

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) PARA
PRODUÇÃO DE FORRAGEM E RESPOSTA A DOIS PATÓGENOS
FOLIARES NO SUL DO BRASIL.**

MARIANA ROCKENBACH DE ÁVILA
Tecnóloga em Agropecuária/MSc. – UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em
Zootecnia
Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre - RS, Brasil

Janeiro de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

de Ávila, Mariana Rockenbach

Avaliação de genótipos de alfafa (*Medicago sativa* L.) para produção de forragem e resposta a dois patógenos foliares no sul do Brasil. / Mariana Rockenbach de Ávila. -- 2017.

93 f.

Orientador: Miguel Dall'Agnol.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Melhoramento genético de plantas. 2. Forrageiras. 3. Doenças foliares. I. Dall'Agnol, Miguel, orient. II. Título.

MARIANA ROCKENBACH DE ÁVILA
Zootecnista e Mestre em Zootecnia

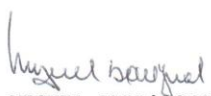
TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de


DOUTORA EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

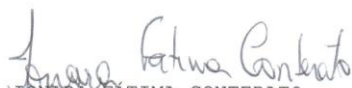
Aprovada em: 27/01/2017
Pela Banca Examinadora



MIGUEL DALL'AGNOL
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador


Homologado em: 29.03.2017.
Por


PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


ROBERTO LUIS WEILER
Dep. de Plantas Forrageiras
e Agrometeorologia/UFRGS


FONARA FÁTIMA CONTERATO
FEPAGRO/São Gabriel


JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
PPG-Fitotecnia/UFRGS


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

***“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não
fizer nada, não existirão resultados”.***

Mahatma Gandhi

Dedico esta tese à base de minha vida: minha família.

AGRADECIMENTOS

Hoje, mais uma vez, agradeço a Deus por estar presente em cada passo do meu caminho.

Aos meus pais Evandro e Laci, meus companheiros de todas as horas. O tempo de nossa convivência “roubado” pela tese só fez fortalecer a vontade de estar junto de vocês.

Aos meus avós Nila e Leonel, alemães de caráter forte e fonte inesgotável de generosidade. Ambos serviram de incentivo e exemplo para mim.

Ao meu irmão Rafael, minha cunhada Karla, meu primo Augusto, minhas tias Liane e Reni e meus afilhados Rafaela e Ricardo, que me proporcionaram inúmeros momentos de alegrias. O companheirismo de vocês me impulsiona.

Aos meus estagiários e bolsistas, em especial a Tamyris, pelos inúmeros dias de dedicação ao meu trabalho de pesquisa, companhia e mates bem cevados.

Aos meus colegas forrageiros, fitopatologistas e melhoristas, pela amizade, conversas, churrascos, trabalhos laboratoriais e separação botânica em completa alegria.

Ao meu orientador no exterior, José Antonio F. Morán e seu grupo de pesquisa, pelo acolhimento e confiança depositada em mim.

Dedico também ao Mestre Miguel Dall’Agnol – exemplo de integridade, pela confiança, paciência, incentivo, amizade e excelente orientação. Sempre com valiosos ensinamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Sem o apoio de todos, este trabalho não teria sido realizado. A eles, meu muito obrigada.

SELEÇÃO DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) PARA PRODUÇÃO DE FORRAGEM E RESISTÊNCIA À *Curvularia geniculata* E PRIMEIRO RELATO DE *Alternaria alternata* EM ALFAFA NO SUL DO BRASIL.¹

Autora: Mariana Rockenbach de Ávila
Orientador: Miguel Dall'Agnol

RESUMO

Estudos de melhoramento genético de alfafa vêm sendo desenvolvidos no DPFA (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia) da UFRGS desde a década de 90, sendo que os principais objetivos destes trabalhos têm sido aumentar a produtividade e persistência da alfafa focando, principalmente, na aptidão ao pastejo. No entanto, outros fatores como a suscetibilidade às doenças, podem afetar a persistência e a qualidade dessa espécie. Este trabalho, teve como objetivo inicial identificar as principais doenças fúngicas foliares ocorrentes no Rio Grande do Sul e verificar a variabilidade genética existente para resistência a doenças nos genótipos em condições de campo e em câmara de crescimento. Duas doenças fúngicas foliares foram identificadas como patogênicas, sendo causadas por *Alternaria alternata* e *Curvularia geniculata*. *A. alternata* foi estudada morfológicamente e identificada molecularmente a fim de caracterizar melhor esse patógeno, sendo a sua ocorrência o primeiro relato em alfafa no sul do Brasil. *C. geniculata*, patógeno que demonstrou maior frequência e agressividade em alfafa, foi utilizado na inoculação das populações 'Crioula' (utilizada como controle), 'E₁C₄' e 'CPPSul' (ambos com aptidão ao pastejo) e mais duas cultivares norte americanas, 'ABT-805' (aptidão ao pastejo) e 'CUF-101' (aptidão para a fenação) a fim de verificar a variabilidade genética. Além disso, a produção de matéria seca (MS) e competição com plantas invasoras foram avaliadas. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando modelos mistos. Os melhores resultados para produção de forragem foram demonstrados pelos genótipos 'CPPSul' (MS= 16.600 kg ha⁻¹) e 'Crioula' (MS = 15.750 kg ha⁻¹). O genótipo E₁C₄, selecionado para aptidão ao pastejo pelo DPFA em trabalhos anteriores, apresentou variabilidade genética para resistência à *C. geniculata* e resultados intermediários de MS, sendo também promissor. Estes três genótipos serão utilizados para investigações subsequentes e novos ciclos de seleção. Cruzamentos e outras avaliações devem ser realizadas com o objetivo de obter cultivares mais adaptadas às condições do Rio Grande do Sul, levando-se em conta a resistência a doenças.

Palavras-chave: plantas invasoras, patógeno foliar, leguminosas forrageiras, resistente e suscetível.

