



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROTEÇÃO DE PLANTAS**



NAYANA BRUSCHI INFANTE

**ESPÉCIES DE *Alternaria* ASSOCIADAS A MANCHA MARROM DA PALMA MIÚDA E
EFEITO DA TEMPERATURA, UMIDADE E RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS**

**RIO LARGO
2021**

NAYANA BRUSCHI INFANTE

**ESPÉCIES DE *ALTERNARIA* ASSOCIADAS A MANCHA MARROM DA PALMA MIÚDA
E EFEITO DA TEMPERATURA, UMIDADE E RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção do título de Doutora
em Proteção de Plantas.

Orientação: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

**RIO LARGO
2021**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

I43e Infante, Nayana Bruschi
 Espécies de *Alternaria* associadas a mancha marrom da palma miúda e efeito da temperatura, umidade e resistência de genótipos. / Nayana Bruschi Infante – 2021.
 75 f.; il.

Tese (Doutorado em Proteção de plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

Inclui bibliografia

1. Doenças da palma. 2. Pleosporacea. 3. Análise multilocus. I. Título.

CDU: 63

FOLHA DE APROVAÇÃO

NAYANA BRUSCHI INFANTE

ESPÉCIES DE *ALTERNARIA* ASSOCIADAS A MANCHA MARROM DA PALMA MIÚDA E EFEITO DA TEMPERATURA, UMIDADE E RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS

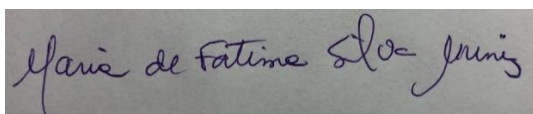
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para obtenção
do título de doutor(a) em Proteção de Plantas

Aprovado em: 30/08/2021

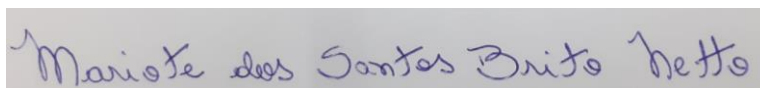
Banca Examinadora



Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (Universidade Federal de Alagoas - Orientador)



Profª Drª. Maria de Fatima Muniz (Universidade Federal de Alagoas - UFAL)



Prof. Dr. Mariote Santos Brito Netto (Universidade Federal de Alagoas - UFAL)



Prof. Dr. Wellington Costa da Silva (Instituto Federal de Pernambuco-IFPE/ *Campus* Vitória de
Santo Antônio)

Rio Largo - AL

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a base e fonte de tudo.

Ao Campus de Engenharias e Ciências Agrárias e todos os seus funcionários. A Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima pela paciência, orientação, pela atenção e por acreditar em mim.

Ao Dr. Frederico Monteiro Feijó pela paciência e parceria nos trabalhos durante esse ano.

À minha família que incondicionalmente me deram apoio e foram meus principais incentivadores.

À minha parceira querida Vanessa, que esteve comigo em todos os momentos desse trabalho.

À todos os meus amigos, sem eles a vida não teria graça.

Ao Laboratório de Fitopatologia Molecular, em especial a Mayra Ferro, que me ajudou a desenvolver conhecimento acadêmico e pelo prazer de ter trabalhado juntamente a todos que o compõe.

RESUMO GERAL

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* e *Opuntia ficus-indica*) é uma cultura de extrema importância para produção animal em muitos países. No Brasil a predominância do cultivo é nas regiões semiáridas do Nordeste, devido à sua adaptabilidade a condições climáticas adversas. Apesar dessa vantagem, a cultura é acometida por muitas doenças, causadas por diversos agentes fitopatogênicos que podem comprometer seu potencial produtivo. Dentre as doenças, a mancha marrom, causada por espécies do gênero *Alternaria*, é considerada a mais importante para a palma miúda. Contudo, ainda não se conhece a real diversidade de espécies pertencentes a esse gênero associadas a doença. Um dos maiores problemas na taxonomia das espécies de *Alternaria* é sua elevada variabilidade de características fenotípicas, sendo necessária a utilização de métodos moleculares para auxiliar na identificação de espécies deste gênero. Outra característica importante desse grupo fúngico é sua elevada adaptabilidade as variadas condições climáticas, ambientes e de hospedeiros. Desta maneira, os objetivos deste estudo foram identificar e caracterizar espécies de *Alternaria* associadas a mancha marrom da palma miúda e avaliar o efeito da temperatura, umidade e resistência de genótipos do hospedeiro a espécies *Alternaria*. Cladódios apresentando sintomas de manchas marrom em sua superfície, foram coletados em seis regiões produtoras de palma forrageira miúda, sendo três no estado de Alagoas e três no estado de Pernambuco. No laboratório, realizou-se isolamento indireto, obtenção de culturas monospóricas e teste de patogenicidade. Posteriormente, os isolados identificados previamente como pertencentes ao gênero *Alternaria* foram identificados com base em análises moleculares de regiões genômicas específicas (ITS, EF1- α , RPB2, GAPDH e ALT a1) para o gênero em questão. A caracterização morfológica foi realizada baseando-se nas estruturas reprodutivas e coloração de colônias para cada espécie identificada. Um total de 14 isolados patogênicos foram obtidos. Com base nas análises filogenéticas e morfológicas o presente estudo identificou três espécies de *Alternaria*, *A. gossypina*, *A. jaccinthisicola* e *A. tomato* associadas a mancha marrom da palma miúda. Nos experimentos de temperatura, umidade e resistência de genótipos, foram utilizadas todas as espécies identificadas neste estudo. O efeito da temperatura sobre a severidade da doença, foi avaliado em cladódios de palma miúda destacados, onde as inoculações foram realizadas com a deposição do patógeno em três pontos equidistantes em cada cladódio. Em seguida, foram acondicionados em estufas incubadoras BOD, durante 10 dias, nas seguintes temperaturas de 13, 17, 21, 25, 29 e 33 °C com fotoperíodo de 12 horas. O teste de períodos de umidade foi realizado de acordo com a metodologia do teste de temperatura, onde foram utilizados os seguintes períodos de permanência em câmara úmida: 12, 24, 36, 48 e 60 horas. O experimento foi mantido em BOD, com fotoperíodo de 12 horas, calibrada para a temperatura que causou a maior severidade no teste anterior para cada espécie de *Alternaria* em questão. O experimento de resistência foi realizado em casa de vegetação, utilizando nove genótipos de palma miúda: Palma Alagoas, Miúda, Melancia, Tamazunchale, Clones 06, 07, 13, 08, 21 e F-21. A faixa de temperatura de 17 °C – 21° C favoreceu a severidade da doença no cladódio de palma miúda, apresentando os maiores tamanhos médios de lesões independente da espécie de *Alternaria* considerada. Períodos acima de 24 horas de câmara úmida favorecerem o desenvolvimento das lesões. Na avaliação da reação dos genótipos de palma miúda, para as três espécies avaliadas os genótipos Clone06 e Clone13 apresentaram os menores tamanhos médios de lesões.

Palavras-chave: *Nopalea cochenillifera*; Doenças da palma; Pleosporaceae; Análise multilocus

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Symptoms of brown spot caused by pathogenic isolates of <i>Alternaria</i> after ten days of incubation. A, B and C - inoculation with disks containing pathogen structures; D, E and F - inoculation with spore suspension. D - <i>A. jacinthicola</i> ; E - <i>A. gossypina</i> and F - <i>A. tomato</i> .	38
Fig. 2: Phylogenetic tree of Bayesian Inference based on the concatenated sequences of the ITS, <i>tef1</i> , <i>rpb2</i> , <i>Alt a1</i> and <i>gapdh</i> regions. The <i>A. alternantherae</i> species was used as an outgroup. Isolates featured in this study are highlighted in bold.	40
Fig. 3: AI, BI e CI - Characteristics of the colonies; AII, BII e CII – Characteristics of the conidiophores; AIII, BIII e CIII – Characteristics of the conidia; AIV, BIV e CIV – Characteristics of the chain. A - <i>A. jacinthicola</i> , B - <i>A. gossypina</i> , C - <i>A. tomato</i> .	42
Figura 4 - Manchas em cladódios causadas por <i>A. jacinthicola</i> , <i>A. tomato</i> e <i>A. gossypina</i> , após 10 dias de incubação a 13, 17, 21, 25, 29 e 33 °C, em palma Miúda.	60
Figura 5 - Diâmetro das lesões em palma miúda causadas por <i>A. gossypina</i> (A), <i>A. jacinthicola</i> (B) e <i>A. tomato</i> (C) em diferentes temperaturas.	61
Figura 6 - Efeito de duas temperaturas simultâneas (17-33°C) no diâmetro das lesões causadas por <i>A. tomato</i> (A), <i>A. gossypina</i> (B) e <i>A. jacinthicola</i> (C) em câmara incubados do tipo BOD.	61
Figura 7 - Diâmetro das lesões em palma miúda causadas por <i>A. jacinthicola</i> (A), <i>A. tomato</i> (B) e <i>A. gossypina</i> (C) em duas temperaturas 17° e 33°C.	62
Figura 8 - Crescimento micelial de <i>A. gossypina</i> , <i>A. jacinthicola</i> e <i>A. tomato</i> , após 10 dias de incubação a 13, 17, 21, 25, 29 e 33 °C, em palma Miúda.	63
Figura 9 - Efeito de diferentes temperaturas no crescimento micelial das espécies <i>A. gossypina</i> (A), <i>A. jacinthicola</i> (B) e <i>A. tomato</i> (C).	63
Figura 10 – Diâmetro das lesões causadas por <i>A. gossypina</i> , <i>A. jacinthicola</i> e <i>A. tomato</i> em diferentes períodos de permanência em câmara úmida (12, 24, 36, 48 e 60) em palma miúda.	64
Figura 11 - Diâmetro das lesões em palma miúda causadas por <i>A. gossypina</i> (A), <i>A. jacinthicola</i> (B) e <i>A. tomato</i> (C) em diferentes períodos de câmara úmida.	65
Figura 12 - Genótipos de <i>N. cochenillifera</i> mantidos em casa de vegetação para realização do teste de resistência in vivo	65
Figura 13 - Diâmetro das lesões causadas por <i>A. gossypina</i> , <i>A. jacinthicola</i> e <i>A. tomato</i> em diferentes genótipos de palma miúda.	66
Figura 14 - Reação de genótipos de <i>N. cochenillifera</i> as espécies <i>A. tomato</i> (A), <i>A. gossypina</i> (B) e <i>A. jacinthicola</i> (C) in vivo em casa de vegetação.	67

LISTA DE TABELAS

Table 1- Description of the primers used to identify species belonging to the <i>Alternaria</i> genus.	34
Table 2: Isolates subjected to DNA analyses in this study, including details on culture collection and GenBank accessions.	35
Tabela 3. Teste de agressividade dos isolados de <i>A. gossypina</i> , <i>A. jacinthicola</i> e <i>A. tomato</i> obtidos no presente estudo causando mancha marrom em <i>N. cochenillifera</i> .	59
Tabela 4 - Diâmetro médios das lesões causadas por <i>A. tomato</i> (A), <i>A. gossypina</i> (B) e <i>A. jacinthicola</i> (C) em genótipos de <i>N. cochenillifera</i> .	67

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2- REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Cultura da Palma forrageira.....	13
2.2 Importância econômica.....	15
2.3 Mancha marrom.....	16
2.4 Gênero <i>Alternaria</i>	16
2.5 Sessão <i>Alternata</i>	18
2.6 Efeito da temperatura e umidade sobre a severidade de doenças.	19
REFERÊNCIAS	21
3 CAPÍTULO I: ESPÉCIES DE <i>Alternaria</i> ASSOCIADAS A MANCHA MARROM DA PALMA MIÚDA, <i>Nopalea cochenillifera</i>	28
Abstract.....	30
Introduction	31
Material and Methods.....	32
Results	37
Molecular characterization	38
Morphological and cultural characterization.....	41
Discussion.....	42
Acknowledgments.....	46
4 CAPÍTULO II: REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE PALMA MIÚDA E FEITO DA TEMPERATURA E UMIDADE SOBRE A MANCHA MARROM	53
RESUMO	54
4.1 INTRODUÇÃO	55
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.2.2 Efeito da temperatura na severidade da mancha marrom causadas por espécies de <i>Alternaria</i>	56
4.2.3 Efeito da temperatura no crescimento micelial.....	57
4.2.4 Efeito de Períodos de permanência em câmara úmida na severidade de mancha marrom causadas por espécies de <i>Alternaria</i>	57
4.3 RESULTADOS.....	59
4.3.2 Efeito da temperatura na severidade de manchas de cladódios.	59
4.3.3 Efeito da temperatura no crescimento micelial.....	62
4.3.4 Efeito de Períodos de permanência em câmara úmida na severidade de mancha marrom causadas por espécies de <i>Alternaria</i>	64

4.3.5 Reação de genótipos de palma miúda a mancha marrom causada por <i>Alternaria</i> spp.	65
4.4 DISCUSSÃO	69
4. 5 CONCLUSÃO	72
REFERENCIAS	73

1- INTRODUÇÃO GERAL

Nopalea cochenillifera (L.) é uma cactaceae, que se tornou o principal alimento para os animais durante longos períodos de estiagem nas regiões semiáridas do Brasil, devido ao seu elevado potencial de produzir forragem (VICTOR et al., 2017). A produção da cultura nos últimos anos, gira em torno de 3,5 milhões de toneladas, sendo a região nordeste responsável por grande parte das áreas de plantio no país, com a predominância de duas espécies: a gigante (*Opuntia ficus-indica*) e a miúda (*N. cochenillifera*) (IBGE, 2017; VICTOR et al., 2017), que tem grande preferência de cultivo, devido sua produtividade, palatibilidade e digestibilidade pelos animais, além de sua resistência a cochonilha do carmim. (Lopes et al. 2012). E apesar da adaptabilidade a climas quentes e secos, a palma miúda é acometida por doenças de origem fúngicas que podem comprometer seu potencial produtivo (SOUZA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; FLORES-FLORES et al., 2013; FEIJÓ, 2016).

Dentre as doenças, a mancha marrom é considerada uma das principais doenças da palma forrageira miúda. Foi relatada pela primeira vez em 2001, no estado de Pernambuco, e atualmente encontra-se distribuída na maioria das dos campos de cultivo. Os sintomas são caracterizados inicialmente por manchas de coloração marrom e preta nos cladódios, de forma circular, com esporulação na superfície da lesão, com 1 a 3cm de diâmetro, podendo se estender de uma face a outra do cladódio, resultando em perfurações devido à necrose do tecido infectado. As lesões podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas, e por conseguinte, causar queda dos cladódios da planta. (SWART, 2003; LIMA et al, 2011; SANTOS et al., 20012; BARBOSA et al., 2012; CONFORTO et al., 2016). A doença tem sido relata em diferentes países, possuindo etiologia controversa, mas no Brasil o gênero *Alternaria* tem sido frequentemente associado à doença (LIMA et al., 2011).

Espécies de *Alternaria* são conhecidos patógenos causadores de danos tanto no campo como em pós-colheita em uma ampla gama de hospedeiros, resultando em grandes perdas econômicas (GABRIEL et al., 2017). A identificação das espécies pertencentes a este gênero fúngico é de extrema importância para uma tomada de decisão de controle, de forma a minimizar essas perdas, no entanto, a elevada plasticidade morfológica do gênero, que apresentam consideráveis variações sob diferentes ambientes e condições de cultivo, tornam difícil a identificação das espécies baseada apenas em suas estruturas reprodutivas (ZHENG et al., 2017), tornando necessário o uso de técnicas moleculares para este fim (LAWRENCE et al., 2013).

Além da dificuldade na identificação das espécies, o gênero *Alternaria* ainda pode ter sua taxa de desenvolvimento e patogenicidade influenciadas por fatores ambientais como temperatura, precipitação e umidade, interferindo diretamente no início e no progresso da doença. A temperatura influencia diretamente no crescimento micelial e germinação dos esporos, interagindo com outros fatores como a duração da umidade superficial, que apresenta relação direta com a infecção e crescimento do patógeno, sendo indispensável para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, afetando diretamente a incidência e severidade da doença. O conhecimento sobre a sensibilidade e as condições necessárias para o seu desenvolvimento, são fundamentais para determinação do manejo adequado para a cultura afetada.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar espécies de *Alternaria* associadas a mancha marrom da palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) no Nordeste brasileiro e avaliar o efeito da temperatura, umidade e resistência de genótipos do hospedeiro a espécies de *Alternaria*.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da Palma forrageira

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), pertence a Divisão Embryophyta, Sub-divisão Angiospermea, Classe Dicotyledoneae, Sub-classe Archiclamideae, Ordem Opuntiales e família Cactaceae, que engloba aproximadamente 178 gêneros e cerca de 2000 espécies (SILVA e SANTOS, 2006), sendo os gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, os mais utilizados como plantas forrageiras no mundo (PADILHA JUNIOR et al., 2016).

A cultura é originária do México (SANGLARD, MELO, 2015) e foi introduzida no Brasil pelos portugueses no século XIX, no estado de Pernambuco, como planta hospedeira da Cochonilha do Carmim [*Dactylopius coccus* Costa (Homóptera, Dactylopiidae)], visando a produção do corante carmim, que na época apresentava grande valor comercial (ARAÚJO et al., 2005; NUNES, 2011). Porém, o cultivo e produção não apresentaram muito sucesso, levando assim ao uso da palma como planta ornamental, na decoração de diferentes ambientes (SANTOS et al., 2006).

Somente no século XX, mais especificamente no ano de 1932, a cultura despertou interesse como planta forrageira, sendo introduzida e disseminada nas regiões semiáridas do nordeste brasileiro, através do primeiro programa governamental de difusão da cultura da palma forrageira, englobando todos os estados, desde o Piauí à Bahia (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe) (LIMA et al., 2001).

As regiões semiáridas representam em torno de 18% do território mundial e são áreas caracterizadas por irregularidades e baixas precipitações, unidos a elevados períodos de seca (SUDENE, 2017). São regiões que também englobam pequenos agricultores, no âmbito da agricultura familiar. Devido a essas características, a manutenção da alimentação dos rebanhos, mais especificamente a produção de forragens e grãos são comprometidas. Portanto, o uso de recursos alimentares alternativos, não convencionais, disponíveis e adaptados a essas áreas, pode ser a melhor opção para garantir a viabilidade dos rebanhos nessas regiões suscetíveis à seca e reduzir os custos na produção (URBANO et al., 2016).

Com isso, a palma forrageira se tornou uma excelente opção de cultivo nessas regiões devido a sua fisiologia. A cultura apresenta como característica principal, a adaptação fisiológica, conhecida como metabolismo fotossintético CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), isso faz com que a planta, fixe melhor CO₂ durante a noite, quando as taxas de evaporação são mais lentas, a partir da abertura dos estômatos, reduzindo a perda de água para o ambiente durante a

fotossíntese. Além do metabolismo CAM, a palma apresenta em seu sistema radicular uma rede de raízes finas próximas da camada superficial do solo, que absorvem de maneira mais eficiente a água de chuvas, mesmo leves e orvalhos, favorecendo seu cultivo nessas regiões (CAVALCANTE et al., 2014). (SANTOS et al., 2010). Para fins forrageiro, existe a predominância de três espécies no Brasil, sendo eles: a palma Gigante, a Redonda e principalmente a palma Miúda (SEAGRI, 2018).

Opuntia ficus-indica, cultivar gigante, também conhecida popularmente como Graúda, apresenta porte médio, caule ereto, com poucas ramificações. Os cladódios são grandes, por isso o nome gigante, seu peso varia de 1,0 a 2,0 kg com aproximadamente 40 a 50 cm de comprimento. As flores são hermafroditas de coloração amarelada, o fruto é uma baga ovoide com a coloração variando entre o amarelo e o roxo quando maduro. É uma cultivar que tem como característica a resistência à seca e elevada produtividade, por outro lado, o seu valor nutricional é mais baixo em relação as outras cultivares, tornando assim a aceitabilidade aos animais menor comparada as outras (SANTOS et al., 1997; FARIAS et al., 2005; SILVA; SANTOS, 2006).

