

Wirla Gonçalves dos Santos

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. QUE INFECTAM PIMENTÕES  
NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS**

DOCUMENTO RECEBIDO  
Data: 03/08/2012  
W. Santos Brancu



UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
RIO LARGO – ESTADO DE ALAGOAS  
2010**



CECA

**Wirla Gonçalves dos Santos**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. QUE INFECTAM PIMENTÕES  
NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Agronomia, na área de concentração de Produção Vegetal e Proteção de Plantas, pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientação:

Profª Dra. Iraíldes Pereira Assunção  
Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

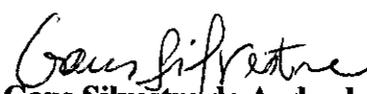
**RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL  
AGOSTO DE 2010**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. QUE INFECTAM PIMENTÕES  
NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS**

**WIRLA GONÇALVES DOS SANTOS**  
Matrícula 2008M21D24S-4

Trabalho de Conclusão de Curso de Mestrado em Agronomia, na área de concentração de Produção Vegetal e Proteção de Plantas, foi aprovado, como requisito parcial na integralização dos créditos para obtenção do grau de mestre em Proteção de Plantas, na Universidade Federal de Alagoas, pela Banca Examinadora formada pelos seguintes doutores:

  
**Profa. Dra. Iraíldes Pereira Assunção**  
Orientadora  
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade  
Centro de Ciências Agrárias - UFAL

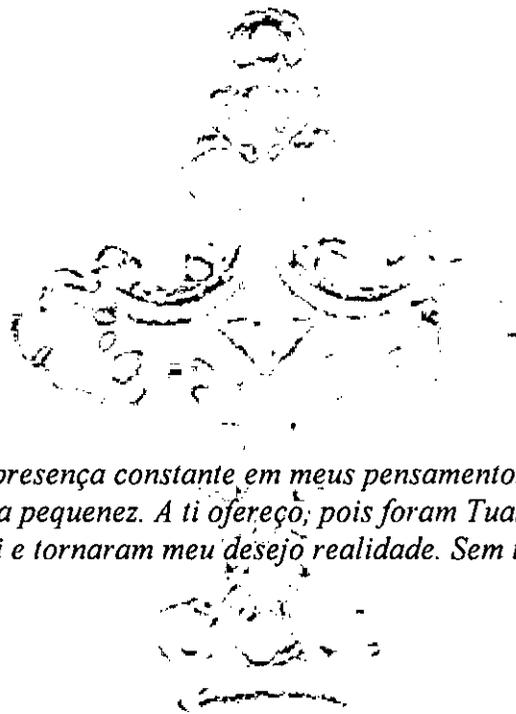
  
**Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima**  
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade  
Centro de Ciências Agrárias - UFAL

**Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano**  
Co-Orientador  
Departamento de Química e Biotecnologia  
Instituto de Química e Biotecnologia - UFAL

  
**Profa. Dra. Maria de Fátima Silva Muniz**  
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade  
Centro de Ciências Agrárias - UFAL

Rio Largo, Estado de Alagoas, Brasil  
13 de agosto de 2010.

## **Ofereço**



### **A Deus**

*Senhor da minha vida, presença constante em meus pensamentos, força na minha fraqueza, gigante diante da minha pequenez. A ti ofereço, pois foram Tuas mãos que me conduziram até aqui e tornaram meu desejo realidade. Sem ti nada sou.*

*"O senhor firma os passos do homem bom, e no seu caminho se compraz, se cair, não ficará prostrado, porque o Senhor o segura pela mão".*

Salmo 37 v. 23, 24

## ***Dedico***

*Aos meus pais*

*O que sou hoje devo a eles! Por tudo que me ensinaram, pelos valores que me inculcaram, pelo apoio, mesmo sem entender bem meus anseios e motivações e por tudo aquilo que não consigo expressar em palavras.*

*À minha família e aos meus amigos para com os quais fui tão ausente fisicamente no período do mestrado, mas que estiveram sempre presentes em meus pensamentos, por serem parte tão importante da minha existência.*

## *Agradecimentos*

*À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), pela bolsa de estudos concedida junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFAL, na área de concentração de Produção Vegetal e Proteção de Plantas (Processo 2002.08.017-08);*

*Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela oportunidade de fazer o Curso de Mestrado de dentro do sistema público e gratuito de ensino;*

*À Profa. Dra. Iraíldes Pereira Assunção, do Centro de Ciências Agrárias da UFAL, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos e, sobretudo, pela paciência.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano, do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, não só pela orientação neste trabalho, mas por todos os anos em que me acolheu em seu laboratório desde a iniciação científica, pelo encorajamento, pela paciência e pela amizade;*

*Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, do Centro de Ciências Agrárias da UFAL, pela confiança, pela paciência e pelos ensinamentos de fitopatologia a mim transmitidos, um universo tão novo para mim;*

*À química e grande amiga Sandra Maria Quintela Souza de Aguiar, do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, pelo incentivo, pelo encorajamento, pelas longas e divertidas conversas, por tornar tão agradável o convívio no laboratório e principalmente por sua doação ao transmitir seus conhecimentos ao longo de dez anos de convívio (In memoriam);*

*À Júlio César Farias de Andrade, companheiro em dez anos de jornada, desde a graduação até aqui, por tudo. É tarefa quase impossível descrever sua importância neste longo caminho;*

*À Profa. e amiga Maria Aliete Bezerra Lima Machado, por me ceder tão gentilmente suas turmas para realização do meu estágio em docência.*

*À Ricardo Manoel dos Santos Silva, pela alegria, pelo exemplo de paciência, solicitude e integridade demonstrados durante os anos em que compartilhamos o laboratório.*

*Ao inesperado, mas muito bem-vindo amigo Carlos Ivan Aguilar-Vildoso, pela vontade de me fazer aprender algo tão complexo pra mim, pela disponibilização das suas horas de descanso em prol desta tarefa, pela imensa paciência diante do meu tão pouco conhecimento. Se Deus coloca as pessoas certas no momento certo nas nossas vidas, posso dizer que desta vez Ele caprichou!*

*Aos colegas que estão ou passaram pelo laboratório, Deyse Julianne, Lysianne, Rosângela Kênia, por tornarem a convivência no laboratório tão agradável.*

*À Joyce Silva Lima, pelo auxílio na execução do trabalho de laboratório;*

*Ao corpo docente do Curso de Mestrado em Agronomia da Ufal, pela dedicação, amizade e conhecimentos transmitidos nessa jornada;*

*À Geraldo de Lima e Marcos Antônio Lopes, secretários da Coordenação deste Curso, pela paciência, pela acolhida, pela pronta colaboração, pelas conversas amigas.*

*Aos membros da banca, Profa. Dra. Iraíldes Pereira Assunção, Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, Profa. Dra. Maria de Fátima Silva Muniz, Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano, pela leitura crítica do trabalho e pelas sugestões.*

*Aos funcionários da biblioteca central, em especial a Janaina Xisto de Barros Lima, pela catalogação da dissertação.*

*Aos colegas do curso, com os quais caminhei por este árduo e delicioso caminho.*

*A todos os que estão aqui e aos que, por ventura, eu tenha deixado de citar, mas não menos importantes na minha caminhada,*

*Os meus sinceros agradecimentos!*

*“Andei...  
Por caminhos difíceis, eu sei.  
Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr.  
E assim a cada passo que der  
Tentarei fazer o melhor que puder.  
Aprendi...  
Não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo  
O universo ao meu redor e aprendo a me conhecer melhor;  
Assim escutarei o tempo que me ensinará  
A tomar a decisão certa a cada momento.  
E partirei...  
Em busca de muitos ideais,  
Mas sei que hoje se encontram meu passado, presente e futuro.  
Hoje sinto em mim a emoção da despedida.  
Hoje é o ponto de chegada.  
Mas, ao mesmo tempo, tempo de partida”.*

(Autor desconhecido)

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
INTRODUÇÃO .....	01
1. REVISAO DA LITERATURA .....	03
1.1. O gênero <i>Capsicum</i> .....	03
1.2. Antracnose e o gênero <i>Colletotrichum</i> .....	05
1.3. Métodos de Identificação de Espécies de <i>Colletotrichum</i> .....	07
2 METODOLOGIA .....	11
2.1 Obtenção dos isolados.....	11
2.2 Obtenção de culturas monoconidiais de isolados de <i>Colletotrichum</i> .....	11
2.3 Teste de patogenicidade.....	13
2.4 Caracterização molecular.....	14
2.4.1 Extração e padronização da concentração do DNA.....	14
2.4.2 Amplificação do rDNA identificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> .....	15
2.4.3 Sequenciamento da região ITS de isolados de <i>Colletotrichum</i> .....	16
2.4.4 Análise filogenética entre os isolados sequenciados.....	17
3 RESULTADOS .....	18
3.1 Identificação molecular.....	18
3.2 Amplificação da região ITS e sequenciamento.....	22
4 CONCLUSÃO .....	25
REFERÊNCIAS .....	26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Identificação do isolado, gênero, ano de coleta, procedência, sistema de cultivo e cultivar de 46 isolados obtidos de pimentão.....	12
<b>Tabela 2</b> - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar regiões do rDNA dos isolados de <i>Colletotrichum</i> .....	16
<b>Tabela 3</b> - Identificação molecular dos isolados de pimentão através da técnica de PCR para região ITS e $\beta$ -tubulina.....	20
<b>Tabela 4</b> - Percentagem de identidade dos isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos de pimentão.....	23
<b>Tabela 5</b> - Comparação das diferentes técnicas utilizadas na identificação de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	24