¹ Tese de Doutorado em Zootecnia - Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (94 p.) Janeiro, 2017.

SELECTION OF ALFALFA (*Medicago sativa* L.) GENOTYPES FOR FORAGE PRODUCTION AND RESISTANCE TO THE FOLIAR PATHOGEN *Curvularia geniculata* AND FIRST REPORT IN SOUTHERN BRAZIL OF *Alternaria alternata* IN ALFALFA.²

Author: Mariana Rockenbach de Ávila

Advisor: Miguel Dall'Agnol

ABSTRACT

Studies of genetic improvement in alfalfa have been development at “Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia” (DPFA), UFRGS since the 90s. The main objective of that work has been to increase the productivity and persistence of alfalfa focusing mainly on grazing tolerant. It is know, however, that other factors such as foliar diseases may affect the persistence and quality this species. This work had as an objective to initiate the identification of the foliar diseases affecting selected alfalfa genotypes in Rio Grande do Sul and verify the variability present in alfalfa to disease resistant under field conditions and growth chamber. Two foliar diseases were identified with pathogenic, caused by *Curvularia geniculata* and *Alternaria alternata*. *A. alternata* was studied morphologically and molecularly in order to better characterize this pathogen, being its first report in alfalfa in Southern Brazil. *Curvularia geniculata*, was more frequent and more aggressive to alfalfa growing in Rio Grande do Sul was spray-inoculated in Brazilian largest commercial cultivar ‘Crioula’ (used as control), ‘E₁C₄’ and ‘CPPSul’ (both grazing tolerant genotypes) plus the US cultivars ‘ABT-805’ (grazing tolerant) and ‘CUF-101’ (a US west coast non-dormant) to verify the variability present in alfalfa genotypes. Furthermore, the competition and dry mass forage production (DM) were analysed. Data were analysed using mixed statistical models. The best results for persistence and forage DM were shown by the ‘CPPSul’ genotypes (DM = 16,600 kg ha⁻¹) and ‘Crioula’ (DM = 15,750 kg ha⁻¹). In addition, the E₁C₄ genotype, select for grazing tolerant by DPFA in previous studies, presented genetic variability for resistance to *C. geniculata* and intermediate results of DM, being also promising. These three genotypes will be used for subsequent investigations and selection cycles. Crosses and other evaluations should be also made with the objective of obtaining cultivars more adapted to the conditions of Rio Grande do Sul, taking into account the resistance to diseases.

Keywords: invasive plants, foliar pathogen, forage legumes, resistant and susceptible.

² Doctoral thesis in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (94 p.) January, 2017.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 <i>Medicago sativa</i> L.: taxonomia, origem e importância.....	16
2.2 Produtividade e utilização da alfafa	18
2.2.1 Problemáticas do desenvolvimento da alfafa no Brasil	20
2.3 Doenças na alfafa.....	23
2.3.1 <i>Alternaria alternata</i>	26
2.3.2 <i>Curvularia geniculata</i>	28
3. HIPÓTESES.....	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivos gerais.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO II	14
FIRST REPORT IN SOUTHERN BRAZIL OF <i>Alternaria alternata</i> CAUSING ALTERNARIA LEAF SPOT IN ALFALFA (<i>Medicago sativa</i> L.).....	33
ABSTRACT	33
INTRODUCTION	33
MATERIALS AND METHODS.....	33
Sampling	33
Morphological characterization and molecular identification.....	34
Fungus isolation and Koch's postulates	34
RESULTS AND DISCUSSION	34
ACKNOWLEDGMENTS	36
REFERENCES	36
CAPÍTULO III	37
SELECTION OF ALFALFA GENOTYPES FOR RESISTANCE TO THE FOLIAR PATHOGEN <i>CURVULARIA GENICULATA</i>	38
ABSTRACT	38
INTRODUCTION	38
MATERIAL AND METHODS	42

Isolation and pathogenicity of <i>C. geniculata</i>	42
Growth chamber pathogenicity testing	43
Growth chamber resistance selection.....	44
Field evaluation of forage yield and competition.....	46
Field evaluation of alfalfa resistance to <i>C. geniculata</i>	48
Statistical analysis	50
RESULTS	50
DISCUSSION	51
Isolation and pathogenicity of <i>C. geniculata</i>	51
Growth chamber and field evaluation of alfalfa resistance to <i>C. geniculata</i>	52
Field Evaluation of forage yield and competition	54
REFERENCES	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
6. REFERÊNCIAS.....	69
7. APÊNDICES	83
8. VITA	92

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO III

Table 1: Alfalfa leaf, stem and total dry matter yield (kg ha^{-1}) for spring 2013, summer, autumn, winter and spring 2014 and summer 2015. The trials were carried out at the Agricultural Experimental Station (Estação Experimental Agrônômica, EEA), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil65

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figure 1: Evolution of the symptoms of foliar injury in random leaves of alfalfa (cv. Crioula). A) 7 days after inoculation; B) 14 days after inoculation35

Figure 2: *Alternaria alternata* spores. A) Spores from the highland area; B) Spore from the lowland area. Mean size for both isolates was 12.6 x 21.2 μm .35

CAPÍTULO III

Figure 1: Mean seasonal temperature and precipitation during November 2013 to January of 2015. Data from the Brazilian National Meteorology Institute (Instituto Nacional de Meteorologia, INMET).....62

Figure 2: A) Alfalfa leaf damage field trials 15 days after inoculation with *Curvularia geniculata* at the CPPSUL and EEA field sites; B) Alfalfa Leaf damage growth chamber experiments 15 days after inoculation with *C. geniculata*. Alfalfa genotypes: 'Crioula' (Brazilian, control commercial cultivar); 'E₁C₄' (Brazilian, grazing tolerant); 'CPPSul' (Brazilian, grazing tolerant); 'ABT-805' (US, grazing tolerant); and 'CUF-101' (US, west coast non-dormant). Site key: CPPSUL, Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sul-Brasileiros (Southern Brazilian Centre for Livestock Research) Bagé; EEA, *Estação Experimental Agronômica* (Agricultural Experimental Station) Eldorado do Sul63