A cultivar redonda (*Opuntia* sp.), conhecida como orelha de onça, é originária da palma gigante. É uma planta de porte médio, com o caule bastante ramificado lateralmente. Os cladódios apresentam um formato ovoide e arredondado, pesando em média 1,8 a 2,0 kg e com cerca de 4,0 cm de comprimento. É uma cultivar que apresenta elevada resistência a seca, alto rendimento de produtividade e boa aceitação para os animais, em relação a cultivar gigante, porém é uma cultivar que apresenta suscetibilidade à cochonilha-do-carmim, desfavorecendo assim o plantio (SILVA; SANTOS, 2006; VASCONCELOS et al., 2007; LOPES et al., 2012).

A palma forrageira miúda, também chamada de doce (*Nopalea cochenilifera*), é uma espécie arbustiva, que apresenta porte reduzido, caule bem ramificado, cladódios com forma obviada, pesando cerca de 350 g e 25 cm de comprimento. Tem como características flores de cor vermelhas e frutos do tipo baga, com coloração variando do vermelho ao roxo. Quando comparada com as cultivares gigante e redonda, a palma miúda mostra-se mais nutritiva e palatável para os animais, por outro lado, é menos resistência à longos períodos seca. (NEVES et al., 2010; GUSHA et al., 2013). Apresenta uma maior exigência quanto a fertilidade do solo, adubação, umidade e temperaturas mais amenas no período noturno. Com relação a produção de matéria seca é superior a palma gigante e redonda. O destaque da palma miúda em relação as outras cultivares, é a resistência a cochonilha-do-carmim (SANTOS et al., 1990; ALBUQUERQUE, 2000; SANTOS et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2009).

Existem atualmente no Brasil, dois bancos de germoplasma de palma. Um banco está localizado na Estação Experimental de Arcoverde - Pernambuco, na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), com aproximadamente 1400 acessos, onde, cerca de 200 destes acessos foram oriundos do México, África do Sul, Argélia, EUA e Chile. O segundo é em Alagoas, no município de Santana do Ipanema, administrado pela Secretaria de Agricultura e pecuária, possuindo cerca de 40 acessos, divididos entre os gêneros *Opuntia* e *Nopalea*. SANTOS et al., 2006).

2.2 Importância econômica

O Brasil possui uma produção média de 3.5 bilhões de toneladas de palma forrageira, produzidas em aproximadamente 126.000 propriedades, distribuídas nas regiões semiáridas dos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Rio Grande do Norte, Ceará e Minas Gerais (IBGE, 2017).

A palma forrageira apresenta níveis de produtividade de 6,5 a 17,5 toneladas de matéria seca (MS) / ha a cada dois anos após o plantio, que podem variar para mais ou para menos de acordo com a variedade, a densidade média de plantas e níveis de adubação (AMORIM et al. 2015; SOUZA et al., 2017). Atualmente, pode custar cerca de US \$ 130,0 / ton MS para o produtor, o que torna a utilização da cultura, muito mais vantajosa, quando comparada a outros tipos de culturas forrageiras, como por exemplo silagem de milho pode chegar a custar US \$ 270 / ton MS (SIQUEIRA et al., 2017)

Além de servir como planta forrageira, A Organização das Nações Unidas (ONU) reconhece o valor econômico da Palma Forrageira (CÂNDIDO FILHO et al., 2014), considerando a cultura como uma alternativa nutricional economicamente viável (DANTAS et al., 2017) podendo contribuir no combate à fome, por meio de sua agência dedicada à alimentação humana, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). A cultura oferece uma ampla gama de usos, incluindo seus frutos, a polpa, sucos, doces e vitaminas (BARBOSA et al., 2009). CÂNDIDO FILHO et al., 2014; SHETTY, 2012; CASTRO et al., 2011;

O cultivo da palma, pode ser alavancada a negócios com elevado valor agregado, como os relacionados à indústria farmacêutica de medicamentos destinados ao tratamento de doenças importantes, que atingem expressivas parcelas da população mundial, como gastrite, hiperglicemia e diabetes (CÂNDIDO FILHO et al., 2014 DIAZ et al., 2017). Outra área de grande importância em nível mundial, diz respeito à sustentabilidade socioambiental. O uso da palma forrageira tem sido amplamente estudado no âmbito da recuperação e conservação de solos, elevando o seu valor

potencial em iniciativas dedicadas à sustentabilidade, envolvendo proteção e conservação do meio ambiente. Que são assuntos bastante relevantes na atualidade (ROCHA, 2012).

Apesar de estudos e pesquisas mostrarem que a cultura apresenta rusticidade, adaptabilidade a diferentes ambientes e elevado aumento na produtividade com o uso de um manejo adequado para a cultura, verifica-se no campo uma queda na produção, em função de danos provocados por pragas e principalmente pela ocorrência de doenças nos cladódios, como a mancha marrom (SOUZA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012).

2.3 Mancha marrom

A mancha marrom (Cladode Brown Spot - CBS) conhecida anteriormente no Brasil como mancha de *Alternaria*, foi relatada pela primeira em 2001, no município de São Bento do Una, Pernambuco, causando sérios problemas para a cultura, e desde então existem relatos de ocorrência desta doença, com incidência de 70 % na maioria das áreas de cultivo (LIMA et al., 2011; BARBOSA et al., 2007). Os sintomas da doença caracterizam-se por manchas de coloração marrom e preta nos cladódios, de formas circulares ou elípticas, medindo cerca 1,0-3,0cm de diâmetro. As lesões podem se estender de uma face a outra do cladódio, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e causando queda dos cladódios (SWART; SWART, 2003; SANTOS et al., 2006).

O principal agente etiológico da doença era até então *Alternaria tenuissima* (Nees et T. Nees). Sendo a maioria dos relatos da doença associadas a essa espécie, caracterizada com base apenas na sintomatologia, morfologia ou sequencias parciais da região ITS (LIMA et al., 2001), o que pode não permitir uma precisa identificação das espécies associadas a doença (HYDE 2014). Recentemente um estudo realizado por Conforto et al., (2019) relatou as espécies *Alternaria longipes* e *A. tenuissima*, associadas a mancha marrom da palma miúda, o que torna a identificação com base em análises multilocus necessária para estudos mais completos e com maior confiabilidade acerca da etiologia da mancha marrom da palma miúda.

2.4 Gênero *Alternaria*

O gênero *Alternaria* (Família: Pleosporaceae, Ordem: Pleosporales, Classe: Dothideomycetes, Filo: Ascomycota), foi inicialmente descrito por Nees (1816) baseado apenas em uma única espécie, *A. tenuis*. Von Keissler (1912) em estudos posteriores

descreveu *Alternaria alternata*, como sinônimo de *A. tenuis* devido a ambiguidades na descrição inicial. Posteriores descrições, re-descrições e critérios revisados dentro do gênero resultaram em um número cada vez mais crescente de novas espécies (SACCARDO 1886; ELLIOT 1917; WILTSHIRE 1933; JOLY 1964).

Alternaria é um gênero fúngico, que representa um dos grupos mais importantes de fungos hifomicetos, é considerado cosmopolita e onipresente, incluindo espécies saprófitas , endofíticas e patogênicas, que estão associadas a diferentes substratos, como materiais vegetais (plantas e sementes), alimentos, solo, restos culturais em decomposição e atmosfera, devido à sua elevada capacidade de adaptação e sobrevivência em diferentes condições ambientais (AUST et al., 1980). São espécies conhecidas como patógenos vegetais bastante agressivos, causando graves problemas a uma ampla variedade de culturas de importância econômica, tanto em campo como no período de pós colheita. (GABRIEL et al., 2017; SICILIANO et al., 2018).

As espécies têm como características a produção de conídios multicelulares pigmentados, tipicamente dictiósporos, fragmósporos e catenulados, com formatos variando entre ovóides, obovóides, cilíndricos e elipsóides, com ou sem bico, de coloração marrom claro a marrom escuro. Micélio aéreo cottonoso, com colônias efusas, geralmente de coloração cinza, esverdeadas, marrom claro a marrom escura e pretas. Hifas incolores e de coloração amarronzada. Conidióforos macronematosos, mononematosos, simples ou ramificados, com uma coloração marrom, únicos ou fasciculados (INDERBITZIN et al., 2006; SIMMONS 2007; PRYOR et al., 2009; LAWRENCE et al., 2014).

A taxonomia de *Alternaria* durante muito tempo foi uma questão bastante controversa, feita com base apenas em caracteres morfológicos. As características eram utilizadas para classificar as espécies dentro do gênero, definindo grupos distintos, como grupos de táxons que produzem padrões de esporulação semelhantes e elevado grau de similaridade nas características de conídios, sendo divididos inicialmente em dois grandes grupos: um grupo de espécies que produziam pequenos conídios, e outro que produzia grandes conídios. (Simmons, 1967,1971,1989, 1992 e 2007). Porém, a utilização apenas esse tipo abordagem, mostrou não ser altamente eficaz para identificação, devido a plasticidade dessas características, com variações consideráveis sob diferentes ambientes e condições de cultivo, e também devido ao elevado nível de similaridade entre algumas espécies, que causou um processo contínuo de revisão taxonômica. (MISAGHI et al. 1978; ANDREW et al., 2009; ZHENG et al., 2017). O que levou a inclusão de dados moleculares para elucidação da taxonomia de *Alternaria* (LAUWRENCE et al., 2015)

Métodos moleculares, baseados em análises de sequências de DNA são capazes de esclarecer a identidade de espécies, a variabilidade intraespecífica de isolados e as relações filogenéticas entre eles. Tais análises são consideradas métodos seguros rápidos e eficientes na investigação de identidade de organismos (MERGULHÃO et al., 2014). A primeira análise molecular dentro do gênero *Alternaria* e outros gêneros de hifomicetes, foi realizada por Pryor e Gilbertson (2000), com base apenas na análise do espaçador interno transcrito (ITS) que forneceu apoio aos grupos morfológicos de espécies descritos anteriormente.

Estudos evolutivos posteriores revelaram que devido a elevada taxa de variabilidade dentro do gênero, são necessárias a utilização de mais de uma região genômica. De acordo com a literatura, os autores citam as regiões ITS-rDNA e os genes CAL, ATPase, GAPDH, ALT a 1, RPB2 e TEF1-alpha como sendo os marcadores moleculares utilizados para auxiliar na identificação deste gênero. De acordo com estudos moleculares, as espécies de *Alternaria* são divididas em grupos chamados de Sessões. Que são definidos como um grupo de espécies que compartilham um elevado grau de caracteres morfológicos e que se agrupam como grupos monofiléticos fortemente suportados, baseados em análises filogenéticas, utilizando dados de sequências de DNA. Atualmente, 26 sessões de *Alternaria* são reconhecidas com base em dados moleculares e morfológicos.

2.5 Sessão *Alternata*

A sessão *Alternata*, contém a maioria das espécies de esporos-pequenos, englobando importantes patógenos vegetais, e a espécie tipo *Alternaria alternata* (LAWRENCE et al., 2013; WOUDENBERG et al., 2013; Woudenberg et al., 2014; GRUM-GRZHIMAYLO et al., 2016). Lawrence et al. (2013), nomeou a sessão como *Alternaria* por incluir a espécie tipo para o gênero *A. alternata*. Em outro estudo Woudenberg et al. (2013) geraram uma variante ortográfica para a sessão, 'sessão *Alternaria*', que é contrária às regras do ICBN, onde recomendam que o nome da sessão que contém as espécies-tipo deve ser repetido o nome genérico inalterado (LAWRENCE et al., 2015). A sessão é composta por cerca de 60 espécies, incluindo importantes patógenos vegetais e de pós colheita, como as espécies *A. alternata*, *A. gaisen*, *A. longipes* e *A. mali* (ROTEM 1994; COATES & JOHNSON 1997).

As espécies inicialmente eram descritas com base na morfologia, os conidióforos primários variam entre curtos a muito longos, retos ou curvos, podendo ser simples ou ramificados, os conídios apresentam-se em cadeias moderadamente longas, simples ou ramificadas, com formatos elipsoides, que variam entre 20 a 35 (60) × 8 a 12 µm, com a presença de septos transversais e

longitudinais. A maioria dos conídios se estreita gradualmente em um bico apical cônico (LAWRENCE et al., 2015).

As espécies que compõe essa sessão apresentam variações moleculares mínima entre elas. As regiões genéticas padrão usadas para a delimitação de espécies de *Alternaria* não são capazes de delinear as espécies da sessão *Alternata* (PEEVER et al., 2004 , ANDREW et al., 2009), sendo necessário o uso de métodos moleculares para correta taxonomia das espécies, como o sequenciamento do genoma completo para definição de genes que possam distinguir as espécies que compõe a sessão, como os genes ATPase, calmodulin e Alt a 1 (LAWRENCE et al., 2013).

2.6 Efeito da temperatura e umidade sobre a severidade de doenças.

Fatores ambientais desempenham papéis importantes no desenvolvimento epidemiológico de doenças de plantas. O conhecimento de condições favoráveis aos fitopatógenos, o estágio fenológico em que o hospedeiro se torna mais suscetível, a faixa de temperatura e umidade ótima para o estabelecimento da doença é imprescindível para compreender a interação patógeno-hospedeiro. As relações e variações desses fatores ambientais possibilitam tanto a determinação da distribuição geográfica, como a incidência e a severidade da doença (DODD et al., 1992; BORGES NETO et al., 2000; ANDRADE et al., 2007)

Diversos autores, observaram que o efeito da temperatura, a precipitação e umidade, podem influenciar diretamente a taxa de desenvolvimento e a patogenicidade dos agentes infecciosos, principalmente os de origem fúngicas, interferindo diretamente no início e no progresso direto das doenças (WILSON 1990; SILVA 2001; LEITE et al., 2002; LIMA FILHO 2003; CUTRIM et al., 2004; KOČMÁNKOVÁ et al. 2009; MBOUP et al., 2012; MC CALLUM et al., 2016; MORAIS et al., 2016).

A temperatura interage com outros fatores, como umidade na superfície das folhas, umidade no ambiente, luz ou microbiota competidora (ROYLE; BUTLER, 1986), influenciando no crescimento micelial, na esporulação, aumentando ou diminuindo a taxa de germinação dos esporos e coloração das colônias. Esses fatores muitas vezes são utilizados para identificação de espécies, o que pode acarretar em erros acerca da taxonomia. (MAIA et al., 2011). Em regiões com temperaturas elevadas, a viabilidade dos esporos e a formação de lesões são reduzidas, culminando com a redução no progresso da doença (TANAKA, 1995).

A duração da umidade superficial, no entanto, aparenta ter relação mais direta com a germinação, infecção e crescimento do patógeno no hospedeiro. A umidade é indispensável para

a germinação da maioria dos esporos fúngicos e para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade, possibilitando a ocorrência de doenças (ARINZE, 1986).

O efeito do clima no progresso da doença torna-se aparente quando se considera a importância da época do ano, isto é, as condições climáticas e o estágio de crescimento das plantas, quando o hospedeiro e o patógeno podem coexistir, a duração e a frequência de temperatura e pluviosidade favorável, o tempo de aparecimento dos vetores e a duração do ciclo de infecção de uma doença em particular (KENAGA, 1994). As mudanças no clima podem produzir impactos significativos sobre os problemas fitossanitários, alterando a distribuição geográfica e temporal dos patógenos (GHINI et al., 2011). Informações que correlacionam a ocorrência de infecção com a presença e concentração do inóculo e variáveis climáticas como temperatura e molhamento foliar são base para geração de ferramentas de manejo que visem alertar sobre a possibilidade de epidemias e reduzir o número de aplicação de fungicidas nas culturas (BROOME et al., 1995; SHTIENBERG et al., 1997; CARISSE et al., 2008).

Outro ponto importante é a relação de dependência entre temperatura e período de umidade com a percentagem de doença, estabelecida sob condições controladas, que nem sempre pode ser observada no campo. Isto ocorre especialmente por causa das variações de temperatura e umidade nas lavouras, além disto, também existem variáveis no campo que não estão presentes em estudos com condições controladas, como plantas em estágios de maturação e em condições fisiológicas diferentes (BIALE, 1950).

O conhecimento sobre o processo de infecção e colonização de *Alternaria* e os fatores ambientais que influenciam este processo, são pré-requisitos para o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes e no desenvolvimento de sistemas de prevenção de doenças (FRAISSE et al., 2006; SOARES et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Califórnia: Elsevier Academic Press. 5. ed, 952p. 2005.
- ALBUQUERQUE, S. G. de Cultivo da palma forrageira no Sertão do São Francisco. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 6 p. 2000.
- ANDRADE, G.C.G et al. Características culturais e severidade da mancha foliar de *Quambalaria eucalypti* sob diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.32, n.4, p.329-334, 2007.
- AMORIM, P.L, et al. Morphological and productive characterization of forage cactus varieties. **Revista Caatinga**. Sep;28(3): p. 230-8. 2015.
- ANDREW, M. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. **Mycologia**. 101 (1), 95–109. 2009.
- ARAÚJO, L. F. et al. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 9, n. 3, p. 379-384, 2005.
- ARINZE, A.E. Post-harvest diseases of tomato fruits in Southern Nigeria. **Journal Fitopatologia Brasileira**. v. 11, n. 3, p. 637 – 645. 1986.
- AUST, H.J et al. Flexibility of plant pathogens in exploiting ecological and biotic conditions in the development of epidemics. In: Palti, J., Kranz, J. (Eds.), **Comparative Epidemiology**. Pudoc, Wageningen, pp. 46–56. 1980.
- BARBOSA, R. S. Doenças da Palma in E. B. Lopes (Ed.), *Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino* p. 47–56. 2007
- BARBOSA, R. S. et al. Doenças da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) *Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino*. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 81 – 98, 2012.
- BIALE, J. B. Postharvest physiology and biochemistry of fruits. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 1, p. 183-206, 1950.
- BORGES NETO, C.R. et al. Influência da idade da plante, período de molhamento de umidificação e concentração do inóculo no desenvolvimento de sintomas provocados por *Cercospora caricis* em tiririca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.2, p.138-142, 2000.
- BROOME, J.C. Development of an infection model for *Botrytis bunch* rot of grapes based on wetness duration and temperature. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.1, p.97-102, 1995.
- CÂNDIDO FILHO, A.; PEREIRA, F.; LIMA, A. Base alimentar humana com o uso da palma forrageira. VI Simpósio de Reforma Agrária e Questões Rurais. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2014.

