos estão sendo aplicadas para desenvolver análises filogenéticas multigênicas e assim revisar a taxonomia do gênero. Esta abordagem polifásica considera tanto as características da cultura e morfologia como análises filogenéticas multigênicas (CAI et al., 2009).

A análise filogenética do gênero *Colletotrichum* mostra nove clados superiores, além de uma série de pequenos grupos e espécies isoladas. Porém, não há atualmente nenhum processo universalmente aceito para nomear os clados com as

categorias sistemáticas tradicionais do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (ICNAFP). Filogeneticamente o gênero possui muitas subunidades monofiléticas com características comuns, porém não classificadas como mesma espécie. Assim, os cladogramas são nomeados conforme espécie tipo representada no grupo. Os principais complexos reconhecidos para *Colletotrichum* são: *acutatum*, *gloeosporioides*, *boninense*, *graminicola*, *spaethianum*, *destructivum*, *dematium*, *truncatum* e *orbiculare* (CANNON et al., 2012).

3.2 Gênero *Capsicum* L.

Capsicum L. é o gênero botânico onde estão classificadas as pimentas e pimentões. Essas hortaliças são amplamente cultivadas, preferencialmente em regiões tropicais e subtropicais. A América Central é considerada como centro de origem de *Capsicum* enquanto os países da América do Sul, incluindo o Brasil, como centros de diversidade (DIAS et al., 2013). Atualmente, as espécies do gênero estão disseminadas na Europa e países asiáticos (SAXENA et al., 2016).

O gênero *Capsicum* pertence à Divisão Spermatophyta, Filo Angiospermae, Classe Dicotyledoneae, Ordem Solanales e Família Solanaceae (ANDREWS, 1995). Todas as espécies do gênero são perenes, ou anuais e crescem predominantemente como arbustos. (MARTINS et al., 2010). A reprodução das espécies domesticadas se caracteriza pela presença de flores andróginas, que favorecem a autopolinização. Entretanto, pequenas taxas de polinização cruzada podem ser observadas e, neste caso, a disseminação polínica se dá por insetos, principalmente as abelhas. Já as espécies silvestres são consideradas de reprodução mista (FILGUEIRA, 2000).

O gênero *Capsicum* tem 40 espécies descritas das quais, cinco são domesticadas: *C. annum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. pubescens* Ruiz et Pavon e *C. baccatum* L. (USDA; ARS, 2015). A facilidade de hibridização e a viabilidade do híbrido faz com que o gênero seja classificado em três complexos, os quais são descritos com as principais espécies componentes: O Complexo *annuum* (CA), contendo as espécies *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. galapagoense*; o complexo *baccatum* (CB) contendo *C. baccatum*, *C. praetermissum* e *C. tovarii*; e o complexo *pubescens* (CP) que consiste das espécies *C. pubescens*, *C. cardenasii* e *C. eximium* (HILL et al., 2013; PICKERSGILL, 1991). Quanto a composição citogenética,

as espécies domesticadas de *Capsicum* possuem cariótipos diploides, com $n=12$ e um tamanho de genoma aproximado de 3.5 Gb (MOSCONE et al., 2003; KIM et al., 2014).

Em relação aos aspectos nutricionais, os frutos de *Capsicum* possuem grande quantidade de antioxidantes, vitamina A, C e E, carotenoides e capsaicinóides. Os capsaicinóides são alcalóides que se acumulam na placenta dos frutos e trazem a característica mais conhecida do gênero: a capacidade de pungência. Entretanto, a concentração desses compostos varia nos frutos de espécies distintas e entre genótipos da mesma espécie. Logo, é possível encontrar frutos de *Capsicum* com diferentes níveis de pungência e outros não pungentes dentro de uma mesma espécie (BOSLAND; VOTAVA, 1999; LANNES, 2005; SAXENA et al., 2016). Complementando ainda o teor nutricional, nos frutos das pimentas e pimentões encontram-se alto teor de ferro e magnésio. Devido a estes fatores, as pimentas e pimentões são indicadas na fitoterapia por estimular o sistema imunológico, além de possuir propriedades termogênicas (MATERSKA; PERUCKA, 2005; SUN et al., 2007).

As pimentas e pimentões são mundialmente produzidos e consumidos, principalmente pela sua variabilidade de atributos sensoriais e nutricionais (WELBAUM, 2015). Em 2016 a produção mundial foi estimada em 33 milhões de toneladas, sendo a Índia o maior produtor mundial, com aproximadamente 20% da produção total. Outros países asiáticos, como China e Tailândia, também estão entre os principais produtores, seguidos por países da América como México e Peru. (FAOSTAT, 2016; SAXENA et al., 2016). No Brasil, a produção e consumo de *Capsicum* é, aproximadamente, de 340 mil toneladas por ano. Essa cultura tem grande importância social e econômica para o país, visto que seu cultivo contribui significativamente para o desenvolvimento da agricultura familiar (SUDRÉ et al., 2010). Dentre as espécies domesticadas do gênero pode-se destacar como sendo as mais importantes no país: *Capsicum annuum* L. com os representantes popularmente conhecidos como pimenta-doce, jalapeño, pimentão; *Capsicum baccatum* L. com os representantes dedo-de-moça e cambuci; *Capsicum chinense* L. que englobam as pimentas de cheiro, habanero, biquinho e *Capsicum frutescens* L, representado pelas pimentas malagueta e tabasco (CARVALHO et al., 2002).

Capsicum annuum é a espécie mais cultivada no Brasil e com isso a mais importante para a economia do país. Essa espécie apresenta uma ampla variabilidade morfológica de frutos, como variação em cor, tamanho e formato, e nos níveis de pungência. Os representantes dessa espécie são conhecidos popularmente

como os pimentões doces, pimentas para páprica, pimenta-americana, pimenta caiena e algumas cultivares ornamentais (HERNÁNDEZ-VERDUGO et al., 2001; RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008). As plantas de *Capsicum annuum* caracterizam-se por ter intensa vegetação, arbustiva, podendo atingir de 0,50 a 0,80 m de altura. As flores são solitárias e aparecem nas axilas das folhas, com pedicelo pendente ou inclinado. A corola é branca, sem manchas na parte basal dos lóbulos. O cálice não possui constrição na junção com o pedicelo, porém pode apresentar-se enrugado. O fruto é carnoso, indeiscente, com polpa firme e geralmente de formato cônico. Quando imaturos podem apresentar coloração verde ou roxa, e quando maduros apresentam coloração amarela ou vermelha (FILGUEIRA, 2000).

Capsicum baccatum possui acessos popularmente conhecidos como dedo-de-moça, pimenta Cambuci ou chapéu de bispo. É uma das espécie de pimenta mais cultivada na América do Sul, sendo também muito utilizada como planta ornamental, tornando-se uma alternativa rentável para os agricultores. Morfologicamente, *C. baccatum* se caracteriza pelo porte arbustivo, com altura entre 1m e 1,5m. A corola é branca e apresenta um par de manchas amareladas ou esverdeadas na base das pétalas. As anteras também têm coloração amarela. Os frutos, que podem ser de várias cores e formas, geralmente são pendentes, persistentes, grandes, com cerca de 1-1,5cm de diâmetro e de 8 a 10 cm de comprimento, possuem pungência suave e semente da cor palha (CARVALHO et al., 2006; MOREIRA et al., 2006).

3.3 Antracnose - Interação entre *Colletotrichum* spp. e *Capsicum* spp.

Até o momento, 24 espécies de *Colletotrichum* que podem causar danos em espécies de *Capsicum* já foram identificadas (MONGKOLPORN; TAYLOR, 2018). Este tipo estudo teve impacto na revisão da nomenclatura das espécies de *Colletotrichum* que possuem capacidade de infectar espécies de *Capsicum*. As principais espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose em pimentas e pimentões percentem aos complexos de espécies acutatum, gloeosporioides e truncatum (NIRENBERG et al., 2002; SHARMA et al., 2005; HARP et al., 2008). Estas espécies apresentam particularidades, como a capacidade de infecção em diferentes órgãos das planta de *Capsicum* (THAN et al., 2008a). As espécies de *Colletotrichum* mais difundidas e comumente relatadas que causam antracnose na América do Sul são *C.*

truncatum, *C. siamanese* e *C. scovillei* (MONGKOLPORN; TAYLOR, 2018).

3.3.1 Estratégias de infecção de *Colletotrichum* spp.

A principal característica de infecção das espécies de *Colletotrichum* é a capacidade de possuir duas fases bem definidas para a infecção e colonização. São os chamados fungos hemibiotróficos. Na fase biotrófica, o fungo se nutre diretamente das células do hospedeiro sem mata-las, e na fase necrotrófica, ele mata o hospedeiro e se alimenta das células mortas (PERFECT et al., 1999). Espécies deste gênero exibem diferentes mecanismos de infecção dependendo do hospedeiro e do estágio de desenvolvimento do fruto. Geralmente, o processo infeccioso se dá na presença de água. Os conídios germinam produzindo o tubo germinativo, cujo ápice diferencia-se em uma célula globosa, que se fixa na superfície do fruto promovendo a adesão, denominada apressório. Os apressórios de *Colletotrichum* spp. apresentam grande variabilidade, desde formatos arredondados até irregulares, e podem ser utilizados como estruturas de identificação morfológica das espécies, juntamente com os conídios (SUTTON, 1992).

Depois da formação do apressório, o patógeno pode permanecer quiescente (inativo sem produzir sintomas) até o início do amadurecimento dos frutos ou da senescência dos órgãos parasitados (PRUSKY, 1996). Geralmente, em frutos verdes ocorre a formação de apressório, hifas de penetração e quiescência, enquanto durante a maturação dos frutos o fungo desencadeia hifas secundárias e colonização no hospedeiro. A Figura 1 esquematiza as estruturas formadas no processo de infecção inicial de *Colletotrichum* spp., e a Figura 2 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão, que revela o crescimento hemibiotrófico de *C. destructivum* durante a infecção. É possível visualizar a formação da vesícula da fase biotrófica (IV) depois da penetração dos apressórios. Neste momento é perceptível que a célula hospedeira está viva pela presença da membrana plasmática. Subsequentemente, as hifas penetram na fase necrotrófica (pH) e degradam o tecido.

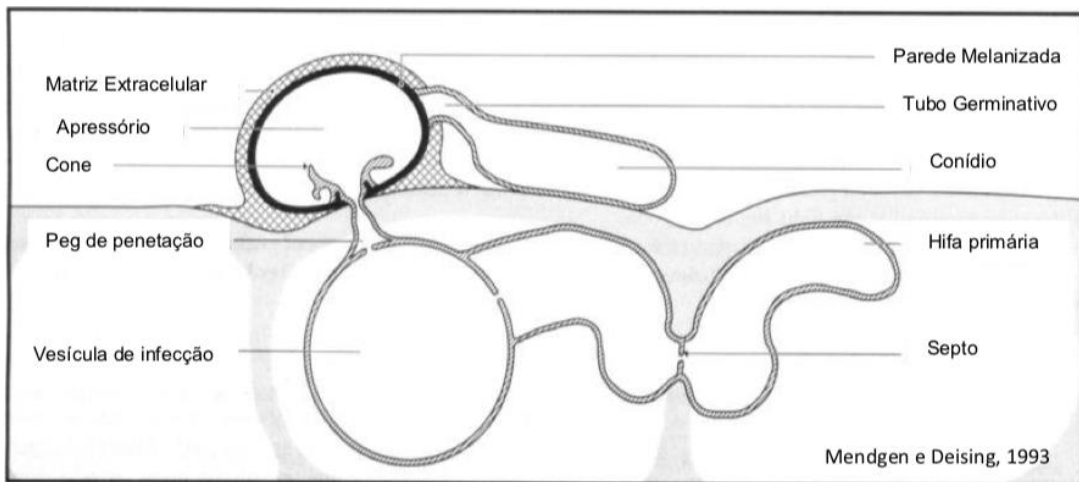


Figura 1: Esquema simplificado das estruturas de infecção de *Colletotrichum* spp. Fonte: MENDGEN; DEISING, 1993)

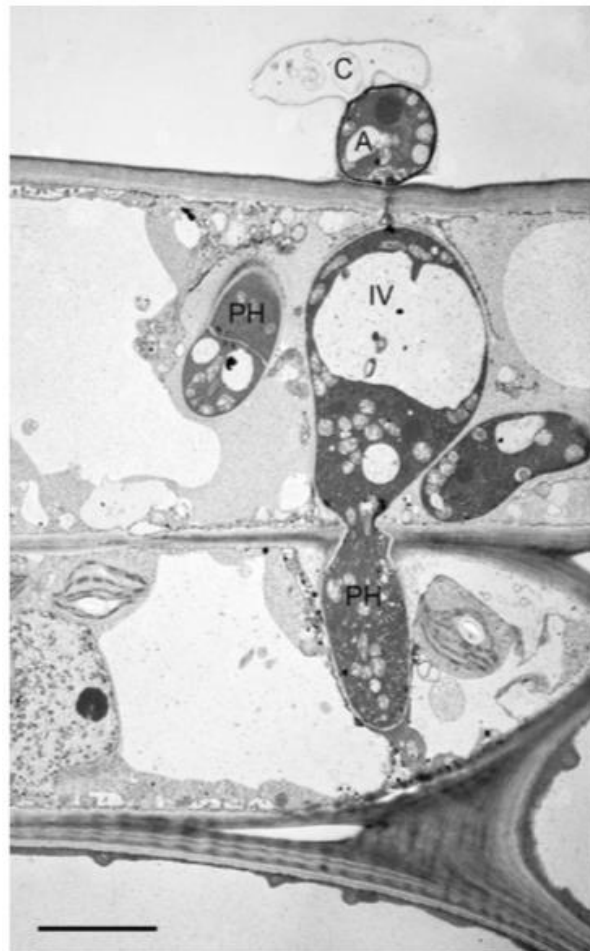


Figura 2: Microscopia eletrônica mostrando as características da infecção de *Colletotrichum* spp. C) Conídio; A) Apressório; IV) Vesícula; PH) Hifa de penetração (Fonte: DEAN et al., 2012).

3.3.2 Sintomas da Antracnose em *Capsicum* spp.

Os sintomas da antracnose em *Capsicum* são semelhantes e independentes da espécie hospedeira. Tipicamente, os sintomas nos frutos são

caracterizados por pequenas lesões depressivas embebidas em água, subcirculares ou angulares com margens castanho-claras. Nos estágios iniciais da infecção, as lesões formam anéis concêntricos de acérvulos úmidos, geralmente de cor salmão (THAN et al., 2008b).

Na Figura 3 é possível visualizar os sintomas da antracnose em frutos imaturos e maduros de *Capsicum*.



Figura 3: Sintoma da antracnose (*Colletotrichum* spp.) em fruto imaturo e maduro de *Capsicum annuum*. Fonte: própria autora.

Para a avaliação da severidade da antracnose em frutos de *Capsicum*, Montri et al., (2009) desenvolveram uma escala de notas da doença ilustrada na Figura 4. As notas atribuídas foram: 0– ausência de sintomas; 1– 1-2% da área do fruto com lesão necrótica ou com lesão encharcada de água em torno do local da infecção; 3– 2-5% da área do fruto com lesão necrótica, acérvulos podem estar presentes, ou lesão embebido em água em até 5% da superfície do fruto; 5– 5-15% da área do fruto com lesão necrótica, presença de acérvulos ou lesão encharcada de água em até 25% da superfície do fruto; 7– 15-25% da área do fruto com lesão necrótica e acérvulos; 9– 25% da área do fruto com necrose, lesão muitas vezes circundando o fruto com acérvulos em abundância. Nesta escala, as notas 0 a 3 correspondem à classes de resistência a *C. capsici*, e as notas 5 a 9 a classes de suscetibilidade.

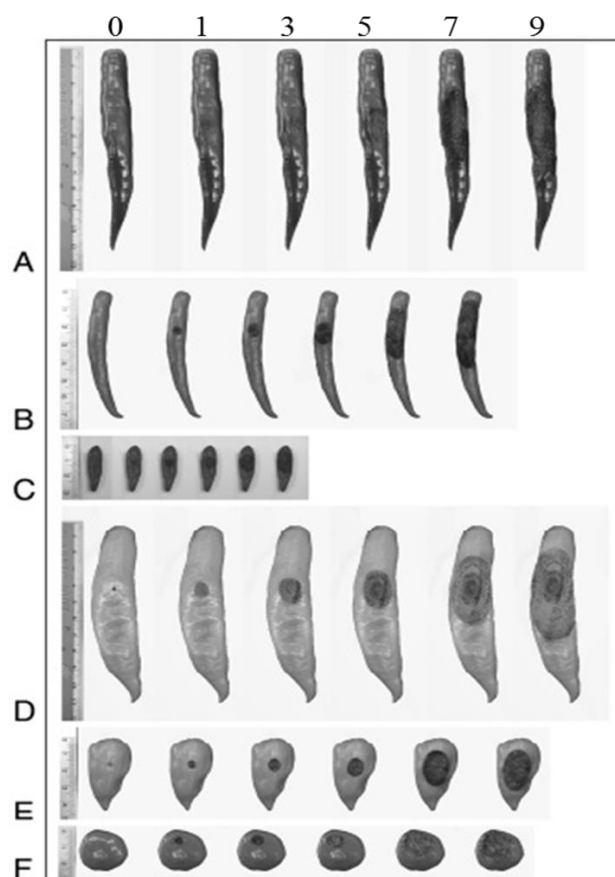


Figura 4: Representação da escala de notas proposta por Montri et al., (2009), na escala de 0 a 9, para caracterização da severidade dos sintomas da antracnose em diferentes espécies de frutos de *Capsicum*. (A) *C. annuum* Bang-chang; (B) *C. annuum* Jinda; (C) *C. frutescens* Kheenoo Suan; (D) *C. baccatum*; (E) *C. chinense* C04714; e (F) *C. chinense* PBC932.

3.3.3 Estratégias de Controle da Doença

Existem diferentes estratégias de manejo integrado para o controle da antracnose em *Capsicum*, que podem minimizar as perdas de produção. Nessa perspectiva estão incluídas medidas como a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, uso de sementes saudáveis, poda e plantio correto além da aplicação de fungicidas químicos e controle biológico. Porém, é cada vez maior a necessidade de utilização de métodos alternativos mais seguros, econômicos, eficientes e sustentáveis para controle da doença (ALI et al., 2016; SAXENA et al., 2016).

A estratégia que traz os maiores benefícios econômicos e sustentáveis é a utilização de cultivares resistentes a doença, uma vez que além de minimizar as perdas, contribui também para a redução no uso de fungicidas químicos cúpricos (MAHASUK et al., 2016).

3.4 Melhoramento Genético de *Capsicum* spp.

3.4.1 Bancos de Germoplasma

Como exemplificado acima, a produção de *Capsicum* em larga escala demanda cultivares com alta produtividade e qualidade de frutos, associadas à resistência a doenças e pragas. Para isso, os programas de melhoramento genético dependem da exploração da variabilidade genética existente no gênero (BIANCHETTI; CARVALHO, 2005). Esta variabilidade é geralmente mantida em Bancos de Germoplasma, repositórios físicos que representam a base genética de uma espécie ou gênero.

O objetivo de um banco de germoplasma é, em primeiro lugar, conservar os genótipos de uma espécie, frente aos constantes processos de degradação ambiental. Entretanto, é essencial que os genótipos mantidos conservados nos BAG (Bancos Ativos de Germoplasma) sejam devidamente caracterizados, para que se tornem disponíveis aos programas de melhoramento, para a exploração máxima da variabilidade existente, desde o conhecimento de fontes de resistência a doenças até de genótipos mais produtivos ou com o mais elevado teor nutricional (RODRIGUES et al., 2010). No Brasil diversas instituições como, a Embrapa Hortaliças, Embrapa Clima Temperado e Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e Universidade Federal de Viçosa mantêm bancos de germoplasma para o gênero *Capsicum*. No BAG da Universidade Estadual de Londrina, por exemplo, contamos atualmente com genótipos tanto das espécies domesticadas de *Capsicum*, como também de espécies silvestres.

A caracterização de germoplasmas tem sido realizada com base em descritores morfológicos, caracteres agrônômicos e marcadores moleculares. Além dos descritores morfológicos, outros caracteres são, igualmente, importantes fontes de variabilidade que merecem atenção na caracterização dos BAGs. Entre eles estão, a diversidade de compostos nutricionais como antioxidantes, flavonoides, vitaminas e carotenoides, a variabilidade genética dos acessos e a identificação de fontes de resistência a doenças (CARDOSO et al., 2018).

3.4.2 Principais Doenças em *Capsicum* spp.

As espécies de *Capsicum* são de grande importância para a economia e cultura mundial. Entretanto, apesar dos avanços tecnológicos e de produção que

tenham ocorrido nessa hortaliça, as doenças ainda são grandes fontes de preocupação, tendo em vista as enormes perdas que causam na cultura (PEREIRA et al., 2011; PRUSKY, 2011; SARATH BABU et al., 2011; PARK et al., 2012; DI DATO et al., 2015; ALI et al., 2016). Entre as doenças que atacam pimentas e pimentões se destacam aquelas causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides (SAXENA, 2016).

Dentre as principais doenças causadas por bactérias, pode-se citar a murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) e a mancha-bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). Os vírus de maior importância são *Potato virus Y*, agente causal do mosaico do pimentão, e *Pepper yellow mosaic virus*, enquanto entre os nematóides destacam-se os *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii* (PINHEIRO et al., 2014). Entre as doenças causadas por fungos têm destaque o oídio (*Leveillula taurica*), que causa danos em partes aéreas, principalmente nas folhas, e *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose, reportada como a doença que mais prejudica a produção de pimentão e pimentas, pois produz lesões nos frutos que são o rendimento economicamente mais lucrativo da cultura (AGRIOS, 2005).

3.4.2 Melhoramento visando a resistência de *Capsicum* spp. a antracnose

No gênero *Capsicum* já foram identificadas algumas fontes de resistência a antracnose, que têm sido utilizadas em programas de melhoramento, visando a identificação e transferência dos genes que conferem resistência a cultivares de pimentas e pimentões (PAKDEEVARAPORN et al., 2005; YOON; PARK, 2005; KIM et al., 2008a; PEREIRA et al., 2011). As fontes de resistência já identificadas pertencem à espécie *C. chinense*, resistente a *Colletotrichum capsici*, e *C. baccatum*, resistente a *C. gloeosporioides* (BABU et al., 2011). No entanto, apesar de ser a espécie mais cultivada em todo mundo, ainda não foram descritas fontes de resistência em *C. annuum* (PARK, 2007).

No Brasil, estudos voltados para a identificação de fontes de resistência para o uso em programas de melhoramento de plantas vêm sendo desenvolvidos. Silva et al. (2014) identificaram duas fontes de resistência a *C. gloeosporioides* em acessos de *C. baccatum*. Bento et al. (2017) utilizaram 54 acessos de *Capsicum* spp. pertencentes ao BAG da UENF para testar fontes de resistência a múltiplas doenças. Nesse trabalho os autores obtiveram sucesso na identificação de um acesso de *C. annuum* resistente a antracnose, mancha bacteriana e possivelmente resistente a PepYMV.

O desenvolvimento de cultivares resistentes enfrenta desafios envolvendo o conhecimento de acessos de *Capsicum*, que carreguem essa característica, e as diferentes interações entre patógeno, hospedeiro e estágio de desenvolvimento do fruto. No entanto, esta é uma tarefa difícil, pois *Colletotrichum* spp apresenta elevada variabilidade de hospedeiros, somado a diferentes reações de patogenicidade e capacidade e de infecção em diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento das pimentas e pimentões (SHARMA et al., 2005; SUN et al., 2015; SAXENA et al., 2014).

3.4.3 Estudos de herança

Além das dificuldades encontradas no âmbito do patógeno, o conhecimento de outras características sobre a resistência também é importante a um programa de melhoramento da espécie. Entre elas, o estudo da herança genética da resistência é fundamental e primário para a tomada de decisões sobre a escolha dos genitores e os métodos de melhoramento a serem empregados. Estudos mostram que existe variação no controle genético da herança a antracnose em *Capsicum*, de acordo com a espécie do patógeno e o estágio de maturação do fruto.