Figure 3: Correlation between invasive plants and total dry matter of alfalfa genotypes in the field at the Agricultural Experimental Station (Estação Experimental Agronômica, EEA), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. Alfalfa genotypes: 'Crioula' (Brazilian, control commercial genotype); 'E₁C₄' (Brazilian, grazing tolerant); 'CPPSul' (Brazilian, grazing tolerant); 'ABT-805' (US, grazing tolerant); and 'CUF-101' (US, west coast non-dormant).....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABT	Nome da cultivar
AJAR	African Journal of Agricultural Research
ALF	Alternaria leaf spot
°C	Graus Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CPPSUL	Embrapa Pecuária Sul
CUF	Nome da cultivar
cv	Cultivar
DM	Dry matter
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPFA	Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia
E ₁ C ₄	População selecionada pelo comprimento do 1º entrenó curto, com 4 ciclos de seleção
EEA	Estação Experimental Agronômica da UFRGS
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FEE	Fundação de Economia e Estatística
FFALM	Fundação Faculdades Luiz Meneghel
g	Gramas
ha	Hectare
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ITS	Internal Transcribed Spacer
kg	Quilo
MG	Minas Gerais
MMBF	Register number
MS	Matéria Seca
MZ-12	Microscopy
PCR	Polymerase Chain Reaction

PDA	Potato Dextrose Agar
RENACAL	Rede Nacional de Avaliação de Cultivares de Alfafa
RS	Rio Grande do Sul
SDPI	Secretaria do Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia
SEIC	Secretaria de indústria e Comércio
t	Tonelada
UERGS	Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	United States Department of Agriculture

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina (USDA, 2016), sendo que esta produção é feita, em sua maioria, em pastagens que representam cerca de 197 milhões de hectares (FAO, 2010). As projeções de que a população mundial até 2050 consumirá dois terços mais proteína animal do que hoje significa que a intensificação da produção pecuária é inevitável (FAO, 2011). Os produtores rurais têm procurado obter um aumento da produtividade por animal e por área, de forma a manter a atividade economicamente viável. Por isso, tem se dado ênfase à intensificação da produção e a nutrição contribui para melhoria da rentabilidade dos rebanhos. A competitividade da atividade pecuária brasileira origina-se, em grande parte, da produção de forragem obtida em pastagens cultivadas.

A participação das leguminosas forrageiras na dieta animal, contribui para incrementar o ganho em peso bem como aportam maior quantidade de nutrientes à dieta, tendo reflexos diretos sobre a produção de leite, por exemplo. Dentre as leguminosas, a alfafa (*Medicago sativa* L.) possui inúmeras características relevantes, como alto potencial produtivo, elevada qualidade nutricional – proteínas, energia, vitaminas e minerais, alta produção de biomassa e flexibilidade de utilização, proporcionando aumento na produtividade dos rebanhos, quando bem manejada. Embora seja considerada como "rainha das forrageiras", e uma das leguminosas mais cultivadas a nível mundial (Michaud et al., 1988), apresenta alguns requisitos específicos para alcançar alta produtividade e persistência.

A alfafa é suscetível a mais de 70 tipos diferentes de fungos, dos quais 30 são considerados limitantes para o crescimento e produtividade (Thal & Campbell, 1987a). Dentre os diferentes objetivos definidos para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de alfafa, podem ser destacados: a obtenção de cultivares que produzam maior quantidade de forragem, materiais adaptados a diferentes condições edafoclimáticas, maior persistência, resistência à doenças e baixo grau de repouso hibernar (Basigalup, 2007). De modo geral, estresses bióticos e abióticos limitam a distribuição geográfica das culturas e acarretam reduções significativas no crescimento e na produtividade de espécies economicamente importantes.

A baixa persistência da alfafa quando utilizada sob pastejo é outro entrave para sua expansão, sendo esta uma característica importante, visto que é a forma de alimentação mais barata quando comparada com silagem ou feno. Uma alternativa para esse problema é a utilização de genótipos com aptidão ao pastejo. Nesse caso, a introdução de resistência às principais doenças foliares em genótipos com aptidão ao pastejo e persistência seria um grande progresso para o melhoramento genético de alfafa no Estado. Diante da contínua demanda de genótipos adaptados ao Rio Grande do Sul, procura-se começar a investigar e agregar características de resistência a doenças em diferentes genótipos, como a cultivar Crioula que é a mais adaptada ao Sul do país. Em experimento realizado pela Embrapa Pecuária Sudeste, esta cultivar apresentou menor infestação de doenças (Rassini et. al., 2006). Esta demanda de informações vem sendo intensificada não apenas no estado do Rio Grande

do Sul, mas também em toda a América do Sul, onde a alimentação dos rebanhos depende amplamente das pastagens.

No Brasil, pouco se sabe sobre a interação entre doenças foliares e genótipos de alfafa e como esses fatores se relacionam com a produção de forragem. Por se tratar de organismo autotetraploide, a herança dos caracteres da alfafa é complexa, o que afeta seu comportamento genético. Em relação à demanda de cultivares adaptadas a tais características, esforços devem ser concentrados no desenvolvimento de programas de melhoramento.