- CARISSE, O. et al. Spatiotemporal relationships between disease development and airborne inoculum in unmanaged and managed Botrytis leaf blight epidemics. **Phytopathology**, St. Paul, v.98, n.1, p.38-44, 2008.
- Castro, P.; Silva, T.; Oliveira, C. Utilização do fruto da palma forrageira na alimentação humana: fabricação de geleia. III Mostra de Iniciação Científica. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Guanambi, 2011.
- CAVALCANTE, L.A.D. et al. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.44, n.4, p.424-433, 2014.
- CONFORTO, C. et al. First Report of Cladode Brown Spot in Cactus Prickly Pear Caused by *Neofusicoccum batangarum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p.1238, 2016.
- CONFORTO, C et al. First report of *Colletotrichum siamense* and *C. fructicola* causing cladode brown spot in *Nopalea cochenillifera* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**. 99, 812. 2017.
- CONFORTO C, et al. Characterization of fungal species associated with cladode brown spot on *Nopalea cochenillifera* in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**. Dec 1;155(4):1179-94. 2019.
- CUTRIM, F. A. Caracterização fisiológica de *Penicillium sclerotigenum* e influência da temperatura e período de molhamento sobre a podridão verde do inhame.. 71f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade/Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2004.
- DANTAS, S. F. A.; LIMA, G. F. C.; MOTA, E. P. Viabilidade econômica da produção de palma forrageira irrigada e adensada no semiárido potiguar. **Revista IPECEGE**, v. 3, n. 1, p. 59-74, 2017.
- DIAZ, M.; ROSA, A.; TOUSSAINT, C.; GUERAUD, F.; SALVAYRE, A. Opuntia spp: characterization and benefits in chronic diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-17.
- DODD, J. C., Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. In: BAILEY, J. A., JEGER, M. J. (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, p.308-325. 1992
- FEIJÓ, F. M. et al. First report of cladode and foot rots caused by *Pythium aphanidermatum* on cactus (*Nopalea cochenillifera*). **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1797-1797, 2016.
- ELLIOT, J.A. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. Press of the New era printing company; 1916.
- FRAISSE, C. W., et al. AgClimate: a climate forecast information system for agricultural risk management in the southeastern USA. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 53, n. 1, p. 13-27, 2006
- FLORES-FLORES, R. et al. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. **Journal of phytopathology**, v. 161, n. 7-8, p. 544-552, 2013.

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Agropecuário 2017. Disponível em:
https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html.
 Acesso: abril de 2018.

GABRIEL, M. F. et al. The major *Alternaria alternata* allergen, Alt a 1: A reliable and specific marker of fungal contamination in citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, Vitoria, v. 257, n. 18, p. 26-30. 2017.

GHINI, R. et al. Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives. **Plant Pathology**, v.60, p.122–32. 2011.

GRUM-GRZHIMAYLO, A.A et al. On the diversity of fungi from soda soils. **Fungal diversity**. Jan 1;76(1):27-74. 2016

GUSHA, J.; et al. Nutritional composition and effective degradability of four forage trees grown for protein supplementation. **Online Journal of Animal Feed Research**, v. 3, n. 4, p. 170-175, 2013.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21-125, 2014.

INDERBITZIN, P. et al. Lateral transfer of mating system in *Stemphylium*. Proceedings of the National Academy of Sciences. Aug 9;102(32):11390-5. 2005

JOLY P. Le genre *Alternaria*; recherches physiologiques, biologiques et systematiques. 1964.

KENAGA, C. B. Plant disease concept, definitions, symptoms and classification. In: KENAGA, C. B. Principles of phytopathology. 2nd ed., **Balt Publishers**, p.12-31. 1994.

KOCMÁNKOVÁ E. et al. Impact of climate change on the occurrence and activity of harmful organisms. **Plant Protection Science**. 45(Special Issue). 2009;

LAWRENCE, C.B. et al. At Deaths Door: *Alternaria* Pathogenicity Mechanisms. **The Plant Pathology Journal**. 24(2):101-11. 2008;

LAWRENCE, D.P. et al. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. **Mycologia**. May 1;105(3):530-46. 2013.

LEITE, R.M.V.B.C.; Amorim. L. Influência da temperatura e do período de molhamento no monociclo da mancha de *Alternaria* em girassol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.2, p.193-2000, 2002.

LIMA FILHO, R.M. Caracterização isoenzimática, inoculações cruzadas de *Colletotrichum* e influência da temperatura no desenvolvimento da antracnose em maracujá. 54f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade/Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2003.

LIMA, I. M. M.; GAMA, N. S. Registro de plantas hospedeiras (cactaceae) e de nova forma de disseminação de *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemiptera: Diaspididae), cochonilha da palma forrageira, nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 479 – 481, 2001

LIMA, G. S. A. et al. Development and validation of a standard area diagram set for assesment of *Alternaria* Spot on cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 691- 695, 2011.

LOPES, E. B. et al. Cultivo da Palma Forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. João Pessoa: EMEPA/FAEPA. 2012. p. 21 – 60.

MAIA FG, et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum spp.* isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**. 27(2). 2011.

MBOUP M. et al. Genetic structure and local adaptation of European wheat yellow rust populations: the role of temperature-specific adaptation. **Evolutionary Applications**. Jun;5(4):341-52. 2012.

MCCALLUM BD, et al. A review of wheat leaf rust research and the development of resistant cultivars in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**. Jan 2;38(1):1-8. 2016.

MISAGHI, I.J. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 68, 29–34. 1978.

MORAIS D, Sache I, Suffert F, Laval V. Is the onset of septoria tritici blotch epidemics related to the local pool of ascospores?. **Plant Pathology**. Feb;65(2):250-60. 2016.

NEVES, A. L. A.; PEREIRA, L. G. R.; SANTOS, R. D.; VOLTOLINI, T. V.; ARAÚJO, G. G. L. de; MORAES, S. A. de; ARAGÃO, A. S. L.; COSTA, C. T. F. Plantio e uso da palma forrageira na alimentação de bovinos no semiárido brasileiro. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010.

NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 1, p. 58-66, 2011.

Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Global report on food crises 2017. Disponível em: . Acesso em: 03 abril. 2019.

PADILHA JUNIOR, M. C.; DONATO, S. L. R.; SILVA, J. A.; DONATO, P. E. R.; SOUZA, E. S. Características morfométricas e rendimento da palma forrageira „Gigante“ sob diferentes adubações e configurações de plantio. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 11, n. 1, p. 67-72, 2016.

PRYOR, B.M, GILBERTSON, R.L. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. **Mycological Research**. Nov 1;104(11):1312-21. 2000.

PRYOR, B.M. et al. *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. **Botany**. Feb;87(2):178-94. 2009.

ROCHA, J. E. S. Palma forrageira no Brasil: o estado da arte. EMBRAPA Caprinos e Ovinos. (Documentos, 106).. p40. 2012.

ROYLE, D. J., BUTLER, D. R., 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, p.139-156. 1986.

SACCARDO, P.A. Sylloge Fungorum vol. 4. Padova, Italy. 1886.

SALEM, H.; SMITH, T. Feeding strategies to increase small ruminant production in dry environments. *Small ruminant research*. Jul 1;77(2-3):174-94. 2008.

SANTOS, D. C. et al. Desempenho produtivo de vacas 5/8 holando/zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 1, p. 12 – 17, 2001.

SANTOS, D. C. et al. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: IPA, 48p. (IPA, Documento 30). 2006.

SANTOS, D. C. E. et al. Usos e aplicações da palma forrageira. In: LOPES, E. B. (Ed.) **Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 99 - 150, 2012.

SANTOS, M. V. F. et al. Estudo comparativo de cultivares de palma forrageira “Gigante”, “Redonda” (*Opuntia ficus-indica* Mill) e “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) na produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 19, n. 6, p. 504 – 511, 1990.

SANTOS, M. V. F. et al. Estudo comparativo de cultivares de palma forrageira “Gigante”, “Redonda” (*Opuntia ficus-indica* Mill) e “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) na produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 19, n. 6, p. 504 – 511, 1997.

SECRETARIA DA AGRICULTURA DO ESTADO DE ALAGOAS (SEAGRI). Disponível em > www.agricultura.al.gov.br. Acessado em: novembro de 2018.

SICILIANO, I. et al. Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic *Alternaria* species isolated from basil. **Food Microbiology**, v. 73, p. 264-274. 2018.

SILVA, S.R. et al. Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, p.726-731, 2001.

SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. *Revista Electrónica de Veterinária REDVET*, v. 7, n. 10, p. 1-13, Out. 2006. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006/100609.pdf>>. Acesso em: 10 de dez. 2019.

SIMMONS E.G. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. **Mycologia**. Jan 1;59(1):67-92, 1967.

SIMMONS E.G. *Helminthosporium allii* as type of a new genus. **Mycologia**. Mar 1;63(2):380-6, 1971.

SIMMONS E.G. *Macrospora Fuckel* (Pleosporales) and related anamorphs. **Sydowia**.;41:314-29, 1989

SIMMONS E.G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. *Alternaria biology, Plant diseases and metabolites*.1-35. 1992.

SIMMONS, E.G. *Alternaria: An Identification Manual*. 2007.

SIQUEIRA, M.C. The use of spineless cactus in the diets of cattle: Total and partial digestibility, fiber dynamics and ruminal parameters. *Animal feed science and technology*. p. 56-64. 2017.

SHETTY, A. Cactus: a medicinal food. *Journal of Food Science & Technology*, v. 49, n. 5, p. 530-536. 2012

SHTIENBERG, D.; Elad, Y. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n.3, p.332–340, 1997.

SOARES, A. R. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e periodo de molhamento. *Tropical Plant Patology*, v.33, n.4, p.265- 272, 2008.

SOUZA, A. E. F. et al. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. *Revista Biotemas*, v. 23, n. 3, p. 11 – 20, 2010.

SOUZA, T. C. Productivity and nutrient concentration in spineless cactus under different fertilizations and plant densities. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 12(4):p. 555-60.2017.

SUDENE. Ministério do Desenvolvimento Regional. 2017. Disponível em: <http://www.sudene.gov.br/planejamento-regional/delimitacao-do-semiarido>. Acesso em 03 de fev. 2019.

SWART, W. J.; SWART, V. R. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South Africa. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. v. 15, p. 115 – 120. 2003.

TANAKA, M. A. S. Transmissão planta-semente e semente-plântula do agente causal da ramulose do algodoeiro. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.) **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**, p.171-178, 1995

VAN ZINDEREN BAKKER, E.M. *Cercospora scirpicola* (Sacc.) nov. comb. *Revue de Mycologi*. 1940;5:64-9. 1940

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife*, v. 2, n. 1, p. 28-31, 2007.

VASCONCELOS, A. G. V.; LIRA, M. A.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; SANTOS, M. V. F. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha do carmim (*Dactylopius ceylonicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 5, p. 827-831, 2009.

VICTOR, M.M., et al. First use of cactus and cushcush as biocatalysts in the enantioselective reduction of β -keto esters. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 126-131. doi:10.1016/j.indcrop.2016.11.048. 2017.

VIVAS, M. et al. Resistance to multiple foliar diseases in papaya genotypes in Brazil. **Crop Protection**, [s.l.], v. 71, p.138-143. 2015

URBANO, S.A. et al. Gérmen integral de milho em substituição ao milho na dieta de ovinos santa inês: características de carcaça e composição tecidual. **Acta Veterinaria Brasilica**. May 31;10(2):165-71. 2016.

SILVA, S.R. et al. Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, p.726-731, 2001.

WILTSHIRE, S.P. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. **Transactions of the British Mycological Society**. Nov 8;18(2):135-IN3. 1933.

WOUDENBERG, J.H et al. *Alternaria* redefined. *Studies in mycology* Jun 1;75:171-212. 2013

WOUDENBERG, J.H. et al. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. **Studies in mycology**. Sep 1;79:1-47. 2014

ZHENG, Li et al. Identification of a Novel *Alternaria alternata* Strain Able to Hyperparasitize *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-10. 2017

3 CAPÍTULO I: ESPÉCIES DE *Alternaria* ASSOCIADAS A MANCHA MARROM DA PALMA MIÚDA, *Nopalea cochenillifera*

Alternaria species associated with cladode brown spot in cactus prickly pear (*Nopalea cochenillifera*).

Nayana Bruschi Infante¹; Gilberlan Costa Santos da Silva¹; Frederico Monteiro Feijó¹; Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva¹; Iraildes Pereira Assunção¹; Gaus Silvestre de Andrade Lima¹.

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Br 104, km 85 Norte, Rio Largo, AL 57100-000, Brasil; frederico.agro2004@gmail.com (82) 988522269.

Abstract

Brown spot is the most important disease for the culture of cactus prickly pear (*Nopalea cochenillifera* (L) Salm-Dyck; Cactaceae family), and in many countries, *Alternaria* spp. are commonly associated with the disease. In Brazil, only three species of *Alternaria* are associated with brown spot: *A. alternata*, *A. tenuissima*, and *A. longipes*. However, other *Alternaria* spp. may be involved in the etiology of the disease. This study aimed to identify *Alternaria* species associated with prickly pear brown spot in Northeast Brazil. Cladodes presenting symptoms of brown spot were collected from three counties in the state of Alagoas and three in the state of Pernambuco. Isolation, obtaining monosporic cultures, and pathogenicity tests were performed. For correct taxonomic positioning of the isolates, morphological and molecular analyses were performed using the internal transcribed spacer (ITS) region and the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*), *Alternaria* major allergen (*Alt a1*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*), and second largest subunit of RNA polymerase (*rpb2*). Fourteen pathogenic isolates were obtained, and according to the morphological and molecular analyses, three species of *Alternaria* were identified: *A. gossypina*, *A. jacinthicola*, and *A. tomato*, all belonging to the *Alternata* section. *A. gossypina*, *A. jacinthicola*, and *A. tomato* are described for the first time in *Nopalea cochenillifera* worldwide.

Keywords: Cactus, Fungal Diseases, Pleosporaceae, Multilocus Analyses.

Introduction

Brown spot is the main disease of the cactus prickly pear (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck; Cactaceae family) in Brazil. It is characterized by brown to black spots, circular in shape, which may coalesce to form large necrotic areas and cause perforations due to the fall of infected tissue (Conforto et al. 2019).

Currently, brown spot is predominantly reported in the Northeast region, with greater frequency in the main producing regions in the states of Alagoas and Pernambuco, where cactus prickly pear culture is of high economic importance (Santos et al. 2001; Souza et al. 2010; Lima et al. 2011; Barbosa et al. 2012; Silva et al. 2014).

The disease, initially named *Alternaria* spot, was reported for the first time in the city of São Bento do Una in the state of Pernambuco, Brazil, and was attributed to *A. alternata*. Since, *A. tenuissima* and *A. longipes* have also been identified as causing brown spot (Lima et al. 2011; Conforto et al. 2019).

The *Alternaria* genus is distributed worldwide, with saprophytic, endophytic, and mainly pathogenic species. It is a group of fungi with great adaptability and survival in different environmental conditions, causing serious problems to a wide range of host plants (Gabriel et al. 2017; Siciliano et al. 2018).

The identification of its species is a very controversial issue, initially resolved by the morphology of reproductive structures, colony coloring, and host specificity (Simmons 1967, 1971, 1989, 1992, 2007), however, due to the overlap and high morphological plasticity between species, the use of multilocus phylogenetic analyses, based on different regions (ITS and mtSSU) and protein coding genes (*gapdh*, *Alt a1*, *tub*, *tef1*, *rpb2*, Chitin synthase, Calmodulin, ATPase), has become standard for taxonomy within the genus, grouping the species into sections, according to the phylogenetic relationship between them (Lawrence et al. 2013; Lawrence et al. 2015).

Thus, the objective of this study was to identify *Alternaria* species associated with brown spot of cactus prickly pear (*N. cochenillifera*) based on morphological and phylogenetic analyses in the Brazilian Northeast region.

Material and Methods

This work was conducted in the Molecular Phytopathology Laboratory of the agrarian Engineering and Sciences Campus of the Universidade Federal de Alagoas (UFAL), located in the city of Rio Largo.

Obtaining and preserving isolates

Alternaria isolates were obtained from cladodes with brown spot symptoms, during the rainy season in 2018 and 2019, in the state of Alagoas, in the cities of Cacimbinhas (09°40'16"S/36°99'14"W), Estrela de Alagoas (09°23'124"S/36°45'36"W) and Palmeira dos Índios (09°40'61"S/36°63'31"W), and Pernambuco, in the cities of Bom Conselho (09°10'12"S/36°40'48"W), São João (08°52'33"S/36°22'01"W) and Lajedo (08°65'83"S/36°32'97"W). Per sampled are, 25 cladodes were collected.

In the laboratory, cladodes were washed under running water and dried using sterilized paper towels. Isolations were completed by removing fragments from symptomatic tissue at the interface between the necrotic tissue and non-symptomatic tissue, which were disinfested with 70% alcohol solution for 30 seconds, sodium hypochlorite (1%) for 1 minute, washed twice in sterile distilled water (SDW), and placed to dry on sterile filter paper. After they were dried, the fragments were transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA), then maintained in BOD at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark for 7 days.

After the colonies were formed, 5 mm disks containing pathogen mycelia were transferred to new Petri dishes containing PDA medium, maintained at a temperature of 25°C until the emergence of the pathogen's reproductive structures, for later identification and obtaining monosporic cultures. After obtaining the monosporic cultures, isolates were preserved using three

methods: test tubes containing PDA culture medium, Castellani, and on autoclaved filter paper (Castellani, 1960). The fungal colonies were deposited in the Coleção de Fitopatógenos da Universidade Federal de Alagoas (COUFAL).

Pathogenicity test

Pathogenicity of fourteen isolates were tested on healthy cladodes detached from prickly pears in a plantation located in the county of Rio Largo, Alagoas, Brazil. The cladodes were washed in running water and disinfested by immersion in 1% NaOCl solution for 3 min, rinsed in SDW and dried at room temperature. Two inoculation methods were used. For both methods the cladodes were wounded with the aid of a previously sterilized needle. In first method, the wound was inoculated with a 5 mm PDA disks containing fungal structures. For the control, PDA-only disks. The pathogenicity was also tested using a spore suspension. The inoculations were performed by applying a drop of 30 μL of a suspension with 10^6 spores mL^{-1} (quantified in a hemocytometer), on each inoculation spot, and in the control treatment a drop of 30 μL SDW was applied. Each cladode was packaged separately in plastic bags containing cotton moistened with SDW, maintained in a humid environment for 48 hours, and then kept in a BOD incubator (Biochemical Oxygen Demand) at 25 ± 1 °C with a 12-hour photoperiod for up to 10 days. Three repetitions per isolate were used, where each repetition consisted of a cladode with four wounds, one being the control (Flores-Flores et al. 2013; Feijó et al. 2019).

Molecular characterization

For molecular characterization, the extraction of DNA was carried out from the mycelial mass of each isolate grown in L-Asparagine liquid medium for five days in a 50 mL Erlenmeyer flask, which was incubated at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) with a photoperiod of 12 hours. The protocol used for extraction was the CTAB method adapted from Doyle (1987). Polymerase chain reactions (PCR) for all genes were prepared in a final volume of 30 μL : 10X buffer (3 μL), MgCl_2 50 mM (0.9 μL), 10 mM DNTP's (2.4 μL), 10 μM of each oligonucleotide (2 μL), 1 U *Taq* DNA

polymerase (0.2 µL) and DNA (1 µL, 25 ng / µL). Primer pairs that code for the ITS, *Alt a1*, *tef1*, *rpb2*, and *gapdh* genomic regions were used (Table 1). The PCR products were then sent for purification and sequencing directly at the Macrogen company in Seoul, South Korea.

Table 1- Description of the primers used to identify species belonging to the *Alternaria* genus.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	PCR conditions	References
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	40 cycles at 94 °C for 20 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 90 s	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
<i>rpb2</i>	5F	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	40 cycles at 94 °C for 60 s, 57 °C for 25 s, 72 °C for 120 s	Reeb et al., 2004
	7cR	CCCATRGTCTTGYYTTRCCCAT		
<i>tef1</i>	526F	GTCGTYGTYATYGGHCAYGT	40 cycles at 94 °C for 20 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 90 s	Rehner, 2001
	1567R	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT		
<i>Alt a1</i>	Alt-F	ATGCAGTTCACCACCATCGC	35 cycles at 94 °C 60 s, 94° C for 30 s, 57 °C for 30s, 72° for 60s, 72° 10min	Hong et al., 2005
	Alt-R	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC		
<i>gapdh</i>	Gpd1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	40 cycles at 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 30 s	Berbee et al., 1999
	Gpd2	GCCAAGCAGTTGGTTGTG		

Fonte: Autora, 2021

The nucleotide sequences obtained were assembled with the Codon Code Aligner v. 6. 0. 2 software and analyzed visually to obtain a consensus sequence of the amplified region for all isolates. The arrangement of nucleotides in ambiguous positions was corrected by comparing the sequences in sense and antisense directions. The initial analyses were performed with the BLASTn algorithm (Altschul et al. 1990) and the non-redundant GenBank database. Reference sequences for several species of the genus were retrieved from GenBank (Table 2) and used for reconstruction of the phylogenetic tree.