Há relatos de cinco genes diferentes conferindo resistência a antracnose em genótipos de *Capsicum*. Pakdeevaporn et al. (2005) e Mahasuk et al. (2009a) identificaram, a partir do cruzamento entre *C. chinense* x *C. annum*, os genes *co1* em frutos imaturos, *co2* em frutos maduros e *co3* em plântulas utilizando um isolado de *C. capsici*. Posteriormente, Mahasuk et al. (2009b), ao avaliarem progênies provenientes do cruzamento entre dois acessos de *C. baccatum*, encontraram dois novos genes o *co4* (fruto imaturos) e *Co5* (frutos maduros), desta vez utilizando duas espécies de *Colletotrichum*: *C. capsici* e *C. acutatum*. Em seguida, Mahasuk et al. (2013) estudaram a reação diferencial da resistência de *C. baccatum* a *C. acutatum* utilizando dois métodos distintos de inoculação em frutos maduros. Os autores relatam a existência de dois genes dominantes responsáveis pela resistência a antracnose, sendo um identificado por cada método de inoculação.

No Brasil ainda não existem cultivares de pimentas e pimentões resistentes às principais doenças que ocorrem no país. Possivelmente porque os recursos aplicados em um programa de melhoramento, para avaliação dos genótipos são altos. Portanto, há a necessidade da criação e aplicação de estratégias que auxiliem na identificação dos genótipos promissores, que possam economizar tempo e recursos financeiros. Entre essas estratégias está o emprego da Seleção Assistida por

Marcadores (SAM), que permite identificar marcadores moleculares ligados aos genes que conferem resistência a doenças, além de monitorar a introgressão destes genes em cultivares de interesse. Junto com a identificação de marcadores associados, é possível também desenhar mapas genéticos visando a localização destas regiões gênicas no genoma (QTLs), além da associação dos mapas genéticos com as características dos acessos.

3.4.4 Marcadores Moleculares e o Melhoramento

Por definição, marcadores moleculares são características do DNA, que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (MILACH, 1998). Com ampla aplicabilidade, a utilização de marcadores moleculares permite avaliar a diversidade genética presente em BAGs, distinguir espécies dentro dos gêneros, construir mapas de ligação e mapear genes que conferem características de interesse agrônomo (BARAL; BOSLAND, 2002, 2004; BUSO et al., 2003; LANTERI et al., 2003; TOQUICA et al., 2003; CARDOSO et al 2018). Os principais tipos de marcadores moleculares utilizados no melhoramento genético são os microssatélites (ou SSR - *Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Entre os marcadores citados, os AFLPs possuem elevado poder de detecção de variabilidade genética, já que exploram polimorfismo de restrição e de amplificação, o que os tornam uma ferramenta valiosa pela geração de grande número de locos polimórficos e de grande reprodutibilidade (RODRIGUES; COSTA, 2011).

A técnica de AFLP baseia-se na digestão do DNA genômico por enzimas de restrição, sem necessidade do conhecimento prévio do genoma, e consiste de três etapas principais: digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, ligação de adaptadores específicos aos fragmentos digeridos e amplificação via PCR, utilizando *primers* que reconhecem as sequências nos adaptadores. A análise dos fragmentos amplificados é feita em gel de alta resolução, ou por meio da eletroforese capilar. O polimorfismo detectado por esses marcadores representa a variabilidade existente nos sítios das enzimas de restrição, e nas regiões amplificadas posteriormente (VOS et al., 1995). A eficiência dos marcadores AFLP, para acessar a variabilidade e diversidade dentro de espécies de *Colletotrichum*, tem sido comprovada em vários relatos da literatura... Porém, a maioria dos estudos refere-se a variabilidade de isolados da espécie *C. gloeosporioides*, possivelmente por ser a espécie com o maior número de

hospedeiros diferentes (BENTES; COSTA NETO, 2011; ADURAMIGBA-MODUPE et al., 2012).

3.4.4 Filogenia baseada no sequenciamento de regiões conservadas

A partir o avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA, aumentou-se concomitantemente a necessidade de implementar esta técnica em estudos de taxonomia e sistemática de espécies. Isso permitiu inferências sobre a identificação de espécies dentro de gêneros, bem como a relação evolutiva entre elas. A utilização de regiões de sequências gênicas conservadas permite estabelecer relações de ancestralidade entre organismos, inclusive em gêneros altamente complexos como *Colletotrichum* (FREEMAN et al., 1999; SCHNEIDER, 2007).

A região ITS (Espaçador Transcrito Interno de rDNA) é considerada o *barcode* (ou código de barras) para identificação de espécies de fungos, já que é a região que possui o maior número de sequências depositadas em bancos de dados. Esta foi inicialmente a única sequência gênica utilizada para identificação de *Colletotrichum* spp.. Porém, atualmente a utilização de uma única região é pouco recomendada devido a baixa resolução (FREEMAN et al., 2000; CAI et al., 2009). A abordagem mais correta e recomendada é a utilização de várias sequências concatenadas. Diversos trabalhos recomendam a utilização de análises multi-locus para a correta identificação das espécies de *Colletotrichum* (CROUCH et al., 2009; DAMM et al., 2009, 2012; PRIHASTUTI et al., 2009; SHIVAS; TAN, 2009; CANNON et al., 2012;). Os genes atualmente utilizados na identificação de espécies de *Colletotrichum* incluem: sequências ITS, GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), ACT (actina), TUB2 (β -tubulina), GS (glutamina sintetase), CAL (calmodulina) entre outros (MARIN-FELIX et al., 2017; MONGKOLPORN; TAYLOR, 2018)

O presente cenário mostra um quadro intenso de trabalhos desenvolvidos na última década, na busca da identificação e caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp., afim de ampliar o conhecimento sobre a biologia das espécies, fornecer dados sobre as relações entre patógenos e hospedeiros e, principalmente, auxiliar na busca de estratégias de controle da doença, como por exemplo na busca de espécimens resistentes em pimentas e pimentões. O uso de abordagens moleculares tem sido uma ferramenta eficaz na compreensão dessa relação, porém, estudos com materiais locais-específicos são escassos, principalmente em países tropicais e subtropicais, onde não existem cultivares resistentes a antracnose lançadas até o



momento, e o manejo é totalmente dependente de fungicidas químicos, que acarretam em uma perturbação ecológica. Portanto, a análise genética da resistência a antracnose, com base em acessos provenientes destas regiões é extremamente necessária. Estes estudos podem fornecer direcionamento para programas de melhoramento de pimentas e pimentões e auxiliar no fortalecimento dos estudos sobre a interação entre *Capsicum* spp. e *Colletotrichum* spp.

ARTIGO A: Caracterização fenotípica, molecular e patogenicidade em *Capsicum* spp. de isolados de *Colletotrichum scovillei* provenientes do Estado do Rio de Janeiro – Brasil.

Giacomin, R.M, Ruas, C.F¹, Gonçalves, L.S.A²

¹Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

²Laboratório de Ecofisiologia e Biotecnologia Agrícola, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

* **Correspondência:** Renata Mussoi Giacomin
giacomin.rm@gmail.com

Palavras-chave: Antracnose; Fontes de Resistência; Pimenta; Pimentão.
Sequenciamento de regiões multilocus.

Resumo

A antracnose é uma doença causada por *Colletotrichum* spp. que está entre os principais patógenos que causa danos em pimentas e pimentões no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No estado do Rio de Janeiro, esta doença é um dos principais entraves para a cultura. No entanto, até o momento são inexistentes trabalhos de identificação e caracterização do patógeno, o que é fundamental para entender a abrangência da doença no Estado. Assim a correta identificação das espécies e estudos de patogenicidade podem fornecer subsídios importantes para o manejo e controle da doença, além de identificar possíveis fontes de resistência para uso em programas de melhoramento da cultura. Neste trabalho coletamos 11 isolados de *Colletotrichum* de pimentas que apresentavam sintomas típicos no estado do Rio de Janeiro. Estes isolados foram caracterizados de acordo com as características morfo-culturais e dados de sequenciamento de cinco regiões (ITS, ACT, CAL, TUB2 e GAPDH) e a variabilidade genética estimada por meio de marcadores moleculares AFLP. Simultaneamente foram obtidas imagens de microscopia da colonização da espécie frente a frutos imaturos de

Capsicum annuum. Os testes de patogenicidade e busca de fontes de resistência foram realizados com a infecção de frutos imaturos e maduros de 50 acessos de *C. baccatum*. O conjunto de dados mostrou que todos os isolados pertencem à espécie *C. scovillei*. Os resultados de patogenicidade em *C. baccatum* revelaram respostas diferenciais estágio-específicas, com a predominância de resistência em frutos maduros. Além disso, quatro possíveis fontes de resistência a *C. scovillei* foram encontradas entre os acessos testados. A combinação destes dados subsidia futuros estudos sobre a interação *C. scovillei/Capsicum* spp, ainda escassos nas principais áreas de ocorrência da antracnose.

Introdução

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos fungos fitopatogênicos mais prejudiciais do mundo em virtude, principalmente, da sua ampla gama de hospedeiros e agressividade. As espécies do gênero podem causar doenças na maioria das espécies de plantas cultivadas no mundo (Dean et al., 2012). A doença causada por espécies de *Colletotrichum*, popularmente conhecida como antracnose, tem grande importância econômica e científica, pois causa sintomas em praticamente todas as partes das plantas (Mongkolporn e Taylor, 2018). As espécies de *Colletotrichum* são divididas filogeneticamente em nove complexos principais: *acutatum*, *gloeosporioides*, *boninense*, *graminicola*, *spaethianum*, *destructivum*, *dematium*, *truncatum* e *orbiculare* (Cannon et al., 2012).

A identificação de espécies de *Colletotrichum* tem sido tradicionalmente baseada em características morfológicas e culturais, como cor e aspecto do micélio, forma de conídios e na relação sintoma/hospedeiro (Cai et al., 2009; Hyde et al., 2009a). No entanto, basear-se exclusivamente em caracteres morfológicos não é confiável, já que este tipo de característica é altamente influenciável pelas condições ambientais (Hyde et al., 2009b).

Vários estudos indicam a associação dos caracteres fenotípicos com a aplicação de análise filogenética multilocus (Cai et al., 2009; Hyde et al., 2009a; Cannon et al., 2012; Noireung et al., 2012; Weir et al., 2012; Sharma et al., 2014; Marin-Felix et al., 2017; Mongkolporn e Taylor, 2018). As primeiras aplicações moleculares para distinguir as espécies de *Colletotrichum* tiveram como base as sequências do gene ITS (DNAr) em 1992 (Mills et al., 1992; Sreenivasaprasad et al., 1992). Desde então, para a identificação dos táxons sugere-se desenvolver análises filogenéticas multilocus, com base em sequências conservadas. As sequências gênicas utilizadas atualmente para a identificação de espécies de *Colletotrichum* incluem: sequências de espaçadores de DNAr (ITS), gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase

(GAPDH), proteína semelhante à actina (ACT), b-tubulina (TUB2), glutamina sintetase (GS), calmodulina (CAL), entre outros (Marin-Felix et al., 2017).

Pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) são olerícolas altamente afetadas pela antracnose principalmente em regiões tropicais e subtropicais, que apresentam condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (Roberts et al., 2001). Estas olerícolas estão entre os constituintes mais importantes da cozinha de países tropicais e subtropicais, principalmente pela versatilidade de consumo e alto valor nutricional. Porém, apesar dos avanços tecnológicos na produção, a antracnose (*Colletotrichum* spp.) tem sido reportada como a doença que mais prejudica a produção nestas regiões, pois produz lesões nos frutos que são os elementos economicamente mais lucrativos da cultura (Park, et al., 2012). Tipicamente, os sintomas nos frutos são caracterizados por pequenas lesões depressivas embebidas em água, subcirculares ou angulares com margens castanho-claras. Nos estágios iniciais da infecção, as lesões formam anéis concêntricos de acérvulos úmidos, geralmente de cor salmão (Than et al., 2008).

A etiologia de espécies de *Colletotrichum* que causam antracnose em pimentas é altamente complexa. Até 2009, apenas três espécies principais eram consideradas como agentes causais da doença: *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides*. Com base nas análises multi-locus a taxonomia de *Colletotrichum* tem sido revista. Atualmente são descritas 24 espécies de *Colletotrichum* que podem atacar pimentas e pimentões, sete delas do complexo *acutatum* e nove do complexo *gloeosporioides* (Mongkolporn e Taylor, 2018). Até o momento, no Brasil foram relatados sintomas de antracnose causados por seis espécies: *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. boninense*, *C. capsici* e *C. scovillei*. No entanto, a maioria destes trabalhos foi desenvolvida com base em análises morfológicas e do espaçador ribossomal ITS (Tozze Júnior et al., 2006, 2007, 2009; Caires et al., 2014).

A correta identificação das espécies causadoras de antracnose é o primeiro passo para auxiliar no entendimento da relação entre patógeno/hospedeiro e desenvolver estratégias de controle efetivas, como a identificação de cultivares resistentes e o correto manejo do controle da doença. Até o momento, o conhecimento sobre a taxonomia e diversidade de espécies que causam antracnose no Brasil ainda é limitado. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: *i*) utilizar sequências multilocus e caracteres fenotípicos para identificar e caracterizar espécies de *Colletotrichum* associadas a *Capsicum* spp. em cultivos de pimenta e pimentão do

estado do Rio de Janeiro, Brasil; ii) visualizar por meio de microscopia eletrônica a colonização de *Colletotrichum* spp. em *C. annuum*; iii) investigar a reação de *C. baccatum* a antracnose (*Colletotrichum* spp.); iv) identificar possíveis fontes de resistência a *Colletotrichum* spp. que possam ser usadas em futuros programas de melhoramento.

Material e Métodos

Coleta e Manutenção dos Isolados

Os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados neste trabalho foram coletados, armazenados e doados pelo Laboratório de Genética e Melhoramento da Universidade Estadual no Norte Fluminense *Darcy Ribeiro* (UENF). Os isolados foram obtidos a partir de frutos de *Capsicum* spp., provenientes de diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro nos períodos de fevereiro de 2013 a novembro de 2014, que apresentavam sintomas típicos de antracnose, caracterizados por uma zona circular afundada com anéis concêntricos e massas de conídios de cor alaranjada (Tabela Suplementar S1). Os frutos foram coletados separadamente a fim de evitar contaminação cruzada.

O isolamento dos esporos foi realizado assepticamente, com auxílio de agulha histológica, por meio da coleta direta das lesões para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) mais antibiótico. A fim de garantir a uniformidade genética dos isolados, foram obtidas culturas monospóricas de todos os isolados. Os isolados foram mantidos em câmara de crescimento a 25°C até o crescimento micelial (sete a dez dias) e posteriormente armazenados a 4 °C até a utilização.

Caracterização Morfológica e Cultural

As características morfológicas avaliadas incluíram morfologia dos conídios, e características culturais como aspecto e coloração da cultura e velocidade de crescimento. Para determinação da velocidade de crescimento da colônia (VCC) e da coloração e aspecto das colônias, os isolados monospóiricos de *Colletotrichum* spp. foram repicados por meio de discos miceliais de 8 mm de diâmetro em placas de petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA (Batata-dextrose-Ágar) + antibiótico. Foram avaliadas cinco repetições de cada isolado durante 10 dias, ou até a primeira colônia atingir a área total da placa. As placas foram mantidas em câmara de

crescimento a 25°C e foto período de 12h claro/ 12h escuro. As mensurações ortogonais foram realizadas a cada 24 horas com auxílio de paquímetro e a velocidade de crescimento micelial expressa em mm/dia.

As medidas de comprimento e largura de conídios foram obtidas através de imagens capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico Zeiss, Olympus BX 60, utilizando o software ZEN (Zeiss®). As características avaliadas foram comparadas com as descrições das espécies do gênero *Colletotrichum* propostas por Sutton (1992) e atualizadas por Damm et al. (2012).

Extração do DNA

Os 11 isolados de *Colletotrichum* spp selecionados para o trabalho foram incubados em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) durante sete dias em câmara de crescimento. O DNA foi extraído a partir da raspagem do micélio da placa, com auxílio de uma alça de drigasliki devidamente estéril. Foi utilizado a metodologia proposta por Zolan e Pukkila (1986), com modificações. O micélio raspado foi macerado com nitrogênio líquido e imediatamente adicionado o tampão de extração contendo CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*, Sigma-Aldrich, Missouri-USA). A qualidade do DNA total obtido, foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1%. A concentração de DNA foi estimada utilizando o quantificador NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Califórnia-USA).

Reação de amplificação das regiões parciais dos genes GAPDH, ACT, CAL, β -TUB e ITS-DNAr.

A identificação das espécies dos 11 isolados de *Colletotrichum* spp. teve como base a análise filogenética multilocus dos genes gliceraldeído3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Actina (ACT), Calmodulina (CAL), β -tubulina (β -TUB), e a região do espaçador de rDNA (ITS-DNAr).

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 25 ng de DNA; 7,5 μ L Gotaq® Green Master Mix (Promega, Winchester-USA), 10 μ M de cada *primer*; 10% de DMSO (*dimetilsulfoxide*) e água ultrapura para completar o volume da reação para 15 μ L. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando como controle um marcador (*ladder*) de peso molecular conhecido (1kb, Ludwig Biotechnology, Rio Grande do Sul-BR), para confirmar se o fragmento amplificado apresentava o tamanho esperado. Em seguida as amostras foram

purificadas com *illustra™ ExoProStar™ 1-Step*, conforme recomendação do fabricante (GE Healthcare, New Jersey-USA), e submetidas a etapa de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume de 10 μL contendo 2,33 μL de tampão (5x), 10 μM de *forward primer*, 1,0 μL de bigdye (BigDye® *terminator cycle sequencing ready reaction kit*; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Califórnia-USA), 1 μL do produto de amplificação purificado e água ultrapura até 10 μL . Esta reação foi repetida e realizada separadamente para o *primer* reverso. As condições usadas para a reação de sequenciamento seguiram o padrão de amplificação recomendado pela fabricante do sequenciador, Applied Biosystem. A precipitação dos produtos amplificados seguiu pela adição de 2,5 μL de EDTA (125 mM) e 30 μL de etanol a 100%. Em seguida as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, precipitadas por centrifugação a 3000 $\times g$ por 30 min (4°C), lavadas com 30 μL de etanol (70%) e secas a 95°C por 30 segundos. Para sequenciamento as amostras foram ressuspensas em 10 μL de formamida Hi-Di, desnaturadas a 95°C por três minutos, imediatamente incubadas em gelo por alguns minutos e submetidas à eletroforese capilar no sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA).

Análise dos Dados - Filogenia

A chamada de bases e a montagem das sequências *contigs* foram realizadas por meio dos softwares Phred v. 071220.c (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998) e Phrap v.1.090518 (Green, 1999), ambos utilizando o pacote Chromaseq v.1.12 (Maddison and Maddison, 2014a). O alinhamento foi realizado pelo software MUSCLE v.3.8.31 (Edgar, 2004), implementado no pacote Align v.1.11 (Maddison et al., 2007). Ambos Chromaseq e Align fazem parte do sistema de computação filogenética Mesquite v.3.01 (Maddison and Maddison, 2014b).

Os *gaps* foram codificados pelo programa SeqState v1.4.1 (Müller, 2005) utilizando-se o método SIC (*simple indel coding*) (Simmons; Ochoterena, 2000). Os filogramas Bayesianos foram construídos separadamente para cada uma das regiões sequenciadas usando o software BEAST v.1.8.3 (Drummond et al., 2012). Os modelos de substituição nucleotídica foram estimados pelo software BEAST a partir do modelo GTR+G. As corridas de 30^8 de gerações na cadeia de Markov e Monte Carlo foram realizadas no portal CIPRES v.3.3 (Miller *et al.* 2010) e utilizaram uma árvore randômica inicial como prior e o modelo de especiação proposto por Yule (Gernhard et

al., 2008; Yule, 1925). A convergência dos dados foi verificada pelo software Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2013) e o software Tree Annotator v.1.8.3 (Drummond *et al.* 2012) foi utilizado para localizar a árvore de máxima credibilidade de clado, após um burn-in de 10 % das árvores amostradas. O filograma Bayesiano de espécies foi construído no software BEAST v.1.8.3 (Drummond *et al.*, 2012) utilizando-se as regiões ACT, GAP, ITS e TUB e os mesmos parâmetros das análises anteriores.

Uma Neighbor-Net (Bryant and Moulton 2004) foi construída a partir das cinco regiões sequenciadas, utilizando a “distância P não corrigida” no software SplitsTree v.4.14.2 (Huson and Bryant 2006). Para verificar os clusters genéticos existentes entre as espécies, uma análise de agrupamento Bayesiano foi realizada com o software BAPS v.6.0 (Corander *et al.* 2008). Foram testados valores de $K = 1$ a $K = 30$ possíveis agrupamentos, utilizando o prior “Clustering with linked loci” indicado para dados de sequências (Corander and Tang 2007).

Amplificação dos marcadores AFLP

A técnica de AFLP foi aplicada de acordo com o protocolo proposto por Vos *et al.*, (1995) com modificações. Aproximadamente 500 ng do DNA extraído foram duplamente digeridos com 1 U de *MseI* e 5 U de *EcoRI* (Thermo Scientific, California-USA) e ligados aos adaptadores *EcoRI* (0,5 μm) e *MseI* (5 μM) em uma reação contendo: T4 DNA ligase (2U); Tampão da T4 DNA ligase 1x; NaCl (0,5 M); BSA (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); e DTT (0,25 mM) até um volume final de 10 μL . O programa para a digestão e ligação consistiu de: 37°C por quatro horas, 22°C por uma hora e 70°C por 10 min. O padrão de digestão e ligação foi visualizado em gel de agarose a 1%. Uma vez confirmada a digestão, o produto amplificado foi diluído 1:4 (v/v) vezes com água ultrapura.

A amplificação pré-seletiva foi realizada utilizando-se 3,5 μL de Gotaq ® Green Master Mix (Promega, Winchester-USA), 0,58 μl dos *primers* pré-seletivos *EcoRI* + A e *MseI* + C (4,75 μM), 3,0 μL do produto de digestão e ligação e água ultrapura a um volume de 10 μL . O programa utilizado na amplificação pré-seletiva consistiu de: 1 ciclo a 72°C por dois minutos, 20 ciclos a 94°C por um segundo, 56°C por 30 segundos, 72°C por dois minutos e um ciclo final a 60°C por 30 minutos. O resultado da amplificação pré-seletiva foi confirmado em gel de agarose a 2% e o produto amplificado foi diluído 1:8 (v/v) vezes em água ultrapura. Para a amplificação seletiva, oito combinações de *primers* foram escolhidas para montagem de um

multiplex de fluorescências (*EcoRI* (FAM)/-AAC/*MseI*-CT, *EcoRI* (NED) – ACA/*MseI*-CTA, *EcoRI* (VIC) – ACT/*MseI*-CA, *EcoRI* (PET) – AAG/*MseI*-CAG, *EcoRI* (FAM)/-ACG/*MseI*-CTAG, *EcoRI* (VIC) – ACT/*MseI*-CAC, e *EcoRI* (NED) – AAC/*MseI*-CATA, *EcoRI* (PET) – AGC/*MseI*-CTCG).

A amplificação seletiva foi realizada em reações de 10 µL contendo: 3,5 µL de PCR Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Promega, Winchester-USA), 0,54 µL de cada *primer MseI* (5 µm) e *EcoRI* (1 µm), 2,5 µL da mistura de reação pré-amplificação diluída e 2,92 µl água ultrapura. O programa de amplificação consistiu de um ciclo a 94°C por dois minutos, 65°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos seguidos de oito ciclos a 94°C por um segundo, 64°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos seguidos de 23 ciclos a 94°C por um segundo, 56°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos e um ciclo final a 60°C durante 30 min. Os fragmentos foram visualizados por eletroforese capilar usando o modelo automatizado 3500XL (Applied Biosystems, California-USA). Apenas fragmentos com intensidade de fluorescência acima de 100 urf (Unidade Relativa de Fluorescência) foram analisados. Os resultados foram combinados em uma matriz binária com o auxílio do software GeneMapper ® software v. 4,1 (Applied Biosystems).

Análises dos Dados AFLP

Para os dados de AFLP, uma análise de agrupamento Bayesiano foi realizada pelo software BAPS v.6.0 (Corander et al. 2008) sendo testados, análise mixture, valores de $K = 1$ a $K = 15$ possíveis agrupamentos, utilizando o prior “Clustering with linked loci”, também indicado para dados de AFLP (Corander e Tang 2007). A partir dos grupos genético encontrados na análise mixture, uma análise admixture foi realizada para verificar a mistura genotípica ancestral de cada indivíduo (Corander e Marttinen 2006). Esta análise contou com 2.000 interações.