No presente estudo, investigaram-se esses fatores no Rio Grande do Sul, como um modelo para fazendeiros de outras partes do país ou até mesmo do mundo com condições geográficas e climáticas semelhantes. Portanto, o presente trabalho objetivou 1. Identificar as doenças foliares que ocorrem em alfafa no Rio Grande do Sul; 2. Avaliar a resistência genética de genótipos de alfafa ao principal patógeno foliar, *Curvularia geniculata*; 3. Estimar a produção de forragem de alfafa e competição com plantas invasoras em condições de campo; 4. Caracterizar morfológicamente e identificar molecularmente um dos patógenos mais frequentes em alfafa no estado, *Alternaria alternata*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Medicago sativa* L.: taxonomia, origem e importância

A alfafa é uma leguminosa herbácea perene, pertencente ao gênero *Medicago*, na qual compreende várias espécies que apresentam diferentes níveis de ploidia, embora a espécie *sativa* seja tetraplóide $2n=4x=32$ (Queiroz & Bauchan, 1988). O seu número básico de cromossomos é igual a oito. Por se tratar de uma espécie autotetraplóide, a herança dos caracteres em alfafa é complexa (Viands et al., 1988). Seu modo de reprodução se caracteriza, predominantemente, pela alogamia, com polinização do tipo entomófila, apresentando uma acentuada depressão endogâmica (Rumbaugh et al., 1988), o que inviabiliza a formação de linhas endogâmicas para a formação de híbridos no melhoramento (Perez, 2003).

Consagrada como a primeira planta forrageira a ser domesticada (Giaveno, 1996), a alfafa (*Medicago sativa* L.) é originária da Ásia Menor e do Sul do Cáucaso, devido à grande variedade de ecótipos existentes na região (Del Pozo, 1983). Os registros mais antigos da utilização da alfafa datam de aproximadamente 1300 a.C. na atual Turquia (Langer, 1995). Essas regiões são denotadas por manifestar invernos frios e verões quentes e secos, cujos solos são, comumente, bem drenados e próximos à neutralidade, em termos de pH (Michaud et al., 1988). No Brasil, os primeiros informes da cultura da alfafa foram realizados em 1850, quando esta foi adentrada ao estado do Rio Grande do Sul através dos países contíguos: Uruguai e Argentina por meio de imigrantes europeus. Relatos primordiais da incidência dessa cultura no estado se deram nos vales dos rios Caí, Taquarí, Jacuí, Uruguai e nas encostas da Serra do Nordeste (Saibro, 1984; Nuernberg, 1990).

A extensão da área cultivada de alfafa no mundo é difícil de ser estimada, em função da ausência de informações recentes dos países produtores. Contudo, Frame et al. (1998) estimaram-na em mais de 30 milhões de hectares, sendo que cerca de 70% desse território encontra-se nos Estados Unidos e na Argentina. O segundo maior país produtor mundial de alfafa é a Argentina (Dall' Agnol & Scheffer-Basso, 2000), com mais de cinco milhões de hectares, seguido pelo Canadá com 3,3 milhões de hectares. A alfafa produzida nos Estados Unidos está voltada para a fenação e é utilizada na alimentação de gado leiteiro ou corte em confinamento. Por outro lado, na Argentina, é utilizada em pastagens consorciadas com gramíneas – principalmente festuca (*Festuca arundinacea*), para a produção de carne e leite (Dall' Agnol & Scheffer-Basso, 2000).

Na década de oitenta, a área de alfafa no Brasil era de 26 mil hectares com 80% dessa área estabelecida no estado do Rio Grande do Sul (Saibro, 1984). Dados mais atualizados sobre a área de cultura de alfafa no Brasil são imprecisos e muitas vezes conflitantes. Os principais estados brasileiros produtores de alfafa são Paraná e Rio Grande do Sul tendo em vista que, neste último estado, a área cultivada abrange menos de quatro mil hectares, embora esteja presente em 19% dos municípios (Freitas et al., 2009; Mittelman et al., 2008).

Apontada como uma das principais plantas forrageiras cultivadas no mundo, a alfafa possui inúmeras características relevantes, como efetividade na fixação de nitrogênio atmosférico – cuja fixação de N₂ varia de 50 a 463 kg/ha/ano (Vance et al., 1988) –, elevada qualidade nutricional (proteínas, energia, vitaminas e minerais) e alta produção de biomassa (Conrad & Klopfenstein, 1988; Botrel et al., 2001; Ferreira 2005; Rassini et al., 2006). Além disso, a alfafa é uma espécie bastante versátil quanto às possibilidades de utilização, apresentando, também, potencial para ser disponibilizada para alimentação animal na forma de feno, silagem, “pellets” desidratados, forragem verde e pastejo (Barnes & Sheaffer, 1995). A versatilidade de sua utilização possibilita ao produtor ajustar a produção de acordo com o tipo de animal e as condições climáticas dominantes (Nuernberg et al., 1990). As condições de solo, principalmente quanto à parte química, estão entre os mais importantes elementos que afetam o cultivo de alfafa no país, em função da baixa à média fertilidade da maioria dos solos no Brasil (Rassini et al., 2006). A planta se adapta melhor a solos profundos, bem drenados, ligeiramente alcalinos e de alta fertilidade (Melton et al., 1988).

A implantação do sistema intensivo de criação de gado para produção de leite em diversas regiões do Brasil elevou a demanda de alimentos volumosos de alto valor nutritivo para melhor proveito do padrão genético dos animais (Vilela, 1992). Logo, a alfafa é uma opção para esses sistemas, pois é considerada a recordista em termos de valores nutritivos dentre as forrageiras (Peres Netto et al., 2011; Loučka & Tyrolová, 2001). A forma fenada dessa forrageira é uma das mais recomendadas devido à combinação de características de alta produção de matéria seca com máxima conservação de seu valor nutritivo e maior aproveitamento da forrageira, na época em que seu desenvolvimento é menos intenso (Campos et al., 2004).