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Centros primários e secundários de origem de *C. annuum*..... 4
- Figura 2** - Confirmação do gênero *Colletotrichum* do pimentão (Cullen et al, 2002).  
Primers: (Cc1F1 e Cc2R1). Tamanho do fragmento: 447 pb. 1ª Linha - M = 1 Kb Plus  
DNA Ladder, 1=700, 2=701, 3=703, 4=705, 5=706, 6=707, 7=722, 8=779, 9=699,  
10=698, 11=697, 12=696, 13=770, 14=780, 15=731, 16=730, 17=729, 18=728, 19=727.  
2ª Linha - M= 1Kb Plus DNA Ladder, 1=726, 2=725, 3=723 , 4=718, 5=895, 6=905,  
7=1054, 8=1055, 9=1070, 10=1071, 11=1072, 12=1073 ,13=1074, 14=1075, 15=1076,  
16=1077, 17=1078, 18=1079, 19=1080..... 18

## RESUMO

RESUMO: O cultivo de pimentões é uma atividade significativa para o setor agrícola brasileiro, destacando-se no país entre as dez hortaliças de maior importância. A cultura do pimentão é atingida por diversas doenças, que assumem diferentes graus de importância dependendo principalmente da época de plantio. A antracnose está entre as doenças mais importantes desta cultura em vários países. A doença é causada por várias espécies de *Colletotrichum*, mas no Brasil tem sido atribuída principalmente a *C. gloeosporioides*, embora o envolvimento de *C. acutatum* tenha sido comprovado recentemente. Neste trabalho, 48 isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão, procedentes de regiões produtoras dos Estados de Pernambuco e Alagoas, foram identificados por meio de técnicas moleculares utilizando os oligonucleotídeos espécie-específicos que amplificaram para a região ITS do rDNA(CaInt2 e CgInt) e da  $\beta$ -tubulina (TBCA e TBCG) e seqüenciamento de DNA. Utilizando os oligonucleotídeos da  $\beta$ -tubulina, 45 isolados foram identificados como *C. acutatum*. Dos 11 isolados que foram seqüenciados, 8 deles pertenciam à espécie *C. acutatum*. Os resultados demonstram que *C. acutatum* é a espécie responsável pela antracnose predominante nas regiões produtoras destes dois Estados.

Palavras-chave – *Colletotrichum acutatum*, antracnose, PCR, seqüenciamento.

#### ABSTRACT

**Identification of species of *Colletotrichum* infecting peppers in the states of Pernambuco and Alagoas** – Growing peppers is a significant activity for the Brazilian agriculture, especially in the country side among the ten most important vegetables. The bell pepper is hit by different diseases, they assume different degrees of importance depending primarily on the planting season. Anthracnose is among the most important diseases of this crop in several countries. The disease is caused by several species of *Colletotrichum*, but in Brazil has been attributed mainly to *C. gloeosporioides*, although the involvement of *C. acutatum* has been established recently. In this study, 48 isolates of *Colletotrichum* obtained from pepper, coming from producing regions of the states of Pernambuco and Alagoas were identified by molecular techniques using primers specie-specific which amplified for the ITS region of rDNA (CaInt2 and CgInt) and  $\beta$ -tubulin (TBCA and TBCG) and DNA sequencing. Using the primers of  $\beta$ -tubulin, 45 isolates

## INTRODUÇÃO

O cultivo de pimentões é uma atividade significativa para o setor agrícola brasileiro. No Brasil, o pimentão destaca-se entre as dez hortaliças de maior importância no mercado (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO 2004, AZEVEDO *et al.* 2006, VIANA, FREIRE, PARENTE. 2007). Anualmente são cultivados cerca de 13.000 hectares de área, com uma produção aproximada de 280 mil toneladas de frutos (RIBEIRO; CRUZ 2002). A produção concentra-se nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, que plantam em conjunto, aproximadamente 5.000 ha, com considerável produção de 120 mil toneladas.

No nordeste a produção atingiu cerca de 78 mil toneladas do fruto (IBGE 2006). Alagoas tem investido nesta cultura e agregado produtores inseridos no conceito da agricultura familiar, favorecendo a geração de emprego e renda. O município de Arapiraca, reconhecido por sua tradição fumageira, vem gradativamente diversificando sua produção agrícola principalmente no ramo da horticultura onde, além de já abastecer 98% do Estado com sua produção de alface, coentro e cebolinha (SECOM-AL 2008), vem despontando com uma produção média de 3 toneladas, também como o maior produtor de pimentão do Estado (IBGE 2006).

A antracnose é uma importante doença do pimentão no Brasil (AZEVEDO *et al.* 2006) e em várias partes do mundo (MARVEL 2003, PARK 2005). Em condições de clima ameno a quente e épocas chuvosas, quando não são adotadas medidas adequadas de controle, as perdas de produção de frutos podem chegar a 100% (KUROZAWA, PAVAN, KRAUSE-SAKATE 2005; AZEVEDO *et al.* 2006).

Em pimentão a antracnose é causada por várias espécies de *Colletotrichum*, mas no Brasil tem sido atribuída principalmente a *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (KUROZAWA, PAVAN, KRAUSE-SAKATE 2005; AZEVEDO *et al.* 2006), embora o

envolvimento de *C. acutatum* Simmonds tenha sido comprovado recentemente (TOZZE Jr., MELLO, MASSOLA Jr. 2006).

Identificar corretamente as espécies de *Colletotrichum* é de primordial importância para o manejo adequado das doenças que são causadas em função do ataque desse grupo de patógenos (MILLS, HODSON, BROWN 1992). Tradicionalmente, a identificação das espécies patogênicas do gênero tem sido feita através de características morfológicas e morfométrica (SMITH, BLACK 1990, SUTTON 1992, GUNNEL, GUBLER 1992, TOZZE Jr., MELLO, MASSOLA Jr. 2006), presença de peritécio (SMITH, BLACK 1990) e sensibilidade ao benomil (FERNANDES, SANTOS, RIBEIRO 2001, TOZZE Jr., MELLO, MASSOLA Jr. 2006). No entanto, estes critérios de identificação, não têm se mostrado adequados para a identificação de espécies já que as características morfológicas e fenotípicas podem variar nas espécies de acordo com as diferentes condições ambientais (SUTTON 1992).

Mais recentemente, técnicas moleculares como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento são empregadas para auxiliar na identificação e caracterização de espécies (FREEMAN *et al.* 1998, MARTÍN; GARCÍA-FIGUERES 1999, LOPEZ 2001, ABANG *et al.* 2002, UREÑA-PADILLA *et al.* 2002, TOZZE Jr. *et al.* 2004).

A existência de oligonucleotídeos espécie-específicos, baseados em sequências de nucleotídeos da região interna transcrita (ITS1) e do DNA ribossomal (rDNA) da  $\beta$ -tubulina, tornaram a técnica de PCR uma grande ferramenta na identificação de espécies de *Colletotrichum*. Além da técnica de PCR, a análise da sequência de nucleotídeos de distintas regiões do genoma que tem facilitado a identificação dos isolados e gerado informações importantes sobre as relações filogenéticas existentes entre as espécies de *Colletotrichum* (SREENIVASAPRASAD *et al.* 1996).

Estudos de identificação baseados em métodos de maior precisão são fundamentais e essenciais para que se afirme corretamente quais as espécies envolvidas, bem como para o desenvolvimento de métodos de controle que tornem possíveis o adequado manejo da doença (TOZZE Jr., MELLO, MASSOLA Jr. 2006).

Diante da relevância desta doença para o pimentão, o presente trabalho teve como objetivo identificar através de técnicas moleculares as espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose nesta cultura.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1. O gênero *Capsicum*

De acordo com BUSO (2001) o gênero *Capsicum*, pertencente à família Solanaceae, compreende as pimentas e pimentões cultivados e seus parentes silvestres, sendo ambos originários do continente americano. REIFSCHNEIDER (2000) cita ainda que as pimentas foram, possivelmente, os primeiros temperos utilizados pelos índios para dar cor, aroma e sabor aos alimentos e para garantir sua conservação, protegendo-os da ação de microorganismos como fungos e bactérias.

Incluídas no gênero *Capsicum* estão 27 espécies de pimentas e pimentões, cinco delas domesticadas, cultivadas em diferentes partes do mundo: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. - e 22 espécies selvagens, distribuídas ao redor do seu centro de origem (DE WITT, BOSLAND 1993, BOSLAND, VOTAVA 1999). Depois do descobrimento das Américas, as pimentas foram introduzidas em diferentes áreas e atualmente encontram-se dispersas pelo mundo. O Brasil concentra uma grande diversidade de espécies de *Capsicum*, principalmente *C. annuum* var. *annuum*; *C. baccatum* var. *pendulum*; *C. chinense* e *C. frutescens* (REIFSCHNEIDER 2000).

No Brasil, o pimentão destaca-se entre as dez hortaliças de maior importância, tendo seu uso tanto para o consumo in natura, no ponto de maturação comercial quanto na indústria alimentícia (REIFSCHNEIDER, RIBEIRO 2004; AZEVEDO *et al.* 2006; VIANA, FREIRE, PARENTE 2007).

As áreas originais onde o pimentão é encontrado são denominadas de centros primários, porém essas plantas foram introduzidas em áreas diferentes, onde, pelo processo de seleção, continuam gerando novos tipos morfológicos. Por esse motivo, as novas áreas são consideradas centros secundários. Assim, como pode ser visto na figura 1, o centro primário



Figura 1: Centros primários e secundários de origem de *C. annuum*

de diversidade de *C. annuum* var. *annuum* (a forma domesticada mais variável e largamente cultivada, a qual pertence o pimentão) inclui México e América Central; centros secundários existem no sudeste e centro da Europa, África, Ásia e partes da América Latina.

A cultura do pimentão é atingida por diversas doenças, que assumem diferentes graus de importância dependendo principalmente da época de plantio.