Uma matriz de distância genética de Nei (Nei, 1972) foi calculada entre os isolados por meio do pacote “poppr” (Kamvar et al., 2014; Kamvar et al., 2015). A partir dessa matriz, foi realizada uma Análise de Coordenada Principal (PCoA) utilizando a função “cmdscale” e construído um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA. Todas as análises foram implementadas no ambiente R v.3.4.1 (R Core Team, 2018). Uma amostra de *Fusarium* sp. foi utilizada como *outgroup*, a fim de enraizar o dendrograma.

Microscopia da colonização de *Colletotrichum* spp. (isolado UEL8.1U) em *Capsicum annuum*

Para visualização da colonização de *Colletotrichum* spp. foi escolhido o isolado UEL8.1U e o acesso GB-103 (*C. annuum*). A escolha do isolado UEL8.1U foi definido com base na sua maior agressividade, quando comparado com os demais isolados em estudos prévios realizados pelo Laboratório de Genética e Melhoramento da UENF (Comunicação Pessoal), enquanto o acesso GB-103 tem sido considerado como padrão de suscetibilidade (Baba et al., 2019). Os frutos do acesso GB-103 foram coletados e desinfetados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por cinco minutos, seguidos de três lavagens com água destilada por um minuto (Silva et al., 2014). Quatorze frutos foram utilizados para infecção com o inóculo, e um fruto foi utilizado como controle (inoculação simulada com água destilada esterilizada).

Para a preparação do inóculo o isolado foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) em pH 7,0 e incubado em câmara de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro até formação de colônias, para uso em suspensão do inóculo. A inoculação dos frutos foi realizada em condições de laboratório pelo método de injeção, como descrito por Kanchana-Udomkan et al. (2004) na parte central do fruto, utilizando uma micro-seringa modelo 1705 TLL (Hamilton, Bonaduz, Suíça). A profundidade da agulha foi fixada em 1mm para garantir o volume do inóculo e a uniformidade do tamanho da lesão. A suspensão de conídios foi preparada minutos antes da inoculação na concentração de 1×10^6 conídios/mL⁻¹, ajustada por contagem na câmara de Neubauer. Após a inoculação, os frutos foram alocados em câmara úmida e incubados no escuro por 24 horas a 25°C, com ciclos subsequentes de 12horas claro/12 horas escuro.

A área inoculada foi fotografada diariamente em estereoscópio (Luxeo 4D Labomed®) em dois aumentos [0,8 e 2,0 (x 10)] e em seguida as amostras foram coletadas para microscopia. As coletas tiveram início 24h após inoculação e perduraram por sete dias. O preparo das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF.

Para a microscopia ótica, os fragmentos de frutos tinham aproximadamente 2 a 4 mm² de área da epiderme, com profundidade variada, e o dobro do tamanho para microscopia de varredura. O preparo inicial das amostras consistiu na fixação em uma solução composta de glutaraldeído (0,2 mL), paraformaldeído (0,5

mL), tampão cacodilato de sódio (1 mL pH 7,2) e 0,3 mL de água deionizada. Em seguida, as amostras imersas nesta solução foram colocadas por 90 minutos em temperatura ambiente e posteriormente armazenadas a 4°C.

Para o processamento, as amostras foram lavadas três vezes em 1 mL de cacodilato de sódio (0,05 M pH 7,2) durante 45 minutos cada em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em uma mistura de cacodilato de sódio (0,1 M pH 7,2) mais tetróxido de ósmio (1%), na proporção de 1:1, por 60 minutos no escuro. Após este processo as amostras foram novamente lavadas em cacodilato de sódio (0,05 M) por três vezes. A desidratação das amostras ocorreu em uma série crescente de acetona nas concentrações (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 1 hora cada.

Microscopia ótica – MO

Os fragmentos da epiderme de 2 a 4 mm² secos utilizando acetona mais resina Epon - Epoxi na proporção de 3:1, por 13 horas. Após este procedimento as infiltrações foram em intervalos de 6 horas cada, nas seguintes proporções de acetona: Epon 2:1; 1:1; 1:2; 1:3; e 0:3. As amostras foram emblocadas (polimerizadas) a 60°C por 48 horas e limadas. Os cortes paradérmicos e transversais da epiderme (0,50 µm) foram realizados com auxílio de um ultramicrotomo (Reichert Ultracut S). Os cortes foram corados com azul de toluidina mais borato de sódio, ambos a 1% por 5 a 10 minutos, lavados em água corrente, secos em placa aquecedora e os cortes foram observados no microscópio (Zeiss). As imagens foram capturadas por uma câmera Cannon Power Shot 14 megapixel e processadas utilizando o *software* Axiovision 4.8.

Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Os fragmentos da epiderme medindo 4 a 8 mm² foram imersos em acetona 100% e sulfato de cobre, e secos no ponto crítico, utilizando 14 substituições em CO₂ líquido (CPD 030, Balzers). Após a desidratação, as amostras foram metalizadas com ouro e paládio (Au-Pd) 10 nm por dois minutos. Em cada *stub* foram colocadas quatro amostras sobre fitas adesivas de carbono, duas com vista transversal a epiderme e duas com vista superior a epiderme. As amostras foram observadas sob microscópio eletrônico de varredura (DSEM 962-ZEISS/Inspect 50-FEI) em 10–20 kV.

Patogenicidade isolado UEL8.1U em acessos de *C. baccatum*

Para o estudo de patogenicidade do isolado UEL8.1U foram avaliados 50 acessos de *C. baccatum* e o acesso GB-103 (*C. annuum*). Os acessos de *C. baccatum* são provenientes de diferentes regiões do Brasil e foram caracterizados por Cardoso et al. (2018). Os acessos foram semeados em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato organo-vegetal e, após o surgimento de dois pares de folhas definitivas, as mudas foram transplantadas para campo experimental na UEL. O espaçamento entre linhas e plantas foram de 1.0m e 0.80m, respectivamente. O campo foi controlado seguindo as recomendações dos tratos culturais para o cultivo de pimentas.

Seis frutos imaturos e maduros foram coletados aleatoriamente de cada acesso (35 e 50 dias DAA, respectivamente) e desinfetados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por cinco minutos, seguidos de três lavagens com água destilada por um minuto (Silva et al., 2014). Cinco frutos foram utilizados para infecção com o inóculo e um fruto foi utilizado como controle (inoculação simulada com água destilada esterilizada).

Para a preparação do inóculo o isolado foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), pH 7,0, e incubado em câmara de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro até formação de colônias, para uso em suspensão do inóculo. A inoculação dos frutos foi realizada em condições de laboratório pelo método de injeção, como descrito por Kanchana-Udomkan et al. (2004) na parte central do fruto, utilizando uma micro-seringa modelo 1705 TLL (Hamilton, Bonaduz, Suíça). A profundidade da agulha foi fixada em 1mm para garantir o volume do inóculo e a uniformidade do tamanho da lesão. A suspensão de conídios foi preparada minutos antes da inoculação na concentração de 1×10^6 conídios. mL⁻¹, ajustada por contagem na câmara de Neubauer. Após a inoculação, os frutos foram alocados em câmara úmida e incubados no escuro por 24 horas a 25°C, com ciclos subsequentes de 12 horas claro/12 horas escuro.

A intensidade das lesões foi avaliada a cada 24h, entre o 1º e o 8º dia após a inoculação (DAI), com base na escala de notas proposta por Montri et al. (2009) na qual: 1 = altamente resistente; 3 = resistente; 4 = moderadamente resistente; 6 = moderadamente suscetível; 8 = suscetível; e 10 = altamente suscetível.

Os dados das observações periódicas foram utilizados para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) como segue

$$AACPD = \sum_i^{n-1} \left(\frac{x_i + x_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

onde: n = o número de observações; X_i = a severidade da doença na “i”-ésima observação e T_i = o tempo em dias na “i”-ésima observação (Campbell e Madden, 1990).

Os dados foram submetidos a análise de variância não-paramétrica e, em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). A correlação de Spearman foi estimada entre as variáveis Nota de severidade da doença e AACPD em dois estádios de desenvolvimento de frutos (frutos imaturos e maduros). Todas as análises foram implementadas no ambiente R v.3.4.1 (R Core Team 2018) utilizando o pacote *agricolae* (De Mendiburu 2017).

Resultados

Caracterização morfo-cultural dos isolados de *Colletotrichum* spp.

As características do aspecto micelial e da colônia de 11 isolados de *Colletotrichum* foram analisadas após o décimo dia de crescimento dos isolados em meio de crescimento BDA (Batata-dextrose-ágar). Foi observada uma padronização dos caracteres para a maioria dos isolados, exceto para os isolados UEL12 e UEL27. O micélio dos dez isolados que apresentaram características similares formaram colônias algodoadas, moderadamente aéreas, com aspecto macio, de coloração frontal cinza esbranquiçada e verso sépia acinzentado, com a presença de anéis concêntricos cinza escuro ao centro. A massa conidial mostrou-se de coloração salmão (Figura 1).

O isolado UEL12 apresentou características de crescimento diferenciadas dos demais. O aspecto do micélio aéreo foi muito mais intenso, ou seja, mais macio que os demais. Da mesma maneira, a coloração da frente da colônia manteve o padrão acinzentado, porém o verso não apresentou os anéis concêntricos como os demais, com coloração acinzentada e sépia apenas no centro da colônia. Por sua vez, o isolado UEL27 apresentou crescimento micelial não aéreo, de cor frontal salmão intensa e verso sépia claro e escuro ao centro. As margens da colônia apresentaram cor mais clara, e não foi possível visualizar a formação de anéis concêntricos. A coloração e aspecto das colônias são mostrados na Figura 1. Não foram observadas diferenças significativas na velocidade de crescimento entre os 11 isolados em meio BDA. O tamanho das colônias variou de 43mm a 82mm após 10 dias de crescimento, enquanto a velocidade de crescimento do micélio apresentou média de 6 mm/dia.

As características da morfologia dos conídios foram observadas após o décimo quinto dia de crescimento dos isolados em meio BDA. Assim como nas culturas, foi possível observar uma padronização nas características dos conídios. Os 50 conídios observados para cada isolado mostraram-se hialinos, de aspecto reto, formato cilíndrico e, na maioria das vezes, uma extremidade arredondada e outra mais pontiaguda. Entretanto, a ponta em forma de lança não pode ser observada em todos os conídios, possivelmente devido a sobreposição durante a análise. O tamanho médio dos conídios variou de 10,5 a 18 μ m de comprimento e 3 a 4 μ m de largura. A descrição das características morfo-culturais está resumida na tabela suplementar TS1.

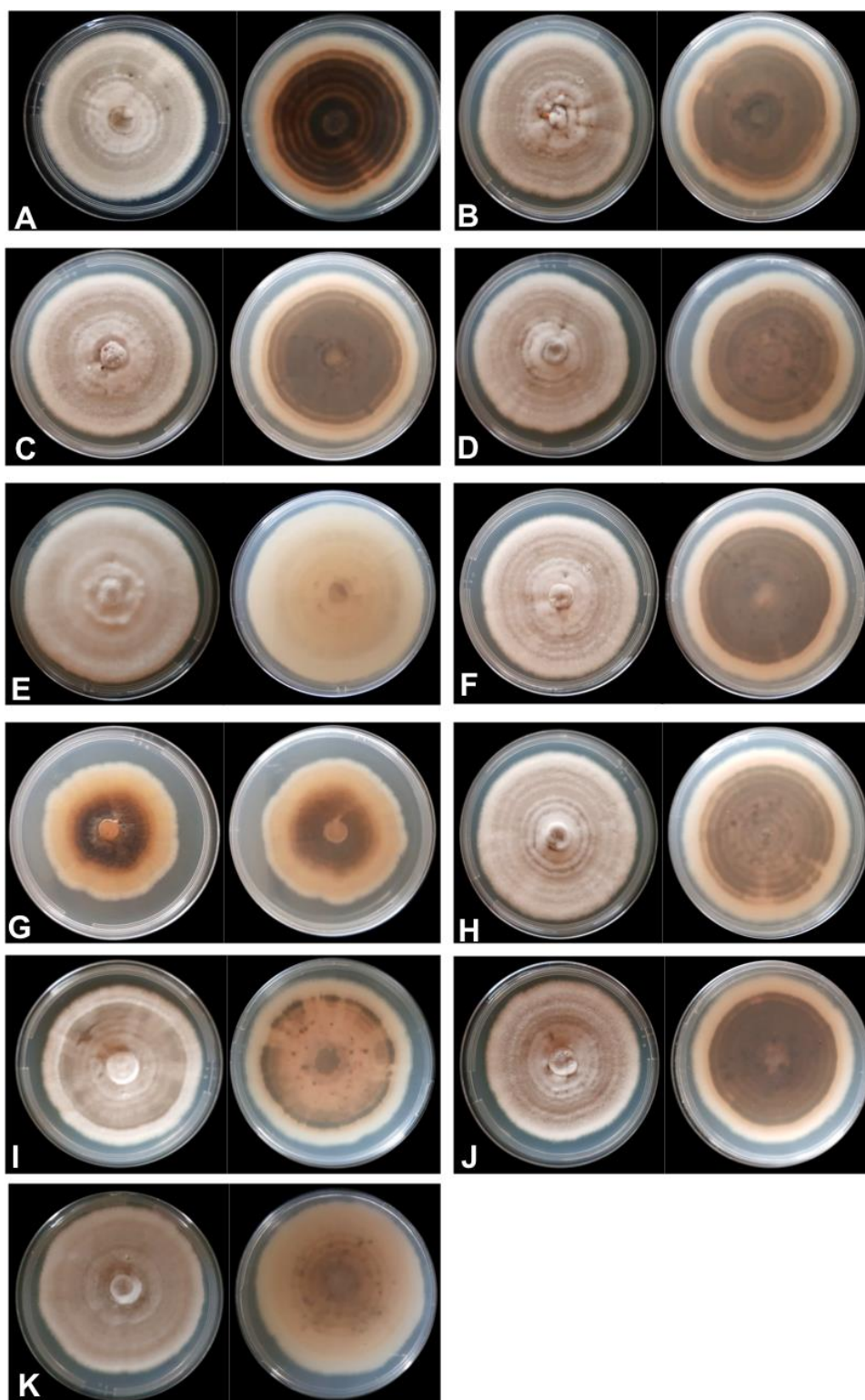


Figura 1: Aspecto e coloração do micélio dos 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Vista frontal e do verso da placa em meio de cultura BDA A) UEL01; B) UEL09; C) UEL8.1U; D) UEL8.1F; E) UEL12; F) UEL22; G) UEL27; H) UEL42; I) UEL53; J) UEL71; K) UEL72.

Filogenia e identificação dos isolados

Para a identificação molecular dos 11 isolados foram utilizadas sequências parciais dos genes ITS, gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH), actina (ACT), β -tubulina (TUB2) e calmodulina (CAL). Os *primers* utilizados bem como referências de desenvolvimento estão apresentados na tabela suplementar TS2.

Os resultados da identificação molecular obtidos com base nas sequências parciais dos genes, somados a análise filogenética de cada região gênica, especialmente de GAPDH, permitiram a identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp.. Esta identificação foi realizada utilizando a ferramenta on line BLASTn seguindo os parâmetros padrões. A busca realizada com a ferramenta online Q-bank fungi database utilizando a análise multigênica, permitiu a identificação de todos isolados, com 100% de indentidade com a espécie *Colletotrichum scovillei*. A filogenia multilocus, obtida com base no conjunto de dados concatenados das cinco regiões gênicas dos isolados representativos da espécie confirmou a análise preliminar.

Para cada região gênica foi construída uma árvore filogenética utilizando sequências compiladas de 34 acessos do GenBank de espécies representativas dos três principais complexos de *Colletotrichum*: acutatum, gloeosporioides e truncatum, mais três espécies externas aos complexos, e uma espécie como *outgroup* (*Monilochaetes infuscans*). As espécies utilizadas, bem como o número de acesso no GenBank estão resumidas na tabela suplementar TS3. As árvores filogenéticas de cada região gênica individual podem ser visualizada nas figuras suplementares S1 a S4.

A análise bayesiana agrupou os isolados de *Colletotrichum scovillei* utilizadas em nosso trabalho, juntamente com um acesso de *C. scovillei* compilado do GenBank, em um subclado dentro de um clado monofilético com as outras nove espécies do complexo acutatum (Figura 2). O subclado que separou as amostras de *C. scovillei* apresentou probabilidade a posteriori (PP) igual a 1 (Figura 2). Nesta mesma árvore é possível observar a associação das espécies de *Colletotrichum* em cinco grupos distintos, com probabilidades mostradas nos nós de cada ramo igual a 1. O primeiro grupo é formado pelas 10 espécies do complexo acutatum, onde *C. guajavae* se associa (PP=1) como espécie irmã de *C. scovillei*. Os segundo, terceiro e quarto grupos são formados pelas oito espécies do complexo gloeosporioides, duas espécies do complexo truncatum, às quais se agrupa o acesso *Colletotrichum* sp LC923, e as espécies *C. cliviae* e *C. brevisporum*, cujos complexos não foram identificados. Como esperado, *Monilochaetes infuscans*, espécie próxima de *Colletotrichum* e patógeno causador de doenças em espécies da família Solanaceae, aparece isolada como *outgroup*. Padrão

similar de agrupamento observado no filograma também foi obtido utilizando o método de Neighbor-Net (Figura 3A) e análise bayesiana (Figura 3B) para visualizar a estrutura genética dos clusters.

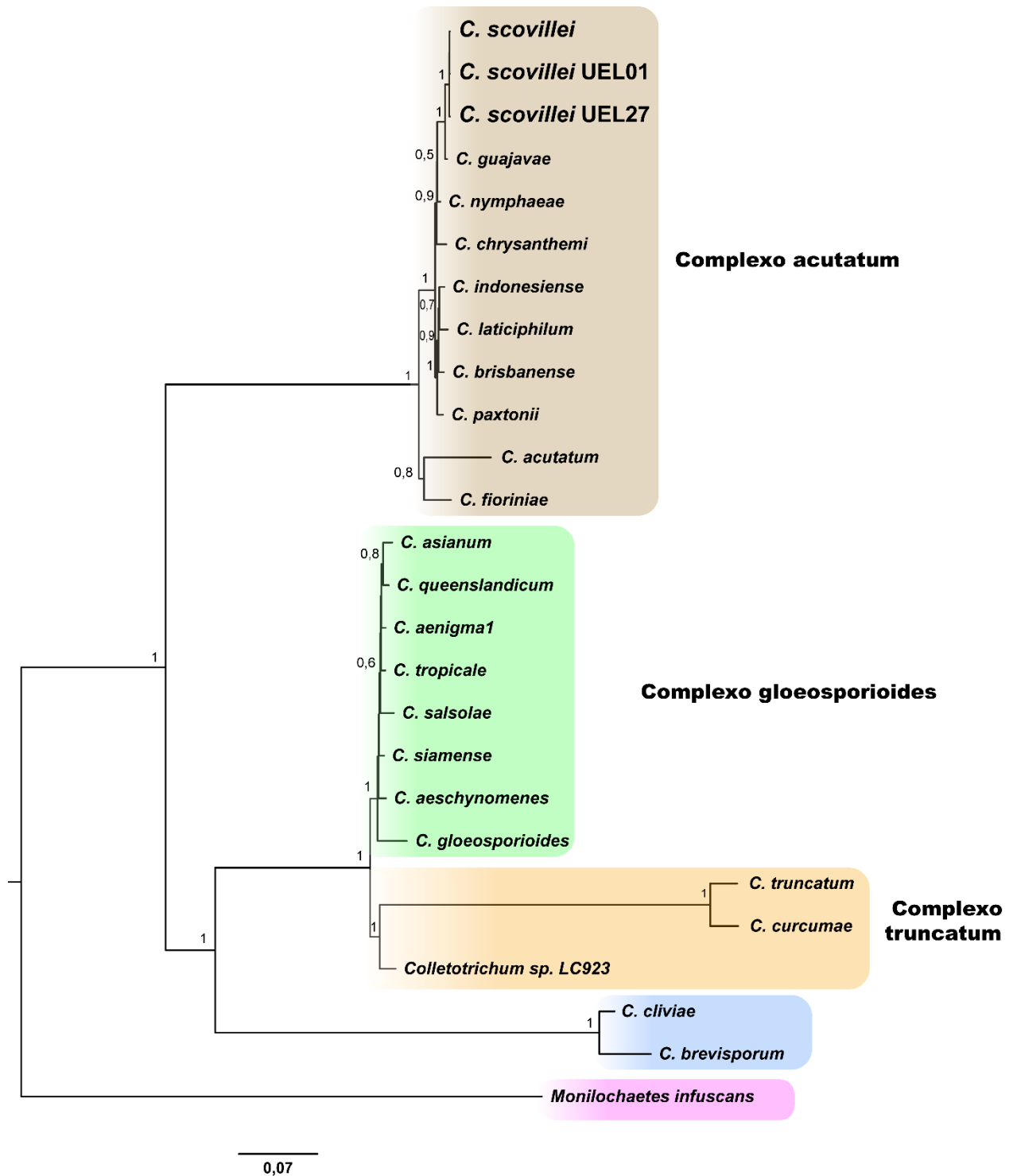


Figura 2: Filograma criado apartir das regiões gênicas GAPDH, β -TUB, ACT e ITS com espécies dos complexos acutatum, gloeosporioides e truncatum e outras espécies do gênero. O modelo evolutivo utilizado para todos os genes foi GTR+I+G. Os valores de probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em fonte maior. O * indica o acesso de *C. scovillei* compilado do GenBank. A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *Monilochaetes infuscans*.

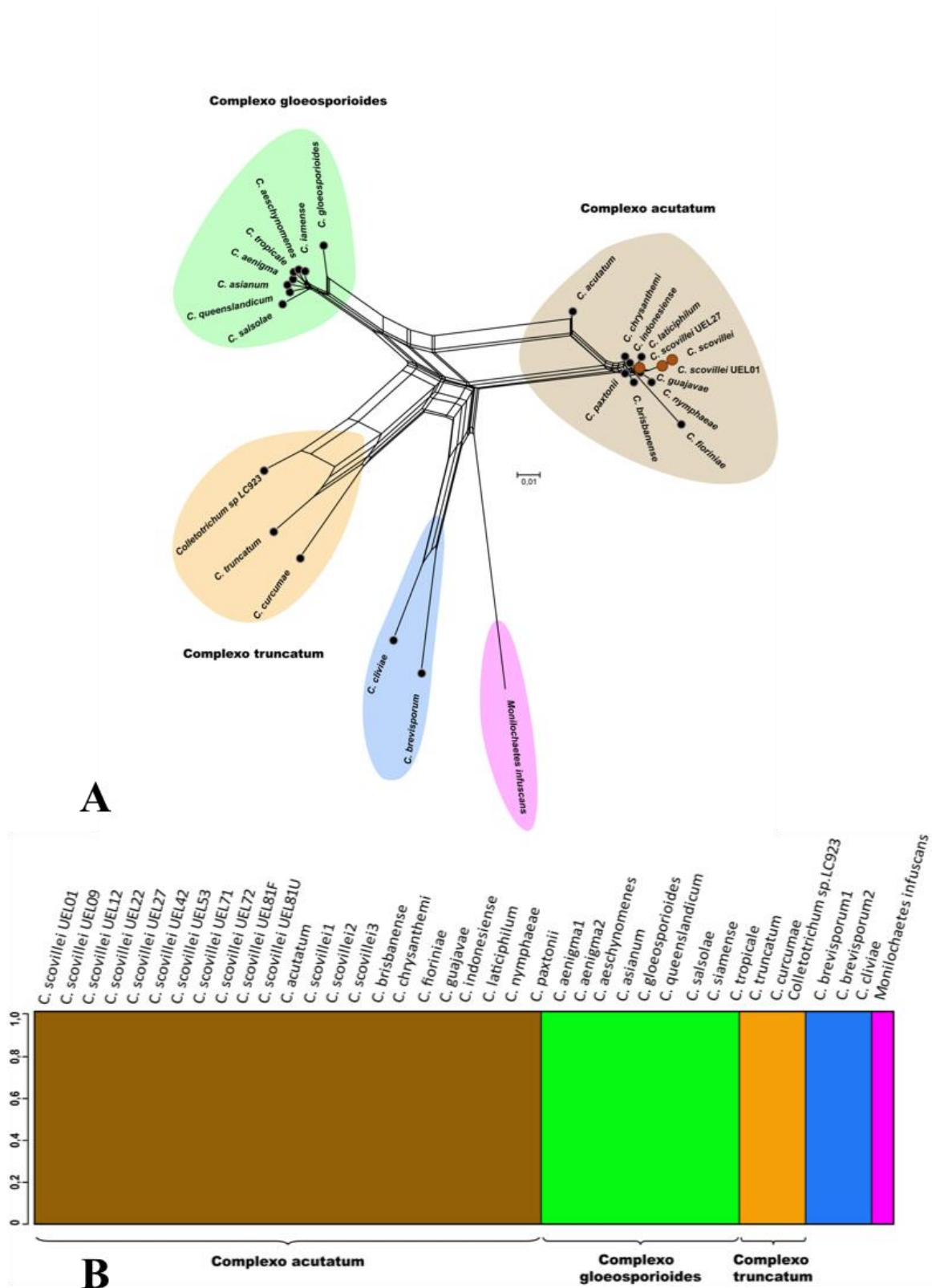


Figura 3: A) Neighbor-Net construída a partir da distância P não corrigida utilizando as cinco regiões gênicas para as espécies de *Colletotrichum* e B) Clusters formados a partir da análise Bayesiana das cinco regiões gênicas e espécies do gênero.