Em vacas leiteiras alimentadas com alfafa, o fornecimento de alimento energético melhora a relação energia:proteína da dieta (Rodrigues et al., 2008), o que proporciona melhoria no desempenho animal. Apesar de historicamente a alfafa ter sido utilizada para produção de feno, atualmente o melhoramento genético está focado na busca de novos genótipos com aptidão ao pastejo (Perez & Dall’agnol, 2009). Tais genótipos podem contribuir para a criação de ruminantes de elevado potencial genético na produção de carne e leite, cuja alimentação, baseada na utilização de pastagem, é considerada mais econômica. Além de ser utilizada como forrageira, a alfafa é considerada uma cultura promissora para uso como matéria-prima bioenergética (Bouton, 2007) e pode também servir como fonte atrativa de néctar para abelhas (Stuteville e Erwin, 1990).

No Brasil, a alfafa Crioula é apontada como a cultivar mais adaptada e mais utilizada dentre os materiais disponíveis. A RENACAL (Rede Nacional de Avaliação de Cultivares de Alfafa), coordenada pela Embrapa Gado de Leite, realizou testes com diversas cultivares de alfafa disponíveis, majoritariamente importadas, e evidenciou que, ainda que existam materiais que possuam bons índices relacionados à produtividade, os impasses em relação à persistência prosseguem (Botrel et al., 1996; Botrel et al., 2001; Ferreira et al., 2004). A alfafa Crioula se caracteriza por não apresentar queda de folhas durante o seu desenvolvimento, resultando em maior acúmulo de

reservas nas raízes e coroa da planta. Além disso, por ser uma planta sem dormência hiberna, com crescimento nesse período, apresenta crescimento ereto, característico de um tipo morfológico para fenação, aptidão para a qual tem sido mais cultivada no Brasil (Perez, 2002), bem como persistência das plantas sob pastejo (Favero, 2006). Ademais, resultados de experimentos conduzidos em múltiplos locais revelaram que a alfafa Crioula, ou materiais derivados dela, estão constantemente entre os materiais de superior desempenho para a produção de forragem (Botrel et al., 2001; Ferreira et al., 1999).

2.2 Produtividade e utilização da alfafa

A alfafa (*Medicago sativa* L.), chamada de “rainha das forrageiras” (Del Pozo, 1983; Hijano & Navarro, 1995), é classificada como uma das mais importantes forrageiras de clima temperado, por reunir alta qualidade e elevada capacidade de produção de matéria seca (Pereira et al., 1998). Segundo Basigalup (2007), pastagens com alfafa são a base da produção de carne e leite na Argentina, sendo importantes para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e pecuários da Região Pampeana. Para obter-se altos índices de rendimentos na cadeia produtiva da carne e do leite, torna-se fundamental a utilização de sistemas sustentáveis e competitivos frente ao avanço do monocultivo da soja (INTA, 2003).

A alfafa é rica em energia, em proteína e em alguns minerais requeridos pelo gado leiteiro, por exemplo, tais como cálcio, potássio, magnésio e fósforo. Com estas características, sua oferta faz com que os animais aumentem o consumo e conseqüentemente a produção de carne e leite, comparativamente à utilização de gramíneas tropicais (Vinholis, 2006). Além da qualidade nutritiva, esta forrageira apresenta elevado potencial de produtividade. A produção de alfafa obtida por Drummond (1972) na Austrália, em um período de 10 meses, foi entre 7,3 e 13,0 t MS/ha. Nos Estados Unidos, embora a área cultivada com alfafa tenha diminuído nos últimos anos, o rendimento de cada corte por hectare aumentou (Bouton, 2001). Este aumento da produção é atribuído ao uso de cultivares melhoradas, simultaneamente com a utilização de manejo adequado nos sistemas de produção (Bouton, 2007).

O potencial de produção da alfafa no Brasil é acima de 25 t MS/ha/ano (Oliveira, 1986; Fontes et al., 1993; Ferragine et al., 2004). No entanto, no Rio Grande do Sul a produtividade média é de 10 t MS de feno/ha/ano (Mittelnann et al., 2008). Foram relatados valores de 12,3 t/ha de MS no Rio Grande do Sul (Saibro, 1972), e 15,0 t/ha de MS no Paraná (Keplin e Santos, 1991), ambos com a cultivar Crioula. Em Santa Catarina, há relatos de produtividade de 7 t a 10 t MS/ha (Nuernberg et al., 1990).

Diversos trabalhos com alfafa na região Sudeste do Brasil evidenciaram que essa forrageira pode produzir até 20 t/ha/ano de matéria seca, com média de teor de proteína de 25% (Fontes et al., 1993; Vilela et al., 1994; Botrel et al., 1996; Rassini, 1998; Evangelista et al., 2001; Ferreira et al., 2004). Na Embrapa São Carlos, São Paulo, em clima tropical de altitude, Oliveira (2006) verificou, média de produção anual de 21 toneladas de matéria

seca por hectare, com três cultivares Crioula, sob pastejo. Produção anual de mais de 40 t de matéria seca por hectare, na Argentina, em condições irrigadas, foi obtida por Spada (2005), quando forneceu 1500 mm de água, durante o ciclo de crescimento (Basigalup et al., 2007). Isso demonstra que essa planta apresenta elevada produtividade quando adequadamente irrigada.

Em relação ao desempenho animal, segundo Bates et al. (1996), pode-se obter ganhos de peso médio de 880 g/cabeça/dia com bovinos de corte. No que tange a leite, a produtividade está ao redor de 20 a 25 kg de leite/vaca/dia, sem a utilização de concentrados (Vilela, 1994; Guaita & Gallardo, 1996).

O National Agricultural Statistics Service formalizou no ano de 2000 uma análise do desempenho da alfafa em relação à produtividade e foi constatado que as cultivares lançadas atualmente estão superando as cultivares mais antigas. Outra exemplo da produtividade da alfafa pode ser verificada nas estatísticas de produção nacional. No Brasil, a alfafa, quando bem manejada, possibilita a produção de um material de excelente qualidade com até onze cortes por ano, o que resulta no mínimo quatro cortes a mais que nos países de clima temperado (Moreira, 2007).