As bactérias são de ocorrência eventual, mas causam grandes perdas em períodos de chuva e de alta umidade. Dentre as bacterioses do pimentão, a pústula, ou mancha-bacteriana é a mais importante em regiões úmidas, ou com períodos de umidade e temperatura elevadas. A bactéria *Xanthomonas* sp., agente causal da doença, tem acentuada variabilidade, existindo três espécies associadas a essa doença: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e *X. gardneri*. A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e a podridão-mole dos frutos, causada por *Pectobacterium* spp., também afetam a cultura do pimentão (COSTA, REIFSCNEIDER 1987; HENZ, COSTA, CARVALHO, BANCÍ 2007; VIANA, FREIRE, PARENTE 2007).

Dois grandes grupos de vírus causam doenças em pimentão, os tospovirus (TSWV e outras espécies) e os potyvirus, como o Pepper Yellow Mosaic Virus (PepYMV). Os vírus causam deformações foliares, mosaicos e morte das plantas, com perdas de até 100%. Já entre os nematóides, o principal gênero que ataca o pimentão é o *Meloidogyne*. A doença geralmente ocorre no campo em reboleiras, e afeta o desenvolvimento das plantas e sua produtividade (HENZ, COSTA, CARVALHO, BANCÍ 2007).

Doenças causadas por oomicetos são mais importantes em regiões com alta umidade. As doenças mais limitantes são a murcha das plantas causada por *Phytophthora* spp., a queda das folhas causada por *Cercospora* spp. e a antracnose dos frutos causada por *Colletotrichum*

spp.. Em regiões com clima mais seco e sob cultivo protegido, tem-se o oídio, causado por *Leveillula taurica*, como grande problema (HENZ, COSTA, CARVALHO, BÂNCI 2007). Dentre estas se destaca a antracnose pelos sérios danos que causa na produção.

### 1.2. Antracnose e o gênero *Colletotrichum*

O termo antracnose deriva da palavra grega anthracis que significa carvão. É o nome comum para doenças de plantas caracterizadas por lesões deprimidas e escuras, contendo estruturas de reprodução do patógeno (THAN *et al.* 2008a).

Considerada como uma doença comum e de ocorrência generalizada no país que, quando associadas à falta do emprego de técnicas de controle adequadas e às condições favoráveis de temperatura (entre 23 e 27°C) em épocas onde os índices de chuvas são mais altos, pode chegar a causar danos de até 100% nas culturas de pimentão (KUROZAWA, PAVAN, KRAUSE-SAKATE 2005). Ocorre em todas as regiões produtoras da cultura, indo desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste (SALGADO, TOKESHI 1980).

Reconhecida como uma das principais doenças do pimentão a antracnose pode causar tombamento em mudas, necrose e mancha foliar, porém, sua maior importância está nas lesões que provoca nos frutos (MANANDHAR, HARTMAN, WANG 1995; LOPES, ÁVILA 2003) tornando-os inadequados para a comercialização e consumo. Além disso, os prejuízos ocorrem tanto no campo como em pós-colheita pela habilidade de quiescência do fungo (HADEN, BLACK 1989; JEFFRIES *et al.* 1990; PEREIRA 1995).

A antracnose em *C. annuum* foi relatada pela primeira vez em 1890 em Nova Jersey – EUA, por Halsted, que descreveu os agentes causais como sendo *Gloeosporium piperatum* E. & E. e *C. nigrum* E. & H. Porém, em 1957 Von Arx redescreveu essas duas espécies como sinônimas de *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (THAN *et al.* 2008a).

Fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* são frequentemente relatados em diferentes espécies de plantas cultivadas (LOPEZ 2001) e estão entre os principais fitopatógenos estudados por serem responsáveis pelo surgimento de sérios danos em muitas culturas tropicais, subtropicais e temperadas. Culturas de cereais, fruteiras e hortaliças podem ser gravemente afetadas pelo fungo e, com isso, sofrer consideráveis perdas na produção. O ataque do patógeno aos frutos é o que causa perdas econômicas mais significativas aos produtores (FREEMAN, KATAN, SHABI 1998; FREEMAN *et al.* 2000; BAILEY, JEGGER 1992).

A disseminação do patógeno pode ocorrer a longas distâncias, através de sementes infectadas e, dentro da cultura, através de respingos de água de chuva ou pela irrigação por

aspersão. A infecção e o desenvolvimento dos sintomas as antracnose podem aparecer em todos os órgãos aéreos da planta, desde o início do seu desenvolvimento, podendo causar tombamento de pré e pós-emergência (BLACK *et al.* 1991). Solanáceas como pimentão, pimentas (*Capsicum* spp.) e jiló (*Solanum gilo* Radd.) apresentam sintomas da doença em toda a parte aérea, mas, em frutos, os sintomas são mais expressivos, manifestando-se por meio das lesões necróticas deprimidas de forma circular, que no centro, em condições ambientais favoráveis, apresentam massa mucilaginosa rósea contendo os conídios (FERNANDES, SANTOS, RIBEIRO 2001; KUROZAWA, PAVAN, KRAUSE-SAKATE 2005). Quando a ocorrência da doença se dá no campo e não há invasão de organismos secundários que acelerem o processo de deterioração dos frutos infectados por *Colletotrichum*, eles não caem e as lesões permanecem firmes (LOPES, ÁVILA 2003).

Morfologicamente, os fungos deste gênero apresentam acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforo simples e alongado, conídios hialinos unicelulares que podem ser ovalados ou oblongos. Na fase perfeita (telomorfa) são denominados como sendo do gênero *Glomerella* (BARNETT, HUNTER 1998).

Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz provavelmente protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES 2002). Segundo MISHRA & SIRADHANA (1979) os conídios não constituem estruturas de sobrevivência porque sua viabilidade diminui rapidamente. Entretanto, o micélio pode permanecer viável por longo período em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda como infecções latentes, não mostrando as plantas sintomas das doenças.

O gênero *Colletotrichum* revela ampla adaptação a diferentes meios de cultivo. (LOPEZ 2001). A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa. No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia (MENEZES 2002).

Seus hospedeiros são atacados através de vários mecanismos, podendo ocorrer a penetração do tecido cuticularizado através de apressórios ou não. Também pode ocorrer penetração direta por hifas não diferenciadas através de células não cuticularizadas, estômatos e ferimentos (VAN DER BRUGGEN, MARAITE 1987).

A interação do patógeno com sua planta hospedeira é caracterizada por uma curta fase biotrófica, quando os dois organismos ficam em contato direto na superfície celular, seguido de uma fase necrofítica destrutiva. Sintomas são visíveis neste último estágio, nas partes aéreas de plantas suscetíveis. Posteriormente, rapidamente expande-se em áreas necróticas que se desenvolvem em brotos apicais de plântulas jovens, em caules, em folhas de plantas adultas e nos frutos (ESQUERRÉ-TUGAYÉ *et al.* 1992).

Dependendo das condições ambientes ou do grau de maturidade do hospedeiro, a penetração não ocorre imediatamente e os apressórios entram num período de quiescência. Esta propriedade é de importância considerável para espécies de *Colletotrichum* que causam infecções latentes em frutos (LOPEZ 2001).

O gênero *Colletotrichum* é, reconhecidamente, o agente etiológico da antracnose do pimentão. Segundo AZEVEDO *et al* (2006) e VIANA, FREIRE & PARENTE (2007) há relatos de diversas espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose nas pimentas e pimentões, tais como *C. gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *Colletotrichum capsici* (H. Syd.) E. Butl. & Bisby, *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schw.) v. Arx e *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes (BUENO 2005), sendo que a maioria destes relatos remete para *C. gloeosporioides*.

Durante muitos anos considerou-se *C. gloeosporioides* como a única espécie causadora antracnose do pimentão, no Brasil (KUROZAWA, PAVAN, KRAUSE-SAKATE 2005), porém, recentemente estudos demonstram a presença de outras espécies como causadoras da doença. TOZZE Jr., BUENO & MASSOLA (2004) relataram a associação de *C. acutatum* à antracnose de solanáceas utilizando técnicas de PCR com marcadores para a espécie.

### 1.3. Métodos de Identificação de Espécies de *Colletotrichum*

Dentro do gênero *Colletotrichum* existem especializações para determinados grupos de hospedeiros, sendo que uma espécie pode estar relacionada com um único hospedeiro, como por exemplo, *C. lindemuthianum*, que ataca o feijoeiro e *C. musae* que ataca bananeira (ALZATE-MARIN *et al.* 2001, PHOTITA *et al.* 2005). Também é comum a ocorrência de várias espécies de *Colletotrichum* associadas a um hospedeiro, como em citros, abacate, maçã, pêssigo e manga que podem ser infectados por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, enquanto o morangueiro pode ser infectado por *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* (CARVALHO, LEITE Jr., UENO 2000, FREEMAN *et al.* 2000, CURRY *et al.* 2002; PERES *et al.* 2002; DENOYES-ROTHAN *et al.* 2003).

No caso das solanáceas o agente causal descrito em literatura é *C. gloeosporioides*, o mesmo da antracnose do mamão, manga, abacate, maçã e outros frutos (BERNSTEIN, ZEHR, DEAN 1995; KIM, OH, YANG 1999; FERNANDES, SANTOS, RIBEIRO 2001; SANDERS, KORSTEN 2003; KUROZAWA, PAVAN, KRAUSE-SAKATE 2005). Porém, estudos recentes demonstram que existe especialização patogênica mesmo dentro da família solanácea (FERNANDES, SANTOS, RIBEIRO 2001; TOZZE Jr., BUENO, MASSOLA Jr., 2004; IVEY, NAVA-DIAZ, MILLER 2004; KUROZAWA, PAVAN, KRAUSE-SAKATE 2005).

As espécies que podem estar envolvidas na antracnose do pimentão, pimenta e jiló são *C. gloeosporioides* (PARK, KIM, LEE 1990; KIM, OH, YANG 1999; OH, KIM, KIM 1999; FERNANDES, SANTOS, RIBEIRO 2001), *C. coccodes* (MCGOVERN, POLSTON 1995; AHN *et al.* 2003), *C. capsici* (MANANDHAR, HARTMAN, WANG 1995; ROY, KILLEBREW, RATNAYAKE 1997) e *C. acutatum* (IVEY, NAVA-DIAZ, MILLER 2004; TOZZE Jr. *et al.* 2005).