Table 2: Isolates subjected to DNA analyses in this study, including details on culture collection and GenBank accessions.

Species	Culture Access Number	GenBank Access Number				
		ITS	<i>tef1</i>	<i>rpb2</i>	<i>gapdh</i>	<i>Alt a1</i>
<i>Alternaria alternantherae</i> ^a	CBS 124392	KC584179	KC584633	KC584374	KC584096	KP123846
<i>A. alternata</i>	CBS 916.96	KF465761	KC584634	KC584375	AY278808	-

<i>A. alternata</i>	CBS 124278	KP124374	KP125152	KP124844	KP124226	KP123922
<i>A. alstroemeriae</i>	CBS 118808	KP124296	KP125071	KP124764	KP124153	KP123845
<i>A. alstroemeriae</i>	CBS 118809*	KP124297	KP125072	KP124765	KP124154	MH084526
<i>A. arborescens</i>	EGS 39.128*	AF347033	JQ672481	JQ646487	AY278810	KY561836
<i>A. arborescens</i>	CBS 127263	KP124416	KP125194	KP124885	KP124267	KP123963
<i>A. betae kenyensis</i>	CBS 118810*	KP124419	KP125197	JQ905180	KP124270	KP123966
<i>A. burnsii</i>	CBS 130264	KP124425	KP125203	KP124894	KP124275	KP123972
<i>A. burnsii</i>	CBS 110.50	KP124421	KP125199	KP124890	KP124271	KP123968
<i>A. cerealis</i>	CBS 119544	KP124408	KP125186	KP124878	-	KP123955
<i>A. dauci</i>	CBS 117097	KC584192	KC584651	KC584392	KC584111	KJ718678
<i>A. dauci</i>	CBS 477.83	KJ718161	KJ718509	KJ718334	KJ718008	KJ718676
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	KC584197	KC584658	KC584399	KC584116	KP123974
<i>A. gaisen</i>	CBS 118488	KP124427	KP125206	KP124897	KP124278	KP123975
<i>A. geophila</i>	CBS 101.13	KP124392	KP125170	KP124862	KP124244	KP123940
<i>A. gossypina</i>	CBS 102601	KP124433	KP125212	KP124903	KP124282	KP123979
<i>A. gossypina</i>	CBS 102597	KP124432	KP125211	KP124902	KP124281	KP123978
<i>A. gossypina</i>	CBS 104.32*	KP124430	KP125209	KP124900	JQ646312	JQ646395
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0258	MT522398	MT530400	MT530386	MT530358	MT530372
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0259	MT522399	MT530401	MT530387	MT530359	MT530373
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0294	MT522400	MT530402	MT530388	MT530360	MT530374
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0295	MT522401	MT530403	MT530389	MT530361	MT530375
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0296	MT522402	MT530404	MT530390	MT530362	MT530376
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0297	MT522403	MT530405	MT530391	MT530363	MT530377
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0298	MT522404	MT530406	MT530392	MT530364	MT530378
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0299	MT522405	MT530407	MT530393	MT530365	MT530379
<i>A. gossypina</i>	COUFAL0300	MT522406	MT530408	MT530394	MT530366	MT530380
<i>A. irridiaustralis</i>	CBS 118486*	KP124435	KP125214	KP124905	KP124284	KP123981
<i>A. irridiaustralis</i>	CBS 118404	KP124434	KP125213	KP124904	KP124283	KP123980
<i>A. jacinthicola</i>	COUFAL0257	MT522407	MT530409	MT530395	MT530367	MT530381
<i>A. jacinthicola</i>	COUFAL0256	MT522408	MT530410	MT530396	MT530368	MT530382
<i>A. jacinthicola</i>	COUFAL0255	MT522409	MT530411	MT530397	MT530369	MT530383
<i>A. jacinthicola</i>	CBS 133751*	KP124438	KP125217	KP124908	KP124287	KP123984
<i>A. jacinthicola</i>	YZU171616	MG78101 1	MG78101 0	MG781015	MG78101 2	MG781013
<i>A. limoniasperae</i>	CBS 102595	-	KC584666	KC584408	AY562411	-
<i>A. longipes</i>	CMM 1377	-	KY549587	KY549618	KY549607	-
<i>A. longipes</i>	CMM 0245	-	KY549582	KY549613	KY549602	-
<i>A. longipes</i>	CMM 1195	-	KY549583	KY549614	KY549603	-
<i>A. longipes</i>	CBS 121332	KP124443	KP125222	KP124913	KP124292	KP123989
<i>A. longipes</i>	CBS 917.96*	KP124442	KP125221	KP124912	KP124291	KP123988
<i>A. longipes</i>	CBS 121333	KP124444	KP125223	KP124914	KP124293	KP123990
<i>A. longipes</i>	CBS 539.94	KP124441	KP125220	KP124911	KP124290	KP123987
<i>A. limoniasperae</i>	CBS 102595*	-	KC584666	KC584408	-	-
<i>A. macrospora</i>	CBS 117228	KC584204	KC584668	KC584410	KC584124	KJ718702
<i>A. porri</i>	EGS48.147	DQ323700	-	JF331598	JF331481	JF331538
<i>A. solani</i>	CBS 116651	KC584217	KC584688	KC584430	KC584139	-
<i>A. solani</i>	CBS 116442	KC584217	KC584688	KC584430	KC584139	-

<i>A. senecionicola</i>	CBS 119545	KP124409	KP125187	KP124879	KP124260	KP123956
<i>Alternaria</i> sp.	CBS 175.52	KC584227	KC584703	KC584445	KC584151	KP123857
<i>Alternaria</i> sp.	CBS 174.52	KC584228	KC584704	DQ677964	KC584152	-
<i>A. tagetica</i>	CBS 479.81	KC584221	KC584692	KC584434	KC584143	KJ718761
<i>A. tenuissima</i>	CBS 965.95	KP124323	KP125099	KP124791	KP124178	KP123872
<i>A. tenuissima</i>	CBS 880.95	KP124322	KP125098	KP124790	KP124177	FN689407
<i>A. tomato</i>	CBS 103.30	KP124445	KP125224	KP124915	KP124294	KP123991
<i>A. tomato</i>	CBS 114.35*	KP124446	KP125225	KP124916	KP124295	KP123992
<i>A. tomato</i>	COUFAL0254	MT522410	MT530412	MT530398	MT530370	MT530384
<i>A. tomato</i>	COUFAL0301	MT522411	MT530413	MT530399	MT530371	MT530385

^a Outgroup

* Ex-type

- Species identified in this study are highlighted in bold.

Fonte: Autora, 2021

Multiple alignments for nucleotide sequences were obtained using the MUSCLE algorithm (Edgar 2004) in the MEGA v. 6 program (Tamura et al. 2013). The phylogenies of Bayesian Inference (BI) for the sequence data of ITS, *Alt a1*, *tef1*, *rpb2*, and *gapdh*, were built individually in the CIPRES portal (Miller et al. 2010) using MrBayes v. 3.2.3 (Ronquist et al. 2012). The best evolutionary model for the partitioning analyses was performed on the concatenated sequences by PartitionFinder 2.1.1 according to Akaike Information Criterion (AIC) (Lanfear et al. 2016). Analyses were running for 10 million generations using four chains and sampled every 1,000 generations, for a total of 10,000 trees. The first 2,500 trees were discarded as a burn-in phase. Later probabilities (Rannala and Yang 1996) were determined from a majority-rule consensus tree generated with the remaining 7,500 trees. The trees were visualized and edited using the FigTree program v.1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) and Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

Morphological and cultural characterization

For cultural characterization, disks of culture medium containing mycelium of the pathogen were removed from the edges of the colonies (grown for seven days) and transferred to Petri plates containing synthetic PDA. The treatments were kept in a BOD incubator at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and a 12-hour photoperiod. The experimental design was completely randomized with five replications per

species, each repetition being a petri plate. The coloring of the colonies and aspect of the aerial mycelium were observed.

For morphological characterization, the size and shape of the spores ($n = 50$), break length, conidiophores, and branching pattern from the isolates were obtained in potato carrot agar (PCA) maintained at a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 days and photoperiod of 8 hours of light and 16 hours of darkness (Simmons 2007). The pictures were captured by a digital camera (Olympus IX2-SLP) attached to the optical microscope with 400 x magnification using the Cellsenses Standard software (SAMSUNG SDC-415®) and later used to determine the length and width of the conidia.

Results

Obtaining the isolates

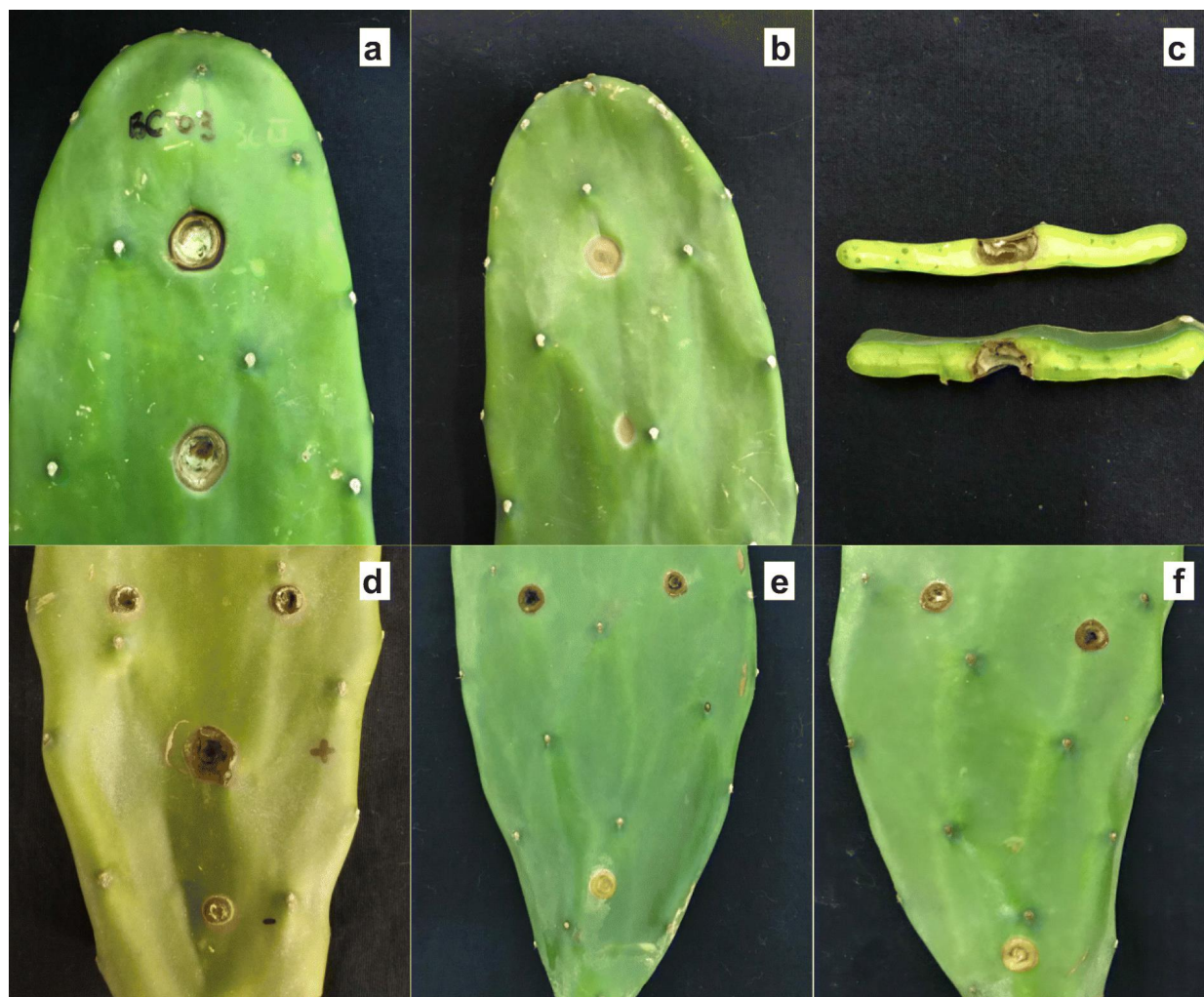
Fourteen fungal isolates were obtained showing morphological characteristics that were compatible with the *Alternaria* genus, six of which were obtained in the state of Alagoas (COUFAL0300, COUFAL0255, COUFAL0256, COUFAL0257, COUFAL0301, and COUFAL0254), and eight were from Pernambuco (COUFAL0294, COUFAL0295, COUFAL0296, COUFAL0258, COUFAL0297, COUFAL0299, COUFAL0259, and COUFAL0298).

Pathogenicity test

All isolates caused symptoms on the cladode cactus prickly pear, regardless of inoculation method. Symptoms were first observed seven days post-inoculation (dpi) and evaluated at 10 dpi. In inoculations with disks containing pathogen mycelial, the lesions were circular and necrotic, which subsequently advanced to other face of the cladode, and presented an average lesion size of 11.21, 9.97, and 9.35 mm for the species *Alternaria gossypina*, *Alternaria jacinthicola*, and *Alternaria tomato*, respectively. Inoculations with the suspension presented a smaller average lesion size, 7.21 (*A. gossypina*), 7.08 (*A. jacinthicola*), and 7.02 mm (*A. tomato*) for all species compared to the tests performed with disks (Fig. 1). The lesions were also circular and necrotic;

however, they were not observed on the other face of the cladode. After the pathogenicity test, re-isolations were performed, thus, confirming Koch's postulates.

Fig. 1: Symptoms of brown spot caused by pathogenic isolates of *Alternaria* after ten days of incubation. A, B and C - inoculation with disks containing pathogen structures; D, E and F - inoculation with spore suspension. D - *A. jacinthicola*; E - *A. gossypina* and F - *A. tomato*.



Fonte: Autora, 2021

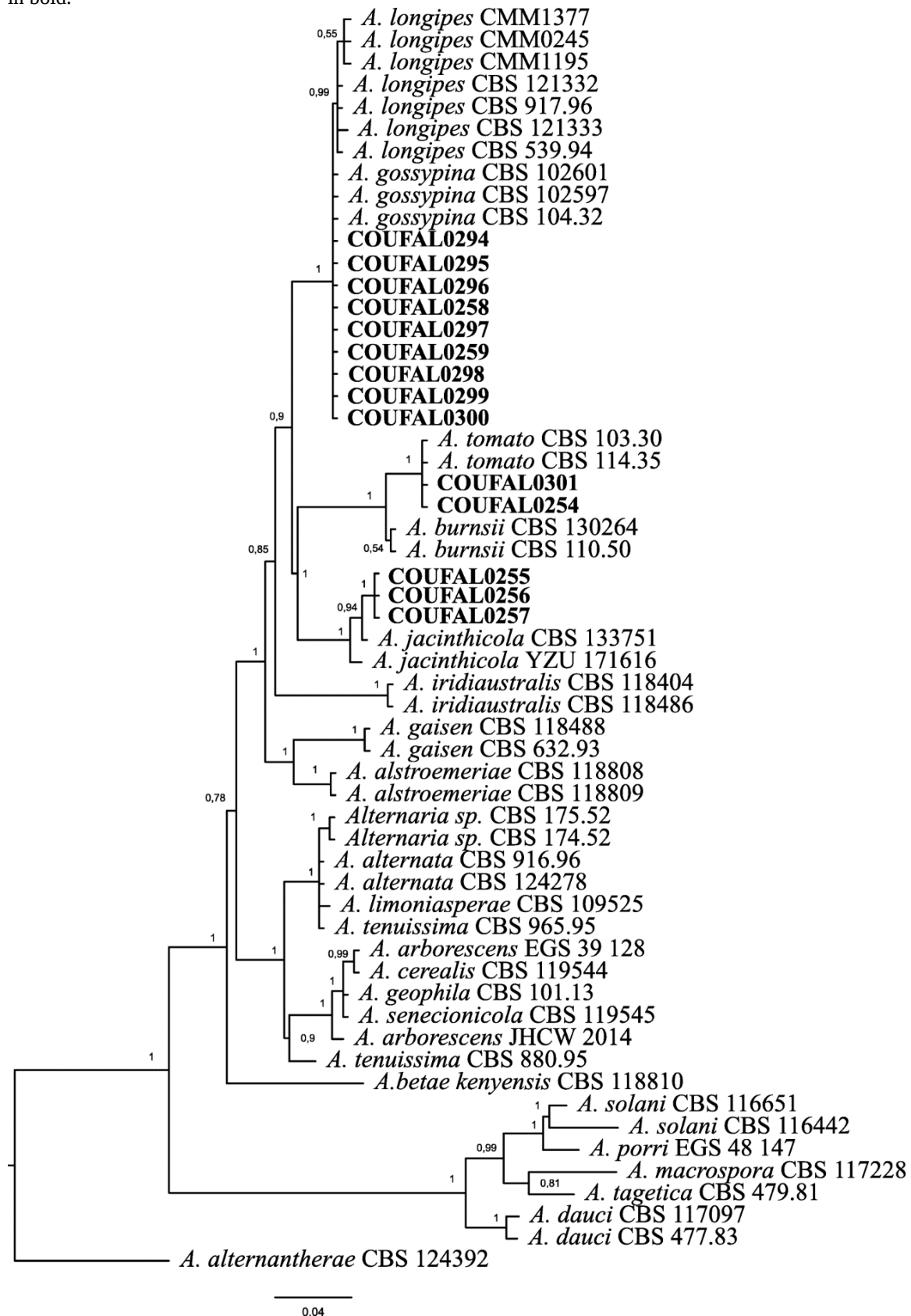
Molecular characterization

Approximately 606 bases were determined for ITS, 347 bases for *tef1*, 957 bases for *rpb2*, 472 bases for *Alt a1*, and 579 bases for *gapdh*. Congruence analyses did not reveal conflict between the data sets of the ITS, *Alt a1*, *tef1*, *rpb2*, and *gapdh* sequences, therefore, they were combined. The generated ML and IB trees showed the same topology, therefore, only the BI tree was presented in this study. The combined data set of the five loci, included 57 taxa with *A. alternantherae* (CBS 124392) as an outgroup taxon. The alignment presented 2961 characters, of

which 345 were parsimony informative sites, 2059 were conserved sites, and 868 were variable sites. The locus limits in the alignments were: 1–597 for *rpb2*, 958–1304 for *tef1*, 135–1883 for *gapdh*, 1884–2489 for ITS, and 2490–2961 for *Alt a1*. For phylogenetic analyses of the BI, according to AIC the TIM+G model was selected for ITS, TRNEF+G for *rpb2* and *tef1*, HKY+G for *Alt a1*, and TRN+G for *gapdh*, and for the combined data, the model GTR + G was used (Study 26406 deposited in TreeBASE).

The results showed that the isolates of this study were grouped into three distinct clades, where: COUFAL0294, COUFAL0295, COUFAL0296, COUFAL0258, and COUFAL0297 were from Bom Conselho/PE, COUFAL0259 and COUFAL0298 were from Lajedo/PE, COUFAL099 was from Estrela de Alagoas/AL, grouped with other sequences of *A. gossypina*, with the posterior probability of 1 in the phylogenetic tree; isolates COUFAL0255 and COUFAL0256 were from Estrela de Alagoas/AL and isolate COUFAL0257 was from Palmeira dos Índios/AL, grouped with *A. jacinthicola* with Bayesian support of 0.98 in the phylogenetic tree; and isolate COUFAL0254 was from Cacimbinhas/AL and COUFAL0301 was from Estrela de Alagoas/AL, grouped with the species *A. tomato* with a level of Bayesian support 1 in the phylogenetic tree (Fig. 2), all belonging to the same section, *Alternata*. The species *A. gossypina* was the most frequently isolated in this study, with most isolates (88.8%) in the state of Pernambuco and only 11.2% obtained in the state of Alagoas. *Alternaria jacinthicola*, as well as *A. tomato*, were obtained only in the state of Alagoas, with 100% isolation prevalence.