Ao comparar-se as forrageiras tropicais (C₄) com as temperadas (C₃), observa-se que as forrageiras temperadas, como a alfafa, azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e os trevos (*Trifolium* spp) apresentam melhor qualidade nutricional em termos de digestibilidade, teor de proteína bruta, menos teor de fibras e maior palatabilidade (Vilela, 1994). Com a intensificação da produção de leite, visando obter maior produtividade e menores custos, é essencial a suplementação de qualidade, portanto, o uso da alfafa como alternativa alimentar para o rebanho leiteiro vem crescendo consideravelmente no Sudeste do país (Ferreira et al., 2015).

Devido às excelentes condições de clima e à possibilidade de produção superior à dos países que possuem as maiores produções, a perspectiva para o cultivo da alfafa no Brasil é muito grande, apesar das tímidas iniciativas ocorridas até o presente momento e praticamente restritas à fenação. A produção animal pode ser aumentada quando o pastejo é limitado à parte superior do dossel. Entretanto, o desempenho cai quando os animais são forçados a consumir a camada inferior, que apresenta menor qualidade (Dougherty & Lauriault, 1999). A alfafa, utilizada sob forma de pastejo, tem seu custo reduzido em 50% quando comparada à fenação e ambas formas podem ser uma alternativa para reduzir os custos da alimentação dos bovinos, em razão da economia com fertilizantes nitrogenados, da diminuição do uso de alimentos concentrados e da contribuição para o aumento da produção de forragem na época seca do ano, dada sua baixa estacionalidade (Passos, 1994; Ferreira et al., 2015).

Frame et al. (1998) destacaram que o declínio progressivo da produção da alfafa ao longo dos anos pode ser atribuído à competição com invasoras, ataque de pragas e doenças, pastejo intenso e cortes muito frequentes. A falta de conhecimento sobre tais fatores contribui significativamente para a baixa utilização dessa forrageira no Brasil (Vilela et al., 2008).

Segundo Counce et. al (1984), técnicas de manejo para a utilização da alfafa sob pastejo foram desenvolvidas de modo a adaptá-la às características da planta, historicamente selecionada para a utilização sob cortes. Apesar disso, perdas expressivas ainda ocorrem (Counce et al., 1984), por isso a preferência por fenação. Os estudos de melhoramento de alfafa no Brasil ainda são escassos quando comparados com outras espécies, e a introdução de materiais do exterior vem sendo a principal estratégia para a disponibilização desse germoplasma aos programas de melhoramento (Ferreira & Pereira, 2005).

Dentre as importantes características agronômicas para o melhoramento de forrageiras, a produtividade de matéria seca se destaca e tem sido avaliada na maioria dos ensaios comparativos de desempenho de cultivares de alfafa (Julier et al., 2000; Botrel et al., 2001; Guines et al., 2002). Contudo, essas características apresentam, na maioria das situações, grande influência ambiental, como é o caso do potencial de produção de alfafa, que pode atingir em torno de 25 t MS ha⁻¹ ano⁻¹, porém, muitas vezes, essa produção não é obtida devido a limitações edafoclimáticas (Fontes et al., 1993).

Para identificação de cultivares de alfafa mais adaptadas a um determinado ambiente, são necessárias avaliações periódicas por meio da avaliação em cortes sucessivos de modo a mensurar o comportamento das principais características fenotípicas (Pereira, 1998). Assim, pode-se estimar a variabilidade genotípica entre o material disponível e a repetibilidade do desempenho de cada cultivar ou progênie (Ferreira et al., 1999). A produtividade é o resultado final de diversas outras características, como resistência a pragas e doenças e tolerância aos diversos tipos de estresses abióticos, podendo ser utilizada como característica representativa da adaptação dos diferentes materiais genéticos. Essa conjuntura torna-se importante por facilitar a avaliação dos ensaios pelo menor número de características avaliadas e por reduzir o custo final dos trabalhos de melhoramento (Ferreira et al., 2010).

2.2.1 Problemáticas do desenvolvimento da alfafa no Brasil

A alfafa é uma das mais importantes leguminosas forrageiras, sendo amplamente cultivada em diversos continentes do mundo em virtude do seu valor econômico significativo e notáveis características agronômicas (Chao et al., 2009). As pesquisas com alfafa no Brasil são relativamente recentes (Fontes et al., 1993; Botrel et al., 1996; Pereira et al., 1998; Ferreira et al., 1999; Botrel et al., 2001; Perez et al., 2002; Perez & Dall'Agnol, 2009) e sempre indicam essa leguminosa como volumoso de alta produtividade e valor nutritivo.

A maioria das tecnologias utilizadas para produção da alfafa foi adaptada de informações obtidas para países de clima temperado. Desse modo, a falta de conhecimento sobre cultivares, controle de plantas invasoras, pragas e doenças que ocorrem mais comumente nos trópicos têm constituído obstáculos ao aumento do cultivo dessa forrageira (Pereira, 2008). Os maiores entraves para a expansão do uso da alfafa no Brasil estão associados à falta de conhecimento sobre seu manejo nas variadas formas de utilização (Paim,

1994), à baixa fertilidade do solo bem como à escassez de cultivares adaptadas às diferentes regiões do país (Lédo et al., 2002).

Outra dificuldade no aumento do número de alfafais no Rio Grande do Sul, e também em outros estados brasileiros, é a baixa persistência da cultura da alfafa, sendo essa sua maior limitação quando utilizada sob pastejo. A exiguidade de persistência da alfafa sob pastejo levou a seleção de plantas sob lotação contínua a ser um método para melhor detectar materiais persistentes por disponibilizar as situações de estresses comuns no campo, ou seja, pisoteio, tração, excreções e desfolhações quase diárias (Smith et al., 1989).