Identificar corretamente as espécies de *Colletotrichum* é de primordial importância para o manejo adequado das doenças que são causadas em função do ataque desse grupo de patógenos (MILLS, SREENIVASAPRASAD, BROWN 1992).

Tradicionalmente, a identificação das espécies patogênicas desse gênero tem sido feita através de características tais como morfologia e morfometria de conídios e apressórios, coloração da colônia, taxa de crescimento micelial, patogenicidade (SMITH, BLACK 1990; SUTTON 1992; GUNNEL, GUBLER 1992; TOZZE Jr., MELLO, MASSOLA Jr. 2006), presença de peritécio (SMITH, BLACK 1990) e sensibilidade à benomil (TOZZE Jr., MELLO, MASSOLA Jr. 2006). Vários trabalhos utilizam estas características para a identificação de *Colletotrichum* spp. (PERES *et al.* 2002; TALHINHAS *et al.* 2002; ANDRADE *et al.* 2007), no entanto a alta variabilidade de *Colletotrichum* spp. sob diferentes condições de cultivo, a falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos e a plasticidade dos fungos pela preferência por seus hospedeiros tem tornado a análise apenas de caracteres morfológicos não confiáveis na identificação de isolados deste gênero (SUTTON 1992; FREEMAN, KATAN, SHABI 1998).

A diferenciação entre espécies com base no círculo de hospedeiros ou hospedeiro de origem também não são critérios confiáveis. É frequente a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada a uma mesma hospedeira e uma mesma espécie pode estar presente em múltiplas hospedeiras (FREEMAN, KATAN, SHABI 1998). Como exemplo, *C.*

*gloeosporioides* e *C. acutatum*, em geral, apresentam sintomas semelhantes como as podridões de frutos em pós-colheita (PERES *et al.* 2002).

Uma das principais limitações da classificação de espécies com base apenas em caracteres morfológicos é que a variação apresentada pelos indivíduos pode não representar espécies diferentes, e sim uma variabilidade fenotípica dentro da mesma espécie. E da mesma forma, indivíduos com características morfológicas semelhantes podem representar espécies diferentes. Especialmente quando traços fenotípicos similares estão presentes em vários grupos distintos (VINNERE 2004). Desta forma técnicas moleculares são métodos alternativos para o estudo taxonômico, tornando-se importantes ferramentas para a resolução de problemas na delimitação de uma espécie (MACLEAN *et al.* 1993) e são ferramentas úteis na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* (LOPEZ 2001; AFANADOR-KAFURI *et al.* 2003; MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.* 2003; TOZZE Jr., BUENO, MASSOLA Jr., 2004; CHUNG *et al.* 2006; PILEGGI *et al.* 2009).

A utilização de oligonucleotídeos específicos para espécies de *Colletotrichum* obtidos a partir da análise de sequência da região ITS permite confirmar ou refutar os resultados gerados da morfologia e patogenicidade (MILLS, HODSON, BROWN 1992; FREEMAN, KATAN, SHABI 1996; LARDNER 1999, FREEMAN *et al.* 2000; ANDRADE *et al.* 2007). Estes oligonucleotídeos estão descritos na literatura, como por exemplo, CaINT2 (SREENIVASAPRASAD *et al.* 1996) e CgINT (MILLS, HODSON, BROWN 1992) que combinados com o oligonucleotídeo ITS4 geram produtos de amplificação específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* respectivamente.

O diagnóstico por PCR baseado em oligonucleotídeos espécie-específicos tem sido amplamente utilizado numa grande variedade de culturas como citros (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMER 1996), pêssego, morango, amêndoa (FREEMAN *et al.* 2000), *Lupinus* sp. (TALHINHAS *et al.* 2002) e oliva (TALHINHAS *et al.* 2005).

As tubulinas, principais proteínas constituintes dos microtúbulos do citoesqueleto de células eucarióticas (STOTZ, LONG 1999), formam um hetero-dímero composto de duas cadeias polipeptídicas homólogas, designadas  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulinas (POSTINGL *et al.* 1981).

A  $\beta$ -tubulina tem despertado grande interesse no meio científico devido à alta conservação da sequência de aminoácidos (COOLEY, CATEN 1993). Genes que codificam  $\beta$ -tubulina em fungos geralmente variam entre filós, mas são muito conservados em espécies relacionadas (KAWCHUK *et al.* 2002; STEFAN *et al.* 2004) e têm sido utilizados para resolver relações filogenéticas entre espécies do gênero *Colletotrichum* (SREENIVASAPRASAD, TALHINHAS 2005).

Na Espanha, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foram identificados através de análise das sequências da região ITS (MARTÍN, GARCIA-FIGUERES 1999). Recentemente, mais de 100 isolados de *Colletotrichum* de áreas de produção de olivas, em Portugal, foram caracterizadas baseando-se nas técnicas de análise das sequências de rDNA e gene da  $\beta$ -tubulina (*tub2*) específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (TALHINHAS *et al.* 2005). Já no Brasil, populações de *Colletotrichum* em goiaba (*Psidium guajava* L.) foram identificadas como *C. acutatum* baseado na técnica de análise das sequências de rDNA (PERES *et al.* 2002).

THAN *et al.* (2008b) diferenciaram isolados de antracnose de pimentas na Tailândia em três espécies: *C. acutatum*, *C. capsici* e *C. gloeosporioides*, através da análise de sequências da região ITS e do gene da  $\beta$ -tubulina. Utilizando-se deste mesmo método, HONG *et al.* (2008) também caracterizaram espécies de *Colletotrichum* em uvas (*Vitis* spp.) na Coreia.

As técnicas de PCR aliadas ao seqüenciamento direto, principalmente de DNA ribossomal, tornaram possível a comparação da região ITS de muitos isolados e tem permitido avanços significativos na organização taxonômica dos fungos, tendo como vantagem a determinação da ordem dos nucleotídeos com rapidez e eficácia. (WHITE 1990; SARTORI 2005). ROSA *et al.* (2006) utilizaram, com sucesso, o seqüenciamento da região ITS – 5.8 do rDNA na análise da diversidade de *Phytophthora parasitica*. Estudos conduzidos por diversos pesquisadores lançaram mão do seqüenciamento do rDNA para demonstrar a variabilidade dos fungos (ABANG *et al.* 2002; PHOTITA *et al.* 2005; BARGUIL *et al.* 2009).

Visto que a resistência a *Colletotrichum* é dependente da espécie do fungo (GNIFFKE 2005) e que dentro do gênero são conhecidas diferenças de sensibilidade a determinados fungicidas (PERES *et al.* 2004, VINNERE 2004), a identificação da (s) espécie (s) responsável (is) pela antracnose do pimentão e a caracterização delas é de vital importância para o desenvolvimento e implementação das estratégias de controle químico, cultural ou genético que podem variar de acordo com a variabilidade intra e interespecífica e região de origem dos isolados, além de propiciar um melhor entendimento da sua epidemiologia.

## **2 METODOLOGIA**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas e no Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

### **2.1 Obtenção dos isolados**

Para a realização deste trabalho, foram selecionados 48 isolados de *Colletotrichum* provenientes de regiões produtoras de pimentão dos Estados de Pernambuco e Alagoas (Tabela 1). O isolamento do fungo em cultura pura foi realizado a partir de fragmentos de tecidos periféricos das áreas lesionadas dos frutos de pimentão apresentando lesões típicas de infecção por *Colletotrichum* que, em seguida, em condições assépticas, foram imersos em álcool 70% durante dois minutos, hipoclorito de sódio 1:3 durante dois minutos. Após este procedimento realizou-se a lavagem do material com água destilada estéril, em seguida, com auxílio de uma pinça flambada, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo papel de filtro estéril, a fim de remover o excesso de água dos tecidos. Quatro fragmentos de cada amostra foram plantados por placa de Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas contendo os fragmentos foram mantidas em temperatura ambiente até o crescimento micelial do fungo.

### **2.2 Obtenção de culturas monoconidiais de isolados de *Colletotrichum***

Uma suspensão de conídios em água destilada esterilizada foi preparada a partir de culturas fúngicas cultivadas em meio BDA. A suspensão foi filtrada em uma camada de gaze dupla esterilizada. Desta suspensão inicial fez-se uma diluição em série, a partir da qual alíquotas de 1mL foram retiradas e transferidas, para tubos de ensaio com 9mL de água desti-

**Tabela 1:** Identificação do isolado, gênero, ano de coleta, procedência, sistema de cultivo e cultivar de 48 isolados obtidos de pimentão ..... (continua)

Nº	ISOLADO	GÊNERO	ANO	LOCAL	SISTEMA	CULTIVAR
1	CFM-905	<i>Colletotrichum</i>	2005	Glória de Goitá - PE	convencional	All Big
2	CFM-895	<i>Colletotrichum</i>	2005	Amaraji - PE	convencional	Magali
3	CFM-780	<i>Colletotrichum</i>	2005	Glória de Goitá - PE	convencional	All Big
4	CFM-779	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
5	CFM-770	<i>Colletotrichum</i>	2005	Chã Grande - PE	orgânica	All Big
6	CFM-731	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	All Big
7	CFM-730	<i>Colletotrichum</i>	2005	Sairé - PE	convencional	Magali
8	CFM-729	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Interprise
9	CFM-728	<i>Colletotrichum</i>	2005	Glória de Goitá - PE	convencional	Magali
10	CFM-727	<i>Colletotrichum</i>	2005	Sairé - PE	convencional	Interprise
11	CFM-726	<i>Colletotrichum</i>	2005	São Joaquim do Monte - PE	convencional	Magali
12	CFM-725	<i>Colletotrichum</i>	2005	São Joaquim do Monte - PE	convencional	All Big
13	CFM-723	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Interprise
14	CFM-722	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Magali
15	CFM-718	<i>Colletotrichum</i>	2005	Glória de Goitá - PE	convencional	All Big
16	CFM-707	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
17	CFM-706	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Comandante
18	CFM-705	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Magali
19	CFM-704	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	All Big
20	CFM-703	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Magali
21	CFM-701	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
22	CFM-700	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
23	CFM-699	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	All Big
24	CFM-698	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Magali
25	CFM-697	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
26	CFM-696	<i>Colletotrichum</i>	2005	Camocim de São Félix - PE	convencional	Magali
27	CFM-217	<i>Colletotrichum</i>	2007	Vitória de Santo Antão - PE	orgânica	All Big
28	CFM-1598	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	Convencional	Magali
29	CFM-1244	<i>Colletotrichum</i>	2007	Calçadas - PE	convencional	Atlante
30	CFM-1238	<i>Colletotrichum</i>	2007	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
31	CFM-1080	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Magali
32	CFM-1079	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
33	CFM-1078	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
34	CFM-1077	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
35	CFM-1633	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
36	CFM-1634	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante

Tabela 1: Continuação

Nº	ISOLADO	GÊNERO	ANO	LOCAL	SISTEMA	CULTIVAR
37	CFM-1076	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
38	CFM-1075	<i>Colletotrichum</i>	2006	São Joaquim do Monte - PE	convencional	Magali
39	CFM-1074	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
40	CFM-1073	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	All Big
41	CFM-1072	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Interprise
42	CFM-1071	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	Atlante
43	CFM-1070	<i>Colletotrichum</i>	2006	Camocim de São Félix - PE	convencional	All Big
44	CFM-1055	<i>Colletotrichum</i>	2006	Chã Grande - PE	orgânica	Atlante
45	CFM-1054	<i>Colletotrichum</i>	2006	Bezerros - PE	convencional	Atlante
46	A2P2	<i>Colletotrichum</i>	2009	Arapiraca - AL	convencional	Magali
47	A2P3	<i>Colletotrichum</i>	2009	Arapiraca - AL	convencional	Magali
48	A2P4	<i>Colletotrichum</i>	2009	Arapiraca - AL	convencional	Magali

lada esterilizada, obtendo-se as concentrações  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ . Posteriormente, fez-se a transferência de 100µL da suspensão de conídios na concentração de  $10^3$  conídios/mL de cada isolado para placas de Petri contendo meio BDA com adição de oxitetraciclina (950µg/mL).

As culturas fúngicas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD a 26°C sob alternância luminosa e diariamente foram observadas em microscópio ótico. Os conídios germinados foram individualmente transferidos para placas de Petri contendo BDA com auxílio de uma alça de platina previamente flambada. As placas de Petri contendo as culturas fúngicas foram mantidas em condições de ambiente e após sete dias, discos de BDA (3 mm) contendo micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4mL de meio BDA e armazenados a 4° C.

### 2.3 Teste de patogenicidade

Neste estudo fez-se a caracterização da patogenicidade dos isolados através de inoculação em frutos destacados. O teste de patogenicidade foi realizado na Universidade Federal de Pernambuco.

Os isolados foram inoculados em frutos feridos e sem ferimento. Os frutos foram colocados em bandejas plásticas e receberam gotas de 20 µL das suspensões de conídios previamente ajustadas para  $10^6$  esporos/mL. Para o tratamento dos frutos feridos, foram feitos pequenos ferimentos sob a gota com alfinete entomológico estéril. Após a inoculação foram colocados nas bandejas pedaços de algodão umedecidos para assegurar a alta umidade, além das mesmas serem cobertas com sacos plásticos borrifados com água deslizada autoclavada,

formando uma câmara úmida. As bandejas foram mantidas a temperatura médica de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ . o mesmo procedimento foi realizado nas testemunhas, mas utilizou-se apenas água nas inoculações.

## 2.4 Caracterização molecular

### 2.4.1 Extração e padronização da concentração do DNA

O DNA genômico total dos isolados foi extraído a partir de culturas monoconidiais crescidas em 5mL de meio batata-dextrose (BD). As culturas foram incubadas à temperatura ambiente ( $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12h sob agitação constante por 72h. Após esse período, o micélio foi lavado em água destilada esterilizada e utilizado para a extração do DNA total, segundo o protocolo de extração CTAB 4% descrito DOYLE & DOYLE (1987), com modificações.

Cerca de 50mg do micélio de cada isolado foi macerado em almofariz, com auxílio de pistilo, na presença de 700 $\mu\text{L}$  de tampão de extração CTAB 4% (NaCl 700mM, Tris-HCl 50mM, pH 8,0, EDTA 10mM) pré aquecido e 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em seguida, o macerado foi transferido para tubos de microcentrífuga e agitado em vortex por 1 minuto e mantido em banho-maria ( $65^{\circ}\text{C}$ ) por 30 minutos, invertendo-se suavemente os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. Após o resfriamento da suspensão fez-se a extração com solvente orgânico adicionando-se 600 $\mu\text{L}$  de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1(v/v)). Os tubos foram agitados durante cinco minutos, invertendo-os para homogeneizar a solução e posteriormente, centrifugados a 9000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ . Cuidadosamente os tubos foram retirados da centrífuga e em seguida, transferiu-se 500 $\mu\text{l}$  da fase aquosa para um outro tubo de microcentrífuga, ao qual foram adicionados 600 $\mu\text{l}$  de isopropanol frio ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e 10% de acetato de potássio 5M, misturando-se cuidadosamente para precipitação dos ácidos nucleicos. Estes tubos foram incubados por uma hora à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Logo após, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes com 0,5mL de Etanol 70% e secados à temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso em 60 $\mu\text{L}$  de TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e EDTA 1mM), contendo 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNase e incubados à  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para a digestão do RNA. As amostras de DNA foram armazenadas à uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Para determinar a concentração do DNA extraído, alíquotas de 3µL das soluções foram misturadas a 1 µL do azul de bromofenol (0,25%) e aplicada em gel de agarose (1%), submerso em tampão TAE 1X (tris-acetato 40mM, EDTA 1mM). Aplicaram-se também soluções de DNA do fago lâmbda de concentrações conhecidas (25; 50; 100 e 200ng/µL de DNA), para estimativa das concentrações do DNA extraído. Em seguida, o gel foi corado numa solução de brometo de etídio (EtBr) na concentração de 0,5µg/mL e visualizado sob luz ultra-violeta.

#### 2.4.2 Amplificação do rDNA e identificação dos isolados de *Colletotrichum*

Todas as reações de amplificações foram realizadas utilizando termociclador modelo Eppendorf Mastercycler personal. Cerca de 30ng do DNA extraído foram utilizados como molde em PCR's contendo os oligonucleotídeos universais que anelam em regiões específicas do DNA de fungos.

Para identificação molecular do gênero *Colletotrichum* utilizou-se o par de oligonucleotídeos Cc1F1 e Cc2R1 (CULLEN *et al.* 2002) (Tabela 2). A PCR foi conduzida na temperatura de desnaturação de 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de: 95°C por 45 segundos, 61° C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final de 72°C por 5 minutos. Posteriormente, fez-se uma nested PCR conduzida em uma temperatura de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as reações de PCR's foram realizadas com os pares de oligonucleotídeos específicos, conforme descrito abaixo. As reações foram realizadas com volume final de 30µL de solução, contendo aproximadamente 30ng do DNA total extraído, 3µL do tampão 10X (tris-HCl 10mM, pH 8,3; KCL 50mM), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 0,4µM de cada oligonucleotídeo.

PCR's com oligonucleotídeos táxon-específicos foram realizadas utilizando-se os oligos CaInt2, específico para *C. acutatum* e CgInt específico para *C. gloeosporioides* em combinação com o oligonucleotídeo ITS4 (Tabela 2) para amplificação da região ITS (SREENIVASAPRASAD *et al.* 1996). As reações foram preparadas em 30µL, conforme descrito acima, e a PCR foi conduzida a uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 60° C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

**Tabela 2:** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar regiões do rDNA dos isolados de *Colletotrichum*

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIA(5'→3')
Cc1F1	ACC TAA CTG TTG CTT CGG CG
Cc2R1	AAA TTT GGG GGT TTT ACG GC
TBCA	CGG AGG CCT GGT TGG GTG AG
TBCG	CGG AAG CCT GGG TAG GAG CG
TB5	GGT AAC CAG ATT GGT GCT GCC TT
CgInt	GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG
CaInt2	GGG GAA GCC TCT CGC GG
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AA

Para amplificação da região  $\beta$ -tubulina, utilizou-se os oligos: TBCA específico para *C. acutatum* e TBCG específico para *C. gloeosporioides* em combinação com TB5 (Tabela 2), de acordo com TALHINHAS *et al.* 2005. As reações foram preparadas em 30 $\mu$ L, conforme descrito acima, e a PCR foi conduzida a uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Em todos os experimentos utilizou-se amostras de DNA de isolados padrões das espécies de *C. acutatum* (CFMM 788) e *C. gloeosporioides* (CFMM 797) como referência. Controles negativos (reações livres de DNA) também foram incluídos. Os padrões usados são pertencentes à Coleção de Fungos Maria Menezes, da Universidade Federal de Pernambuco.

Após as amplificações, alíquotas de 3 $\mu$ L dos produtos da PCR foram acrescidas de 1 $\mu$ L de azul de bromofenol (0,25%) e aplicadas em gel de agarose (1,5%). Ao lado das amostras, aplicou-se uma alíquota do 1Kb Plus DNA Ladder para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados. As amostras foram então submetidas à eletroforese por aproximadamente 2 horas a 3V/cm do gel. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) e fotografado sob luz ultravioleta.