Fig. 2: Phylogenetic tree of Bayesian Inference based on the concatenated sequences of the ITS, *tef1*, *rpb2*, *Alt a1* and *gapdh* regions. The *A. alternantherae* species was used as an outgroup. Isolates featured in this study are highlighted in bold.

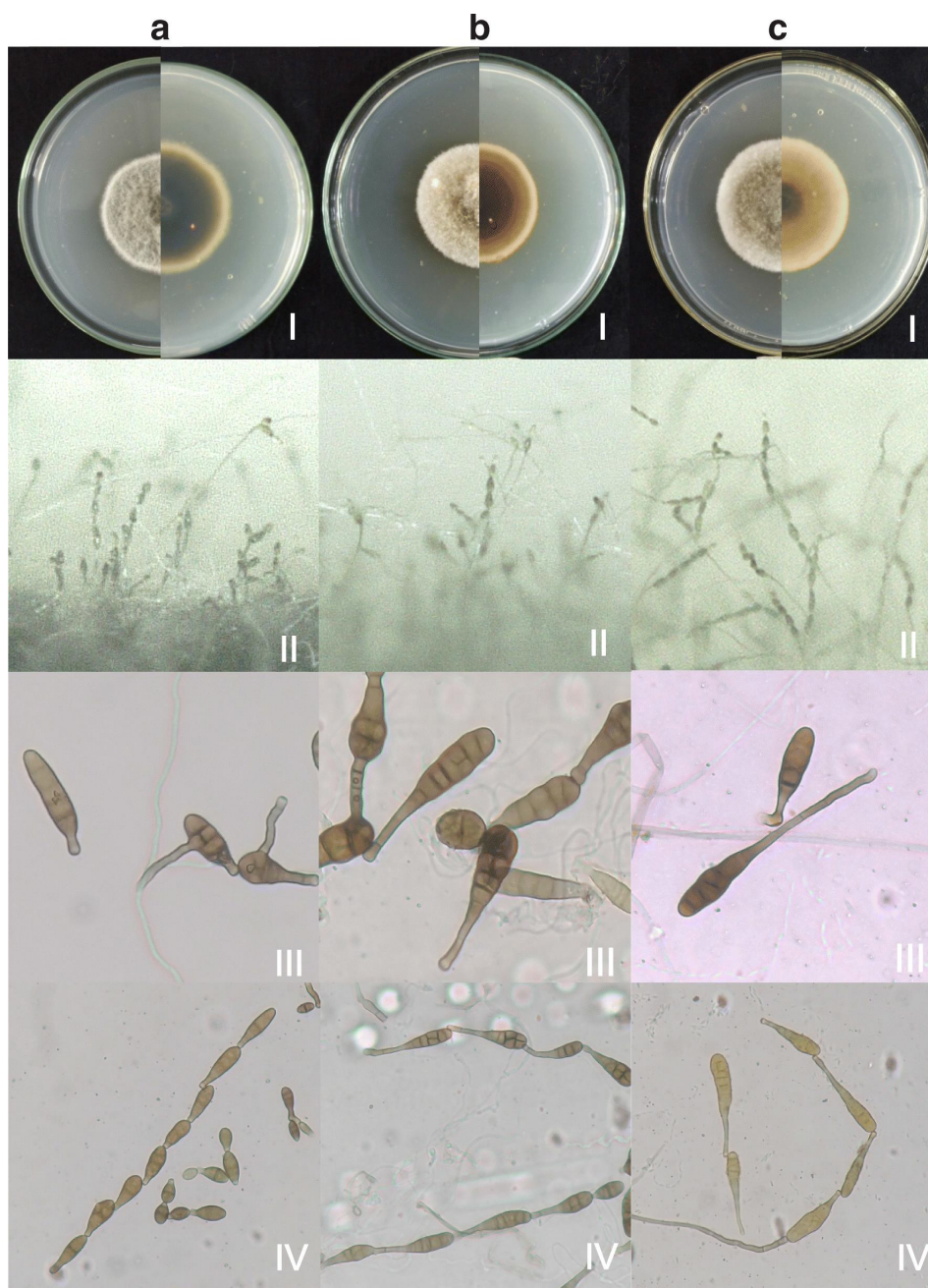


Morphological and cultural characterization

Alternaria jacinthicola presented colonies with regular edges, whitish gray aerial mycelium, and on the reverse side, a dark brown color with white edges. The species *A. gossypina* presented colonies with regular edges, cottony aerial mycelium, with whitish to gray color on the surface, a light brown color on the reverse side, and presence of concentric rings with white borders. The *A. tomato* species presented colonies with regular edges on the back, cottony aerial mycelium of a whitish gray color, and the reverse side of the colonies showed a dark brown color in the center and a lighter color toward the edges (Fig. 3).

In the morphological analyses, all species had unique conidiophores, in a chain with 2 to 6 conidia, lateral to the hyphae or terminals, with a dark brown color. *Alternaria jacinthicola* presented brown conidia, generally in chains of 2 to 6, rarely solitary, ellipsoid or obclavate, with smooth walls. The conidia measured $(15.22) 19.65 (28.00) \times (4.33) 6.30 (8.76) \mu\text{m}$ in size with 3 to 4 transverse septa and 1 longitudinal septum with a beak from 5 to 15.79×2 to $4 \mu\text{m}$ in size. *Alternaria gossypina* presented brown conidia, generally in chains of 2 to 3 conidia, rarely solitary, ellipsoid or obclavate, with smooth walls. The conidia measured $(14.27) 21.39 (28.53) \times (5.04) 7.51 (10.69) \mu\text{m}$ in size with 5–7 transverse septa and 1–2 longitudinal septa with a beak from 3.5 to 14.32×2 to $3.9 \mu\text{m}$ in size. *Alternaria tomato* presented brown conidia, septate, obclavate, simple or grouped in chains of 2 to 4 conidia measuring $(13.5) 19.03 (24.45) \times (4.62) 6.85 (9.56) \mu\text{m}$ in size, with four transverse septa, one longitudinal septum, and the beak measuring 4 to 8.65×1 to $2 \mu\text{m}$ in size (Fig. 3).

Fig. 3: AI, BI e CI- Characteristics of the colonies; AII, BII e CII – Characteristics of the conidiophores; AIII, BIII e CIII – Characteristics of the conidia; AIV, BIV e CIV – Characteristics of the chain. A - *A. jacinthicola*, B - *A. gossypina*, C - *A. tomato*.



Fonte: Autora, 2021

Discussion

Through the combined analyses of the ITS region and *gapdh*, *Alt a1*, *tef1*, and *rpb2* genes associated with morphology, *A. gossypina*, *A. jacinthicola*, and *A. tomato* were identified and

characterized in this study, grouping them into three distinct clades, within the *Alternata* section, as pathogens causing brown spot in the prickly pear (*Nopalea cochenillifera*).

The identification of *Alternaria* spp. within the *Alternata* section, which includes “small conidia” species, has been somewhat challenging, due to the plasticity of morphological characteristics initially used in the taxonomy. Today, the use of molecular techniques for this purpose is recommended (Lawrence et al. 2013). Initially the ITS genomic region was often used in the characterization of fungal species, providing strong support to the described morphological groups, however, its use was debated due to the informativeness level of the region (Hyde 2014). Thus, phylogenetic analyses have become indispensable to elucidate the phylogenetic “knots” within the genus *Alternaria*, and combinations that include the ITS region and protein codes, such as *gapdh*, *Alt a1*, *tef1*, *rpb2*, Calmodulin, Chitin synthase, ATPase, and *tub*, can be used (Pryor and Gilbertson 2000; Hong et al. 2005; Rokas and Carroll 2005; Andrew et al. 2009; Pryor et al. 2009; Lawrence et al. 2012; Lawrence et al. 2013, 2014; Woudenberg et al. 2013; Grum-Grzhimaylo et al. 2016).

Regarding the phylogenetic analyses, it was observed in this study that the ITS region and the *tef1* gene were incapable of distinguishing the three identified species, probably due to the conservation and slow rate of molecular evolution of these genomic regions, as described by other authors (Stiller and Hall 1997; Baldauf and Palmer 1993; Cheney et al. 2001; Lawrence et al. 2013). In studies performed by Ding et al. (2019), it was observed that the use of protein coder genes together (*gapdh*, *rpb2*, *Alt a1*, Calmodulin, and ATPase) revealed a more strongly supported Bayesian Inference topology within the *Alternata* section, and the *Alt a1* gene was the most informative. It was also observed that the data of the *Alt a1* gene showed better topological resolution among all the genes used here. However, the combination of these genomic regions proved to be superior to the other alternatives derived from a single isolated region in the identification of *Alternaria* spp. belonging to the *Alternata* section in this study.

Thus, it is possible to affirm that the need to use combined genes in the precise identification of species that make up the *Alternata* section, is due to the minimal molecular variation, reported by other authors (Woudenberg et al. 2015) and visualized in this study, that is, few fixed nucleotides can separate one species from another, when the genes are analyzed individually. *Alternaria gossypina* shows only three fixed nucleotides in its genome, however, it can easily be distinguished from *A. alternata* using combined molecular data (Woudenberg et al. 2015). This species has a close phylogenetic relationship with *A. longipes*, recently associated with brown spot in *N. cochenillifera* in the state of Pernambuco (Conforto et al. 2019). *Alternaria tomato* and *A. jacinthicola*, also show a low number of fixed nucleotides, due to their close relationship with *A. burnsii*, which grouped in a clade called “clade brothers” (Luo et al. 2018).

Among the identified species in this study, *A. gossypina* was the most prevalent, and the only one of the three species present in both collection states (Alagoas and Pernambuco). This species was first recognized in 1931 in the cotton culture in Zimbabwe, and today, it is responsible for diseases in different hosts in different parts of the world (Farr and Rossman 2019). To date, there are no reports of this species associated to prickly pear in the world, nor reports in other cultures in Brazil.

Alternaria jacinthicola was described as a new species in 2011 in West Africa, and it has been reported in peanuts (Republic of *Mauritius*), clove (China), and wheat (Oman) (Farr and Rossman 2019). To date, there are no reports of this species in Brazil associated with any culture, therefore, this is the first report of *A. jacinthicola* in Brazil and in the world, causing prickly pear disease.

Alternaria tomato was originally described in 1939 infecting *Solanum lycopersicum*. Currently, it has a restricted host range, being reported, in addition to tomatoes, in potatoes (*Solanum tuberosum*), beans (*Phaseolus vulgaris*), passion fruit (*Passiflora edulis*), and more recently, causing leaf spot in sunflower (*Helianthus annuus*) cultivations in Mexico (Farr and

Rossman 2019). Furthermore, this species is known to produce mycotoxins in foods, causing problems in humans (Shinha and Bhatnagar 1998). Thus, this is the first report of this species infecting *N. cochenillifera* in the world, and the first occurrence of this species in Brazil.

Although there are no reports on the presence of the species *A. jacinthicola*, *A. tomato*, and *A. gossypina* in Brazil in any other culture, it is possible that they occur in the country, not only in *N. cochenillifera*, and this is probably due to the scarcity of studies focused on multilocus phylogenetic analyses of the *Alternaria* genus, since morphological analyses alone or in conjunction with analyses of the ITS region are unable to separate *Alternaria* species, especially within the *Alternata* section, where the species are considered indistinguishable morphologically.

In prickly pear, *Alternaria* species have already been reported as causing spots in *Opuntia ficus-indica* cladodes in Mexico (*A. alternata*), Egypt (*A. alternata*), South Africa (*A. tenuissima*), and Brazil (*A. tenuis*). In *N. cochenillifera*, *A. tenuissima* and, more recently, *A. alternata* and *A. longipes* have been reported to be associated with brown spot in Brazil (Farr and Rossman 2019).

In the morphological analyses, the identified species presented characteristics similar to those of previous studies for the species *A. gossypina*, *A. jacinthicola*, and *A. tomato* (Hopkins 1931; Luo et al. 2018; Poudel et al. 2019). Colony colorations varied compared to other studies, and according to Simmons 1992, these variations occur due to the cultivation conditions and culture medium used; therefore, they are not reliable for species delimitation (Lawrence et al. 2016).

Regarding pathogenicity, suspension tests were carried out in the present study for the identified species, however, despite causing symptoms in the cladode cactus prickly pear, they presented smaller average lesion size in comparison to tests with disks containing pathogen structures. According to the literature, tests with spore suspension are scarce for cactus prickly pear culture, regardless of the pathogens in question, probably because they produce small lesions, as observed in this study, confirming that the pathogenicity tests performed with disks containing

structures pathogen are more recommended for the culture cactus prickly pear (Flores-Flores et al. 2013; Oliveira et al. 2018; Feijó et al. 2019; Conforto et al. 2019).

Finally, our findings revealed a greater diversity of *Alternaria* spp. associated with brown spot in prickly pear, where we can include the species identified here *A. gossypina*, *A. jacinthicola*, and *A. tomato* as new etiological agents of the disease. It also provides data that can be useful to identify the best control measures for an adequate management of the disease in prickly pear plantation areas.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas – FAPEAL. We also thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for a masters fellowship.

References

- Andrew M., Peever T.L., and Pryor B.M. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*. Jan 1;101(1):95-109.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410 (1990)
- Baldauf, S.L., and Palmer, J.D. (1993). Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Dec 15;90(24):11558-62.

- Barbosa, R. S., Calvalcanti, V. A. L., Lopes, E. B, and Araújo, E. (2012). Doenças da Palma forrageira. In E. B. Lopes (Ed.), *Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino* (pp. 81–98). João Pessoa: EMEPA/FAEPA.
- Castellani, A. (1960). A brief note on the viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Imprensa Medica Lisbon*. 24: 270-272.
- Cheney, S.A., Lafranchi-Tristem, N.J., Bourges, D. and Canning, E.U. (2001). Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. Jan;48(1):111-7.
- Conforto, C., Lima, N.B., Garcete-Gómez, J.M., Câmara, M.P., and Michereff. S.J. (2019). Characterization of fungal species associated with cladode brown spot on *Nopalea cochenillifera* in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. Dec 1;155(4):1179-94.
- Ding, S., Meinholz K., Cleveland, K., Jordan, S.A., and Gevens, A.J. (2019). Diversity and virulence of *Alternaria* spp. causing potato early blight and Brown spot in Wisconsin. *Phytopathology*. Mar 20;109(3):436-45.
- Doyle, J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Bull. Bot. Soc. Am.* 19: 11–15. Hemphill J, Basal H and Wayne C. 2006. Screening Method for Salt Tolerance in Cotton. *American Journal of Plant Physiology*. 1,107-112.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 1;32(5):1792-7.
- Farr, D. F., and Rossman, A. Y. (2019). Fungal database: Fungus-host distributions. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>. Accessed 23 Mar 2019.

Feijo, F.M., Silva, M.J., Nascimento, A.D., Infante, N.B., Ramos-Sobrinho, R., Assunção, I.P., and Lima, G.S. (2019) Botryosphaeriaceae species associated with the pickly pear cactus, *Nopalea cochenillifera*. *Tropical Plant Pathology*. Oct 15;44(5):452-9.

Flores-Flores, R., Velázquez-del Valle, M.G., León-Rodríguez, R., Flores-Moctezuma, H.E., and Hernández-Lauzardo, N.A. (2013) Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. *Journal of phytopathology*. Aug;161(7-8):544-52.

Gabriel, M. F., Uriel, N., Teifoori, F., Postigo, I., Suñén, E., and Martínez, J. (2017). The major *Alternaria alternata* allergen, Alt a 1: A reliable and specific marker of fungal contamination in citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*. 257;(18): 26-30.

Grum-Grzhimaylo, A.A., Grum-Grzhimaylo, A.A., Georgieva, M.L., Bondarenko, S.A., Debets, A.J., and Bilanenko, E.N. (2016). On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Diversity*. Jan 1;76(1):27-74.

Hong, S.G., Cramer, R.A., Lawrence, C.B., and Pryor, B.M. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*. Feb 1;42(2):119-29.

Hopkins, J. C. F. (1931). "*Alternaria gossypina* (Thüm.) comb. nov. causing a leaf spot and boll rot of cotton." *Transactions of the British Mycological Society* 16.2-3: 136-IN4.

Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., De Cock, A. W. A. M., Dissanayake, A. J., Glockling, S. L., Goonasekara, I. D., Gorczak, M., Hahn, M., Jayawardena, R. S., Al Van Kan, J. A. L., Laurence, M. H., Lévesque, C. A., Li, X., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Manamgoda, D. S., Martin, F. N., Mckenzie, E. H. C., Mctaggart, A. R., Mortimer, P. E., Nair, P. V. R., Pawłowska, J., Rintoul, T. L., Shivas, R. G.,

- Spies, C. F. J., Summerell, B. A., Taylor, P. W. J., Terhem, R. B., Udayanga, D., Vaghefi, N., Walther, G., Wilk, M., Wrzosek, M., Xu, J.-C., Yan, J.-Y., and Zhou, N. (2014). One stop shop: backbones trees for important pytopathogenic genera: I. *Fungal Diversity*. 67, 21–125.
- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., and Calcott, B. (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*. Mar 1;34(3):772-3.
- Lawrence, D.P., Park, M.S., and Pryor, B.M. (2012). *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with nov. comb for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycological progress*. Aug 1;11(3):799-815.
- Lawrence, D.P. Gannibal, P.B., and Peever, T.L., Pryor B.M. (2013) The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia*. May 1;105(3):530-46.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B, Dugan, F.M., and Pryor, B.M. (2014). Characterization of *Alternaria* isolates from the infectoria species-group and a new taxon from Arrhenatherum, *Pseudoalternaria arrhenatheria* sp. nov. *Mycological progress*. May 1;13(2):257-76.
- Lawrence, D.P., Travadon, R., and Baumgartner, K. (2015). Diversity of *Diaporthe* species associated with wood cankers of fruit and nut crops in northern California. *Mycologia*. Sep 1;107(5):926-40.
- Lima, G. S. A., Assunção, I. P., Martins, R. B., Santos, H. V., and Michereff, S. J. (2011). Development and validation of a standard area diagram set for assessment of *Alternaria* spot on the cladodes of the prickly pear cactus. *Journal of Plant Pathology*. 93, 691–695.
- Luo, H., Ma, D.F., Sun, Z.X., and Deng, J.X. (2018). First Report of Leaf Spot Disease Caused by *Alternaria jacinthicola* on *Tagetes erecta* in China. *Plant disease*. Nov 16;102(11):2375.

Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In 2010 gateway computing environments workshop (GCE). Nov 14:1-8.

Oliveira, L.F., Feijó, F.M., Mendes, A.L., Neto, J.D., Netto, M.S., Assunção, I.P., and Lima, G.S. (2018). Identification of *Colletotrichum* species associated with brown spot of cactus prickly pear in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. Jun 1;43(3):247-53.

Poudel, B., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-Lauzardo, A.N., Zhang, S. (2019). First report of *Alternaria tomato* causing leaf spot on sunflower in Mexico. *Plant Disease*. May 16;103(5):1029.

Pryor, B.M., and Gilbertson, R.L. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*. Nov 1;104(11):1312-21.

Pryor, B.M., Creamer, R., Shoemaker, R.A., McLain-Romero, J., and Hambleton, S. (2009). Undifilum, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. *Botany*. Feb;87(2):178-94.

Rannala, B., and Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*. Sep 1;43(3):304-11.

Rokas A., and Carroll, S.B. (2005). More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Molecular Biology and Evolution*. May 1;22(5):1337-44.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*. May 1;61(3):539-42.