Na alfafa, e em outras espécies de forrageiras perenes, busca-se, usualmente melhorar características morfológicas, fisiológicas e agrônômicas que promovam superior rendimento, melhor qualidade da forragem e maior persistência das plantas no sistema de produção. Todavia, selecionar progênies superiores não é incumbência simples, uma vez que os caracteres de interesse em sua pluralidade de herança quantitativa apresentam comportamento complexo por serem influenciados pelo ambiente, bem como estarem inter-relacionados de forma que a seleção de um provoca uma série de mudanças em outros (Cruz, 2006). Adicionalmente, a persistência da alfafa é fortemente afetada por interações entre o hábito de crescimento e as práticas de manejo uma vez que a baixa persistência poderia estar, também, ligada em parte às doenças foliares da raiz ou da coroa (Beuselinck et al., 1994).

Dentre os fatores que contribuem para a baixa persistência de alfafa e cornichão, ambas leguminosas forrageiras, destaca-se a pouca atenção dos programas de melhoramento genético à resposta das plantas ao pastejo (Perez & Dall'Agnol, 2009). Entretanto, o melhoramento genético de alfafa para aptidão ao pastejo é uma alternativa importante para o desenvolvimento e estabelecimento dessa cultura (Perez, 2003). No Brasil, os estudos com o objetivo de selecionar alfafa tipo pastejo são recentes, no entanto trabalhos têm mostrado que as características morfológicas de plantas de alfafa influenciam na aptidão ao pastejo (Perez & Dall'Agnol, 2009; Brandoli, 2009).

O principal fator limitante na seleção para a tolerância de pastejo na alfafa é a dificuldade de desenvolver técnicas precisas para selecionar as muitas características morfológicas e fisiológicas associadas a esse caráter (Scheffer-Basso & Muniz, 2010). Segundo Briske (1996), a aptidão ao pastejo depende de mecanismos que possibilitem às plantas sobreviverem e crescerem sob pastejo. Esses mecanismos são o escape (mecanismos que reduzem a probabilidade da planta ser desfolhada) e a tolerância (mecanismos que aumentam o crescimento da planta após o pastejo). O primeiro depende de características morfológicas e componentes bioquímicos, enquanto que o segundo depende da disponibilidade meristemática e dos processos fisiológicos da planta que permitam a rebrota (Briske, 1996).

Na cultura da alfafa, as cultivares que possuem aptidão ao pastejo possuem características morfológicas particulares, como: hábito de crescimento mais prostrado e entrenós mais curtos em relação às cultivares tipo-feno (Bouton et al., 1991; Hijano & Basigalup, 1995). Smith Jr. et al., (1989) relataram que a resistência a pragas e doenças poderia estar relacionada à aptidão ao pastejo.

Pesquisas no Sul do Brasil estão desenvolvendo genótipos com esse tipo de aptidão, como é o caso da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em parceria com a Embrapa Pecuária Sul – Bagé, RS. Perez (2003), trabalhando com diferentes genótipos de alfafa na UFRGS, evidenciou que a aptidão ao pastejo pode ser relacionada com entrenós de dimensão reduzida e demonstrou que existe variabilidade fenotípica na fase inicial de desenvolvimento em alfafa, permitindo separar genótipos quanto à aptidão ao pastejo através do comprimento do primeiro entrenó – região situada entre o nó cotiledonar e o nó da primeira folha unifoliolada, possibilitando a detecção precoce de tal aptidão. Tal estudo revelou que plântulas da cv. Crioula exibem variabilidade quanto ao comprimento de nós e entrenós. Essa variabilidade indica a possibilidade de seu uso como indicador de aptidão ao pastejo de alfafa, podendo acelerar e tornar o processo de melhoramento mais eficiente (Perez, 2003; Favero, 2006).

Favero et al. (2008) selecionaram populações de alfafa em Passo Fundo, RS, com variabilidade no rendimento da matéria seca e sobrevivência com base nessa característica. Um dos genótipos encontrados nestes estudos foi utilizado no presente trabalho (E₁C₄) a fim de avaliar seu desempenho e, se os resultados forem promissores, serão inseridas outras características de interesse agrônomo no genótipo com aptidão a pastejo.

Para obtenção de genótipos superiores é necessária a reunião de uma série de atributos favoráveis em determinados genótipos que confirmem rendimento comparativamente maior e satisfaçam as exigências do mercado. Com isso, a seleção baseada em uma ou poucas características mostra-se inadequada, levando a um produto final superior apenas em relação aos poucos caracteres selecionados (Cruz & Regazzi, 1997). Outras informações de Saibro (1984), no Rio Grande do Sul, e de Pedroso et al. (1987), no Paraná, apontam os seguintes fatores de baixa produtividade e perenidade dos alfafais nesses estados: ataques de insetos e doenças, manejo incorreto da adubação e intensa competição por invasoras.

Sob pastejo, Hoveland (1992) relatou que as principais causas responsáveis por falhas na utilização de alfafa estão relacionadas à mortalidade das plantas quando em condições de pastejo contínuo intenso, o que promove a eliminação do estande de plantas e favorece o aumento das invasoras.

As plantas invasoras podem reduzir consideravelmente a produtividade da cultura da alfafa, competindo por água, luz, nutrientes, além de reduzirem a qualidade da forragem e das sementes (Peters & Peters, 1992). Com a expansão da alfafa para novas áreas, diferentes do seu centro de origem, novos problemas surgiram e também não foi diferente no aspecto fitossanitário. Na literatura brasileira consultada foram encontradas algumas citações sobre a ocorrência de doenças em alfafa em determinadas regiões do Brasil e, embora sejam trabalhos com abrangência limitada, se constituem em excelente indicativo de que tais problemas podem estar ocorrendo também em outras regiões do país (Porto, 2008).