#### 2.4.3 Sequenciamento da região ITS de isolados de *Colletotrichum*

Para sequenciamento dos isolados de *Colletotrichum*, inicialmente fez-se a amplificação da região ITS, utilizando os oligos ITS4 e ITS5 (Tabela 2) que direcionam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 550pb, compreendendo a região espaçadora ITS1 e ITS2, bem como o gene que codifica para a subunidade 5.8S do RNA ribossomal (WHITE *et al.* 1990).

Posteriormente, os produtos de PCR da região ITS dos isolados de *Colletotrichum* foram submetidos à sequenciamento automático de DNA. Para realização do sequenciamento foi necessário purificar os produtos da PCR. A purificação foi realizada com os kits GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 2%.

A reação para sequenciamento foi efetuada num termociclador MJ Research, modelo PTC 200, na EMBRAPA Hortaliças/Brasília. A composição da reação foi a seguinte: produto de PCR 2 $\mu$ L (25-30ng), premix de sequenciamento 4 $\mu$ L, primer 5 $\mu$ M 0,6 $\mu$ L, água ultra-pura 3,4 $\mu$ L, totalizando 10 $\mu$ L. O fragmento foi sequenciado de ambas as extremidades, utilizando-se os oligonucleotídeos ITS4 e ITS5, separadamente, em um aparelho MegaBace 1000 (GE Healthcare).

As sequências obtidas foram editadas e comparadas com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando-se o programa Blastn.

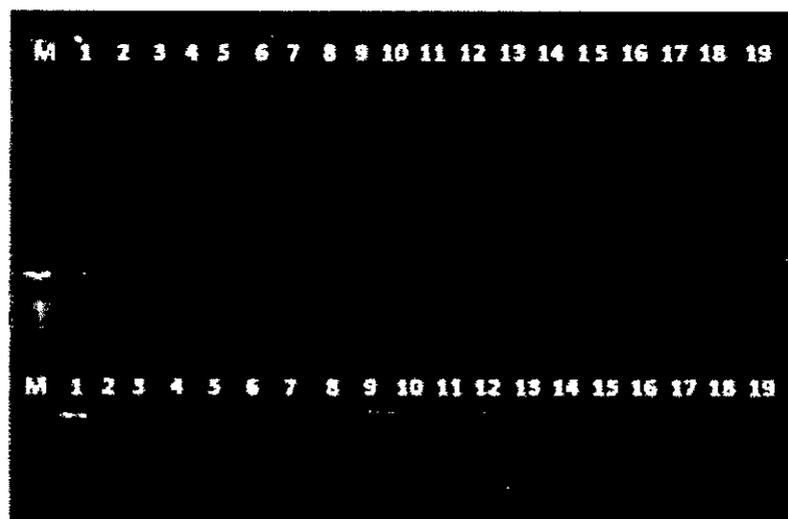
#### **2.4.4 Análise filogenética entre os isolados sequenciados**

As sequências dos isolados foram salvas no formato Fasta e comparadas, duas a duas, mediante alinhamento no programa DNAMAN versão 4.0. Com o alinhamento das sequências foi obtida a porcentagem de identidade entre os isolados.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Identificação molecular

A análise eletroforética em gel de agarose 1,5% utilizando-se os oligonucleotídeos (Cc1F1 e Cc2R2) específicos para identificação do gênero (CULLEN *et al.* 2002) amplificou um fragmento de 447 pb para todos os isolados analisados, demonstrando que todos eles pertencem ao gênero *Colletotrichum* como ilustra a Figura 2. Os demais oligonucleotídeos específicos para cada espécie também amplificaram fragmentos de DNA para determinados isolados, permitindo, desta forma, a identificação molecular de espécies (Tabela 3).



**Figura 2:** Confirmação do gênero *Colletotrichum* do pimentão. **1ª Linha** - M = 1 Kb Plus DNA Ladder, 1=700, 2=701, 3=703, 4=705, 5=706, 6=707, 7=722, 8=779, 9=699, 10=698, 11=697, 12=696, 13=770, 14=780, 15=731, 16=730, 17=729, 18=728, 19=727. **2ª Linha** - 1=726, 2=725, 3=723, 4=718, 5=895, 6=905, 7=1054, 8=1055, 9=1070, 10=1071, 11=1072, 12=1073, 13=1074, 14=1075, 15=1076, 16=1077, 17=1078, 18=1079, 19=1080

Para a maioria dos isolados analisados, representada por 43 isolados (Tabela 3) observou-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 pb quando utilizou-se o

par de oligonucleotídeos CaInt2/ITS4. Não foi observado produto de amplificação para os isolados CFM696, CFM895, CFM1072, CFM1079, CFM1633 e CFM1634 quando esses oligonucleotídeos foram utilizados. Quando se utilizou CgInt/ITS4, não foi detectado nenhum produto de amplificação, exceto para o isolado Cg, utilizado como controle positivo. Resultados semelhantes foram observados por ALMEIDA & COELHO (2007) em análises de caracterização utilizando isolados de *Colletotrichum* que infectam maracujá amarelo. Em estudos envolvendo isolados de *Colletotrichum* que infectam frutos de mamoeiro, ANDRADE *et al.* (2007), também não observaram produtos de amplificação para a maioria dos isolados testados, contudo o uso desses oligonucleotídeos táxon-específicos confirmou a identidade de alguns isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Resultados obtidos por ANDRADE *et al.* (2007), sugerem ainda que, existe uma baixa especificidade desses oligonucleotídeos em relação aos isolados de mamão analisados dos estados da Bahia e do Espírito Santo, servindo, dessa forma, apenas como critério complementar para a caracterização de isolados do mamoeiro.

Os resultados obtidos neste estudo, utilizando os iniciadores CaInt2, CgInt combinados com ITS4 corroboram com aqueles obtidos por TOZZE Jr. (2007), onde o mesmo demonstrou que *C. acutatum* é a espécie predominante que infecta pimentões nas principais áreas produtoras da região Sudeste e Sudoeste do Brasil, com frequência de 72% da população amostrada.

Outros estudos, também obtiveram resultados semelhantes (ADASKAVEG, HARTIN 1997, FOSTER, ADASKAVEG 1999) sugerindo que esses iniciadores poderão ser utilizados para identificação da espécie *C. acutatum* em diferentes patossistemas.

Resultados semelhantes foram obtidos quando foi utilizado o par de oligonucleotídeos TBCA/TB5 para amplificação do produto do PCR dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão. Foi possível observar que entre os 48 isolados analisados, em 45 foi observado um produto de amplificação de aproximadamente 550 pb (Tabela 3). Para quatro isolados (CFM895, CFM1079, CFM1633 e CFM1634) não foi observado nenhum produto de amplificação.

**Tabela 3:** Identificação molecular dos isolados de pimentão através da técnica de PCR para região ITS e  $\beta$ -tubulina (continua)

ISOLADO	CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO Cc1F1/Cc2R1	PCR (ITS)		PCR ( $\beta$ -tubulina)	
		CaInt2/ITS4	CgInt/ITS4	TBCA/TB5	TBCG/TB5
		C. a.	C.g.	C. a.	C.g.
CFM-217	+	+	-	+	-
CFM-696	+	-	-	+	-
CFM-697	+	+	-	+	-
CFM-698	+	+	-	+	-
CFM-699	+	+	-	+	-
CFM-700	+	+	-	+	-
CFM-701	+	+	-	+	-
CFM-703	+	+	-	+	-
CFM-704	+	+	-	+	-
CFM-705	+	+	-	+	-
CFM-706	+	+	-	+	-
CFM-707	+	+	-	+	-
CFM-718	+	+	-	+	-
CFM-722	+	+	-	+	-
CFM-723	+	+	-	+	-
CFM-725	+	+	-	+	-
CFM-726	+	+	-	+	-
CFM-727	+	+	-	+	-
CFM-728	+	+	-	+	-
CFM-729	+	+	-	+	-
CFM-730	+	+	-	+	-
CFM-731	+	+	-	+	-
CFM-770	+	+	-	+	-
CFM-779	+	+	-	+	-
CFM-780	+	+	-	+	-
CFM-895	+	-	-	-	-
CFM-905	+	+	-	+	-
CFM-1054	+	+	-	+	-
CFM-1055	+	+	-	+	-
CFM-1070	+	+	-	+	-
CFM-1071	+	+	-	+	-
CFM-1072	+	-	-	+	-
CFM-1073	+	+	-	+	-

Tabela 3: Continuação

ISOLADO	CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO Cc1F1/Cc2R1	PCR (ITS)		PCR ( $\beta$ -tubulina)	
		CaInt2/ITS4	CgInt/ITS4	TBCA/TB5	TBCG/TB5
		C. a.	C.g.	C. a.	C.g.
CFM-1074	+	+	-	+	-
CFM-1075	+	+	-	+	-
CFM-1076	+	+	-	+	-
CFM-1077	+	+	-	+	-
CFM-1078	+	+	-	+	-
CFM-1079	+	-	-	-	-
CFM-1080	+	+	-	+	-
CFM-1238	+	+	-	+	-
CFM-1244	+	+	-	+	-
CFM-1598	+	+	-	+	-
CFM-1633	+	-	-	-	+
CFM-1634	+	-	-	-	+
A2P2	+	+	-	+	-
A2P3	+	+	-	+	-
A2P4	+	+	-	+	-
Contr. CG	+	-	+	-	+
Contr. CA	+	+	-	+	-

C.a.= *C. acutatum*, C.g.= *C. gloeosporioides*; + = positivo para reação; - = negativo para reação

Quando foram utilizados os iniciadores TBCG/TB5 nas reações de amplificações, apenas o DNA dos isolados CFM1633 e CFM1634 apresentaram um fragmento de aproximadamente 550 pb, sendo identificados como pertencente à espécie *C. gloeosporioides*.