- Santos, D. C. Santos, M.V., Farias, I., Dias, F.M., and Lira, M.D. (2001). Desempenho produtivo de vacas 5/8 holando/zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30(1):12-7.
- Siciliano, I., Ortega, S.F., Gilardi, G., Bosio, P., Garibaldi, A., and Gullino, M.L. (2018). Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic *Alternaria* species isolated from basil. *Food Microbiology*. Aug 1;73:264-74.
- Silva, L.M., Silva, L.M., Fagundes, J.L., Viegas, P.A., Muniz, E.N., Rangel, J.H., Moreira, A.L., and Backes, A.A. (2014). Produtividade da Palma Forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio. *Ciência Rural*. Nov;44(11):2064-71.
- Simmons, E.G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia*. Jan 1;59(1):67-92.
- Simmons, E.G. (1971). *Helminthosporium allii* as type of a new genus. *Mycologia*. Mar 1;63(2):380-6.
- Simmons, E.G. (1989). *Macrospora Fuckel* (Pleosporales) and related anamorphs. *Sydowia*.;41:314-29.
- Simmons, E.G. (1992). *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. *Alternaria* biology. *Plant diseases and metabolites*.:1-35.
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria*. An identification manual. In: CBS biodiversity series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands
- Shinha, K.K., and Bhatnagar., D.(1998). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. CRC Press, 1998.

- Souza, A. E. F., Nascimento, L.C, Araújo, E., Lopes, E.B., and Souto, F.M. (2010). Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. *Revista Biotemas*. 23(3), 11-20.
- Stiller, J.W, and Hall, B.D. (1997). The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Apr 29;94(9):4520-5.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. (30):2725–2729.
- Woudenberg, J.H., Groenewald, J.Z., Binder, M., and Crous, P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in mycology*. 75: 171-212.
- Woudenberg, J.H., Seidl, M.F., Groenewald J.Z., De Vries, M., Stielow, J.B., Thomma, B.P., and Crous, P.W. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes. *Studies in Mycology*. 82: 1-21.

4 CAPÍTULO II: REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE PALMA MIÚDA E FEITO DA TEMPERATURA E UMIDADE SOBRE A MANCHA MARROM

RESUMO

Nopalea cochenillifera (L.), é um alimento indispensável para os animais nas regiões semiáridas do nordeste brasileiro. Apesar da adversidade de clima dessas regiões, a cultura é afetada por muitas doenças, como a mancha marrom. O gênero *Alternaria* é um dos mais importantes grupos fúngicos associados a essa doença no Brasil e suas espécies se destacam pela capacidade de adaptação a diferentes ambientes, o que lhe permite crescer nas mais variadas condições climáticas e em diferentes hospedeiros. Diante disso, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito da temperatura, umidade e resistência de genótipos de palma miúda a mancha marrom causada por espécies *Alternaria*. O efeito da temperatura sobre a severidade da doença, foi avaliado em cladódios de palma miúda destacados. Um isolado representativo de *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato* foi selecionado para proceder as inoculações, a partir de um teste de agressividade. As temperaturas utilizadas no experimento foram 13, 17, 21, 25, 29 e 33 °C com fotoperíodo de 12 horas, foi avaliado também o efeito da temperatura no crescimento micelial dos isolados. No experimento de umidade foram utilizados as mesmas espécies e os seguintes períodos de permanência em câmara úmida: 12, 24, 36, 48 e 60 horas. O experimento foi mantido em BOD, com fotoperíodo de 12 horas, utilizando a temperatura que causou a maior severidade no teste anterior para cada espécie de *Alternaria* em questão. O experimento de resistência (in vivo) foi realizado em casa de vegetação, utilizando nove genótipos de palma miúda: Palma Alagoas, Miúda, Melancia, Tamazunchale, Clones 06, 07, 13, 08, 21 e F-21. As inoculações foram realizadas com as mesmas espécies de *Alternaria* utilizadas nos experimentos anteriores. Para as três espécies utilizadas no estudo, *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato* a faixa de temperatura entre 17 e 21°C favoreceu os maiores tamanhos de lesões, já para o crescimento micelial a temperatura ótima de crescimento (mm) foi de 25 a 29° C. O período de permanência que favoreceu o desenvolvimento das lesões foram os períodos acima de 24 horas para as três espécies. Os genótipos que apresentaram os menores tamanhos de lesões foram os Clones 06 e 13.

Palavras-chave: *Nopalea cochenillifera*; Resistência genética; Agressividade; *Alternaria*

4.1 INTRODUÇÃO

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* e *Opuntia ficus-indica*), pertencem à família Cactaceae, que engloba aproximadamente 178 gêneros e cerca de 2000 espécies, sendo os gêneros *Opuntia* e *Nopalea* os mais cultivados como planta forrageira nas regiões semiáridas do Nordeste do brasileiro (IBGE, 2017; VICTOR et al., 2017). Essas regiões são caracterizadas por irregularidades, baixas precipitações, unidos a elevados períodos de seca (SUDENE, 2017), e devido a essas características, a produção de forragens e grãos são afetadas, comprometendo a viabilidade das culturas e tornando a palma forrageira uma excelente opção para a alimentação animal (LOPES et al., 2007).

As temperaturas nessas regiões podem variar de 15 - 40°C a depender da época do ano, com umidade relativa podendo ultrapassar os 80%, e essas variações de temperatura e umidade são imprescindíveis para que ocorra doenças (TEIXEIRA 2015; SUDENE 2017; IBGE 2018) como a mancha marrom da palma forrageira miúda. A temperatura influencia o crescimento do patógeno, podendo influenciar a taxa de germinação dos esporos. Em regiões com temperaturas elevadas, a viabilidade dos esporos e a formação de lesões são reduzidas, culminando com a redução no progresso da doença (TANAKA, 1995). Já a umidade tem relação com a infecção, sendo indispensável para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade de doenças (ARINZE, 1986).

Espécies de *Alternaria*, são encontradas em uma ampla variedade de ambientes, podendo se desenvolver em temperaturas que variam de 16 – 31 °C e em locais com umidade variando entre 40 – 90%. Esta diversidade de ambientes permite que as espécies de *Alternaria* criem estratégias específicas para colonizar e se desenvolver nos hospedeiros, ocasionando problemas em diferentes culturas de importância econômica (TÖFOLI et al., 2015). No entanto, no Brasil, não existem trabalhos que avaliem o desenvolvimento de *Alternaria* e sua interação com as condições edafoclimáticas do semiárido, resultando na ocorrência de doenças em palma forrageira.

Além disso, inexistem estudo voltados ao controle da mancha marrom, como trabalhos que avaliem a reação de genótipos de palma miúda a doenças, apensar do Brasil possuir dois bancos ativos de germoplasma de palma forrageira, sendo um localizado na Estação Experimental de Arcoverde - Pernambuco, na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), com aproximadamente 1400 acessos, onde, cerca de 200 destes acessos foram oriundos do México, África do Sul, Argélia, EUA e Chile. O segundo está localizado no município de Santana do Ipanema, Alagoas, administrado pela Secretaria de Agricultura e pecuária, possuindo cerca de 40

acessos, divididos entre os gêneros *Opuntia* e *Nopalea* (SANTOS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2009; LOPES et al. 2010; CAVALCANTE et al., 2014).

Com isso, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito da temperatura, umidade e resistência de genótipos de palma miúda a mancha marrom causada por espécies *Alternaria*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Avaliação da agressividade

Na avaliação da agressividade de cada isolado, foram utilizados cladódios destacados de palma miúda oriundos de plantio comercial em Rio Largo-AL. As inoculações foram realizadas de acordo a metodologia implementada por Oliveira, 2016. Em seguida os cladódios foram mantidos em câmara úmida por 48 h a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. A severidade da doença foi avaliada 10 dias após a inoculação. Para isso, o diâmetro das lesões foi determinado com a medição cada lesão em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de um paquímetro digital. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta

4.2.2 Efeito da temperatura na severidade da mancha marrom causadas por espécies de *Alternaria*.

Para avaliação do efeito da temperatura na severidade da doença, foram realizadas inoculações nos cladódios destacados de palma forrageira da variedade miúda. Para isso foram realizados ferimentos com agulhas previamente esterilizadas, onde foram depositados discos de batata dextrose, agar (BDA) contendo estruturas do patógeno, com 5mm de diâmetro. Na testemunha foram utilizados apenas discos de BDA sem estruturas do patógeno (OLIVEIRA, 2016). Posteriormente, cada cladódio foi acondicionado separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com água destilada esterilizadas (ADE). Após 48h os cladódios foram retirados dos sacos plásticos e incubados por mais 10 dias. O experimento foi mantido BOD (Biochemistry Oxygen Demand) e as temperaturas testadas foram 13, 17, 21, 25, 29 e 33°C, com fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 6x3x4, sendo seis temperaturas, três espécie de *Alternaria* (*A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*) e quatro repetições. A unidade experimental foi constituída por um cladódio com quatro pontos de inoculação, um deles a testemunha. Dez dias após as inoculações determinou-se o diâmetro médio das lesões com o auxílio de um paquímetro digital, medindo-se cada lesão em dois sentidos perpendiculares, obtendo-se a severidade das lesões.

Foi também realizado a avaliação do efeito de dois regimes de temperatura (diurna/noturna) na severidade da doença. Para tanto foi seguida a mesma metodologia citada acima para as inoculações. As temperaturas avaliadas foram 33°C (diurna) e 17° (noturna) (Hebba F.D. Al-lami et al. 2020). O delineamento experimental foi realizado em DIC com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de um cladódio com quatro ferimentos sendo um a testemunha. Dez dias após a inoculação o diâmetro das lesões foi determinado medindo-se cada lesão em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se assim a severidade das lesões. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta. O experimento foi repetido duas vezes.

4.2.3 Efeito da temperatura no crescimento micelial

Para o experimento utilizou-se foram utilizados três isolados representativos das espécies *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*. Inicialmente os isolados foram colocados para crescer em BDA a 25°C por sete dias, em seguida, discos de BDA contendo estruturas do patógeno com 5mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo BDA sintético. Foram utilizadas 5 placas de Petri por isolado.

As placas foram acondicionadas em BOD, ajustadas para as temperaturas de: 13, 17, 21, 25, 29 e 33°C, com fotoperíodo de 12 horas. O diâmetro de cada colônia foi medido em duas direções perpendiculares com o auxílio de um paquímetro digital após 10 dias de encubação para cada temperatura. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade, e posteriormente a análises de regressão linear utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta.

4.2.4 Efeito de Períodos de permanência em câmara úmida na severidade de mancha marrom causadas por espécies de *Alternaria*.

Para o experimento que determinou o efeito dos períodos de permanência em câmara úmida (umidade) sobre a severidade da doença foi conduzido in vitro utilizando a temperatura de 25 °C para as espécies de *Alternaria* testada. Os períodos de câmara úmida, foram montados de acordo com a metodologia do teste de temperatura, onde, cada cladódio foi acondicionado separadamente em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão umedecido com ADE, retirados a cada 12 horas constituindo assim cinco períodos de permanência em câmara úmida 12, 24, 36, 48 e 60 horas, posteriormente mantidos incubados na BOD por mais 10 dias.

O delineamento experimental foi realizado em DIC, em um esquema fatorial de 5x3x3, sendo cinco períodos de câmara umidade, três espécies de *Alternaria* (*A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*) e três repetições, onde cada repetição será constituída por um cladódio com quatro ferimentos sendo um a testemunha. Ao final do experimento foi determinado o diâmetro médio das lesões, para tanto utilizou-se um paquímetro digital para medir as lesões em dois sentidos perpendiculares.

Os valores obtidos nos experimentos de temperatura e umidade foram submetidos à análise de variância pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade, e posteriormente a análises de regressão linear utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta. Ambos os experimentos foram repetidos duas vezes.

4.2.5 Reação de genótipos de palma miúda a mancha marrom causada por *Alternaria* spp.

Para avaliação da resistência, cladódios de nove genótipos de palma miúda (Palma Alagoas, Sertânia, Clone 06, Tamazunchale, Melancia, Clone 07, Clone 08, Clone F-21, Clone 21 e Miúda) foram obtidos da Coleção de Genótipos de Palma da Secretaria de Agricultura do Estado de Alagoas, situada no município de Santana do Ipanema, AL. Em seguida foram plantados em vasos contendo solo estéril e mantidos em casa de vegetação do Campus CECA/UFAL.

As inoculações foram realizadas aos 150 dias após o plantio, pelo método de deposição de estruturas do patógeno (discos de BDA com 5mm de diâmetro), na superfície dos cladódios sadios. A testemunha será inoculada com disco de BDA sem estruturas do patógeno. Posteriormente, as plantas foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes, para a obtenção da câmara úmida por 60h. As plantas foram mantidas na casa de vegetação por 60 dias para avaliação dos sintomas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (9x3x3), representado por nove genótipos, três isolados de *Alternaria* e três repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma planta com dois cladódios secundários. Foram realizados quatro ferimentos com o auxílio de uma agulha esterilizada por cladódios, sendo três ferimentos inoculados com o patógeno e um a testemunha. 60 dias após as inoculações, os diâmetros das lesões foram determinados com o auxílio de um paquímetro digital em dois sentidos perpendiculares, obtendo-se assim a severidade das lesões. As médias de severidade das lesões foram submetidas à análise de variância e os valores obtidos comparados pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Avaliação da agressividade

Foi observado agressividade diferenciada para todos os isolados obtidos no presente estudo e suas respectivas espécies. Para *A. gossypina* os isolados BC01, EA05, L19, BC10, BC02 e BC20 apresentaram as menores lesões respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. O isolado L09 diferiu dos demais isolados e dos isolados SJ15.1 e BC03 que apresentaram as maiores lesões. Apesar do isolado BC03 não diferir estatisticamente do SJ15.1, apresentou as maiores lesões em relação a todos os isolados de *A. gossypina* obtidos neste estudo. Os isolados EA12, EA14 e PI10 de *A. jacinthicola* não diferiram estatisticamente entre si, no entanto o isolado PI10 apresentou o maior tamanho médio de lesões. Já os isolados CAC30 e EA43 de *A. tomato* diferiram estatisticamente entre si e o isolado EA43 apresentou maior tamanho médio de lesões. Assim os isolados BC03 (*A. gossypina*), PI10 (*A. jacinthicola*) e EA43 (*A. tomato*) que apresentaram os maiores tamanhos de lesões no teste de agressividade foram selecionados para condução dos demais experimento (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de agressividade dos isolados de *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato* obtidos no presente estudo causando mancha marrom em *N. cochenillifera*.

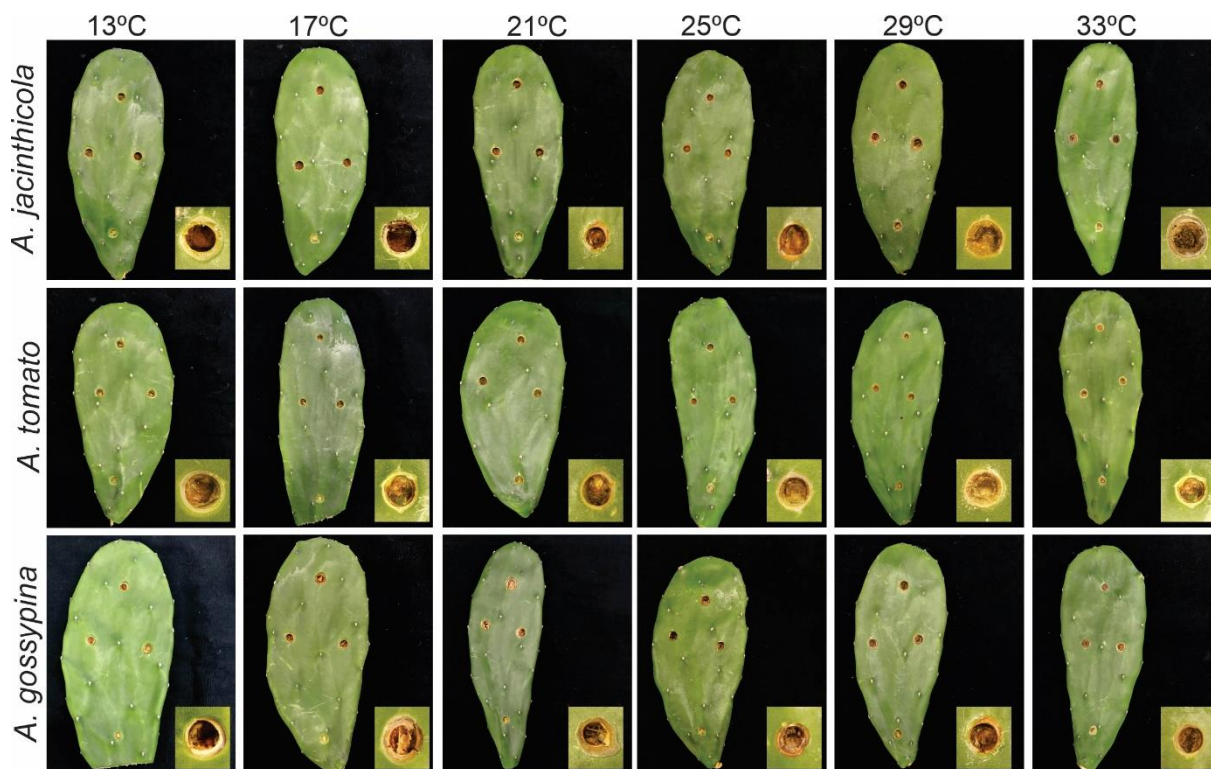
Espécies	Isolados	Tamanho Medio das Lesões (mm)
<i>Alternaria gossypia</i>	BC01	8.483333 a1
	EA05	8.700000 a1
	L19	9.016667 a1
	BC03	14.333333 a3*
	BC02	9.200000 a1
	BC20	10.250000 a1
	L09	11.566667 a2
	SJ15.1	12.816667 a3
	BC10	9.050000 a1
<i>A. jacinthicola</i>	EA12	8.966667 a1
	EA14	8.983333 a1
	PI10	9.500000 a1
<i>A. tomato</i>	EA43	11.150000 a2
	CAC30	7.966667 a2

* Diferença estatística entre os isolados de *Alternaria* obtidos no presente estudo
Fonte: Autora, 2021

4.3.2 Efeito da temperatura na severidade de manchas de cladódios.

Passado o período de 10 dias de incubação, pode ser observado que as temperaturas testadas influenciaram no tamanho das lesões causadas pelas espécies *A. jacinthicola*, *A. tomato* e *A. gossypina* em palma miúda (Figura 4).

Figura 4 - Manchas em cladódios causadas por *A. jacinthicola*, *A. tomato* e *A. gossypina*, após 10 dias de incubação a 13, 17, 21, 25, 29 e 33 °C, em palma Miúda.