Variabilidade dos isolados de *Colletotrichum scovillei* por meio de marcadores moleculares AFLP

O sequenciamento de regiões multigênicas, associado a análises filogenéticas e morfoculturais permitiu a identificação e classificação dos 11 isolados de *Colletotrichum* spp. coletados para este trabalho. Esta análise polifásica possibilitou classificar todos os isolados como pertencentes a espécie *C. scovillei* Damm, bem como identificar diferenças entre as características fenotípicas apresentadas pelos isolados. A partir deste resultado, objetivou-se então estimar a variabilidade genética presente entre os isolados estudados, por meio de marcadores moleculares. Para tanto, foi aplicada a técnica concomitantemente a um isolado fúngico externo, afim de se obter juntamente um grupo externo nas análises.

A variabilidade genética entre os isolados foi estimada a partir dos dados obtidos de oito combinações de *primers* seletivos de AFLP. Os produtos de amplificação geraram 694 fragmentos, distribuídos entre 50 e 500pb, dos quais 405 foram polimórficos. A distância genética média, estimada com base no coeficiente de Nei (1972) entre os isolados de *C. scovillei* foi de 0,59. A menor distância genética foi entre os isolados UEL8.1U e UEL22, e a maior distância entre os isolados UEL8.1F e UEL12 foi de 1.09. Na comparação geral, o isolado UEL27 foi o que obteve os maiores valores da distância de Nei quando comparado a todos os outros isolados. Os valores das distâncias entre todos os isolados (excluindo-se o grupo externo) são mostrados na tabela suplementar S4.

O dendrograma, obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA identificou a formação de um único grupo entre todos os isolados de *C. scovillei*, quando enraizado com o *outgroup*. Neste grupo, é possível visualizar que o isolado UEL27 está alocado mais externamente ao clado, com um bootstrap de 100% (Figura 4A). A estimativa do número possível de clusters, obtida por meio da abordagem Bayesiana (excluindo-se o grupo externo de maneira similar a distância de Nei) também identificou o isolado UEL27 com estruturação diferentemente do demais. Nesta análise foi possível observar a possível existência de dois grupos no conjunto de isolados: um contendo apenas o isolado UEL27, e outro com os demais (Figura 4B). A análise da coordenada principal (PcoA) também evidencia o distanciamento do isolado UEL27 dos demais, com a separação do mesmo graficamente. Os eixos X e Y explicaram 36.4% da variabilidade dos isolados de *C. scovillei* (22,9% e 13,5% respectivamente) (Figura 4C).

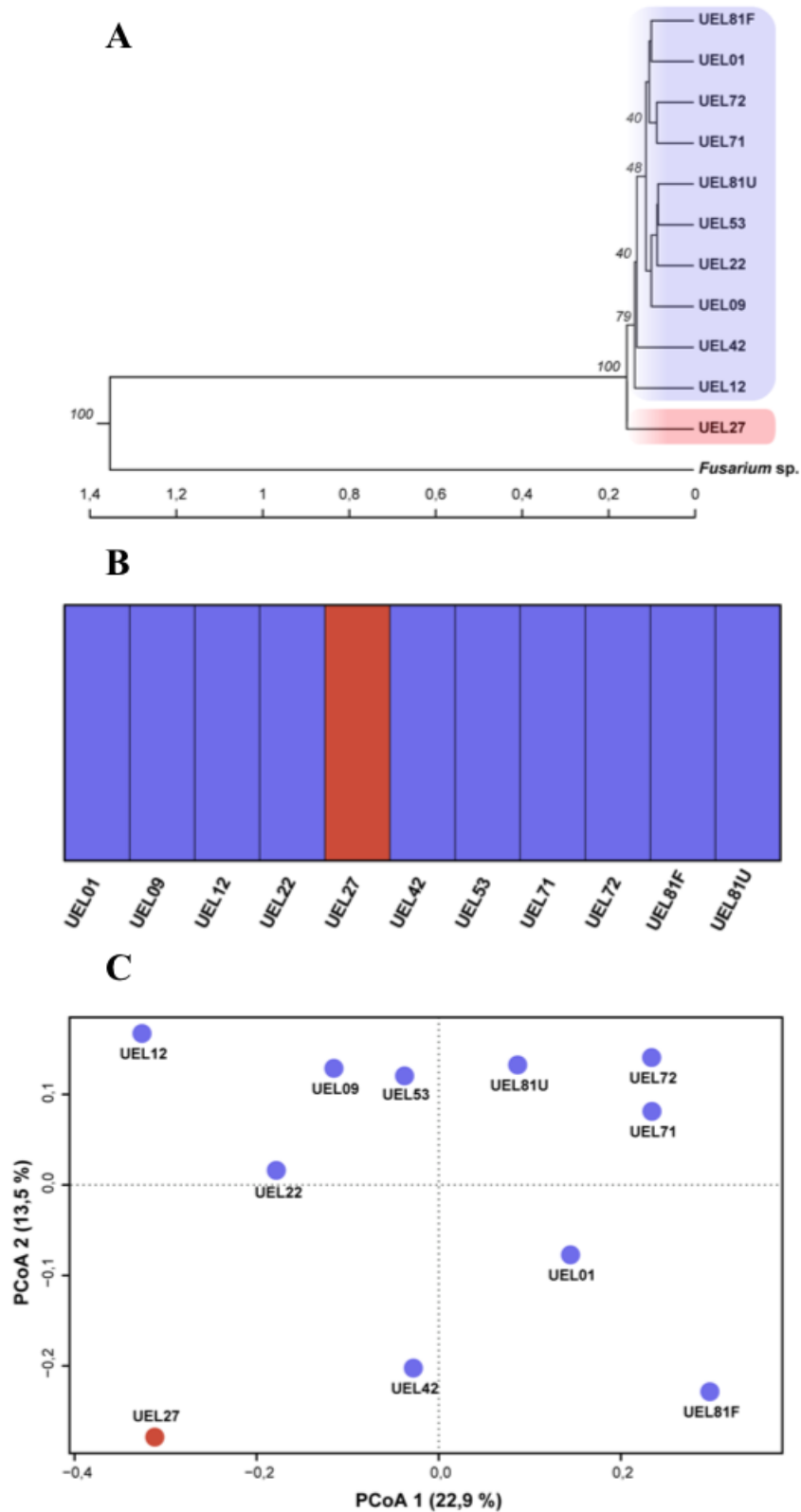


Figura 4: Análises de agrupamento evidenciando a variabilidade presente nos 11 isolados de *Colletotrichum scovillei* A) Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o outgroup para enraizar a árvore *Fusarium* sp. B) Clusters formados pela análise Bayesiana; C) Análise das Coordenadas Principais (PCoA).

Análise microscópica da colonização de *Colletotrichum scovillei* (Isolado UEL8.1U) em frutos imaturos de *Capsicum annuum* L.

Compreender a interação planta x patógeno é fundamental para estabelecer estratégias de controle ou erradicação de doenças. Uma das formas de se estudar essa interação é por meio da microscopia. Um dos isolados pertencentes à espécie *Colletotrichum scovillei*, previamente identificado como sendo mais agressivo em frutos de *Capsicum annuum*, foi selecionado para o estudo da interação compatível *C. annuum* x *C. scovillei*. Este estudo objetivou caracterizar micromorfológicamente o processo de colonização deste isolado. Para este trabalho foi selecionado o isolado UEL8.1 e frutos imaturos de um acesso suscetível de *C. annuum* var. *annuum*, GB-UEL103.

Na Figura 5 encontram-se imagens obtidas de microscópio estereoscópico, óptico e eletrônico de varredura (MEV) a cada 24 horas após a infecção durante sete dias. Em A e B é possível observar a vista superior da epiderme do fruto em microscópio estereoscópico e MEV, respectivamente.. E em C e D estão as imagens oriundas de um corte transversal à epiderme em microscopia óptica e MEV, respectivamente. Com as imagens microscópicas é possível observar a colonização do patógeno, desde a germinação dos esporos até a degradação celular do hospedeiro ao longo do tempo.

O período de incubação da doença nos frutos imaturos foi de 48 h DAI (Dias Após a Inoculação), onde foi possível verificar pequenos pontos depressivos na epiderme e o início da formação de hifas de colonização. Na imagem de microscopia óptica é possível visualizar o início da colonização das células do parênquima, com depressão do tecido causada pela ruptura de células. No terceiro dia de infecção, após 72 h, em microscópio estereoscópico, pode-se observar a presença de conídios de cor salmão, assim como as duas imagens transversais mostram a colonização e presença de hifas já atingindo o colênquima. Na microscopia óptica nota-se a presença de acérvulos. Entre o quarto e quinto dia já é possível encontrar conídios germinados ao longo da epiderme do fruto e visualizar a ruptura da epiderme com um aglomerado de acérvulos. A partir do sexto dia de colonização, é possível visualizar a total ruptura das células da epiderme tanto no corte paradérmico como no transversal. E finalmente no último dia avaliado, após 168h as imagens mostram a formação dos conídios pelas hifas

secundárias e total colonização e morte do tecido hospedeiro (Figura 5).

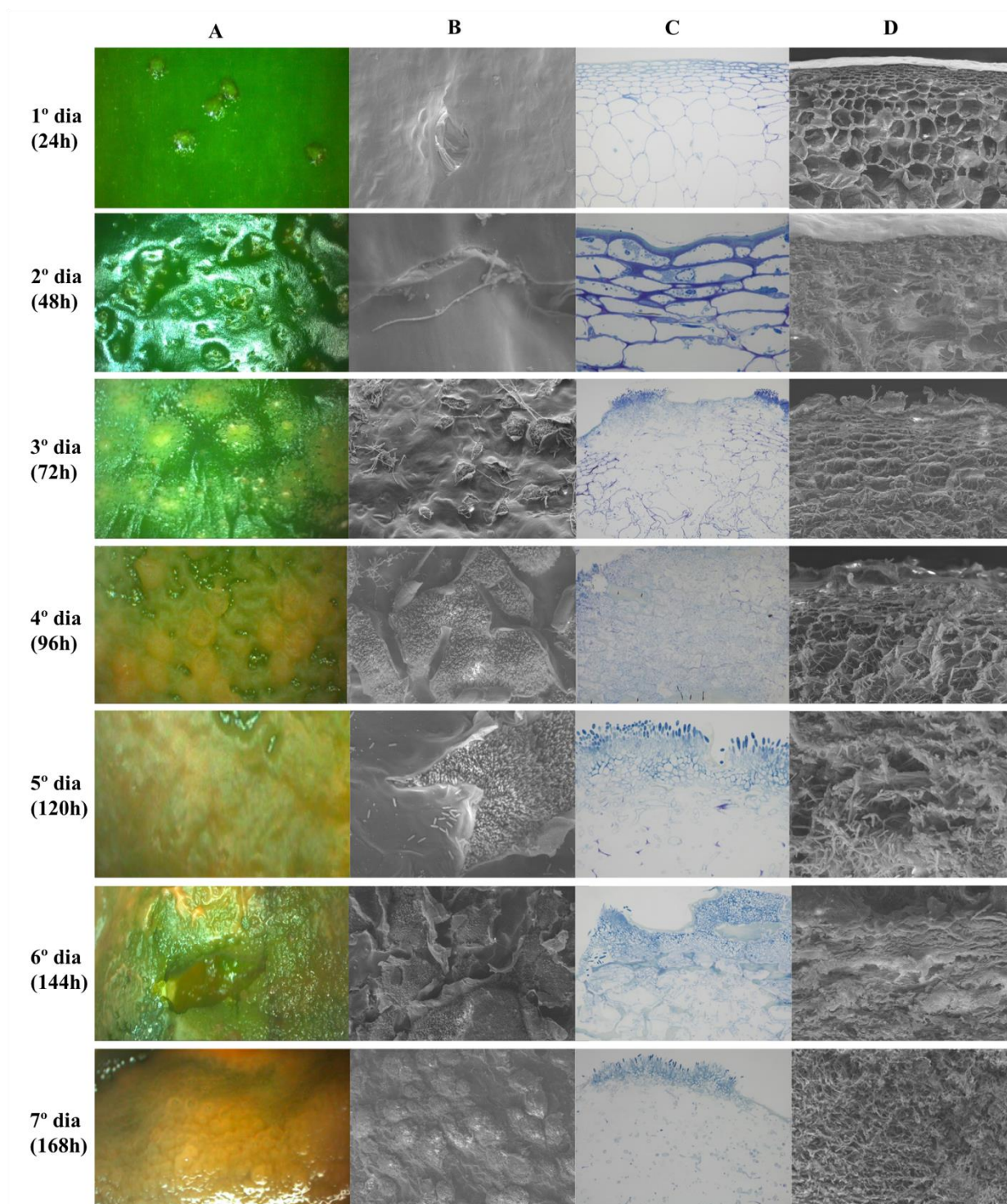


Figura 5: Microscopia da infecção e colonização de frutos imaturos de *Capsicum annuum* inoculados com *Colletotrichum scovillei*. As imagens foram obtidas diariamente durante sete dias. Na coluna A imagens do corte paradérmico d região inoculada em microscopia eletroscópica. Na coluna B corte paradérmico da região inoculada em microscopia de varredura. Em C corte transversal em microscopia óptica e em D corte transversal em microscopia eletrônica de varredura

Ao longo das observações periódicas verificou-se que a colonização ocorreu seguindo o padrão descrito para o gênero. Na Figura 6 A é possível visualizar a germinação de um conídio através de um tubo germinativo que deu origem a uma célula globosa, chamada apressório. É a partir deste apressório que inicia-se o processo de colonização e formação da hifa primária. Nesta mesma figura, em B e C são mostrados imagens de conídios possivelmente em processo de re-infecção, a partir do quarto ou quinto dia de colonização, logo após a ruptura da massa conidial. Por último, na figura 6 D mostra o exato momento da formação de conídios a partir de hifas secundárias na epiderme do fruto infectado, característica intrínseca à espécie *C. scovillei*. Este processo se dá provavelmente como um tipo de re-infecção do patógeno, e não mais a partir do inóculo ao qual o fruto foi exposto.

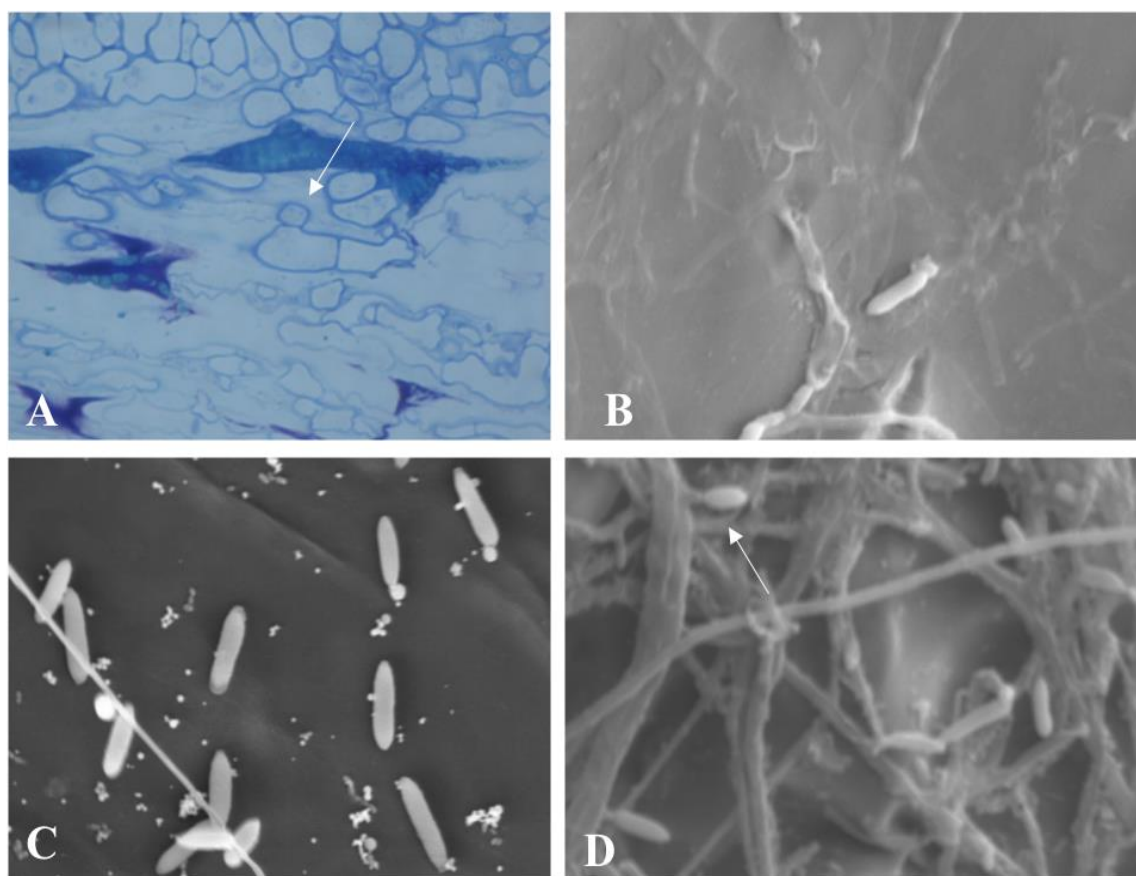


Figura 6: Imagens de microscopia da colonização de *C. scovillei* em *C. annuum*. A) Conídio germinado com apressório na superfície do hospedeiro. B e C) Conídios germinando. e D) Formação de conídio a partir de hifas secundárias em processo de re-infecção.

Patogenicidade de *Colletotrichum scovillei* (isolado UEL8.1) em *Capsicum* spp.

Para investigar as respostas de acessos *Capsicum* a esta espécie de *Colletotrichum* pouco estudada e identificar possíveis fontes de resistência que possam ser utilizadas em programas de melhoramento, 50 acessos de *C. baccatum* e um de *C. annuum* pertencentes ao BAG da UEL foram testados contra o isolado UEL8.1. Este isolado foi inoculado em frutos imaturos e maduros de *Capsicum* spp. utilizando o método de injeção.

Após as avaliações periódicas a cada 24 horas durante oito dias foi possível identificar diferentes respostas em relação a espécie de *Capsicum* e também ao estágio de desenvolvimento do fruto. A análise de variância não paramétrica (ANOVA) mostrou efeito significativo entre as fontes de variação: acessos, estágio de desenvolvimento dos frutos (DF), interação entre DF e nota de severidade média (Tabela 1). Em geral foi observado maior suscetibilidade a antracnose em frutos imaturos que em frutos maduros, com notas finais médias de 7,05 e 2,81 respectivamente, e média da AACPD de 21,22 e 13,82 respectivamente (Tabela 2). A correlação mostrou alta associação entre as variáveis (AACPD e Nota) em frutos imaturos e maduros (0,92 e 0,87 respectivamente). Porém observou-se baixa correlação quando comparados os estádios de desenvolvimento dos frutos.

Tabela 1: Análise não-paramétrica e valores médios para os efeitos da inoculação de *Colletotrichum scovillei* em frutos de 51 acessos de *Capsicum* spp., em dois estádios de desenvolvimento do fruto.

Efeito ^{1/}	ATS	GL	p-valor
Nota			
Acessos (A)	7,88	29,72	<0.0001
Desenvolvimento do fruto (DF)	729,72	1,00	<0.0001
A x DF	4,17	26,29	<0.0001
Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD)			
Acessos (A)	1,91	27,92	0.003
Desenvolvimento do fruto (DF)	92,97	1,00	<0.0001
A x DF	3,00	28,67	<0.0001
Médias	Nota	AACPD	
Frutos Verdes	7,05	21,22	
Frutos Maduros	2,80	13,82	

Entre os acessos estudados, treze não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$) apresentando os menores valores de

AACPD para frutos imaturos e trinta e seis para frutos maduros. Os acessos com nota de severidade menor ou igual a 3 foram considerados resistentes, nos dois estádios de desenvolvimento. Quatro acessos (GB-113, GB-118, GB-208 e GB-215) apresentaram resistência a *C. scovillei* nos dois estádios de maturação. Em relação ao acesso de *C. annuum* testado, GB-103 confirmou a suscetibilidade a doença tanto em frutos imaturos quanto maduros apresentando notas de severidade igual a 10 e 8,40 respectivamente. Em geral lesões típicas foram observadas em todos os acessos de *Capsicum* spp testados, diferindo apenas no grau de patogenicidade entre acessos e entre estágio de desenvolvimento do fruto. Fotos dos sintomas típicos da doença apresentados por alguns acessos são mostrados na Figura 7. Nesta Figura também é possível observar a diferença na reação ao patógeno em relação ao estágio de desenvolvimento do fruto, apresentando sintomas nos frutos imaturos e ausência dos mesmos nos frutos maduros (Figura 7 C e D)



Figura 7: Patogenicidade de *Colletotrichum scovillei* em frutos de *Capsicum* spp. após sete dias de inoculação. As imagens mostram os sintomas em frutos imaturos e maduros. A) GB-131; B) GB-189; C) Frutos imaturos com sintomas de GB-104 D) Frutos maduros com ausência de sintomas de GB-104.

Tabela 2: Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e Nota de Severidade para os efeitos da inoculação de *Colletotrichum scovillei* em frutos de 51 acessos de *Capsicum* spp., em dois estádios de desenvolvimento do fruto.

Acessos	Frutos verdes			Frutos Maduros		
	AACPD	Nota	Classe ³	AACPD	Nota	Classe
GB-193	24,10	9,20	AS	9,80*	5,60	MS
GB-157	16,10*	7,20	S	16,30	5,60	MS
GB-189	26,50	10,00	AS	13,70	4,80	MS
GB-137	17,60	7,20	S	10,40	3,80	MR
GB-114	17,80	8,40	AS	8,00*	1,00	AR
GB-105	18,30	8,40	AS	9,40*	3,00	R
GB-145	19,50	8,40	AS	8,80*	3,60	MR
GB-214	13,50*	6,40	S	8,00*	1,80	R
GB-113	10,80*	2,60	R	8,00*	1,00	AR
GB-207	20,70	6,80	S	14,60	5,00	MS
GB-116	22,70	9,20	AS	19,70	8,40	AS
GB-212	18,30	7,60	S	9,80*	3,80	MR
GB-219	16,50	6,80	S	9,20*	2,20	R
GB-130	17,20	5,60	MS	11,60	3,80	MR
GB-110	23,70	10,00	AS	8,00*	1,00	AR
GB-136	18,00	5,40	MS	9,40*	3,00	R
GB-141	14,60*	5,20	MS	8,90*	2,60	R
GB-210	17,30	6,00	MS	8,00*	1,00	AR
GB-187	17,00	7,00	S	8,40*	2,20	R
GB-182	12,20*	4,20	MS	9,60*	1,80	R
GB-101	20,90	10,00	AS	8,20*	1,80	R
GB-190	19,30	6,80	S	8,20*	1,40	R
GB-216	17,10	8,00	S	8,20*	2,00	R
GB-111	18,30	6,00	MS	8,20*	1,60	R
GB-119	10,10*	3,40	MR	8,70*	2,80	R
GB-107	20,70	7,60	S	8,70*	1,60	R
GB-126	12,60*	3,80	MR	8,20*	1,60	R

Acessos	Frutos verdes			Frutos Maduros		
	AACPD	Nota	Classe ³	AACPD	Nota	Classe
GB-134	37,30	10,00	AS	12,30	4,80	MS
GB-163	17,90	6,00	MS	8,00*	1,00	AR
GB-104	16,70	7,20	S	9,60*	2,80	R
GB-208	11,20*	3,00	R	8,40*	2,20	R
GB-118	12,70*	2,80	R	8,00*	1,00	AR
GB-135	27,70	10,00	AS	8,60*	1,40	R
GB-200	20,90	8,00	S	8,00*	1,80	R
GB-172	27,30	9,20	AS	9,10*	3,20	MR
GB-184	23,70	9,20	AS	9,10*	2,40	R
GB-177	14,80*	5,00	MS	8,00*	1,80	R
GB-159	13,10*	5,20	MS	10,40	1,80	R
GB-103	12,00*	4,20	MS	8,00*	1,00	AR
GB-215^{1/}	8,90	2,60	R	8,00*	1,40	R
GB-156	16,10*	6,80	S	8,00*	1,00	AR
GB-223	20,50	7,60	S	8,20*	1,40	R
GB-146^{2/}	25,10	10,00	AS	8,00*	1,00	AR
GB-128	20,50	6,00	MS	17,30	6,00	MS
GB-129	29,70	10,00	AS	13,30	4,40	MS
GB-132	21,50	8,00	S	10,10	3,00	R
GB-150	23,50	8,80	AS	10,40	3,40	MR
GB-201	22,30	9,60	AS	9,50*	2,40	R
GB-178	17,00	5,00	MS	9,30*	2,20	R
GB-131	22,90	8,40	AS	14,70	6,00	MS
GB-103	31,46	10,00	AS	18,78	8,40	AS

*Médias com * mostram diferença não significativa do controle pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$).