Estudos similares realizados por TALHINHAS *et al.* (2005), em que os autores determinaram e avaliaram os padrões de distribuição de 128 isolados espécies de *Colletotrichum* que infectam oliveiras em Portugal, concluíram que a espécie dominante foi *C. acutatum* (97%) com limitada ocorrência da espécie *C. gloeosporioides*. No mesmo estudo os autores puderam ainda separar cinco diferentes grupos baseados em padrões moleculares, entre os quais quatro deles pertenciam à espécie *C. acutatum*. Entretanto, mais recentemente, VALERO *et al.* (2010) utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos, baseados na região da  $\beta$ -tubulina, a fim de identificar espécies de *Colletotrichum* em frutos de limão, concluíram que a espécie *C. gloeosporioides* é mais frequentemente encontrada no sudeste da Espanha, com frequência de 81,5% e a espécie *C. acutatum* apresentou frequência limitada na região com apenas 18,75% do total de isolados analisados.

Os isolados CFM1079 e CFM895 tiveram o DNA amplificado quando foram utilizados iniciadores específicos para a identificação do gênero, no entanto, quando foram utilizados os iniciadores espécie-específicos não foram observados nenhum produto de amplificação, sugerindo tratar-se de espécies distintas. Neste caso, faz-se necessário a utilização de outros iniciadores ou então seqüenciamento da região ITS.

### 3.2. Amplificação da região ITS e Sequenciamento

A região ITS do rDNA, amplificada com os oligonucleotídeos universais ITS1/ITS4, gerou um fragmento de 550 pb, para todos os 48 isolados estudados. Analisando-se os produtos de PCR desta região não é possível observar polimorfismo entre os isolados, capaz de diferenciá-los, demonstrando a necessidade de se utilizar outros métodos como o seqüenciamento dos produtos de amplificação, para a identificação correta dos isolados avaliados neste estudo.

Inicialmente, os produtos de amplificação da região ITS de todos os isolados foram seqüenciados, contudo apenas as seqüências de onze isolados puderam ser utilizadas neste estudo. Diante dos resultados foi possível observar que três isolados apresentaram identidade acima de 90% com *Glomerella acutata*, dois isolados apresentaram identidade acima de 90% com *Colletotrichum* sp. e os demais apresentaram identidade de entre 83 e 89% com *G. acutata* (Tabela 4). Esses resultados reforçam os resultados obtidos anteriormente quando foram utilizados os iniciadores espécie-específicos, demonstrando que os iniciadores CaInt2 e CgInt juntamente com ITS4, poderão ser utilizados para estudos de identificação das espécies de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, bem como os iniciadores TBCA e TBCG combinados com o iniciador TB5.

De um modo geral, os produtos da amplificação da região ITS aliada ao método de RFLP ou seqüenciamento tem sido utilizados para estudos de identificação de espécies de diversos fungos ou estudos de diversidade genética entre diferentes isolados (O'DONNELL, GRAY 1992; EDEL *et al.* 1995; SILVA-HANLIN *et al.* 1999; EDEL *et al.* 2001; OTERO, DUCASSE, MILLER 2004).

**Tabela 4:** Percentagem de identidade dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de pimentão

ISOLADOS	ESPÉCIE	% DE IDENTIDADE
CFM1055	<i>Glomerella acutata</i>	89
CFM1073	<i>Colletotrichum</i> sp.	85
CFM1074	<i>Colletotrichum</i> sp.	91
CFM1080	<i>Glomerella acutata</i>	85
CFM697	<i>Glomerella acutata</i>	82
CFM700	<i>Glomerella acutata</i>	87
CFM701	<i>Colletotrichum</i> sp.	94
CFM704	<i>Glomerella acutata</i>	83
CFM723	<i>Glomerella acutata</i>	95
CFM727	<i>Glomerella acutata</i>	91
CFM779	<i>Glomerella acutata</i>	95

Ao comparar a amplificação do DNA dos isolados estudados utilizando os oligonucleotídeos espécie-específico com o sequenciamento, observou-se que oito isolados (CFM697, CFM700, CFM704, CFM723, CFM727, CFM779, CFM1055 e CFM1080) identificados como *C. acutatum* apresentaram maior identidade com *G. acutata*, enquanto que três isolados (CFM701, CFM1073 e CFM1074) apresentaram maior identidade com *Colletotrichum* sem espécie definida (Tabela 5).

A partir dos resultados obtidos pode-se constatar que a antracnose que ataca os cultivares de pimentão nas regiões estudadas é causada, na sua predominância, pela espécie *C. acutatum* (TALHINHAS *et al.* 2005, TOZZE Jr. 2007, VALERO *et al.* 2010), ao contrário do que está descrito na maior parte da literatura encontrada atualmente que relata como sendo o agente causal *C. gloeosporioides*, fato constatado também por BUENO (2005), que observou em seus estudos que dos 27 isolados obtidos de pimentão, 14 foram identificados pela técnica de PCR como sendo *C. acutatum*, apenas dois foram positivos para *C. gloeosporioides*.

Nos Estados Unidos, IVEY, NAVA-DIAZ & MILLER (2004) também identificaram *C. acutatum* em pimentões verdes. Esta espécie tem causado perdas de até 100% no campo, perdas muito superiores aquelas causadas por *C. gloeosporioides* e *C. coccodes* por eles constatados.

O resultado é relevante pelo fato de que, com essas informações, os tratamentos no que diz respeito ao manejo da doença devem ser revistos, para que sejam utilizados métodos de

controle adequados ao *C. acutatum*, bem como para o desenvolvimento de variedades resistentes a este fungo.

**Tabela 5:** Comparação das diferentes técnicas utilizadas na identificação de isolados de *Colletotrichum* spp.

ISOLADOS	TÉCNICA		
	PCR (ITS)	PCR ( $\beta$ -tubulina)	SEQUENCIAMENTO
CFM1055	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>
CFM1073	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
CFM1074	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
CFM1080	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>
CFM697	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>
CFM700	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>
CFM701	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
CFM704	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>
CFM723	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>
CFM727	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>
CFM779	<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>Glomerella acutata</i>

## 4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos com a amplificação do gene da  $\beta$ -tubulina, e da região ITS, o fungo *C. acutatum* é a espécie responsável pela antracnose nos Estados de Pernambuco e Alagoas.

A técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos mostrou-se ferramenta adequada para a identificação molecular dos isolados de *Colletotrichum* que infectam pimentões.

*"É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca."*

Dom Hélder Câmara

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ABANG, M. M. et al. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of yam in Nigeria. **Plant Pathology**, v.51, p.63-71, 2002.
- ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, v. 87, p.979-987, 1997.
- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology** 93:579-587. 2003.
- AHN, I. P. et al. Signaling pathways involed in preinfection development of *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. coccodes* and *C. dematium* pathogenic on red pepper. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63, n.2, p. 281-289, 2003.
- ALMEIDA, L. C. COÊLHO, R. S. B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores, bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.4, p.319-328, 2007.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Análises de DNA de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* visando identificação de patótipos. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n.2, p. 197-202, 2001.
- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos de mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n. 1, p. 21-31, 2007.
- AZEVEDO, C. P. et al. **Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas**. Brasília, DF: Embrapa hortaliças, 2006. 4p. (Embrapa hortaliças. Comunicado técnico, 35).
- BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Oxford: **British Society for Plant Pathology**, p.88-120. 1992.
- BARGUIL, B. M. et al. Identificação e variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* causando antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1639-1646, 2009.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 218p. 1998.

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

BLACK, L. L. et al. **Pepper Diseases: a field guide**. Tainan: AVRDC, 1991, 98p.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. **Peppers: vegetable and spice capsicums**. Wallingford: CABI Publishing, 1999. 204 p.

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

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

BUSO, G. S. C. et al. **Espécies silvestres do gênero *Capsicum* coletadas na Mata Atlântica Brasileira e sua relação genética com espécies cultivadas de pimenta: uma primeira abordagem genética utilizando marcadores moleculares**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 22p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 7).

CARVALHO, F. M. S.; LEITE Jr., R. P.; UENO, B. Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n.1, p. 72-78, 2000.

CHUNG, K. R. et al. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and post-bloom fruit drop of citrus. **FEMS-Microbiology Ecology**, 2003.

COOLEY, R. N.; CATEN, C. E. Molecular analysis of the *Septoria nodorum*  $\beta$ -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. **Molecular and General Genetics**, v. 237, p. 58-64, 1993.

COSTA, G. O.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Mosaico, pústula bacteriana e requeima do pimentão – Revisão bibliográfica. **Anais Esc. Agron. e Vet.**, v. 17, n. 1, p. 113-132, jan/dez, 1987.

CULLEN, D. W. et al. Detection of *Colletotrichum* coccodes from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, v. 51, n. 3, p. 281-292, 2002.

CURRY, K. J. et al. Strawberry anthracnose: histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. **Phytopathology**, v. 92, n.10, p.1055-1063, 2002.

DE WITT, D.; BOSLAND, P. W. A brief history of pepper growing. In: DE WITT, D.; BOSLAND, P. W. (Eds.). **The pepper garden**, p. 5-21, 1993.

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

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. et al. **A. Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species.** In: BAILEY, R. J., JEGER, M. J. (Eds.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford. CAB International. 1992. pp.121-133.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EDEL, V. et al. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. **Phytopathology**. v. 85:579-585. 1995.

EDEL, V. et al. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. **FEMS-Microbiology Ecology**. n. 36, p.61-71. France, 2001

FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, R. L. D. Sensibilidade ao fungicida benomil *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n.2, p.89-95, 2001.

FOSTER, H. HADSKAVEG, J. E. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. **Phytopathology**. v. 89, p.1056-1065, 1999.

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

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.

FREEMAN, S. et al. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, v. 90, n. 6, p.608-614, 2000.

GNIFFKE, P. **Host resistance to pepper anthracnose.** Progress Report. Shanhua, Taiean: AVRDC – The World Vegetable Center. 2003. Disponível em: <<http://www.avrdc.org/pdf/03anthracnose.pdf>>. Acesso em: 22 Mar. 2010.