Fonte: Autora, 2021

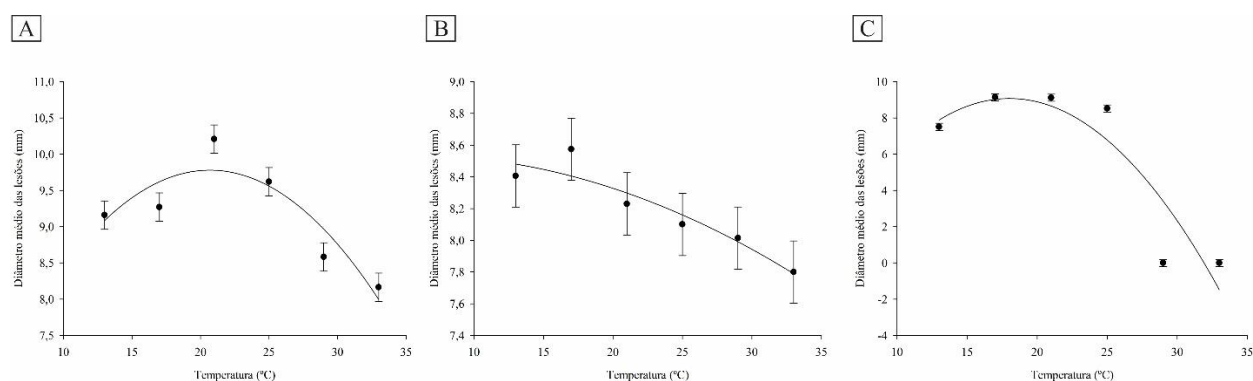
Os resultados demonstraram que as temperaturas 17 e 21 °C apresentaram as maiores lesões para a espécie *A. tomato*, não diferindo estatisticamente entre si, mas diferiram das temperaturas de 25 e 13 °C, respectivamente. As temperaturas de 29 e 33 °C não causaram lesões em palma miúda para esta espécie. Já a espécie *A. jacinthicola* a temperatura que causou maior tamanho médio de lesões foi de 17 °C diferindo das demais temperaturas testadas. Para esta espécie as demais temperaturas (13, 21, 25, 29 e 33 °C) não diferiram estatisticamente entre si, contudo a temperatura de 29 °C causou as menores lesões em palma miúda. Para *A. gossypina* o maior tamanho de lesões ocorreu na temperatura de 21°C, diferindo estatisticamente das demais temperaturas testadas. As menores lesões foram observadas nas temperaturas de 29 e 33°C que não diferindo estatisticamente entre si, mas diferindo das temperaturas de 13, 17 e 25°C que apresentaram tamanho intermediário de lesões.

Alternaria tomato não apresentou lesões nos cladódios nas temperaturas acima de 25°C. Já *A. gossypina* e *A. jacinthicola* apresentaram lesões em todas as temperaturas testadas, sendo *A. gossypina* a espécie que apresentou os maiores tamanhos de lesões em uma maior faixa de temperatura (13-33°C), e também a espécie que apresentou os maiores tamanhos médios de lesões,

indicando uma maior severidade quando comparada as outras duas espécies utilizadas, *A. tomato* e *A. jacinthicola* (Figura 5).

O modelo matemático que se adaptou as análises de regressão da interação entre temperaturas de incubação e as espécies de *Alternaria* utilizadas no presente estudo para os dados obtidos foi a quadrática. Nos dados de temperatura para *A. gossypina* obtivemos a seguinte equação, $y = -0,0118x^2 + 0,4875x + 4,7379$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,90$. Para os dados temperatura para *A. jacinthicola*, $y = -0,001x^2 + 0,0105x + 8,5098$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,94$ e para *A. tomato* a equação foi obtida a seguinte equação, $y = -0,047x^2 + 1,6936x - 6,1847$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,90$.

Figura 5 - Diâmetro das lesões em palma miúda causadas por *A. gossypina* (A), *A. jacinthicola* (B) e *A. tomato* (C) em diferentes temperaturas.



Fonte: Autora, 2021

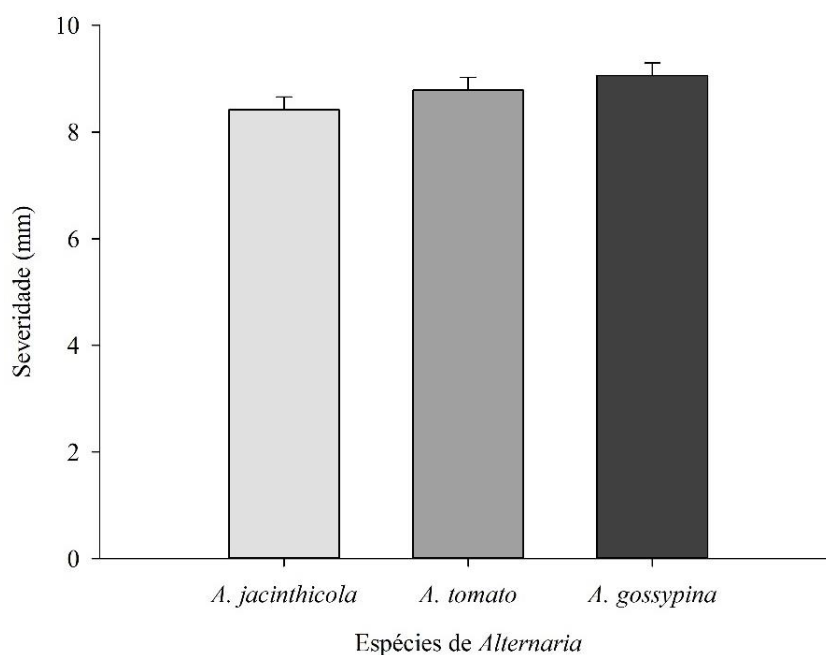
No experimento que avaliou dois regimes de temperatura 17-33° (noturna/diurna) as espécies de *Alternaria* apresentaram tamanho médio de lesões diferenciados, contudo não houve diferença estatística, onde *A. jacinthicola* apresentou a menor média de lesões 8,41 mm, seguida de *A. tomato* com 8,78 mm e *A. gossypina* que apresentou a maior média de lesões, 9,05 mm (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Efeito de duas temperaturas simultâneas (17-33°C) no diâmetro das lesões causadas por *A. tomato* (A), *A. gossypina* (B) e *A. jacinthicola* (C) em câmara incubados do tipo BOD.



Fonte: Autora, 2021

Figura 7 - Diâmetro das lesões em palma miúda causadas por *A. jacinthicola* (A), *A. tomato* (B) e *A. gossypina* (C) em duas temperaturas 17° e 33°C.



Fonte: Autora, 2021

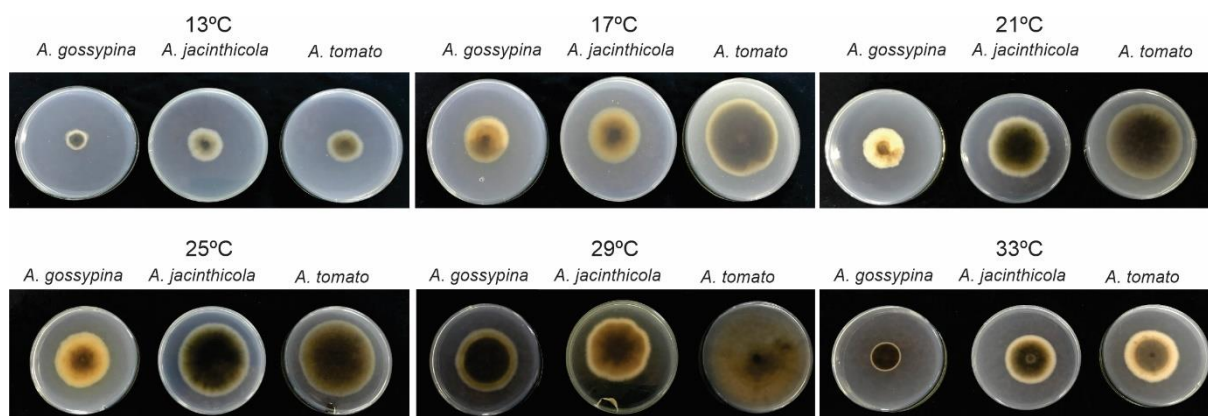
4.3.3 Efeito da temperatura no crescimento micelial

As temperaturas testadas causaram efeito sobre o crescimento micelial das espécies de *Alternaria* testadas, tendo crescimento em todas as faixas de temperatura (entre 13 e 33 °C) (Fig. 6). Para as três espécies a temperatura ótima de crescimento micelial (mm) foi de 25 a 29 °C e os menores valores pode ser observado na temperatura de 13°C. A espécie *A. gossypina* apresentou maior crescimento micelial na temperatura de 29°C (53,67 mm) não apresentando diferença estatisticamente da temperatura de 25°C (48,64 mm). *Alternaria tomato* também apresentou

crescimento ótimo a 29° C (86,77), contudo, diferiu das demais temperaturas testadas. Já para *A. jacinthicola*, diferentemente das demais espécies, apresentou crescimento micelial ótimo na faixa de temperatura de 25°C (60,83 mm), no entanto, não diferiu estatisticamente da temperatura de 29 °C (57,97 mm). A menor taxa de crescimento micelial foi observada na temperatura de 13 °C para as três espécies avaliadas, 18,15 mm, 27,94 mm, 29,47 mm para *A. gossypina*, *A. tomato* e *A. jacinthicola*, respectivamente (Figura 8).

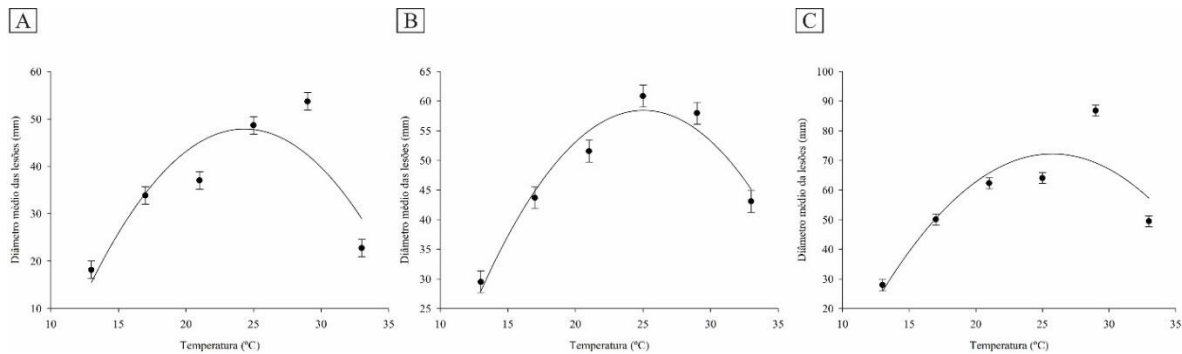
Nos dados de temperatura para o crescimento micelial de *A. gossypina* obtivemos a seguinte equação, $y = -0,2519x^2 + 12,259x - 101,28$ e $R^2 = 0,86$. Para os dados temperatura para o crescimento micelial de *A. jacinthicola*, $y = -3,3623x^2 + 26,972x + 4,3597$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,94$ e para *A. tomato* a equação foi obtida para os dados de temperatura para o crescimento micelial foi seguinte, $y = -0,2848x^2 + 14,667x - 116,64$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,87$, modelo matemático que se adaptou as análises regressão obtidos foi a quadrática (Figura 9).

Figura 8 - Crescimento micelial de *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*, após 10 dias de incubação a 13, 17, 21, 25, 29 e 33 °C, em palma Miúda.



Fonte: Autora, 2021

Figura 9 - Efeito de diferentes temperaturas no crescimento micelial das espécies *A. gossypina* (A), *A. jacinthicola* (B) e *A. tomato* (C).

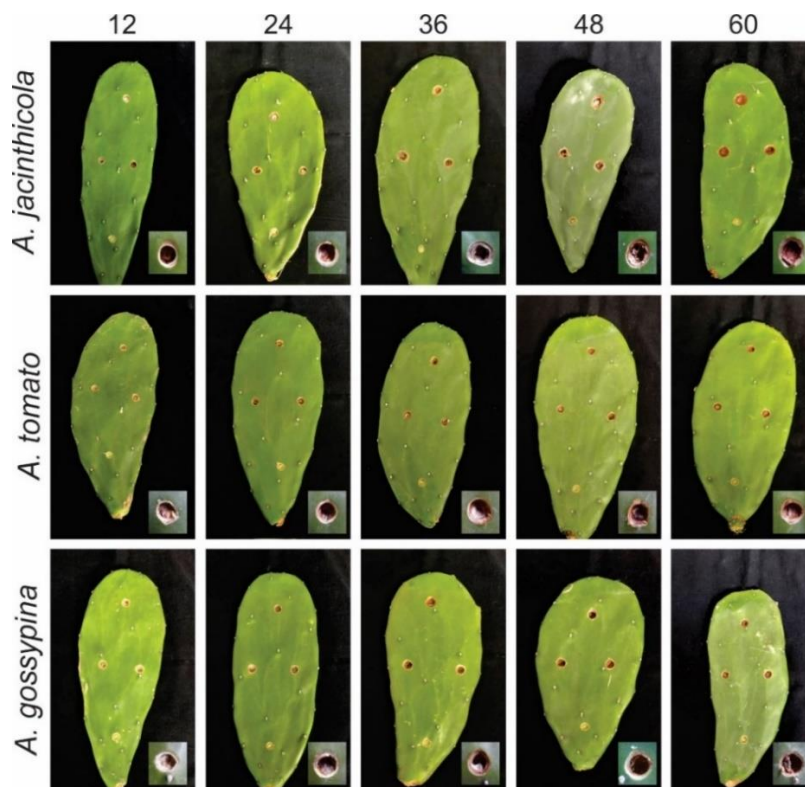


Fonte: Autora, 2021

4.3.4 Efeito de Períodos de permanência em câmara úmida na severidade de mancha marrom causadas por espécies de *Alternaria*.

Os cladódios de palma Miúda incubados a 25°C durante 10 dias apresentaram lesões características da mancha marrom com diâmetros das lesões variados de acordo com o período de permanência em câmara úmida em relação as espécies de *Alternaria* utilizadas no presente estudo (Figura 10).

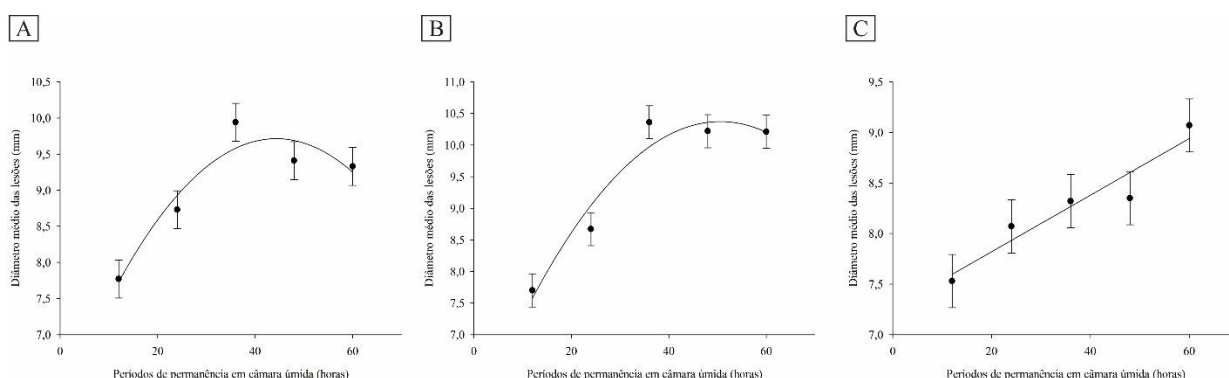
Figura 10 – Diâmetro das lesões causadas por *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato* em diferentes períodos de permanência em câmara úmida (12, 24, 36, 48 e 60) em palma miúda.



Fonte: Autora, 2021

No experimento, observou-se que para as três espécies testadas, períodos acima de 24, 36, 48 e 60 horas favorecem o desenvolvimento das lesões. Sendo as menores lesões observadas em 12hrs de câmara úmida. Para *A. gossypina* e *A. jacinthicola* o período de 36 horas de câmara úmida, favoreceu os maiores tamanhos médios de lesão não diferindo estaticamente dos períodos de 48 e 60 horas. Já para *A. tomato*, o período de 60 horas de câmara úmida foi o período que favoreceu os maiores tamanhos de lesões diferindo dos demais períodos avaliados (Figura 11).

Figura 11 - Diâmetro das lesões em palma miúda causadas por *A. gossypina* (A), *A. jacinthicola* (B) e *A. tomato* (C) em diferentes períodos de câmara úmida.



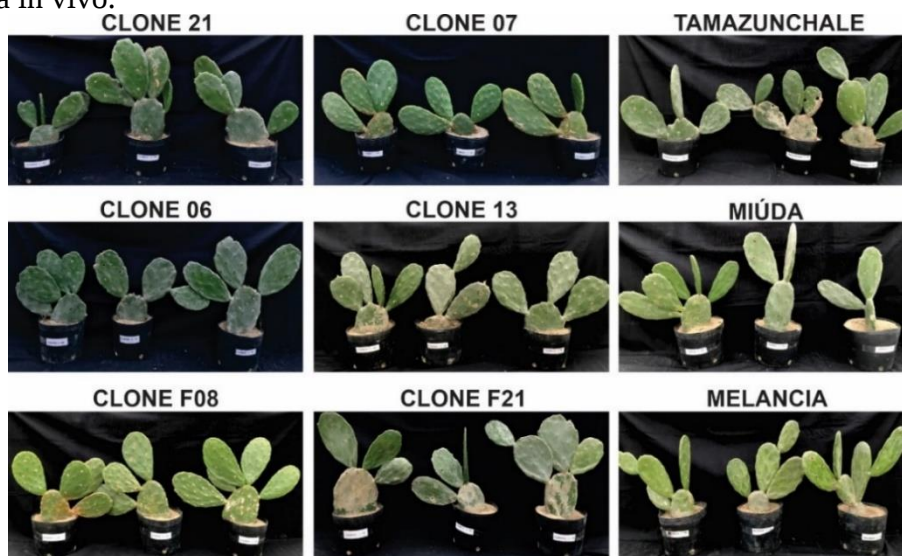
Fonte: Autora, 2021

O modelo matemático que se adaptou as análises de regressão da interação entre os períodos de permanência em câmara úmida variou de acordo com os dados obtidos e as espécies de *Alternaria* utilizadas no presente estudo. Sendo o modelo quadrática, nos dados de umidade para *A. gossypina* e *A. jacinthicola* obtivemos a seguintes equações, $y = -0,0019x^2 + 0,1684x + 5,9789$ e $y = -0,0019x^2 + 0,1906x + 5,5611$, respectivamente, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,91$ para *A. gossypina* e R^2 de 0,94 para *A. jacinthicola*. Para os dados de umidade para *A. tomato* se adaptou a uma regressão linear com a equação $y = 0,028x + 7,2633$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,91$.

4.3.5 Reação de genótipos de palma miúda a mancha marrom causada por *Alternaria* spp.

Passado o período de incubação observou-se o desenvolvimento de lesões típicas de mancha marrom nos nove genótipos utilizados no experimento (Figura 12).

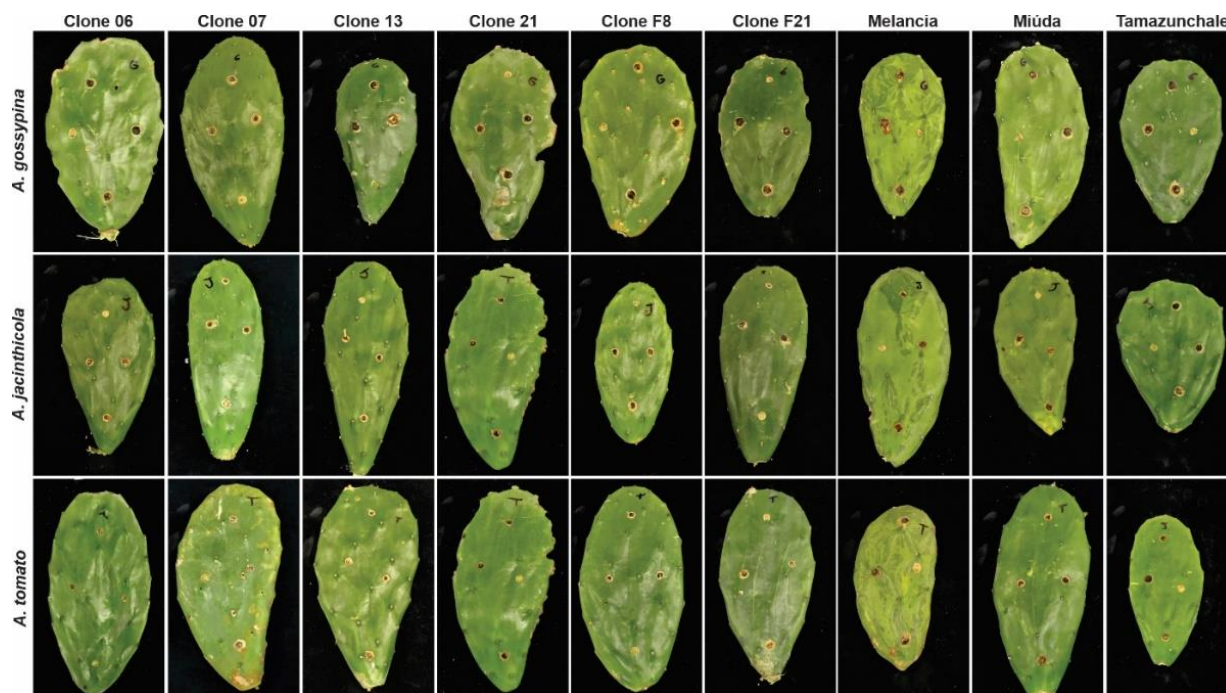
Figura 12 - Genótipos de *N. cochenillifera* mantidos em casa de vegetação para realização do teste de resistência in vivo.