¹ Acesso usado como controle resistência para frutos imaturos

² Acesso usado como controle resistência para frutos maduros

³ Escala de notas proposta por Montri et al., (2009). AR= altamente resistente; R= resistente; MR= moderadamente resistente; MS= moderadamente suscetível; S= suscetível; AS= altamente suscetível.

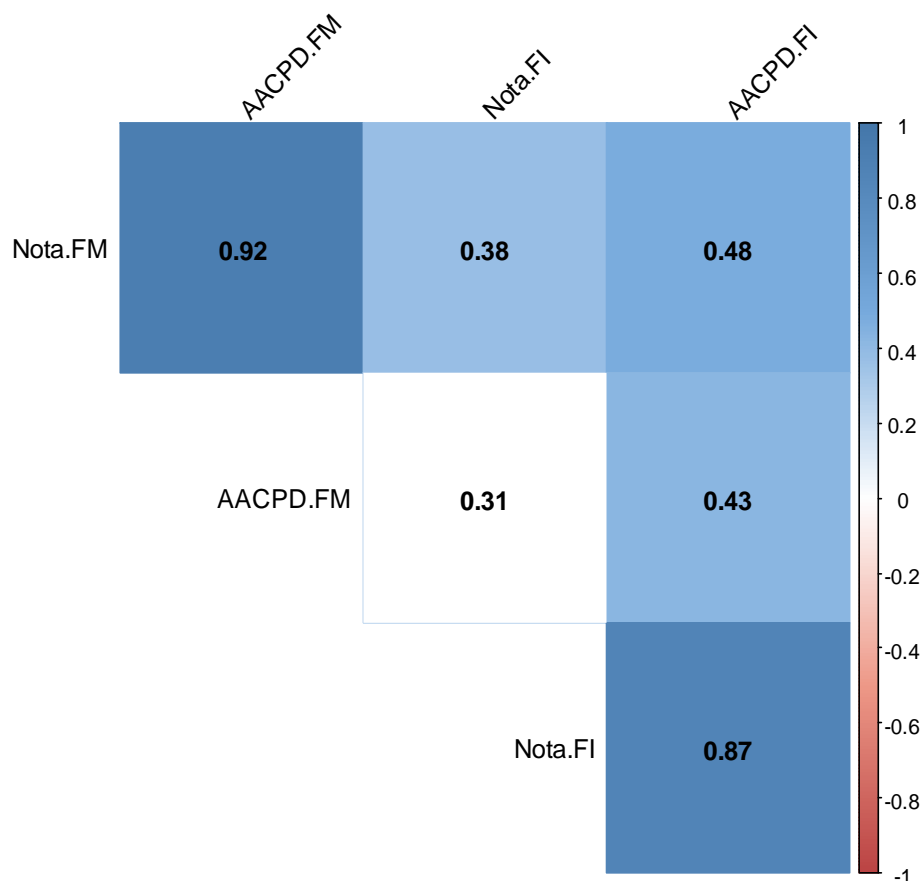


Figura 8: Correlação de Spearman entre duas variáveis: nota da severidade da antracnose e área abaixo da curva do progresso da doença – AACPD em 51 acessos de *Capsicum* spp. em dois estádios de desenvolvimento do fruto (FI: frutos imaturos, e FM: frutos maduros).

Discussão

As pimentas e pimentões são consideradas umas das culturas vegetais mais importantes do mundo. No Brasil são produzidos em torno de 5 milhões de toneladas ano⁻¹, porém grande parte desta produção não chega ao mercado final. A produção e comércio de pimentas e pimentões é intensamente atingido por diversas doenças, porém a antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é considerada uma das principais doenças fúngicas, pelas perdas que causa tanto no pré quando nos pós colheita. Deste modo, caracterizar o agente etiológico da antracnose é de extrema importância, para minimizar os extensos danos causado à produção de pimentas e pimentões no Brasil, principalmente no estado do Rio de Janeiro.

Neste trabalho, a associação de abordagens morfológicas e moleculares foi utilizada para identificar isolados de *Colletotrichum* de sintomas típicos de antracnose de pimentas, em dois pontos do estado do Rio de Janeiro, que apresentam

tipologias e clima contrastantes. A associação de metodologias têm sido estreitamente recomendadas, pois associam dados moleculares que são estáveis e confiáveis, a caracteres morfológicos que apesar de altamente influenciados pelo ambiente, também são capazes de caracterizar e auxiliar na diferenciação e identificação de espécies (Cai et al., 2009; Tang et al., 2012; Liu et al., 2016; Mongkolporn and Taylor, 2018). Pela combinação das análises morfológicas, como características de crescimento cultural, coloração e conídios e sequenciamento de regiões conservadas no genoma dos fungos, foi possível identificar e caracterizar os isolados de *Colletotrichum* spp. como pertencentes a espécie *Colletotrichum scovillei* D.

Colletotrichum scovillei é uma das espécies do gênero que pertencem ao segundo clado do complexo acutatum. Embora as sequências ITS sejam consideradas como a região *barcode* para identificação de fungos, segundo Sharma et al. (2016) utilizá-la isoladamente não permite diferenciar claramente o complexo acutatum de *Colletotrichum*. Por outro lado, as regiões parciais dos genes TUB2 e GAPDH são as mais recomendadas para diferenciação desta espécie (Damm et al., 2012). Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os citados acima, já que a região ITS foi dentre as cinco, a que menos apresentou variabilidade entre as espécies do complexo, bem como a região GAPDH obteve a maior parcimônia nos dados (Figura suplementar S1). Cabe ressaltar que nossos resultados corroboram com a literatura em demonstrar que uma abordagem polifásica é sim a mais indicada (Damm et al., 2012; Oo et al., 2017). Todas as características morfológicas encontradas neste trabalho estão de acordo com as descritivas da espécie por Damm et al. (2012).

A espécie *C. scovillei* foi descrita pela primeira vez na Tailândia em 2008 (Than et al., 2008), e desde então diversos trabalhos tem identificado esta espécie em áreas de cultivo de *Capsicum* spp. *C. scovillei* também foi encontrada em Laos (Phoulivong et al., 2010), Japão (Kanto et al., 2013), China (Liu et al., 2016), e novamente na Tailândia (Oo et al., 2017). No Brasil o primeiro relato foi em 2014 em frutos de pimentão no estado de Minas Gerais (Caires et al., 2014), e em 2017 nos estados de Alagoas e Amazonas (Silva et al., 2017). No entanto, estudos sobre características, área de abrangência, manejo, controle e fontes de resistência são incipientes. Oo et al. (2017) testaram diversas variedades de *Capsicum* contra *C. scovillei*, mas não encontraram nenhuma fonte de resistência ao patógeno.

Apesar dos 11 isolados de *C. scovillei* não apresentarem variabilidade nas sequências das cinco regiões avaliadas, foi encontrado diferenças nas características

culturas, principalmente de dois isolados. Este fato levou a investigação da variabilidade genética entre os mesmos, por meio de marcadores moleculares AFLP. Fundamentados em testes estatísticos, como Distância genética de Nei (1972), agrupamentos genéticos Bayesianos e UPGMA e Análise da Coordenada principal, foi possível concluir que existe variabilidade genética entre os isolados e que o isolado UEL27, além de apresentar as principais diferenças culturais, também se mostrou mais distante geneticamente dos demais. Trabalhos visando identificar o polimorfismo de isolados de *Colletotrichum* ainda são escassos, porém, são essenciais para compreender a diversidade genética e as relações entre os isolados, assim como revelam os trabalhos de Wijesekara et al. (2005), Prittesh et al. (2016) e Patel et al. (2018) que buscaram e identificaram elevada diversidade genética dentro de espécies de *Colletotrichum*.

A correta identificação da espécie, conhecimento da variabilidade do patógeno e das estratégias de infecção, são passos importantes para traçar estratégias de controle e manejo eficientes da antracnose em *Capsicum* spp. Porém, a maior eficiência na redução de danos causados por esta doença está na utilização de cultivares resistentes. A maioria das cultivares de pimentas e pimentões disponíveis no mercado é suscetível a *Colletotrichum* spp. e, conseqüentemente, levam ao uso excessivo de fungicidas químicos para controle (Ali et al., 2016; Saxena et al., 2016). Existem algumas fontes de resistência já descritas na literatura, porém, todas estão relacionadas com a resistência às espécies mais difundidas, como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. capsici* (Pakdeevaporn et al., 2005; Kim et al., 2008; Montri et al., 2009; Silva et al., 2014; Mahasuk et al., 2016), existindo poucos trabalhos publicados, sobre a interação *Capsicum/C. scovillei*. Portanto, é importante examinar as respostas de acessos e cultivares locais de pimentas a espécies de *Colletotrichum* mais frequentemente encontradas na região para fornecer subsídios para programas de melhoramento da cultura.

Afim de encontrar estas respostas, confrontamos um isolado de *C. scovillei* (UEL8.1) previamente selecionado pela capacidade de virulência com 51 acessos de *Capsicum* spp. em dois estádios de desenvolvimento dos frutos. Foi encontrada uma elevada variabilidade de resposta dos acessos a *C. scovillei* e em relação ao estágio de desenvolvimento do fruto. Alguns estudos disponíveis na literatura descrevem que genes diferentes podem conferir resistência à antracnose a depender do estágio de maturação. Os trabalhos de Pakdeevaporn et al. (2005), Lin et al. (2007), Than et al. (2008), Mahasuk et al. (2009a e b), Bento et al. (2010) e Baba et al. (2019)

identificaram genes distintos, responsáveis pela resistência em frutos imaturos e maduros, além de também evidenciarem distinção de genes em relação a diferentes patógenos. Neste trabalho, assim como nos citados acima, os frutos maduros mostraram-se mais resistentes em relação aos imaturos (Tabela 1). Esta maior resistência de frutos maduros está possivelmente relacionada ao aumento da produção e concentração de antioxidantes durante o processo de maturação dos frutos de *Capsicum* spp, além da indução da expressão de alguns compostos fenólicos responsáveis por respostas a infecção (Howard et al., 2000; Kim et al., 2001, Mahasuk et al., 2009b). A pepper esterase (PepEST) e capsidiol estão entre estes compostos fenólicos possivelmente envolvidos na resistência de frutos maduros pois já foram relatados como principal substancia acumulada nas regiões de infecção por *Colletotrichum* sp. (Kim et al., 2001, Mahasuk et al., 2009; Park et al., 2014; Lee et al., 2017).

Quatro acessos de *C. baccatum* utilizados neste trabalho apresentaram-se resistentes nos dois estádios de maturação dos frutos. Estes acessos são considerados promissores e importantes para futuros estudos relacionados à resistência, como herança genética e mapeamento da resistência, bem como podem ser utilizados em programas de melhoramento da espécie. O acesso de *C. annuum* inoculado simultaneamente mostrou-se completamente suscetível a doença. Este acesso foi utilizado como padrão de suscetibilidade para visualizar a infecção e colonização de *C. scovillei* por meio da de microscopia ao longo do tempo. Esta caracterização é fundamental para visualizar como ocorrem mudanças na morfologia das células e necrose ao longo dos dias de infecção e assim, traçar estratégias para bloquear este processo (Park et al., 2012).

Sumariamente nossos resultados, associados a dados publicados, mostram que *C. scovillei* é a espécie de *Colletotrichum* que está produzindo danos a produção e comércio de pimentas e pimentões no estado do Rio de Janeiro. A caracterização e identificação de isolados que apresentamos é o primeiro passo para o conhecimento sobre a epidemiologia e desenvolver estratégias efetivas de controle da antracnose. Especialmente na relação com *Capsicum* spp. a melhor alternativa é dedicar investimentos de programas de melhoramento para selecionar e desenvolver cultivares que sejam resistentes a *Colletotrichum* spp. em todas as fases de maturação. Para tanto, mais trabalhos são necessários para ampliar o conhecimento do patógeno e investigação de fatores relacionados a resistência de *Capsicum*, como identificação de novas fontes de resistência e estudos de herança genética.

Referências Citadas

- Ali, A., Bordoh, P. K., Singh, A., Siddiqui, Y., and Droby, S. (2016) Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. *Crop Prot.* 90:132-141.
- Baba, V.Y., Constantino, L. V., Ivamoto, S.T., Moreira, A.F.P., Madeira, T. B., Nixdorf, S.L., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A. (2019) *Capsicum-Colletotrichum* interaction: Identification of resistance sources and quantification of secondary metabolites in unripe and ripe fruits in response to anthracnose infection. *Scien Horti.* 246:469-477, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.011>.
- Bento, C.S, de Souza, A.G., Sudré, C.P., Pimenta, S., Rodrigues, R. (2017) Multiple genetic resistances in *Capsicum* spp. *Genet Mol Res.* 16:3.
- Bryant, D., Moulton, V. (2004) Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Mol Bio and Evol.* 21: 255–265.
- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B., Waller, J., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C., Johnston, P.R. (2009) A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers* 39:124.
- Caires, N.P., Pinho, D.B., Souza, J.S.C., Silva, M.A., Lisboa, D.O., Pereira, O.L., Furtado, G.Q. (2014) First report of anthracnose on pepper fruit caused by *Colletotrichum scovillei* in Brazil. *Plant Dis.* 98:1437.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. (1990) Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, New York City.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S. (2012) *Colletotrichum*- current status and future directions. *Stud Mycol.* 73:181–213.
- Carbone, I., Kohn, L.M. (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91:553–556.
- Cardoso, R.; Ruas, C. F.; Giacomini, R. M.; Ruas, P.M.; Ruas, E.A.; Rodrigues, R.; Gonçalves, L. S. A. (2018) Genetic variability in Brazilian *Capsicum baccatum* germplasm collection assessed by morphological fruit traits and AFLP markers. *Plos One.* 13:5 e0196468. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196468>
- Corander, J., Marttinen, P. (2006) Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Mol Ecol.* 15: 2833–2843.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., Tang, J. (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinfo.* 9: 539
- Corander, J., Tang, J. (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Math Biosc.* 205: 19–31.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.C.H., Crous, P.W. (2012) The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology.* 73:37-113.

- Dean, R., Van, Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Foster, G.D. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13.
- Drummond, A.J., Suchard, M. a., Xie, D., Rambaut, A., (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29:1969–1973. doi:10.1093/molbev/mss075
- Edgar, R.C., (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Ewing, B., Green, P., (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8:186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186
- Gernhard, T., Hartmann, K., Steel, M., (2008) Stochastic properties of generalised Yule models, with biodiversity applications. *J. Math. Biol.* 57:713–735. doi:10.1007/s00285-008-0186-y
- Glass, N.L., Donaldson, G. (1995) Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323–1330
- Green, P., (1999) Documentation for PHRAP [WWW Document]. URL <http://www.phrap.org/phredphrap/phrap.html> accessed 04 feb 2019
- Howard, L.R., Talcott, S.T., Brenes, C.H., Villalan, B. (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J Agric Food Chem.* 48: 1713–1720.
- Huson, D.H., Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. (2009) *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Divers* 39: 147-182.
- Kamvar, Z.N., Brooks, J.C., Grünwald, N.J. (2015) Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Front. Genet.* 6:208. doi: 10.3389/fgene.2015.00208. 2018.
- Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., Grünwald, N.J. (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281. doi: 10.7717/peerj.281
- Kanchana-Udomkan, C., Taylor, P.W.J., Mongkolporn, O. (2004) Development of a bioassay to study anthracnose infection of chili fruit caused by *Colletotrichum capsici*. *Thai J Agric Sci.* 37:293–297.
- Kanto, T., Uematsu, S., Tsukamoto, T., Moriwaki, J., Yamagishi, N., Usami, T., Sato, T. (2014) Anthracnose of sweet pepper caused by *Colletotrichum scovillei* in Japan. *J Gen Plant Pathol* 80:73–78 .

- Kim, S. H., Yoon, J. B., Do, J. W., and Park, H. G. (2008) A major recessive gene associated with anthracnose resistance to *Colletotrichum capsici* in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Breed Sci* 58:137-141.
- Kim, Y. S., H. H. Lee, M. K. Ko, C. E. Song, C.-Y. Bae, Y. H. Lee, and B.-J. Oh. (2001). Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (*Capsicum annuum*) esterase. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 80-85.
- Lin, S. W., Gniffke, P. A., and Wang, T. C. (2007) Inheritance of resistance to pepper anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Acta Hortic* 760:329-334.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang, X., Zhang, S., Gong, G. (2016) Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Sci Rep.* 6:32761.
- Maddison, D.R., Maddison, W.P., (2014b) Chromaseq: a Mesquite package for analyzing sequence chromatograms. Version 1.12 [WWW Document]. URL <http://mesquiteproject.org/packages/chromaseq> (accessed 04 feb 2019).
- Maddison, D.R., Wheeler, T.J., Maddison, W.P., (2007) Align: a Mesquite package for aligning sequence data. Version 1.11 [WWW Document]. URL [Disponível em: http://mesquiteproject.org](http://mesquiteproject.org) (accessed 04 feb 2019).
- Mahasuk, P., Khumpeng, N., Wasee, S., Taylor, P. W. J., and Mongkolporn, O. (2009a) Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) at seedling and fruiting stages in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Breed.* 128:701-706.
- Mahasuk, P., Taylor, P.W.J. and Mongkolporn, O. (2009b) Identification of Two New Genes Conferring Resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Capsicum baccatum*. *Phytopathology.* 99:1100-1104.
- Mahasuk, P., Struss, D., and Mongkolporn, O. (2016) QTLs for resistance to anthracnose identified in two *Capsicum* sources. *Mol Breed.* 36:1-10.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J.Z., Cai, L. (2017) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Stud in Myco.* 86, 99–216,
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans, LA, 1:8.
- Mills, P.R., Hodson, A., Brown, A.E. (1992) Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: Bailey JA, Jeger MJ, eds. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK: CABI, 269–88.
- Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J. (2018) Chili anthracnose: *Colletotrichum* taxonomy and pathogenicity. *Plant Path.* DOI: 10.1111/ppa.12850
- Montri, P., Taylor, P. W. J., and Mongkolporn, O. (2009) Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the Causal Agent of Chili Anthracnose, in Thailand. *Plant Dis.* 93:17-20.

- Müller, K., (2005) SeqState: Primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Appl. Bioinformatics*. 4:65–69. doi:10.2165/00822942-200504010-00008
- Nei, M. (1972) Genetic distances between populations. *American Naturalist*. 106:283-292.
- Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Jones, E.B.G., Bahkali, A.H., Hyde, K.D. (2012) Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Mycol*. 33:347–362
- O'Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Tewksbury, J.J., Reagan, K.M., Machnicki, N.J., Carlo, T.A., Haak, D.C., Penaloza, A.L.C., Levey, D.J. (2008) Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T., Cigelnik, E. (2000) A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41:61–78.
- Oo, M.M., Oh, S.K. (2017) Characterization and Pathogenicity of New Record of Anthracnose on Various Chili Varieties Caused by *Colletotrichum scovillei* in Korea , *Mycobiology*. 43:153-62.
- Pakdeevaporn, P., Wasee, S., Taylor, P. W. J., and Mongkolporn, O. (2005) Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. *Plant Breed*. 124:206-208.
- Park, S., Jeong, W. Y.; Lee, J. H.; Kim, Y. H.; Jeong, S. W.; Kim, G. S. (2012) Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 130:981–985.
- Park, S., Park, A. R., Im, S., Han, Y. J., Lee, S., Back, K., and Kim, Y. S. 2014. Developmentally regulated sesquiterpene production confers resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* in ripe pepper fruits. *Plos One*. 9:e109453.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., and Hyde, K.D. (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*. 44:33-43.
- Prittesh, P., Amaresan, N., Rushabh, S., Krishnamurthy, R., Bhasker, V. J (2016) *Plant Dis Prot*. 123:273–7.
- Prittesh, P., Rajkumar, B.K., Preeti, P., Rusabh, S., Krishnamurthy, R. (2018) Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went accessions based on RAPD and ISSR markers. *Journal of Gen Eng and Biotech*. 16:153–159
- R CoreTeam. (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. 19 Jul.
- Rambaut, A., Suchard, M., Drummond, A., 2013. Tracer.

- Roberts, P.D., Pernezny, K., Kucharek, T.A. (2011) Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. on pepper. University of Florida/Institute of Food and Agricultural Sciences DOI: <http://edis.ifas.ufl.edu/PP104>
- Saxena, A., Raghuvanshi, R., Gupta, V. K., and Singh, H. B. (2016) Chili anthracnose: The epidemiology and management. *Front Microbiol* 7:1-18.
- Sharma, G., Shenoy, B.D. (2016) *Colletotrichum* systematics: Past, present and prospects. *Mycosphere*. 7:1093–1102. DOI 10.5943/mycosphere/si/2c/2
- Sharma, G., Pinnaka, A.K., Shenoy, B.D. (2014) Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat markers. *Fungal Divers.* 71:247–264.
- Silva, J.R.A., Chaves, T., Silva, R.G., Barbosa, L.F., Costa, J. F., et al (2017) Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil. *Trop. plant pathol.* DOI 10.1007/s40858-017-0151-7
- Silva, S. A. M., Rodrigues, R., Gonçalves, L. S. A., Sudré, C. P., Bento, C. S., Carmo, M. G. F., et al. (2014) Resistance in *Capsicum* spp. to anthracnose affected by different stages of fruit development during pre- and post-harvest. *Trop. Plant Pathol.* 39:335–341 Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-341
- Simmons, M.P., Ochoterena, H., (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 49:369–381. doi:10.1080/10635159950173889
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E., Mills, P.R. (1992) DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol and Mol Plan Path.* 41:265–81.
- Sun, C.Y., Mao, S.L., Zhang, Z.H., Alain, P., Wang, L.H., Zhang, B.X. (2015) Resistances to anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) of *Capsicum* mature green and ripe fruit are controlled by a major dominant cluster of QTLs on chromosome P5. *Sci Hortic.* 181: 81–88.
- Sutton, B.C. (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph. In: Bailey JA & Jeger MJ (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England, CAB International Wallingford. 388p.
- Tang, J. M. (2012) A study on pathogens identification of pepper fruit anthracnose and their biological characteristics in Guangxi, Master's thesis (Guangxi University).
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A., Solon, S.L., Crowhurst, R.N. (1992) Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J. (2008) Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chili (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plan Path.* 57:562–572.
- Tozze Júnior, H.J., Gioria, R., Suzuki, O., Brunelli, K.R., Braga, R.S., Massola Júnior, N.S. (2007) Natural occurrence of *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes causing anthracnose on pepper (*Capsicum annuum* L.) in Brazil. *Summa Phytopathol.* 33:418.