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

HADEN, J. F.; BLACK, L. L. **Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp.** In: International Symposium On Integrated Management Practices: Tomato and Pepper Production in the Tropics, Tainan: AVRDC, 1989.

HENZ, G. P. et al. Como cultivar pimentão: alta produtividade. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**, n.42, fev./mar. 2007.

HONG, S. K. et al. Morphological Variations, Genetic Diversity and Pathogenicity of *Colletotrichum* species Causing Grape Ripe Rot in Korea. **Plant Pathol. J.** v. 24, n. 3, p. 269-278, 2008.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum**. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag. 2001. 500p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=818&z=p&o=2&i=P>. Acesso em: 14 jan. 2010.

IVEY, M. L. L.; NAVA-DIAZ, C.; MILLER, S. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. **Plant Disease**, v. 88, n.11, p.1198-1204, 2004.

JEFFRIES, P. et al. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, v. 39, p. 343-366, 1990.

KAWCHUK, L.M. et al. Isolation of the  $\beta$ -tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*. **Plant Pathology**, v.24, p.233-238, 2002.

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

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

LARDNER, R. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Mycological Research**, v. 103, p.275-285, 1999.

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

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum* in **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 291-339, 2001.

MACLEAN, D. J. et al. How do we identify and classify fungal pathogens in the era of DNA analysis? **Advances in Plant Pathology** 10: 207-244, 1993.

MCGOVERN, R. J.; POLSTON, J. E. First report of fruit rot of *Capsicum chinense* caused by two species of *Colletotrichum*. **Plant Disease**, v. 79, p. 212, 1995.

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

MARTÍN, M. P.; GARCÍA-FIGUERES, F. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 733-741, 1999.

- MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V. et al. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primer for their identification. **J. Phytopathol.** 151:135-143. 2003.
- MARVEL, J. K. **Biology and control of pepper anthracnose.** 2003, 84 f. Thesis (PhD) - Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 23-24, 2002.
- MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98. 1/3, p.137-144, 1992.
- MILLS, P. R.; HODSON, A.; BROWN, A. E. **Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits.** In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control.* Wallingford: CAB International, 1992, p. 269-288.
- MISHRA, A.; SIRADHANA, B. S. Studies on the survival of sorghum anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) pathogen. **Phillippine Agriculture**, v.62, p. 149-152, 1979.
- O'DONNELL, K; GRAY, L. E. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. **Mol. Plant-Microbe interact**, v.8, p. 709-716, 1992.
- OH, B. J.; KIM, K. D.; KIM, Y. S. Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 6, p. 547-552, 1999.
- OTERO L., DUCASSE, D.; MILLER R. N.; Variability in ribosomal DNA genic spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different hosts. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.441-446, 2004.
- PARK, H. K.; KIM, B. S.; LEE, W. S. Inheritance of resistance to anthracnoses (*Colletotrichum* spp.) in pepper (*Capsicum annum* L.) II. Genetic analyses of resistance to *Colletotrichum dematium*. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v.31, n.3, p.207-212, 1990.
- PARK, S. K. **Differential interaction between pepper genotypes and *Colletotrichum* isolates causing anthracnose.** 2005, 56 f. Dissertation (MSc) - Seoul National University, Seoul, Korea.
- PEREIRA, R. M. F. V. **Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de *Colletotrichum gloeosporioides* "sensu" Arx, isolados de pimentão (*Capsicum annum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Raddi) e seu controle químico.** 1995. 151p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1995.
- PERES, N. A. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal Phytopathology**, v. 150, p.128-134, 2002.

PERES, N. A. R. et al. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p.125-130, 2004.

PHOTITA, W. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 18, n.1, p.117-133, 2005.

PILEGGI, S.A.V. et al. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1076-1088. 2009.

POSTINGL, H. et al. Complete amino acid sequence of alfa-tubulin from porcine brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 2757-2761, 1981.

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

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO C. S. C. **Introdução e importância econômica**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. Disponível em:  
<<http://www.cnpq.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>>. Acesso em: 01 Fev. 2010.

RIBEIRO, C. S. C.; CRUZ, D M. R. Tendências de mercado. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, n. 14, junho-julho, 2002.

ROSA, D.D. et al. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. **Summa Phytopathol.**, v. 32, n. 2, p. 188-191, 2006.

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

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

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

SARTORI, D. **Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A em grãos de café**. 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2005.

SECOM – Secretaria de Estado da Comunicação de Alagoas. **Alagoas se torna auto-suficiente na produção de alface, coentro e cebolinha**. Disponível em:  
<http://secomal2.achanoticias.com.br/especiais.kmf?cod=7460932>. Acesso em: 25 Mar. 2010.

SILVA-HANLIN ; W, D. M. et al. Ribosomal DNA sequencing data reveals low genetic variability among *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 534-539, 1999.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, vol. 74, p. 69-76, 1990.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, 2005.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, v. 45, n. 4, p.650-655, 1996.

SREENIVASAPRASAD, S.; TALHINHAS, P. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 4, p. 361-378, 2005.

STEFAN, G.R.W. et al. Cloning of beta-tubulin and succinate dehydrogenase genes from *Uromyces fabae* and establishing selection conditions for their use in transformation. **Plant Pathology**, v. 110, p. 767-777, 2004.

STOTZ, H. U.; LONG, S. R. Expression of the pea (*Pisum sativum* L.) alpha-tubulin gene is correlated with cell division activity. **Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 1-14, 1999.

SUTTON, B. C. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

TALHINHAS, P. et al. Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, v. 92, p. 986-996, 2002.

TALHINHAS, P. et al. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 71, 2005.

THAN, P.P. et al. *Review: Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v 9, n. 10, p. 764-778, 2008a.

THAN, P.P. et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 562-572, 2008b.

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

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

TOZZE Jr., H.J. et al. *Colletotrichum acutatum* como agente causal de antracnoses em hortaliças solanáceas. **Resúmenes**: Córdoba, Sociedade Argentina, 2005, p.468.

- TOZZE Jr., H. J.; MELLO, M B. A.; MASSOLA Jr., N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de *Colletotrichum* sp. de hortaliças Solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v..32, nº 1, p. 71-79, 2006.
- UREÑA-PADILLA, A.R. et al. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. **Phytopathology**, v. 92, p. 1245-1252, 2002
- VALERO, M. et al. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. **Eur J. Plant Pathol.** V.127, p.399-405, 2010.
- VAN DER BRUGGEN, P.; MARAITE, H. Histopatology of cassava anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis*. **Parasitica**, v. 43, p. 3-21, 1987.
- VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; PARENTE, G. B. **Controle das principais doenças do pimentão cultivado nas regiões serranas do Estado do Ceará.** Fortaleza, CE: Embrapa agroindústria tropical, 2007. (Embrapa agroindústria tropical Comunicado técnico on line 132).
- VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science ad Technology**, Uppsala, v.917, 72p., 2004 Disponível em: <http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn>. Acesso em: 21 Mar. 2010.
- WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In. INNIS, M.A. **PCR protocols: a guide to methods and applications.** Academic Press, San Diego, 1990, p. 315-322.

---

<sup>1</sup>Referências elaboradas segundo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, NBR 6023.



PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM AGRONOMIA – CONCENTRAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL e  
PROTEÇÃO DE PLANTAS  
CÓDIGO-CAPEs – 2601012010M -9

UFAL

CECA

Aos treze dias do mês de agosto de dois mil e dez, às 10h00: horas, no prédio do Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da UFAL, sob a presidência do Profª Drª IRAILDES PEREIRA ASSUNÇÃO (CECA/UFAL) reuniu-se a Banca Examinadora para Defesa Pública da Dissertação de Mestrado da Farmacêutica: **WIRLA GONÇALVES DOS SANTOS** aluna do Curso de Mestrado em Agronomia "Produção Vegetal e Proteção de Plantas" da UFAL, sob o título "**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM SPP QUE INFECTAM PIMENTÕES NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS**". A Banca Examinadora ficou assim constituída: Profª. Drª. IRAILDES PEREIRA ASSUNÇÃO (CECA/UFAL) – Orientadora; – Membro Titular; Prof. Dr. GAUS SILVESTRE DE ANDRADE LIMA – (CECA/UFAL) – Membro Titular; Profª Drª. MARIA DE FÁTIMA SILVA MUNIZ - (CECA/UFAL) - Membro Titular; Prof. Dr. LUIZ CARLOS CAETANO – (IQB/UFAL) – Membro Titular e Prof. Dr. JÚLIO ALVES CARDOSO FILHO– (CECA/UFAL) – Membro Suplente. Ocorrências: Abertura pela presidente da banca Profª Drª. IRAILDES PEREIRA ASSUNÇÃO que agradeceu as valiosas presenças dos demais membros componentes da banca, manifestando sua satisfação pela defesa de mais uma Dissertação de Mestrado do Curso de Agronomia do CECA, desta feita sob sua orientação. A seguir, parabenizou a-mestranda **WIRLA GONÇALVES DOS SANTOS** pelo trabalho apresentado. A Presidente da Banca Examinadora iniciou os trabalhos passando a palavra ao Profª Drª MARIA DE FÁTIMA SILVA MUNIZ e logo após foram ouvidos os comentários e análises dos demais componentes da banca. Terminada a defesa, procedeu-se o julgamento, pelos membros examinadores, sendo a candidata **APROVADA**, fazendo jus, ao título de Mestre em Agronomia, área de Concentração em Proteção de Plantas e que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Banca Examinadora e por mim, Marcos Antonio Lopes, Secretário. Rio Largo (AL), 13 de agosto de 2010.

MARCOS ANTONIO LOPES

Profª Drª IRAILDES PEREIRA ASSUNÇÃO  
Presidente

Prof. Dr. GAUS SILVESTRE DE ANDRADE LIMA  
Membro

Profª Drª. MARIA DE FÁTIMA SILVA MUNIZ  
Membro

Prof. Dr. LUIZ CARLOS CAETANO

DOCUMENTO RECEBIDO  
Data: 03/08/2012