Fonte: Autora, 2021

Os resultados obtidos foram classificados de acordo com a diferença estatística apresentada entre os genótipos e as respectivas espécie de *Alternaria* testadas, grupo 1 os genótipos que apresentaram as menores lesões, grupo 2 com lesões intermediárias e grupo 3 os que apresentaram as maiores lesões (Figura 13). Para a espécie *A. tomato*, os genótipos Clone 06, Clone 13 e Clone F08 no grupo 1 com as menores lesões, os genótipos Clone 21, Tamazunchale, Miúda e Clone F21, grupo 2 com lesões intermediárias e os genótipos Melancia e Clone 07 no grupo 3, apresentando respectivamente as maiores lesões. Para *A. jacinthicola* os genótipos Clone 06 e Clone 13, apresentaram as menores lesões ficando no grupo 1, no grupo 2, com lesões intermediárias, os genótipos Tamazunchale, Clone 21 e Clone F21, e os genótipos Clone F08, Miúda, Melancia e Clone 07 com as maiores lesões. Já para *A. gossypina*, no grupo 1 com as menores lesões ficaram os genótipos Clone 06, Clone 21, Clone 13 e Miúda, os genótipos Clone F08 e Clone 07 no grupo 2 e no grupo 3, os genótipos Clone F21, Tamazunchale e Melancia, apresentando, respectivamente as maiores lesões (Tabela 5; Figura 14).

Figura 13 - Diâmetro das lesões causadas por *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato* em diferentes genótipos de palma miúda.



Fonte: Autora, 2021

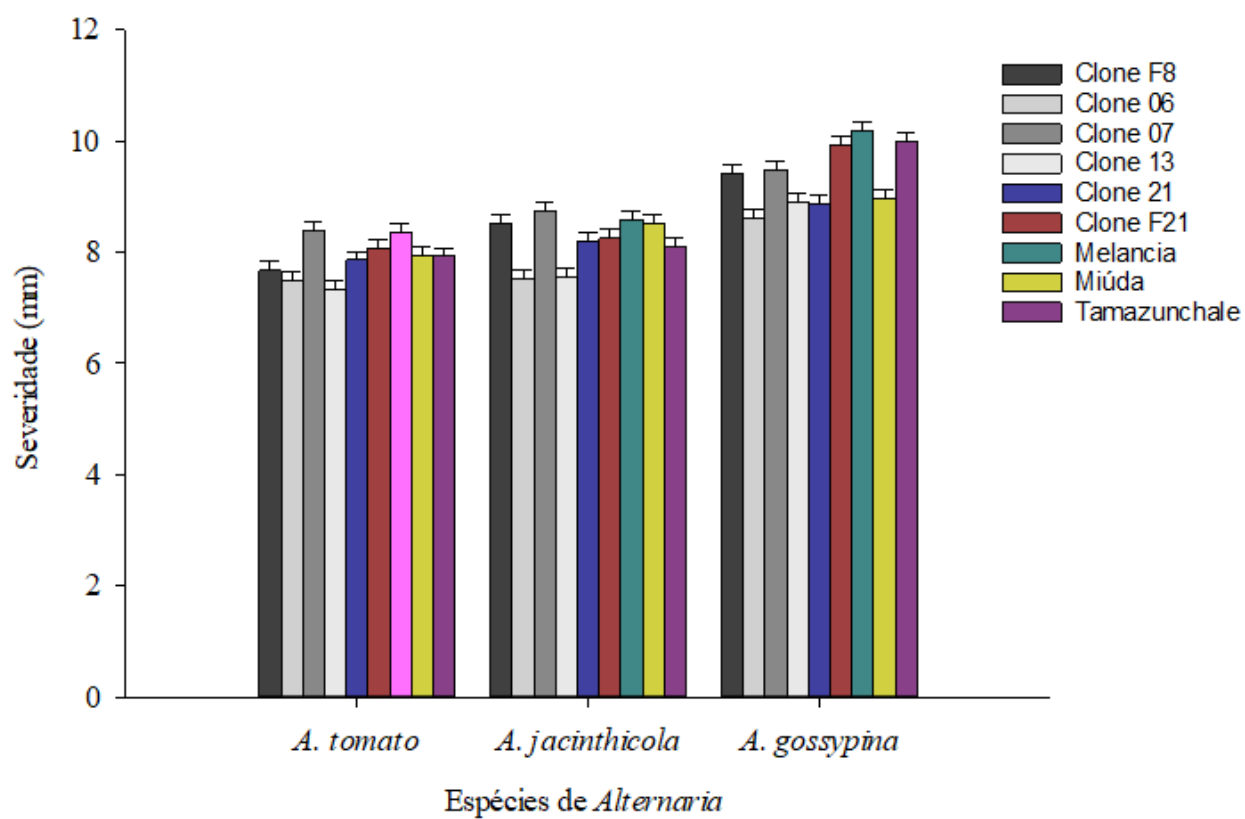
Tabela 4 - Diâmetro médios das lesões causadas por *A. tomato* (A), *A. gossypina* (B) e *A. jacinthicola* (C) em genótipos de *N. cochenillifera*.

Genótipos	Espécies		
	<i>A. tomato</i>	<i>A. jacinthicola</i>	<i>A. gossypina</i>
Clone F8	7.67 cC	8.51 aB	9.42 bA
Miúda	7.94 bB	8.53 aA	8.97 cA
Clone 07	8.38 aB	8.74 aB	9.48 bA
Clone 21	7.86 bB	8.21 bB	8.88 cA
Clone F21	8.07 bB	8.24 bB	9.94 aA
Melancia	8.35 aB	8.59 aB	10.19 aA
Clone 06	7.53 cB	7.48 cB	8.60 cA
Clone 13	7.32 cB	7.54 cB	8.91 cA
Tamazunchale	7.92 bB	8.09 bB	9.99 aA

A- Diferença estatística em relação aos genótipos a – diferença estatística entre as espécies

Fonte: Autora, 2021

Figura 14 - Reação de genótipos de *N. cochenillifera* as espécies *A. tomato* (A), *A. gossypina* (B) e *A. jacinthicola* (C) in vivo em casa de vegetação.



Fonte: Autora, 2021

4.4 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou a interação significativa da temperatura, período de permanência em câmara úmida e de genótipos influenciando diretamente no desenvolvimento e a severidade da mancha marrom em palma miúda, ocasionada por três espécies de *Alternaria*: *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*, sendo *A. gossypina* a mais agressiva.

A temperatura é o fator físico ambiental mais importante para definir o crescimento e a reprodução dos fungos (HUBBALLI et al., 2010). O gênero *Alternaria* é conhecido por apresentar grande adaptabilidade a diferentes ambientes, desenvolvendo-se em temperaturas que variam de 15 a 32°C, sendo a de 25° considerada ótima para maioria das espécies (CANIHOS et al., 1999; ROTEM, 1994; TÖFOLI et al., 2015). Neste estudo, a faixa de temperatura ótima para o maior desenvolvimento das lesões, para as três espécies avaliadas, foi de 17 a 21°C. No entanto, ainda são escassos trabalhos que avaliem o efeito desse parâmetro para as espécies identificadas no presente estudo, tanto em palma forrageira como em outros patossistemas.

Estudos realizados por Pleysier et al., (2006) com *A. alternata*, relataram uma faixa ótima de temperatura entre 25 °C e 30 °C para o desenvolvimento da ferrugem de alternaria em árvores de Paulownia (*Paulownia fortunei*). Leite et al. (2002) demonstraram que os regimes de 25 e 30°C favoreceram o incremento da mancha de alternaria em girassol, causada por *A. helianthi*, diferindo dos resultados obtidos aqui, provavelmente pelas diferentes espécies avaliadas, onde faixas de temperaturas mais amenas (17 - 21°) favoreceram o desenvolvimento das lesões. Adicionalmente, é possível observar que independentemente do hospedeiro, a faixa de temperatura mínima para o desenvolvimento da doença ocorreu abaixo dos 15 °C; no presente estudo a menor temperatura para desenvolvimento das lesões foi de 13 °C. A mesma faixa de temperatura mínima também foi observada por Al-Lami et al., (2020) para *A. brassicae* e *A. japônica* na cultura da colza, com as duas espécies expressando doenças em temperaturas mais baixa de 10 e 14 °C.

Diferentemente dos resultados obtidos nos testes de temperaturas individuais, as espécies identificadas no presente estudo apresentaram resultados similares nos tamanhos médios das lesões em palma miúda quando testadas em duas temperaturas simultâneas (17 – 33°C), simulando as características diurna e noturna da região do agreste do estado de Alagoas e Pernambuco. Nesse caso, é possível demonstrar que independentemente da espécie prevalente no campo de cultivo a severidade da mancha marrom terá o mesmo comportamento. Al-Lami et al., (2020) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas (dia e noite) no desenvolvimento da mancha foliar em Canola (*Brassica napus*), causada por *alternaria brassicae* e *A. japônica*, e observaram que as

temperaturas 22 – 17 °C favoreceram a severidade da doença, diferindo dos resultados obtidos para *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*.

Em geral, as temperaturas que favorecem o crescimento, germinação e esporulação variam de acordo com microrganismo e também pelas interações patógeno x hospedeiro x ambiente, sendo os mesmos fatores limitantes para o crescimento micelial dos patógenos. (SHARM e AHIR, 2018). A temperatura no agreste nordestino é caracterizada por ser mais quente durante o dia e reduzida a noite, com elevada umidade, e médias aproximadas em torno de 17° e 36°, que variam, também, com a época do ano (SEMARH, 2021).

Quando avaliado o efeito da temperatura no crescimento micelial, constatou-se que a faixa de temperatura de 25 a 29 °C favoreceu um maior crescimento micelial das três espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Sharm e Ahir, 2018, Sarkar et al., 2017, Jadhav e Wadikar, 2018, Choudhary et al., 2017, Hubballi et al., 2010, observando que a faixa de temperatura que mais favoreceu o crescimento micelial de isolados de *Alternaria alternata*, pertencente à mesma sessão das espécies do presente estudo, ficaram entre 25 - 30 °C. No entanto, não há relação entre a taxa de crescimento micelial com o tamanho das lesões ocasionadas pelas espécies de *Alternaria* identificadas neste estudo, testadas com os mesmos regimes de temperatura.

A duração ótima do período de câmara úmida foi acima de 36hrs, para *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*, sendo durações abaixo de 24hrs não satisfatórias para incremento das lesões para as respectivas espécies. Bassimba et al., (2017) trabalhando com avaliações combinadas de temperatura e molhamento foliar, em tangerina, observaram resultados semelhantes ao obtidos neste estudo, não observando sintomas em temperaturas reduzidas e períodos de molhamento abaixo de 24 horas. Os autores observaram, também, que a incidência da doença foi maior na faixa de temperatura entre 17 – 27°, com períodos 38 h atingindo o valor máximo da doença. Canihos et al. (1999) observaram que a infecção da mancha marrom em tangerina causada por *A. alternata* foi maior com pelo menos 36 horas de umidade e enfatizou que provavelmente períodos de molhamento mais longos favoreçam a doença.

O experimento de avaliação de reação de genótipos sugeriu que os Clones 13, 06 e 21 são genótipos promissores na resistência as espécies *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*, por apresentarem os menores tamanhos de lesões nos cladódios de palma miúda. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2016), avaliando a resistência de genótipos de palma miúda a mancha marrom, causada por *Colletotrichum* spp., e observou que os genótipos Clone 13 e Clone 21 apresentam boas características de resistência. assim como no presente estudo para *Alternaria* spp., e como a mancha marrom em palma forrageira está associada a muitos gêneros

fúngicos, Conforto et al. (2019), é possível que estes genótipos apresentem bons resultados se testados com os demais gêneros fúngicos identificados causando mancha marrom em *N. cochenillifera*.

Outros trabalhos de resistência genética em palma forrageira existentes são focados na seleção de genótipos que apresentem resistência a insetos e melhores respostas produtivas em diferentes condições de manejo (CAVALCANTE et al., 2014; SILVA et al., 2014). Até então, o manejo da mancha marrom é feito apenas pela retirada e destruição dos cladódios infectados (BARBOSA et al. 2012), contudo, não é uma prática eficiente para controlar a doença (SANTANA et al., 2019). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a necessidade de novos estudos voltados não só ao melhor conhecimento da epidemiologia, mas, também, a busca por genótipos promissores que alinhem características agronômicas interessantes e resistência a patógenos causadores da mancha marrom, considerada a doença mais importante para *N. cochenillifera* no Nordeste brasileiro.

4.5 CONCLUSÃO

- A faixa de temperatura de 17 – 21°C favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios, independente da espécie de *Alternaria* considerada (*Alternaria gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*);
- O período de permanência em câmara úmida superior a 24 horas favoreceu o desenvolvimento das lesões nos cladódios quando inoculados com espécies de *Alternaria*: *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*
- Os genótipos de palma forrageira: Clone 06, Clone 13 e Clone 21 apresentaram menores diâmetros de lesões quando inoculados com as espécies *A. gossypina*, *A. jacinthicola* e *A. tomato*.

REFERENCIAS

- AL-LAMI, H. F., YOU, M. P.; BARBETTI, M. J. Temperature Drives Contrasting *Alternaria* Leaf Spot Epidemic Development in Canola and Mustard Rape from *Alternaria japonica* and *A. brassicae*. **Plant disease**. v.104, n.6, p.1668-1674, 2020.
- ARINZE, A.E. Post-harvest diseases of tomato fruits in Southern Nigeria. **Journal Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 637 – 645. 1986.
- BARBOSA, R.S., CALVALCANTI, V.A.L., LOPES, E.B., ARAÚJO, E. Doenças da palma forrageira. In: Lopes EB (ed) Palma forrageira: Cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. EMEPA/ FAEPA, João Pessoa, p, 81–98, 2012.
- BASSIMBA, D. D.; MIRA, J. L.; VICENT, A. Evaluation of models for *Alternaria* brown spot of mandarin under Mediterranean conditions by partial receiver operating characteristic curve analysis. **Phytopathology**, v.107 n.6, p.721-731, 2017.
- CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola tangelo* leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**. v.85 n.5, p. 429 - 33,1999.
- CAVALCANTE, L. A. D. et al. Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, p. 424-433, 2014.
- CHOUDHARY, S. et al. Effect of Physical Factors on Growth of *Alternaria alternata* Inciting Leaf Blight of Isabgol. **Chemical Science Review and Letters**. v.6 n. 22, p. 857- 863, 2017.
- DIPANKAR, S. et al. Studies on leaf spot of chilli. **International Journal of Plant Protection**. V. 10 n. 2, p. 369-374, 2017.
- DRUMOND, M.A., MORAES, S.A., & RIBASKI, J. Sistemas agroflorestais para o semiárido brasileiro. **IX Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais**. Ilhéus/BA, Out/2013.
- HUBBALLI, M. et al. Effect of Environmental Conditions on Growth of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight of Noni. **World Journal of Agricultural Sciences**. v.6 n. 2, p. 171-177, 2010.
- HUBBALLI, M. et al. Effect of environmental conditions on growth of *Alternaria alternata* causing leaf blight of noni. **World Journal of Agricultural Sciences**. v.6 n. 2, p. 171-7, 2010.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agropecuário 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html. Acesso: abril de 2018.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. [IBGE]. *Geografia*. Recuperado de: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/semiarido.shtm?c=4>>. Acesso em 18.fev.2018.

- JADHAV, S.B.; WADIKAR, M.S. Effect of different physical factors on growth of *Alternaria* isolates from *Capsicum annum* L. **International Journal of Botany Studies**. v. 3 n. 1, p. 137-139, 2018.
- LEITE, R. M.; AMORIM, L. Influence of temperature and leaf wetness on the monocycle of *Alternaria* leaf spot of sunflower. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27 n. 2, p. 193-200, 2002.
- LOPES E.B, et al., Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. João Pessoa: Emepa/Faepa. 2007.
- LOPES, E. B.; BRITO, C. H. de; ALBUQUERQUE, I. C. de; BATISTA, J. de L. Desempenho do óleo de laranja no controle da cochonilha-docarmim em palma gigante. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 252-258, 2009.
- PLEYSIER, C. E. et al. Temperature, humidity, wounding and leaf age influence the development of *Alternaria alternata* lesions on leaves of *Paulownia fortunei*. **Australasian Plant Pathology**. v.35, n.3, p. 329-333, 2006.
- ROTEM, J. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. **The American Phytopathological Society**. St. Paul, Minnesota, 1994.
- SANTANA, M. D., de LIMA LEITE, I. C. H., da SILVA SANTOS, I. C., MICHEREFF, S. J., do LIVRAMENTO FREITAS-LOPES, R., LOPES, U. P. Reduction of cladode brown spot in cactus pear in semiarid growing areas and yield increase using fungicides. **Journal of Plant Pathology**. p. 1-6, 2020.
- SANTOS, D. C. dos; FARIAS, I.; LIRA, M. de A.; SANTOS, M. V. F. dos; ARRUDA, G. P. de; COELHO, R. S. B.; DIAS, F. M.; MELO, J. N. de. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco. Recife: IPA, 2006. 48 p. (IPA. Documentos, 30).
- Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (SEMARH). 2021. Disponível em: <http://www.semarh.al.gov.br/tempo-e-clima/previsao-climatica>. Acesso: janeiro de 2021.
- SHARMA, R. L.; AHIR, R. R. Physiological studies of *Alternaria* causing Alternaria blight of tomato. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v.6, n.6, p.844-84, 2018.
- SUDENE. Ministério do Desenvolvimento Regional. 2017. Disponível em: <http://www.sudene.gov.br/planejamento-regional/delimitacao-do-semiarido>. Acesso em 03 de fev. 2019.
- TANAKA, M. A. S. Transmissão planta-semente e semente-plântula do agente causal da ramulose do algodoeiro. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.) **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**, p.171-178, 1995.
- TEIXEIRA, M.N. O sertão semiárido: uma relação de sociedade e natureza numa dinâmica de organização social do espaço. **Revista Sociedade e Estado**, v. 31, n. 3, p. 769-797, doi: 10.1590/S0102-69922016.00030010. 2015.
- TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015.

VASCONCELOS, A. G. V. de; LIRA, M. de A.; CAVALCANTI, V. L. B.; SANTOS, M. V. F. dos WILLADINO, L. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha do carmin (*Dactylopius* sp) **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 5, p. 827-831, 2009.

VICTOR, M.M., et al. First use of cactus and cushcush as biocatalysts in the enantioselective reduction of β -keto esters. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 126-131. doi:10.1016/j.indcrop.2016.11.048. 2017.