- Tozze Júnior, H.J., Massola Júnior, N.M., Câmara, M.P.S., Gioria, R., Suzuki, O., Brunelli, K.R., Braga, R.S., Kobori, R.F. (2009) First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose on pepper in Brazil. *Plant Dis.* 93:106.1
- Tozze Júnior, H.J., Mello, B.A., Massola-Júnior, N.S. (2006) Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathol* 32:77–79
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T; Hornes, M., Frigtrs, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* 33:4407- 4414.
- Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U. (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol.* 73:115–180.
- White, T.J., Bruns ,T., Lee, S., Taylor, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White YJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and application.* Academic, San Diego. 315–322
- Wijesekara, R., Aggarwal, D.K., Agarwal , H. (2005) Morphological and molecular characterization of five *Colletotrichum* species from India. *Indian Phytopath.* 58:448-453.
- Yule, G., (1925) *A Mathematical Theory of Evolution, Based on the Conclusions of Dr.J.C.Willis.* ... London. 213:21–87.
- Zolan, M., Pukkila, P. (1986) Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell Biol.* 6:195-200.

Material Suplementar

Tabela suplementar 1: Caracterização morfológica e cultural de 11 isolados de *Colletotrichum* spp.

Identificação	VCC(mm/dia)	Aspecto/cor micelial		Conídios		Procedência
		Frente	Verso	Tamanho (comp x larg) (um)	Forma	
UEL01	6,30	Aéreo, algodoado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	Sépia acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	11-18 x 3 – 3,9	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Teresópolis-RJ
UEL8.1U	5,80	Aéreo, algodoado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	Sépia acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	12-19 x 5 – 6,9	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Nova Friburgo/RJ
UEL8.1F	6,20	Aéreo, algodoado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	Sépia acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	13 – 18 x 5 – 6	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Nova Friburgo/RJ
UEL09	6,20	Aéreo, algodoado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	Sépia acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	10 – 17 x 3 – 4,1	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	NI-1
UEL12	6,40	Aéreo, algodoado, cinza esbranquiçado.	Cinza claro e levemente assepsiado no centro.	10,5 – 14 x 3,2 – 4,2	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	São João da Barra-RJ
UEL22	6,10	Aéreo, algodoado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	Sépia acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	10,5 – 12 x 3 – 4,4	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Campos dos Goyatacazes - RJ
UEL27	4,80	Não aéreo, salmão e sépia ao centro.	Sépia claro a escuro no centro, margens mais claras e anéis concêntricos não vistos.	13 – 13,9 x 3 - 4	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Campos dos Goyatacazes - RJ
UEL42	6,00	Aéreo, algodoado, cinza esbranquiçado com acérvulos	Sépia acinzentado com anéis concêntricos e	11,9 – 14 x 4,1 - 5	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade	São João da Barra-RJ

Identificação	VCC(mm/dia)	Aspecto/cor micelial		Conídios		Procedência
		Frente	Verso	Tamanho (comp x larg) (um)	Forma	
UEL53	5,30	salmão. Aéreo, algodado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	cinza ferro no centro. Sépie acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	10,3 – 12 x 3 – 4,2	redonda e outra aguda. Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Teresópolis – RJ
UEL71	6,20	Aéreo, algodado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	Sépie acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	11 – 18 x 3,2 – 3,9	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Teresópolis – RJ
UEL72	6,30	Aéreo, algodado, cinza esbranquiçado com acérvulos salmão.	Sépie acinzentado com anéis concêntricos e cinza ferro no centro.	10,5 – 16 x 3 - 4	Hialino, reto, cilíndrico com uma extremidade redonda e outra aguda.	Teresópolis – RJ

Tabela Suplementar 2: Cinco regiões gênicas utilizadas na análise multilocus dos isolados de *Colletotrichum* spp. com seus respectivos *primers*. .

GENE	Produto final	Nome do Primer	Sequência do primer	Referência
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GD_F	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Templeton et al. (1992)
		GD_R	GGGTGGAGTCGTACTIONTGAGCATGT	
ITS	Espaçador transcrito interno	ITS_F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	White et al. (1990)
		ITS_R	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	
TUB2	β -Tubulina 2	T1_F	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	Glass e Donaldson (1995)
		Bt2_F	GGTAAGCAAATCGGTGCTGCTTTC	
ACT	Actina	Bt2_R	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Carbone e Kohn (1999)
		ACT512_F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	
CAL	Calmodulina	ACT783_R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	O'Donnel et al. (2000)
		CL1_F	GAATTCAAGGAGGCCTTCTC	
		CL2_R	CTTCTGCATCATGACCTGGAC	

Tabela Suplementar 3: Espécies do gênero *Colletotrichum* utilizadas neste trabalho com detalhes dos isolados e números de acessos ao GenBank das cinco regiões gênicas.

Espécies do complexo acutatum	Código do isolado	Número de acesso do Genbank				
		GAPDH	β -TUB	ACT	CAL	ITS
<i>C. acutatum</i>	CBS 112996; ATCC 56816/STE-U 5292; HTTJ3	JQ948677	JQ005860	JQ005839	MH113878	JQ005776
<i>C. brisbanense</i>	CBS 292.67; DPI 11711	JQ948621	JQ949942	JQ949612	-	JQ948291
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126518; PD 84/520	JQ948601	JQ949922	JQ949592	-	JQ948271
<i>C. fioriniae</i>	CBS 128517; LF603	JQ948622	JQ949943	JQ949613	KJ954727	JQ948292
<i>C. guajavae</i>	CPC 18893; IMI 350839	JQ948600	JQ949921	JQ949591	-	JQ948270
<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551; CPC 14986	JQ948618	JQ949939	JQ949609	-	JQ948288
<i>C. laticiphilum</i>	CBS 112989; IMI 383015, STE-U 5303	JQ948619	JQ949940	JQ949610	-	JQ948289
<i>C. nymphaeae</i>	CBS 515.78	JQ948527	JQ949848	JQ949518	-	JQ948197
<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753; CPC 18868	JQ948615	JQ949936	JQ949606	-	JQ948285
<i>C. scovillei</i>	CBS 126529; PD 94/921-3, BBA 70349; HNCS015	JQ948597	JQ949918	JQ949588	KX673577	JQ948267
	CBS 126530; PD 94/921-4; LJTJ70	JQ948598	JQ949919	JQ949589	KP943584	JQ948268

Tabela suplementar 3: Continuação COUFAL0054		KY319100	KY319109	-	-	KY319118
Espécies do complexo gloeosporioides	Código do isolado	Número de acesso do Genbank				
		GAPDH	β -TUB	ACT	CAL	ITS
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608	JX010044	JX010389	JX009443	JX009683	JX010244
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673	JX009930	JX010392	JX009483	JX009721	JX010176
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580; CBS 130418	JX010053	JX010406	JX009584	FJ917506	FJ972612
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878; ICMP 17821, CBS112999	JX010056	JX010445	JX009531	JX009731	JX010152
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	JX009934	JX010414	JX009447	JX009691	JX010276
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051	JX009916	JX010403	JX009562	JX009696	JX010242
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578; CBS 130417	JX009924	JX010404	FJ907423	FJ917505	JX010171
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949; ICMP 18653, MTCC 11371	JX010007	JX010407	JX009489	JX009719	JX010264
Espécies do complexo truncatum	Código do isolado	Número de acesso do Genbank				
		GAPDH	β -TUB	ACT	CAL	ITS
<i>C. truncatum</i>	CBS 151.35	GU228254	GU228156	GU227960	-	GU227862
<i>C. curcumae</i>	IMI 288937	GU228285	GU228187	GU227991	-	GU227893

Tabela suplementar 3: Continuação

<i>C. jasminigenum</i>		LC923	HM131499	HM153770	HM131508	HM131494	HM131513
Outras espécies importantes do gênero <i>Colletotrichum</i>		Código do isolado	Número de acesso do Genbank				
			GAPDH	β-TUB	ACT	CAL	ITS
<i>C. brevisporum</i>	BCC 38876		JN050227	JN050244	JN050216	-	JN050238
	COUFAL0053		KY319099	KY319108	KY319123	KY319126	KY319117
<i>C. cliviae</i>	CBS 125375		GQ856756	JX519249	JX519240		GQ849464
Outgroup							
<i>Monilochaetes infuscans</i>	CBS 869.96		JX546612	JQ005864	JQ005843		-

Tabela Suplementar 4: Distância genética de Nei (1972) entre os 11 isolados de *Colletotrichum* spp.

	UEL01	UEL09	UEL12	UEL22	UEL27	UEL42	UEL53	UEL71	UEL72	UEL81F
UEL01										
UEL09	0,57									
UEL12	0,84	0,53								
UEL22	0,52	0,42	0,51							
UEL27	0,85	0,72	0,68	0,54						
UEL42	0,65	0,64	0,79	0,59	0,83					
UEL53	0,62	0,50	0,60	0,41	0,74	0,56				
UEL71	0,63	0,57	0,89	0,64	0,94	0,69	0,66			
UEL72	0,58	0,67	0,87	0,70	0,90	0,82	0,54	0,50		
UEL81F	0,56	0,75	1,09	0,73	0,98	0,71	0,73	0,60	0,66	
UEL81U	0,44	0,41	0,58	0,38	0,81	0,58	0,42	0,42	0,44	0,52

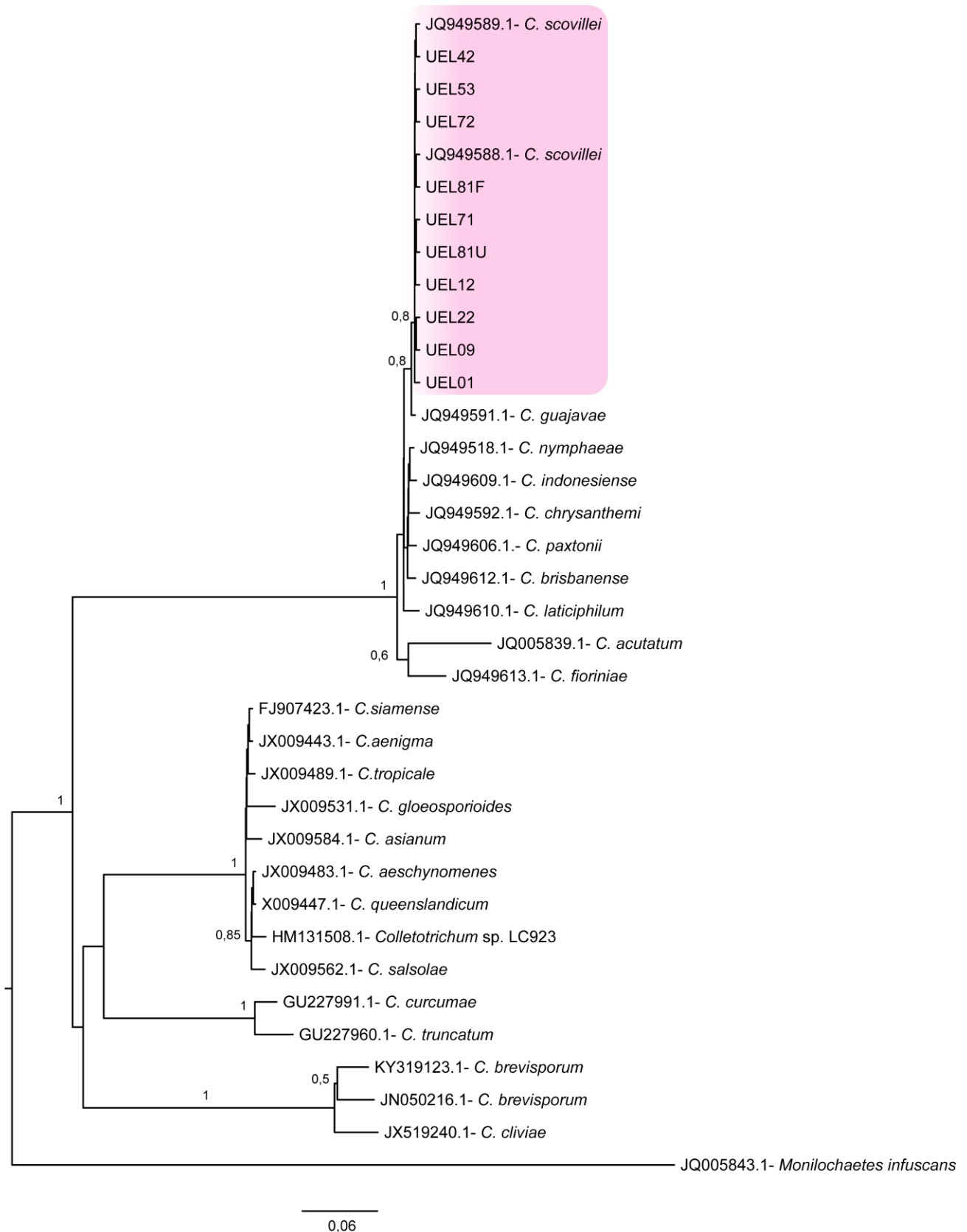


Figura Suplementar 1: Filograma da região gênica ACT contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Os valores da probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em destaque (rosa). A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o *outgroup* *Monilochaetes infuscans*.

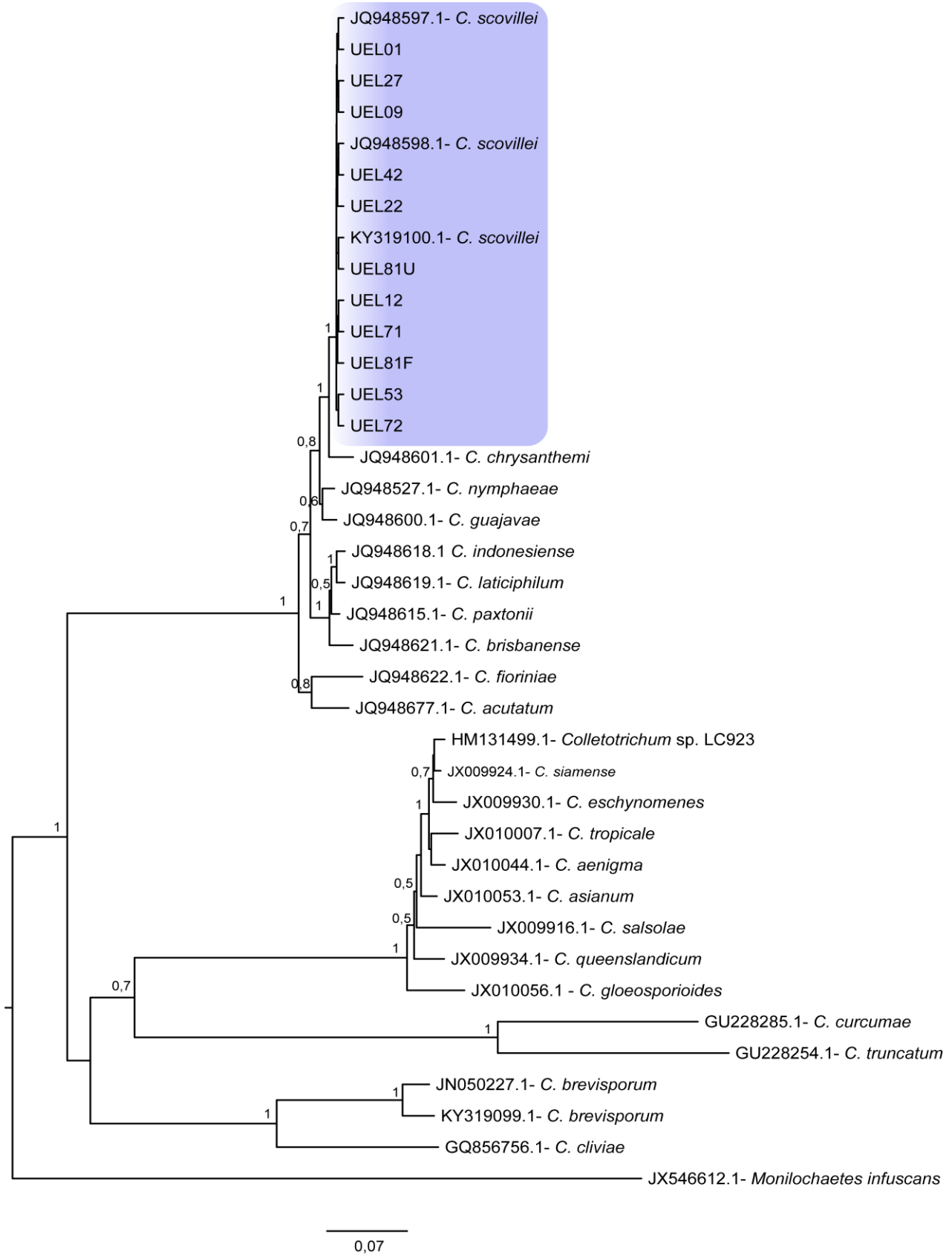


Figura suplementar 2: Filograma da região gênica GAPDH contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Os valores da probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em destaque (roxo). A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *Monilochaetes infuscans*.

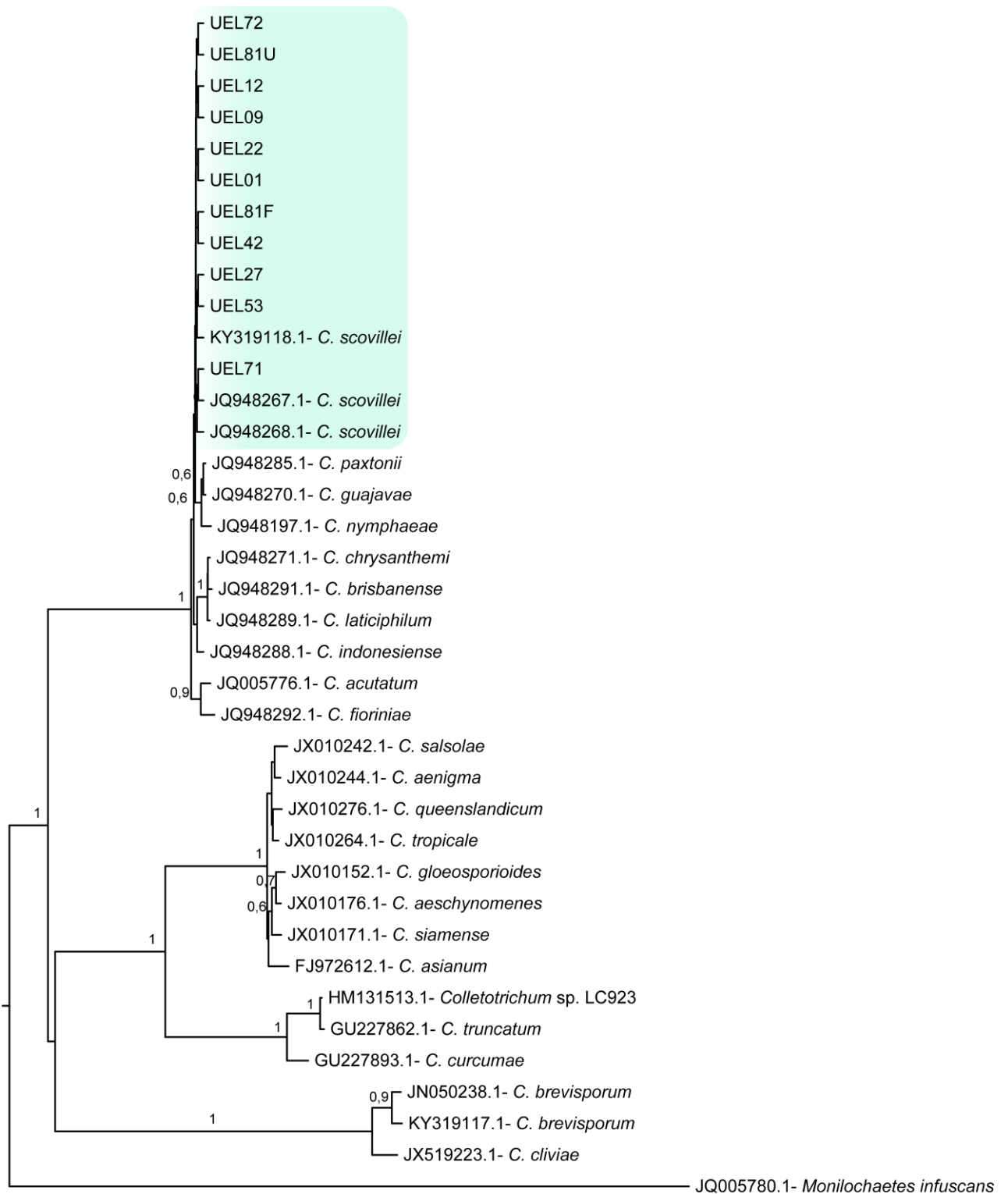


Figura suplementar 3: Filograma da região gênica ITS contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Os valores da probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em destaque (verde). A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o *outgroup* *Monilochaetes infuscans*.

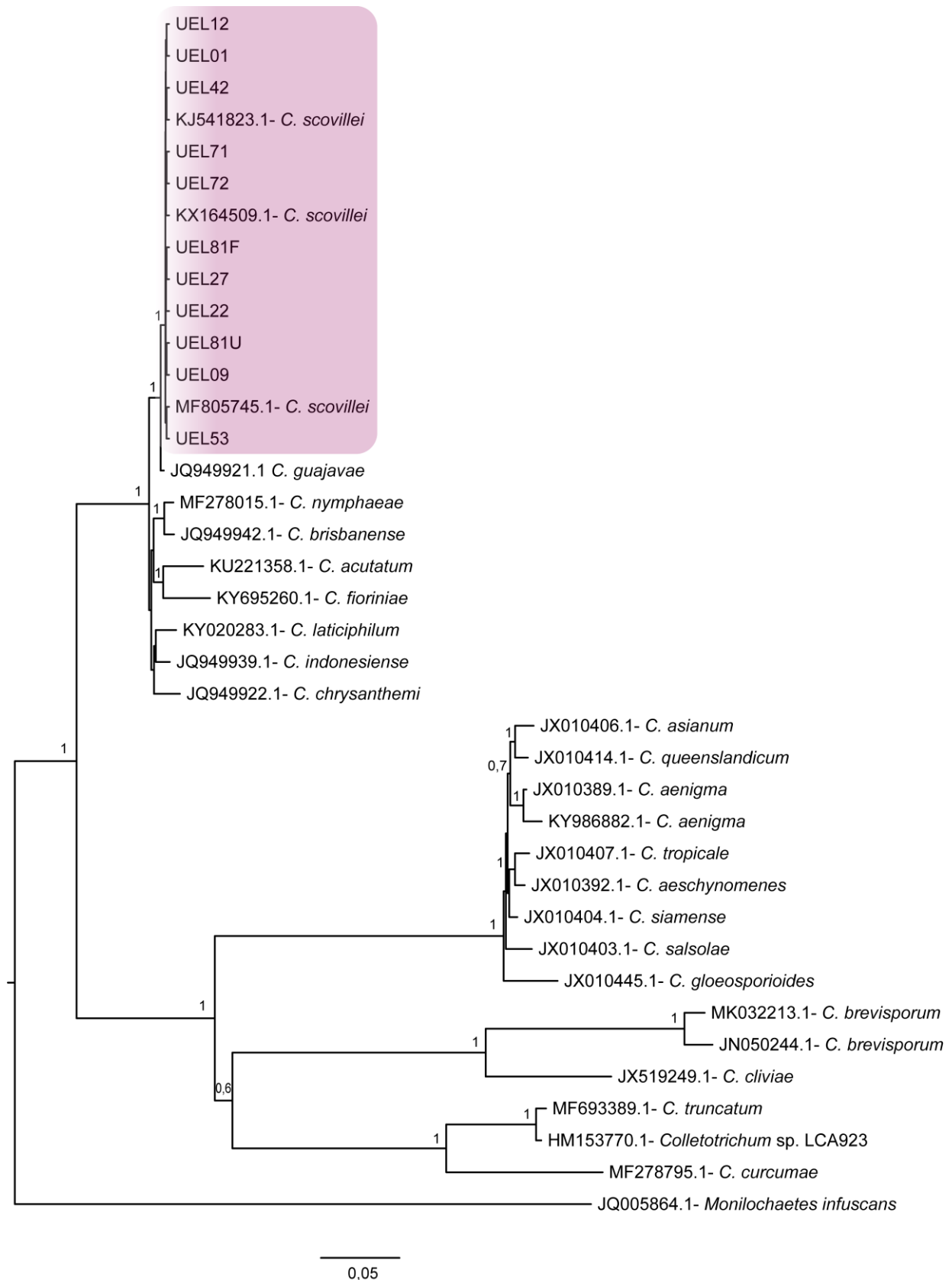


Figura suplementar 4: Filograma da região gênica TUB2 contendo os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. Os valores da probabilidade a posteriori >0.5 são mostrados nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão em destaque (rosa escuro). A barra de escala (0.07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *Monilochaetes infuscans*.

ARTIGO B: Inheritance of anthracnose resistance caused by *Colletotrichum scovillei* in unripe and ripe *Capsicum annuum* fruits (Plant Disease)

Renata M Giacomini, Claudete F Ruas, Leandro SA Gonçalves

Corresponding Author: **Leandro SA Gonçalves**
leandrosag@uel.br

Abstract

Anthracnose is one of the diseases that most affects the production of sweet and chili peppers worldwide, mainly in tropical and subtropical zones. Caused by species of the genus *Colletotrichum*, leads result in severe fruits damages during the pre- and post-harvest. Development of resistant cultivars is the most effective strategy for disease control. Knowing the genetic basis of resistance is one of the main elements for developing resistant cultivars. This work reports the analysis of inheritance of the resistance of *Capsicum annuum* to *C. scovillei* in two fruit development stages. The unripe and ripe fruits were inoculated by injection method, and the anthracnose severity was evaluated for eight days using a score scale. It was found that the inheritance of the resistance has independent expression in unripe and ripe fruits. In both cases, two main genes are responsible for resistance with polygenes effects. Genetic control, with a quantitative aspect, has its major expression in the effects of dominance than in the additive effects, both in two fruit development stages of *Capsicum annuum*.

1 **Introduction**

2 Chilli and sweet peppers (*Capsicum annuum* L.) are considered one of the main
3 vegetables in the world and it is among the most important constituents of tropical and
4 subtropical culinary, especially for its sensorial and nutritional characteristics
5 (Welbaum 2015). Although there have been technological and production advances in
6 this crop, diseases still generate great concern, causing serious yield losses (Ali et al.
7 2016; Babu et al. 2011; Di Dato et al. 2015; Park et al. 2012; Pereira et al. 2011; Prusky
8 2011).

9 Among fungal diseases, anthracnose (*Colletotrichum* spp.) has been reported as
10 one of the most destructive in peppers (Agrios 2005). The typical fruits symptoms are
11 sunken lesions of circular or angular shape, with concentric rings of acerves that are
12 often moist and with mass production of orange conidia, leading to rotting in pre and
13 post-harvest periods (Than et al. 2008). This disease is more frequent in tropical and
14 subtropical zones, since these regions have environmental conditions, such as high
15 temperature and humidity, which favors their development (Royle and Butler 1986).
16 Anthracnose in sweet and chili peppers is commonly associated with 24 species of
17 *Colletotrichum*, which are described as having the ability to infect fruits at different
18 development stages (Ali et al. 2016; Mongkolporn and Taylor 2018; Saxena et al.
19 2016). Three species of *Colletotrichum* are considered as the most destructive in South
20 America: *C. truncatum* (syn. *C. capsici*; Damm et al. 2012), *C. siamense* and *C.*
21 *scovillei* (Mongkolporn and Taylor 2018). *Colletotrichum scovillei* has been recently
22 described as a *Colletotrichum* species that can cause lesions in both ripe and unripe
23 fruits, becoming important the knowledge between this species and the interaction with
24 sweet and chilli peppers (Caires et al. 2014).

25 There are different management strategies for the control of anthracnosis in
26 *Capsicum*, such as crop rotation with non-host species, application of chemical
27 fungicides and biological control (Ali et al. 2016; Saxena et al. 2016). However, the one
28 strategy that brings the greatest economic and sustainable benefits is the use of resistant
29 cultivars. In addition to minimizing losses, it also contributes to the reduction in the use
30 of chemical fungicides for disease control (Mahasuk et al. 2016).

31 The development of resistant cultivars poses challenges that involve knowing
32 which of *Capsicum* accesses carry this characteristic, in addition to understanding the
33 different interactions between pathogen, host and fruit developmental stage. However,
34 this is a challenging task since in the *Colletotrichum/Capsicum* patosystem there is an
35 association of multiple pathogens with different host species, added to its virulence and
36 infectious capacity at different stages of fruit development (Saxena et al. 2014; Sharma
37 et al. 2005 Sun et al. 2015).

38 In *Capsicum*, sources of anthracnose resistance have been found in Asia, *C.*
39 *chinense* L. and *C. baccatum* Jacq. by World Vegetable Center – AVRDC (1999), and
40 have been used for studies of resistance inheritance (Kim et al. 2008; Montri et al. 2009;
41 Pakdeevaporn et al. 2005; Silva et al. 2014) and as parents in breeding programs
42 (Mahasuk et al. 2016).

43 Inheritance and genetic control studies have shown variation according to the
44 pathogen species and the fruit developmental stage. Studies reported five different
45 genes conferring resistance to anthracnose in *Capsicum* genotypes. Pakdeevaporn et
46 al. (2005) and Mahasuk et al. (2009a) identified a different gene for each developmental
47 stage from a cross between *C. chinense* x *C. annuum*, using as pathogen *C. capsisi: col*
48 in unripe fruits and *co2* in mature fruits, besides a third gene, *co3* in seedlings. Another
49 research group (Mahasuk et al., 2009b) found two genes (*co4* for unripe and *co5* for ripe

50 fruits) when studying populations from the crossing of *C. baccatum* accessions, using
51 the inoculum of two species of *Colletotrichum* species: *C. capsici* and *C. acutatum*.
52 Other studies indicate different expression for the inheritance of these characteristics, as
53 two dominant genes in unripe fruits and recessive in ripe fruits (Lin et al. 2007).

54 In Brazil some studies have been carried out searching for anthracnose
55 resistance sources. However, inheritance and mapping studies that associate accessions
56 of *Capsicum* to *Colletotrichum* are still lacking, particularly with *C. scovillei*. Therefore,
57 our main objective was to use of the resistance analysis to generate information
58 regarding the inheritance of the resistance of neotropical pepper to anthracnose. This
59 knowledge is essential for species breeding programs, as well as guiding subsequent
60 studies, such as quantitative feature mapping (QTL's) and expression of the responsible
61 genes.

62 **Material and methods**

63 Population development

64 In order to evaluate the genetic inheritance of the anthracnose, the generations P₁, P₂,
65 F₁, F₂, BC₁, BC₂, were used from the crossing between the accessions of *C. annuum*
66 GBUEL104 (P₁) and GBUEL103 (P₂). These parents belong to the germplasm bank of
67 the Universidade Estadual de Londrina (UEL) and were previously identified as
68 resistant (P₁) and susceptible (P₂) to *C. scovillei*, respectively. The experiment was
69 carried out in an experimental field at UEL, in a randomized complete block design,
70 with three replications. The spacing between rows and plants was 0.80 and 0.60m,
71 respectively. Each block contained replicates of all the generations analyzed. The field
72 was controlled following the recommendations of the cultural practices for chilli and
73 sweet peppers cultivation.

74 Disease inoculation and evaluation

75 We collected six unripe (35 days after anthesis - DAA) and ripe (50 DAA) fruits
76 from each plant and disinfected them superficially in 1% (w/v) sodium hypochlorite
77 solution for five min, followed by three washes with distilled water for one min (Silva
78 et al. 2014). Five fruits from each accession and each fruit development stages were
79 evaluated, and one fruit was used as control (mock inoculation with sterilized distilled
80 water).

81 For inoculum suspension, the strain UEL8.1U was grown in potato-dextrose-
82 agar medium (PDA), pH 7.0, and incubated in the dark at 25 ° C, until colonies were
83 formed. The inoculation of the fruits was performed under laboratory conditions by the
84 injection method, as described by Kanchana-Udomkan et al. (2004) in the central part of
85 the fruit, using a micro syringe model 1705 TLL (Hamilton, Bonaduz, Switzerland).
86 The depth of the needle was fixed at 1 mm to ensure inoculum volume and uniformity
87 of lesion size. The conidial suspension was prepared minutes before inoculation at the
88 concentration of 1×10^6 conidia.mL⁻¹, adjusted by counting in the *Neubauer* chamber.
89 After inoculation the fruits were placed in a humid chamber and incubated in the dark
90 for 24 hours at 25 °C, with subsequent cycles of 12h light / 12h dark.

91 Anthracnose severity in *Capsicum* spp. fruits was evaluated every 24 h, among
92 the 1st and 8th day after inoculation (DAI), and values were based on score scale
93 proposed Montri, Taylor, and Mongkolporn (2009) where 1 = highly resistant; 3 =
94 resistant; 4 = moderately resistant; 6 = moderately susceptible; 8 = susceptible; and 10 =
95 highly susceptible.

96

97 Data analysis

98 Data from the periodic observations were used to calculate the area under the
99 disease progress curve (AUDPC) (Campbell and Madden,

100 1990):
$$\text{AUDPC} = \sum_i^{n-1} \left(\frac{x_i + x_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$
, where: n = the number of observations;
 101 x_i = the severity of the disease at the "i" th observation and t_i = the time in days at the "i"
 102 -th observation. This analysis was performed using software R (R Core Team 2018),
 103 using the *agricolae* package (De Mendiburu 2017).

104 Classes with final grades (8th DAI) less than or equal to three were considered as
 105 resistant and the others as susceptible. The chi-square test (χ^2) was calculated
 106 considering the rate of segregation of individuals who were resistant or susceptible in

107 the generations by the following formula:
$$\chi_c^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$
, where: O_i = observed
 108 number of individuals in the phenotype class; E_i = expected number of individuals in
 109 the i th phenotypic class; k = number of phenotypic classes.

110 AUDPC values were used to estimate the genetic and environmental
 111 components, the average of the generations and the genetic effects involved in the
 112 expression of the characteristic (Cruz et al. 2004). The analyzes were performed using
 113 the following formulas:

- 114 • Phenotypic variation: σ_f^2): $\sigma_f^2 = \sigma_{F2}^2$
- 115 • Ambiental variation: σ_s^2): $\sigma_s^2 = \frac{(\sigma_{P1}^2 + 2\sigma_{F1}^2 + \sigma_{P2}^2)}{4}$
- 116 • Genotypic variation (σ_g^2): $\sigma_g^2 = \sigma_{F2}^2 - \sigma_s^2$
- 117 • Additive variation (σ_a^2): $\sigma_a^2 = 2\sigma_{F2}^2 - (\sigma_{RC1}^2 + \sigma_{RC2}^2)$
- 118 • Variance due to dominance deviations (σ_d^2): $\sigma_d^2 = \sigma_g^2 - \sigma_a^2$
- 119 • Heritability in the broad sense $[(h)_a^2]$: $h_a^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_{F2}^2}$
- 120 • Heritability in the narrow sense $[(h)_r^2]$: $h_r^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_{F2}^2}$,

- 121 • Average dominance degree (ADD): $ADD = \frac{d}{a}$
- 122 • Minimum number of genes (η): $\eta = \frac{R^2 (1 + 0,5k^2)}{8 \sigma_g^2}$

123 The genetic parameters were estimated based on the means of the generations, as
 124 exemplified by the following formulas: $\overline{P1} = m + a + aa$; $\overline{P2} = m - a + aa$;
 125 $\overline{F1} = m + d + dd$; ; and . Where: m = mean of all possible homozygotes; a = measure
 126 of additive effects; d = measure of dominance deviations; aa = measure of all additive x
 127 additive interactions; ad = measure of all additive x dominant interactions; dd =
 128 measure of all dominant x dominant epistatic interactions.

129 In the complete model (m, a, d, aa, ad, dd), the parameters were estimated using
 130 the ordinary least squares method. In the additive-dominant model (m, a, d), the
 131 parameters were estimated by the non-orthogonal decomposition of the sum of the
 132 squares. The fit of the model was evaluated through the coefficient of determination
 133 (R^2), which expresses the degree of similarity of the estimates between the estimated
 134 and observed values. All analyzes were performed with the aid of the statistical
 135 software GENES (Cruz 2013). In order to identify the existence of genes with a greater
 136 effect and / or the presence of polygenic actions with additive and non-additive effects,
 137 the genetic models test was performed by the likelihood function using the Monogen v.
 138 0.1 (Silva 2003). Initially, it was considered the most complete genetic model (Model
 139 1), which presents effects of a larger gene, with additive and dominance effect, and
 140 polygenes also with additive and dominance effects. From model 1 that contains all the
 141 genetic parameters, other simpler models are generated (Models 2 to 9). The estimates
 142 of the parameters were obtained by the maximum likelihood method and the hypothesis
 143 test by the likelihood ratio between two models (LR). The LR statistic considers that
 144 each parameter added to a model implies a significant increase of the variation

145 explained by it. The LR was calculated by the following formula:
$$LR = -\frac{2 \ln(L(M_i))}{L(M_j)}$$

146 where L (Mi) and L (Mj) are the likelihood functions of models i and j, with model i
147 being hierarchical to the model.

148

149 **Results and discussion**

150 The absence of symptoms in GBUEL104 and the presence of severe symptoms
151 in GBUEL103 confirm the uniformity of resistance and susceptibility expression in the
152 parental accessions used for both unripe fruits and ripe fruits. In the F₁ generation, a low
153 variability of the symptoms was observed, where the fruits were mostly resistant at both
154 development stages. In F₂ it was possible to visualize the wide variability expected for
155 this generation: plants that did not present symptoms until plants with severe lesions.
156 The inheritance of *C. annuum* resistance to *C. scovillei* was tested for unripe and ripe
157 fruits and the segregation data are presented in Table 1. The F₂ generation showed
158 different segregation in unripe and ripe fruits. In unripe fruits, 73 resistant (R) and 52
159 susceptible (S) plants were found, adjusting the Mendelian ratio of 9R: 7S ($\chi^2 = 0.234$,
160 *pvalue* = 0.62). The results indicate a good fit to the segregation model of two dominant
161 genes with complementary epistatic effects. However, in ripe fruits a different character
162 configuration was visualized with 114 (R) and 12 (S), adjusting the segregation to 9: 3:
163 3: 1, or 15:1 (R:S) ($\chi^2 = 2.30$, *pvalue* = 0.12). These results are characteristic of the
164 segregation model of two independent genes. The inheritance of anthracnose resistance
165 has been extensively studied and the genetic control reported is highly variable,
166 depending on different factors such as *Colletotrichum* isolates, source of resistance, fruit
167 developmental stage and even inoculation method. For example, the resistance response
168 in unripe fruits of *C. chinense* (PBC932 strain) to *C. acutatum* was controlled by two
169 dominant genes, and in ripe fruits by two recessive genes (Lin, Gniffke, and Wang

170 2007). However, resistance to *C. capsici* was conferred by a recessive gene (Mahasuk et
171 al. 2009a). Nevertheless, for *C. annuum* resistance was found to *C. acutatum* triggered
172 either by a single recessive gene (Kim et al. 2007; Kim et al. 2008; Mahasuk et al.
173 2009b), as even by polygenes (Lee et al. 2010).

174 Some studies with other *Colletotrichum* species agree with the present data. For
175 example, Kim et al. (1999) also evaluated different responses to *Colletotrichum*, in this
176 case *C. gloeosporioides*, in unripe and ripe fruits of *C. annuum* and found a differential
177 reaction of the isolates at different fruit development stages. The involvement of distinct
178 inheritance responsible for resistance in unripe and ripe stages suggests that changes in
179 fruit maturity may trigger and activate different genes to be expressed when in contact
180 with the pathogen (Mahasuk et al. 2009a). It is known, for example, that the esterase
181 gene (PepEST) is highly expressed in ripe pepper fruits and may be involved in
182 resistance to *Colletotrichum* by inhibiting the appressory formation in fungi (Kim et al.
183 2001, Mahasuk et al. 2009). In addition, other compounds are also related to the
184 resistance in ripe fruits, such as capsidiol and some phenolic compounds. Capsidiol
185 especially, is considered the main phytoalexin accumulated in ripe peppers fruits
186 infected with *Colletotrichum* spp. where the production of this terpene occurs
187 substantially around the site of infection (Park et al. 2014; Lee et al. 2017).

188 The AUDPC values were used to calculate the genetic parameters, both based on
189 the variances (Table 3) and on the means (Table 4). The coefficient of environmental
190 variation was lower than that of genetic variation, indicating that the genetic effects act
191 in greater proportion in the expression of the resistance. The dominance variance was
192 32.02 in unripe fruits and 16.52 in ripe fruits and the broad-sense heritability was 51.96
193 and 54.24%, respectively (Table 3). The values of heritability are considered
194 intermediate and may have influenced the environment to which the experiment was

195 submitted. The heritability estimate is based on the measure of the phenotypic variation
196 that is attributed to genetic causes, that is, it reflects the part of the inherited phenotypic
197 variation (Falconer 1987). Thus, the characteristics that presented high heritability
198 coefficients suffer little influence from the environment, i.e., the phenotype is a safe
199 indication of the genetic value of the individuals. Similar heritability values have been
200 described for the resistance of *C. annuum* to anthracnose. Syukur et al. (2013) tested
201 resistance to *C. acutatum* and found a heritability of 47.5%. With the mathematical
202 model applied, it was not possible to estimate the additive variance and consequently
203 the heritability in the restricted sense. Therefore, it is possible to say that for the
204 inheritance of resistance to *C. scovillei* the predominance was of dominance variance. It
205 is important to emphasize that this information is valid for the environmental conditions
206 that the study was submitted, as well as for the pathogen and source of resistance used.

207 The average degree of dominance (ADD), shows the occurrence of partial
208 dominance in unripe fruits (0.63), and complete dominance in ripe fruits (0.99) (Table
209 2). These data indicate the predominance of non-additive effects on the control of the
210 expressed character and dominance of the alleles that confer resistance over the alleles
211 that confer susceptibility. It was not possible to estimate the number of genes acting on
212 the resistance in any of the development stages, through the variances method. As a
213 result, the maximum likelihood method was used to identify the presence of major
214 effect genes and/or polygenes.

215 The mean generation analyses were used to test the complete model and the
216 additive-dominant model (Table 3). In the complete model, it was verified that the
217 dominance effect has the greatest contribution to the character, both in unripe and ripe
218 fruits, still suffering from epistatic effects of the dominant-dominant interaction. In the
219 additive-dominant model, a greater contribution of dominance effects was also

220 observed, accounting for 42% of the variation in unripe fruits and 14% in ripe fruits
221 (Table 2). Through the coefficient of determination (R^2) gene effects on resistance to *C.*
222 *scovillei* were confirmed as dominance. The values found were 85 and 92% in unripe
223 and ripe fruits (Table 2), respectively, confirming that this simpler model is sufficient to
224 explain the characteristic under study. Several studies related to resistance to diseases
225 have reported the efficiency of the additive-dominant model to explain the inheritance
226 of characters. The resistance of *C. baccatum* to *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV)
227 can also be explained by the additive-dominant model, but with the greater participation
228 of the additive effects in the expression of the character (Bento et al. 2013). In contrast
229 to this study, studies with other species of the Solanaceae family have also
230 demonstrated that resistance to some diseases is highly influenced by additive effects
231 (Chen et al. 2016; Singh et al. 2015).

232 The results shown here, such as the superiority of the dominance and heritability
233 effect, indicate that the transfer of anthracnose resistance in *C. annuum* and the
234 development of resistant cultivars is a possible but labor-intensive task, since the
235 development of large progenies in plants is needed for selection of resistant plants. An
236 alternative to this issue is the study of genes that confer resistance, in order to
237 understand the number of associated loci, and if they have larger or smaller effects in
238 addition to if there is an interaction of polygenes. Moreover, we can map them to know
239 the physical location and interactions about which compounds are being expressed and
240 even the development of markers associated with the characteristic (Yoon et al. 2009).

241 The presence of major effect genes and of polygenes, as well as their additive or
242 dominant effects were estimated by the maximum likelihood method proposed by Silva
243 (2003) (Table 4). Thus, assuming the present environmental variation, the best model to
244 explain the resistance to *C. scovillei* in unripe and ripe fruits is that the inheritance is

245 controlled by a major effect gene and polygenes both with additive and dominance
246 effects.

247 The study of inheritance by the maximum likelihood method was effective in
248 determining the control of the characteristic. This analysis has been applied effectively
249 in inheritance studies not only of resistance factors, but also of agronomic
250 characteristics of chilli and sweet peppers, such as fruit morphology and yield (Bento et
251 al. 2016). The method was also effective when applied to other crops as an inheritance
252 of resistance to *Colletotrichum* spp. in cotton (Oliveira et al. 2016) and inheritance of
253 acyl-sugars synthesis in tomato (Gonçalves et al. 2007).

254 Based on all the analyzed aspects, it is possible to establish that the inheritance
255 of resistance to *C. scovillei* in *C. annuum* is expressed independently in the different
256 fruit development stages. In both cases, two main genes responsible for resistance,
257 possibly different and with associated polygene effects, were found. Genetic control,
258 with quantitative aspect, has its greatest effect expressed in partial dominance in unripe
259 fruits and total in ripe fruits. Little is known about the interactions of *C. scovillei* and
260 *Capsicum* fruits. In addition, the first report of this *Colletotrichum* species in Brazil was
261 in 2014, so there are highly necessities of research on this subject. Therefore, these
262 results are important to support this kind of research, especially in neotropical peppers
263 where there is an excessive incidence of losses of yield, and no resistant cultivar
264 developed until the present moment.

Literature cited

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, Academic Press, 5^a Ed., 635p.

Ali, A., Bordoh, P. K., Singh, A., Siddiqui, Y., and Droby, S. 2016. Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. Crop Prot 90:132-141.

AVRDC 1999. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Talnan Taiwan, vii + 152 p.

Babu, B. S., Pandravada, S. R., Prasada Rao, R. D. V. J., Anitha, K., Chakrabarty, S. K., and Varaprasad, K. S. 2011. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. Crop Prot 30:389-400.

Bento, C. S., Rodrigues, R., Gonçalves, L. S. A., Oliveira, H. S., Santos, M. H., Pontes, M. C., and Sudré, C. P. 2013. Inheritance of resistance to Pepper yellow mosaic vírus in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Genet Mol Res 12: 1074-1082.

Bento, C. S. Rodrigues, R. Sudré, C. P. Medeiros, A. M. Mathias, V. A. S., and Gonçalves, L. S. A. 2016. Determining the inheritance of agronomic traits in chili pepper. Horti Bras 34: 367-373.

Campbell CL, Madden LV. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: John Wiley & Sons.

Chen, L., Guo, X., Wang, H. et al. 2016. Plant Cell Tiss Organ Cult 127: 315.

Cruz, C. D. 2013. GENES - Software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. Acta Sci. - Agron 35:271-276.

Cruz CD, Regazzi AJ & Carneiro PCS. 2004. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, UFV. 480p.

Cruz, C. D. and Regazzi A. J. 1997. Biometric models applied to genetic improvement. 2^a Ed. Viçosa. Editora da UFV.

Damm,U. Cannon, PF. Woudenberg JCH. Crous, PW. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex, Studies in Mycology, 73, pp. 37-113.

Di Dato, F., Parisi, M., Cardi, T., and Tripodi, P. 2015. Genetic diversity and assessment of markers linked to resistance and pungency genes in *Capsicum* germplasm. Euphytica. 204:103-119.

Falconer, D. S. Introduction to quantitative genetics. 1987. Viçosa, MG: UFV. 279 p.

- Gonçalves, L. D., Maluf, W. R., Cardoso, M. D. G., Gomes, L. A. A., and Nascimento, I. R. D. 2007. Inheritance of tomato leaflet acylsugar contents in genotypes derived from an interspecific cross. *Pesq Agropec Bras* 42:699-705.
- Harp, T. L., Pernezny, K., Ivey, M. L. L., Miller, S. A., Kuhn, P. J. and Datnoff, L. 2008. The etiology of recent pepper anthracnose outbreaks in Florida. *Crop Prot.* 27:1380-1384.
- Kanchana-Udomkan C, Taylor PWJ, Mongkolporn O. 2004. Development of a bioassay to study anthracnose infection of chili fruit caused by *Colletotrichum capsici*. *Thai J Agric Sci.*; 37(4): 293–297.
- Kim, K. D., Oh, B.J., and Yang, J. 1999. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolates with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica.* 27: 97-106.
- Kim, Y. S., H. H. Lee, M. K. Ko, C. E. Song, C.-Y. Bae, Y. H. Lee, and B.-J. Oh. 2001. Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (*Capsicum annuum*) esterase. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 80-85.
- Kim, S. H., Yoon, J. B., Do, J. W., and Park, H. G. 2007. Resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in Chili Pepper (*Capsicum annuum*). *J Crop Sci Biotechnol* 10: 277-280.
- Kim, S. H., Yoon, J. B., Do, J. W., and Park, H. G. 2008. A major recessive gene associated with anthracnose resistance to *Colletotrichum capsici* in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Breed Sci* 58:137-141.
- Lee, J., Hong, J.H., Do, J.W., and Yoon, J.B., 2010. Identification of QTLs for resistance to anthracnose to two *Colletotrichum* species in pepper. *J Crop Sci Biotechnol* 13:227-233.
- Lee, H.A., Kim, S., Kim, S., and Choi, D. 2017. Expansion of sesquiterpene biosynthetic gene clusters in pepper confers nonhost resistance to the Irish potato famine pathogen. *New Phytologist* 215:1132-1143.
- Lin, S. W., Gniffke, P. A., and Wang, T. C. 2007. Inheritance of resistance to pepper anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Acta Horti* 760:329-334.
- Mahasuk, P., Khumpeng, N., Wasee, S., Taylor, P. W. J., and Mongkolporn, O. 2009a. Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) at seedling and fruiting stages in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Breed* 128:701-706.
- Mahasuk, P., Taylor, P.W.J. and Mongkolporn, O. 2009b. Identification of Two New Genes Conferring Resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Capsicum baccatum*. *Phytopathology* 99:1100-1104.
- Mahasuk, P., Struss, D., and Mongkolporn, O. 2016. QTLs for resistance to anthracnose identified in two *Capsicum* sources. *Mol Breed* 36:1-10.

- Mongkolporn, O., Montri, P., Supakaew, T.T., and Taylor, P.W.J., 2010. Differential reactions on mature green and ripe chili fruit infected by three *Colletotrichum* species. *Plant Dis.* 94:306-310.
- Mongkolporn, O. and Taylor, P. W. 2018. Chili anthracnose: *Colletotrichum* taxonomy and pathogenicity. *Plant Pathol* 67:1255-1263.
- Montri, P., Taylor, P. W. J., and Mongkolporn, O. 2009. Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the Causal Agent of Chili Anthracnose, in Thailand. *Plant Dis* 93:17-20.
- Nirenberg, H. I., Feiler, U. and Hagedorn, G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. Nov. in modern terms. *Mycologia* 94:307-320.
- Oliveira, M. A. C., Duarte, J. B. Morello, C. L., Suassuma, V. D., and Oliveira, A. B. 2016. Mixed inheritance in the genetic control of ramulosis (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) resistance in cotton. *Genet Mol Res* 15:1-6.
- Pakdeevaporn, P., Wasee, S., Taylor, P. W. J., and Mongkolporn, O. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. *Plant Breed* 124:206-208.
- Park, S., Jeong, W. Y., Lee, J. H., Kim, Y. H., Jeong, S. W., Kim, G. S., et al. 2012. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 130:981-985.
- Park, S., Park, A. R., Im, S., Han, Y. J., Lee, S., Back, K., and Kim, Y. S. 2014. Developmentally regulated sesquiterpene production confers resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* in ripe pepper fruits. *Plos One* 9:e109453.
- Pereira, M. J., Massola Junior, N. S., Sussel, A. A., Sala, F. C., Costa, C. P. da, and Boiteux, L. S. 2011. Reação de acessos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*. *Hortic. Bras* 29:569-576
- Prusky, D. 2011. Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects. *Food Secur* 3:463-474.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Royle, D.J., Butler, D.R., 1986. Epidemiological Significance of Liquid Water in Crop Canopies and its Role in Disease Forecasting. *In: Ayres, P.G., Boddy, L. (Eds.), Water, Fungi and Plants.* Cambridge University Press, Cambridge, p.139-156.
- Saxena, A., Raghuwanshi, R., Gupta, V. K., and Singh, H. B. 2016. Chilli anthracnose: The epidemiology and management. *Front Microbiol* 7:1-18.
- Saxena, A., Raghuwanshi, R., and Singh, H. B. 2014. Molecular, phenotypic and pathogenic variability in *Colletotrichum* isolates of subtropical region in north-eastern India, causing fruit rot of chillies. *J. Appl. Microbiol* 117:1422-1434.

- Sharma, P. N., Kaur, M., Sharma, O. P., Sharma, P., and Pathania, A. 2005. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici*, the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of north-western India. *J. Phytopathol* 153:232–237.
- Silva, S. A. M., Rodrigues, R., Gonçalves, L. S. A., Sudré, C. P., Bento, C. S., Carmo, M. G. F., et al. 2014. Resistance in *Capsicum* spp. to anthracnose affected by different stages of fruit development during pre- and post-harvest. *Trop Plant Pathol* 39:335-341.
- Silva, W.P. 2003. Estimadores de máxima verossimilhança em misturas de densidades normais: uma aplicação em genética. Lavras: UFLA. 60p (Dissertação mestrado).
- Singh, R. K. Rai, N. Singh, M. Saha, S., and Singh, S. N. 2015. Detection of tomato leaf curl virus resistance and inheritance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J Agri Sci* 153:78–89.
- Sun, C. Y., Mao, S. L., Zhang, Z. H., Palloix, A., Wang, L. H., and Zhang, B. X. 2015. Resistances to anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) of *Capsicum* mature green and ripe fruit are controlled by a major dominant cluster of QTLs on chromosome P5. *Sci Hortic* 181:81–88.
- Syukur, M., Sujiprihati, S., Koswara, J., and Widodo. 2013. Genetic analysis for resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) using diallel crosses. *SABRAO J Breed Genet* 45:400-408.
- Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., and Taylor, P. W. J. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathol* 57:562-572.
- Welbaum, G.E. 2015. Family Solanaceae in Vegetable Production and Practices. CAB International Publisher, p.486.
- Yoon, B. J., Do, W. J., Kim, H. S., and Park, G. H. 2009. Inheritance of Anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) Resistance in *Capsicum* Using Interspecific Hybridization. *Kor. J Hor. Sci Technol* 27:140-144

Table 1: Phenotypic segregation of resistance and susceptibility to *Colletotrichum scovillei* in the P1, P2, F1 and F2 generations and chi-square test (χ^2) for segregation in the two stages of fruit development.

Fruit development stages	Chili population	Observed Frequency		Expected segregation R:S	χ^2	P-value
		R	S			
Unripe fruits	P ₁	14	0			
	P ₂	0	14			
	F ₁	11	3			
	F ₂	73	52	9:7	0.234	0.62*
Ripe fruits	P ₁	18	0			
	P ₂	0	6			
	F ₁	11	1			
	F ₂	114	12	15:1	2.30	0.12*

$\div 2$ tab to 1GL. *Significant at 5% probability

Table 2: Genetic parameters of the F₂ population obtained from the AUDPC in unripe and ripe *Capsicum annuum* fruits inoculated with *Colletotrichum scovillei*.

Parameter	Estimate	
	Unripe fruits	Ripe fruits
Phenotypic variance	10.18	2.53
Environmental variance (F ₂)	4.88	1.16
Genotypic variance	5.29	1.37
Additive variance	-	-
Variance dominance	32.02	16.52
Broad heritability (%)	51.96	54.24
Heritability restricted h ² (%)	-	-
Average degree of dominance (averages)	0.63	0.99
Maximum value in F ₂	20.7	14.16
Minimum value in F ₂	7.0	7.0
Number of genes (based on variances)	-	-

Table 3: Estimation of genetic effects and significance test of the hypothesis of nullity of genetic parameters (t) in the complete model of unripe and ripe *Capsicum annuum* fruits inoculated with *Colletotrichum scovillei*.

Effect	Estimate		Variance		t	
	Unripe	Ripe	Unripe	Ripe	Unripe	Ripe
m	1.86	7.81	14.69	7.07	0.48	2.93
a	-6.68	-10.31	0.09	0.13	-21.30	-27.94
d	28.04	1.62	126.32	62.13	2.49	0.20
aa	13.01	9.96	14.60	6.94	3.40	3.78
ad	9.11	9.90	13.69	7.16	2.46	3.70
dd	-19.26	-1.64	57.05	27.53	-2.55	-0.31
R ²			1	1		
m	14.52	12.99	0.087	0.063	49.08	
a	-6.39	-5.78	0.093	0.071	-20.93	
d	-5.42	-6.65	0.42	0.14	-8.29	
R ²			0.8	0.92		

Table 4: Hypothesis tests for the hierarchical genetic models of the genetic inheritance of *Colletotrichum scovillei* in unripe and ripe *Capsicum annuum* fruits.

Models	GL	X ²	
		Unripe fruits	Ripe fruits
1 vs 2	3	26.33*	47.60*
1 vs 3	1	16.48*	68.83*
1 vs 4	4	51.21*	175.47*
1 vs 5	2	16.48*	68.83*
1 vs 6	5	51.21*	175.48*
1 vs 7	5	31.84*	65.41*
1 vs 8	6	69.14*	225.84*
1 vs 9	7	117.23*	252.24*
2 vs 4	1	24.88*	127.86*
2 vs 6	2	24.88*	127.86*
2 vs 7	2	5.51 ns	17.80*
2 vs 8	3	42.81*	178.24*
2 vs 9	4	90.90*	204.64*
3 vs 5	1	0.99 ns	0.00 ns
3 vs 6	4	34.72*	106.64*
3 vs 8	5	52.65*	157.01*
3 vs 9	6	100.74*	183.41*
4 vs 6	(a)	(a)	(a)
4 vs 8	2	17.92*	50.37*
4 vs 9	3	66.01*	76.77*
5 vs 6	3	34.72*	106.64*
5 vs 9	5	100.74*	183.41*
6 vs 9	2	66.01*	76.77*
7 vs 8	1	37.29*	160.43*
7 vs 9	2	85.38*	186.83*
8 vs 9	1	26.33*	47.60*

*; ns - Significant and not significant at 0.1% probability by the t-test

(a) - Negative value due to convergence problems.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação de dados de caracterização morfo-cultural aliados aos dados de sequenciamento de regiões multilocus e aplicação de marcadores moleculares AFLP revelou que os 11 isolados de *Colletotrichum* spp. coletados no estado do Rio de Janeiro são da espécie *C. scovillei*. Além disso foi possível visualizar a variabilidade genética entre estes isolados. A correta identificação dos patógenos e da diversidade entre eles é um ponto crucial para conhecimento e desenvolvimento de estratégias de controle das doenças fúngicas que atacam as pimentas e pimentões e causam efetivos danos a produção e comércio.

Para o melhor entendimento da relação de *Capsicum* com a antracnose causada por *C. scovillei* e também na busca de fontes de resistência a esta doença, infectamos frutos da espécie *C. baccatum* com um isolado previamente selecionado pela elevada agressividade. Foram observadas respostas distintas estágio-específica, sugerindo que o estágio de desenvolvimento do fruto influencia nas respostas contra o ataque do fungo. Frutos maduros de *Capsicum* spp. em geral apresentaram maior resistência à antracnose em relação aos frutos imaturos. Adicionalmente encontramos quatro fontes de resistência a *C. scovillei* (GB-113, GB-118, GB-208 e GB-215) que podem ser usadas futuramente para outros estudos envolvendo a expressão de genes que atuam na resistência e também como parentais em programas de melhoramento da espécie.

Na busca da maior compreensão da relação *Colletotrichum/Capsicum* desenvolvemos simultaneamente um trabalho de análise da herança da resistência, para compreender o número de genes que atuam contra a infecção de *C. scovillei*. Para tanto testamos a doença em uma população F₂ de *C. annuum* em dois estádios de maturação de frutos. Neste trabalho também verificamos que há herança e expressão diferencial de genes em relação a maturação de frutos. Porém, em ambos os estádios encontramos a atuação de duas forças principais, possivelmente genes de efeito maior associado a expressão de poligenes de efeito menor.

Os resultados obtidos são importantes informações na compreensão da base genética por trás da resistência a doenças, além de auxiliarem na identificação e caracterização de fitopatógenos. Especialmente em *Capsicum* spp. em que as perdas por antracnose são altamente significativas, estudar e compreender estas relações é fundamental para desenvolver estratégias efetivas de controle e desenvolver cultivares resistentes, adaptadas ao locais de ocorrência e que associem além da resistência, outras características de interesse agrônomo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADURAMIGBA-MODUPE, A. O.; ASIEDU, R.; ODEBODE, A. C; and OWOLADE, O. F. Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* in Nigeria using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 33, p. 8189-8195, 24. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> DOI: 10.5897/AJB11.230,. 2012.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, Academic Press, 5ª Ed., 635p., 2005.

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

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

BABU, B. S.; PANDRAVADA, S. R.; RAO, R. P; ANITHA, K.; CHAKRABARTY, S. K.; VARAPRASAD, K. S. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. **Crop Protection**, v. 30, n. 4, p. 389-400, 2011.

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Genetic diversity of a *Capsicum* germplasm collection from Nepal as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 127, n. 3, p. 318-324, 2002.

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): A multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, n. 6, p. 826-832, 2004.

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

BIANCHETTI, L.; CARVALHO, S. I. C. Subsídios à coleta de germoplasma de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceae). In: WALTER B.M.T.; CAVALCANTI T. B. (Ed). **Fundamentos para coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 355-385, 2005.

BOSLAND, P. W.; VOLTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice *Capsicums***. Wallingford: CABI Publishing, 1999. p. 204.

BUSO, G. S. C.; AMARAL, Z. P. S.; BIANCHETTI, L. B.; MACHADO, F. R.; FERREIRA, M. E. 2003. Genetic variability and phylogenetic analysis of Brazilian species of *Capsicum*. **Capsicum Eggplant Newsl**, v. 22, p. 13-16. 2003.

CAI, L.; GIRAUD, T.; ZHANG, N.; BEGEROW, D.; CAI, G.; SHIVAS, R. G. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, v.50, p.121-133, 2011.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS,

R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

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

CARDOSO, R.; RUAS, C. F.; GIACOMIN, R. M.; RUAS, P.M.; RUAS, E.A.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L. S. A. Genetic variability in Brazilian *Capsicum baccatum* germplasm collection assessed by morphological fruit traits and AFLP markers. **PLoS one**, v. 13, n. 5, p. e0196468, 2018.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas do Gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, Embrapa Hortaliças. 27p, 2006.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B.; HILLMAN, B. – What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematic and species diagnosis? A case study using the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, v. 101, n. 5, p. 648-656, 2009.

DAMM, U.; ARONCELLI, R.; CAI, L.; KUBO, Y.; O'CONNELL, R.; WEIR, YOSHINO, K.; CANNON, P. F. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. **IMA Fungus: The Global Mycological**, v. 1, n. 2, p. 161-165, 2010.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45, 2009.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. In: Damm, U., Cannon, P. F., Crous, P. W.(ed.) *Colletotrichum*: complex species or species complex? **Studies in Micology**, v.73, n.1 p. 36, 2012.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS ZA ET AL. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, p.414–30, 2012.

DIAS, G. B.; GOMES, V. M.; MORAES, T. M.; ZOTTICH, U. P.; RABELO, G. R.; CARVALHO, A. O.; ... & DA CUNHA, M. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6488-6501, 2013.

DI DATO, F., PARISI, M., CARDI, T., AND TRIPODI, P. Genetic diversity and assessment of markers linked to resistance and pungency genes in *Capsicum* germplasm. **Euphytica**, v. 204, n. 1, p. 103-119, 2015.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics: FAOSTAT Domains/Production/Crops**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acessado em: 28 de agosto de 2018.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**, Viçosa: UFV, 402 p., 2000.

- FREEMAN S, M. D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, v. 90, n. 6, p. 608–614, 2000.
- FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.
- GAZIS, R.; REHNER, S.; CHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular ecology**, v. 20, n. 14, p. 3001-3013, 2011.
- GIRAUD, T.; REFRÉGIER, G.; LE GAC, M.; DE VIENNE, D. M.; HOOD, M. E. Speciation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 6, p. 791-802, 2008.
- HARP, T. L. *ET AL.* The etiology of recent pepper anthracnose outbreaks in Florida. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1380-1384, 2008.
- HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; LUNA-REYES, R.; OYAMA, K. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 226, p. 129- 142, 2001.
- HILL, T. A.; ASHRAFI, H.; WO, R. C. S.; YAO, J.; STOFFEL, K.; TRUCO, J.M.; KOZIK, A.; MICHELMORE, R.W.; DEYNZE, A.V. Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30k unigene pepper genechip. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56200, 2013.
- KIM S. H.; YOON J. B.; DO J. W.; PARK H. G. Resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Crop Science Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 277-280, 2007.
- KIM, S.; PARK, M.; YEOM, S. I.; KIM, Y. M.; LEE, J. M.; LEE, H. A.; SEO, E.; CHOI, J.; CHEONG, K.; KIM, K. T.;... & CHOI, D. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species, **Nature genetics**, v. 46, n. 3, p. 270, 2014.
- LANNES, S. D. **Diversidade em *Capsicum chinense*: Análise química, morfológica e molecular.** 2005. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- LANTERI, S.; ACQUADRO, A.; QUAGLIOTTI, L.; PORTIS, E. RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in north-west Italy. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 7, p. 723-735. 2003.
- MAHASUK, P.; CHINTHAISONG, J.; MONGKOLPORN, O. Differential resistances to anthracnose in *Capsicum baccatum* as responding to two *Colletotrichum* pathotypes and inoculation methods. **Breeding science**, v. 63, n. 3, p. 333-338, 2013.
- MAHASUK, P.; KHUMPENG, N.; WASEE, S.; TAYLOR, P.W.J.; MONGKOLPORN, O. Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) at seedling and fruiting stages in chili pepper (*Capsicum* spp.). **Plant Breeding**, v. 128, n. 6, p. 701-706, 2009a.

MAHASUK, P.; TAYLOR, P.W.J.; MONGKOLPORN, O. Identification of Two New Genes Conferring Resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Capsicum baccatum*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1100-1104, 2009b.

MAHASUK, P.; STRUSS, D.; AND MONGKOLPORN, O. QTLs for resistance to anthracnose identified in two *Capsicum* sources. **Molecular breeding**, v. 36, n. 1, p. 10, 2016.

MARIN-FELIX Y, GROENEWALD JZ, CAI L ET AL. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in mycology**, v. 86, p. 99-216, 2017.

MARTINS, K. C.; PEREIRA, T. N. S.; SOUZA, S. A. M.; COSTA, F. R. Meiose viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1746-1751. 2010.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1750-1756. 2005.

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, v. 124, n. 2, p. 193-213, 1993.

MILACH, S. C. K. Principais Tipos de Marcadores Moleculares e suas Características. In MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre. UFRGS, p 17-28, 1998.

MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P. W. J. Chili anthracnose: *Colletotrichum* taxonomy and pathogenicity. **Plant Pathology**, 2018. DOI: 10.1111/ppa.12850

MONTRI, P.; TAYLOR, P. W. J.; MONGKOLPORN, O. Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the Causal Agent of Chili Anthracnose, in Thailand. **Plant Disease**, v. 93, n. 1, p. 17-20, 2009.

MOREIRA, G. R.; CALIMAN, F. R. B.; SILVA, D. J. H.; RIBEIRO, C. S. C. **Espécies e variedades de pimenta. Informe Agropecuário**. v. 27, n. 235, p. 16- 29, 2006.

MOSCONE, E.A.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A. T. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. **Annals of Botany**, v. 92, p. 21-29, 2003.

NIRENBERG, H. I.; FEILER, U.; HAGEDORN, G. Description of *Colletotrichum lupini* comb. Nov. in modern terms. **Mycologia**, v. 94, n. 2, p. 307-320, 2002.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TEWKS BURY, J. J.; REAGAN, K. M.; MACHNICKI, N. J.; CARLO, T. A.; HAAK, D. C.; PENALOZA, A. L. C.; LEVEY, D. J. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11808-11811, 2008.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060, 2012.

PAKDEEVARAPORN, P.; WASEE, S.; TAYLOR, P. W. J.; MONGKOLPORN, O. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. **Plant Breeding**, v. 124, n. 2, p. 206-208, 2005.

PARK, H. G. **Problems of anthracnose in pepper and prospects for its management**, in Abstracts of the First International Symposium on Chilli Anthracnose.2007

PEREIRA, M. J. Z.; MASSOLA Júnior, N. S.; SUSSEL, A. A. B.; SALA, F. C.; COSTA, C. P.; BOITEUX, L. S. Reação de acessos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 569-576, 2011.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J; GREEN, J. R. *Colletotrichum* - a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999.

PICKERSGILL, B. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: TSUCHIYA, T.; GUPTA P. K. **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**, part B. Elsevier, Amsterdam, p. 139-160, 1991.

PINHEIRO, J. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; PEREIRA, R. B.; MOITA, A. W. Reação de genótipos de *Capsicum* ao nematoide-das-galhas. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 371-375, 2014.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 89-109, 2009.

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

PRUSKY, D. Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects. **Food Security**, v. 3, n. 4, p. 463-474, 2011.

QIN, C.; YU, C.; SHEN, Y.; FANG, X.; CHEN, L.; MIN, J.; ... & YANG, Y. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5135-5140, 2014.

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

ROBERTS, P. D.; PERNEZNY, K.; KUCHAREK, T. A. **Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. on pepper**. University of Florida/Institute of Food and Agricultural Sciences, 2011.

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

RODRIGUES, R.; COSTA, F. R. Marcadores moleculares em pimenteira. In: RÊGO, E. R., FINGER, F. L., & Rêgo, M. M. **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.)**. Recife: Imprima, p. 137-164, 2011.

SARATH BABU, B.; PANDRAVADA, S. R.; PRASADA RAO.; R. D. V. J.; ANITHA, K.; CHAKRABARTY, S. K.; AND VARAPRASAD, K. S. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. **Crop Protection**, v. 30, n. 4, p. 389-400, 2011.

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI, R.; AND SINGH, H. B. Molecular, phenotypic and pathogenic variability in *Colletotrichum* isolates of subtropical region in north-eastern India, causing fruit rot of chillies. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, p. 1422-1434, 2014.

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI, R.; GUPTA, V. K.; AND SINGH, H. B. Chilli anthracnose: The epidemiology and management. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p. 1527, 2016.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: Um guia prático**. Ed. Holos, Belém, 200p, 2007.

SHARMA, G.; KUMAR, N.; WEIR, B. S.; HYDE, K. D.; SHENOY, B. D. Apmat gene marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 117-138, 2013a.

SHARMA, G.; PINNAKA, A. K.; SHENOY, B. D. ITS-based diversity of *Colletotrichum* from India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 3, n. 2, p. 194-220, 2013b.

SHARMA, G.; PINNAKA, A. K.; SHENOY, B. D.; Resolving the *Colletotrichum* siamense species complex using ApMat marker. **Fungal Diversity**, v. 71, n. 1, p. 247-264, 2015.

SHARMA, P. N.; KAUR, M.; SHARMA, O. P.; SHARMA, P.; AND PATHANIA, A. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici*, the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of north-western India **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 4, p. 232-237, 2005.

SHIVAS, R .G., and TAN, Y. P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 111, p. 122, 2009.

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

SREENIVASAPRASAD, S.; MEEHAN, B. M.; MILLS, P. R.; BROWN, A. E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, v. 39, n. 3, p. 499-512, 1996.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL-JUNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de Pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p.22-27, 2005.

SUDRÉ, C. P.; GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; RIVA-SOUZA, E. M.; DOS S. BENTO, C. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and molecular research**, v. 9, n. 1, p. 283-294, 2010.

SUN, T.; XU, Z.; WU, C. T.; JANES, M.; PRINYAWIWATKUL, W.; NO, H. K. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 98-102. 2007.

SUTTON, B. C. **The genus *Glomerella* and its anamorph**. In: Bailey JA & Jeger MJ (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England, CAB International Wallingford. 388p, 1992.

SUTTON, BC. - The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, **Kew, London**. 1980.

TALHINHA, S. P. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum* sp. Causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 1, p. 77-79. 2002.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal genetics and biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000.

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

THAN, P. P.; PRIHASTUTI, H.; PHOULIVONG, S.; TAYLOR, P. W. J.; HYDE, K. D. Chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 764, 2008b.

TOQUICA, S. P.; RODRIGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J. Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon department in Colombia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 6, p. 639-647, 2003.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network (GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. DOI: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/explist.pl>. Acessado em 28 de agosto 2018.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIGTRS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Reserach**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414. 1995.

VOTAVA, E. J.; BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. **Economic Botany**, v. 59, n. 1, p. 8-17. 2005.

WELBAUM, G.E. **Family Solanaceae in Vegetable Production and Practices**. CAB International Publisher, p.486. 2015.

WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal, **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

YOON, J.B.; PARK, H.G. Trispecies bridge crosses, (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) × *C. baccatum*, as an alternative for introgression of anthracnose resistance from *C. baccatum* into *C. annuum*. **Horticulture environment and biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 5-9, 2005.