Em relação a doenças e problemas com invasoras, observa-se que ainda são escassas as informações no Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul. Diante desse fato, ambas as informações serão elucidadas com o

presente trabalho, assim como o estudo da utilização de cultivares resistentes às doenças e mais eficientes em relação à habilidade competitiva, o que resulta em aumento de produtividade de biomassa da alfafa. As futuras cultivares de alfafa deveriam apresentar incremento em rendimento e resistência aos diversos fatores bióticos. Ainda, é desejável que fossem desenvolvidas cultivares portadoras de características especiais que possibilitem sua utilização sob condições específicas de ambiente e formas de utilização (corte e pastejo) (Pereira, 2008).

2.3 Doenças na alfafa

Com a expansão das pastagens e intensificação da atividade pecuária nos últimos anos, várias doenças de forrageiras começaram a ter importância significativa, causando perdas em produtividade e qualidade de pastagens (Mallmann et al., 2013). No Brasil, as doenças que atingem a alfafa ainda são praticamente desconhecidas, bem como os danos causados por elas. Atualmente, apesar de existirem recomendações para o uso de fungicidas para tratamento de sementes de alfafa, pouco se conhece sobre os patógenos foliares que causam danos a essa cultura no Brasil (Oliveira & Corsi, 1998). Os primeiros trabalhos de melhoramento genético de alfafa foram realizados nos Estados Unidos entre 1903 e 1915, buscando a tolerância ao frio e, posteriormente, a resistência a doenças (Jacques, 1975). Os países que se dedicam intensivamente ao cultivo dessa forrageira, como Estados Unidos e Argentina, por exemplo, estudam exaustivamente estes organismos, sendo esse, inclusive, um dos aspectos mais enfatizados na seleção e no desenvolvimento de cultivares (Pozza & Souza, 1994).

O próprio manejo da cultura da alfafa proporciona o desenvolvimento de doenças, principalmente durante as operações de cortes, enleiramentos, recolhimento e controle de plantas daninhas (Juliatti et. al. 2011). Todas essas práticas culturais podem causar injúrias às raízes, folhas e à coroa, o que facilita a penetração dos patógenos, além da sua disseminação. Assim, em alfafais mecanizados, há uma tendência do aparecimento de diversos tipos de fungos que podem retirar os nutrientes de seus tecidos vegetais (Grayer & Kukubun, 2001). As doenças provocam perdas econômicas de dois tipos: perdas diretas e perdas indiretas. As perdas diretas envolvem decréscimo da produtividade, causado pela mortandade de plantas ou pela diminuição do vigor, e redução da qualidade da forragem, provocada pelas manchas foliares e ou pela desfolha. As perdas indiretas compreendem diminuição do valor nutricional da forragem causada pela perda e pela degradação dos compostos químicos de alto valor nutricional (proteínas, açúcares, lipídios e vitaminas), presença de micotoxinas, diminuição na nodulação, aumento da susceptibilidade ao ataque de insetos e proliferação de plantas daninhas agressivas (Gieco & Basigalup, 2011). Em períodos chuvosos e quentes, de uma maneira geral, as doenças sempre são mais abundantes e as lesões se desenvolvem mais rapidamente em número e tamanho, levando à desfolha da planta (Stuteville & Erwin, 1990).

A maior parte das espécies de fungos retira os nutrientes de tecidos vegetais mortos, reciclando-os para serem utilizados por outros organismos

(Grayer & Kukubun, 2001). Segundo Stuteville e Erwin (1990), as doenças são o resultado da interação dos hospedeiros suscetíveis, dos patógenos virulentos e das condições ambientais que predispõem à doença. Os patógenos podem sobreviver em folhas de plantas hospedeiras e se multiplicarem sob condições de baixa umidade ou ambiente desfavorável sem causar sintomas aparentes da doença, já as epidemias ocorrem quando as condições do ambiente se tornam favoráveis (Thall & Campbell, 1987a). De acordo com Marchi et al. (2011), o conhecimento sobre os agentes etiológicos, sobretudo com respeito à influência dos mesmos na capacidade de suporte e na produtividade das pastagens, ainda é limitado no Brasil resultando em dificuldades no estabelecimento de medidas específicas para o manejo de doenças em plantas forrageiras.

A alfafa, assim como outras leguminosas forrageiras, apresenta problemas em relação à falta de cultivares adaptadas às condições locais. Em decorrência disso, a maior parte da semente comercializada no Brasil resulta da importação de materiais pouco adaptados, acarretando baixa persistência e, conseqüentemente, menor aceitação da espécie por parte dos produtores (Viecelli, 2000). Entre as cultivares disponíveis no mercado mundial, a Alfagraze foi a primeira a ser desenvolvida para alta persistência sob pastejo (Bouton et al., 1991), possuindo boa produtividade de forragem e de sementes (Smith & Bouton, 1993). Além dessa cultivar, várias outras foram posteriormente desenvolvidas, como por exemplo, a cultivar norte-americana ABT 805, que também apresenta aptidão ao pastejo e não apresenta período de dormência (Bouton et al., 1991). No entanto, deve-se enfatizar que a cultivar Crioula continua sendo a mais utilizada no País, apresentando boa estabilidade (Ferreira et al., 2004). Além do mais, é considerada como o material nacional melhor adaptado, embora existam outros materiais que vêm sendo testados pela RENACAL (Rede Nacional de Avaliação de Cultivares de Alfafa), com produtividades similares ou superiores, apesar de problemas de persistência (Dall'Agnol & Scheffer-Basso, 2000).

A alfafa é susceptível ao ataque de mais de 70 tipos diferentes de patógenos, tendo em vista que aproximadamente 30 são considerados limitantes ao crescimento e produção dessa cultura (Thal & Campbell, 1987b; Kimati, 1999). Segundo lamauti & Salgado (1997), as principais cultivares de alfafa utilizadas no Brasil – Crioula, CUF-101, Flórida 77 e Pioneer – não têm resistência satisfatória às principais doenças.

O emprego de agroquímicos tem sido a forma mais comum utilizada no controle de doenças, porém verifica-se algumas desvantagens, principalmente por contaminar o meio ambiente com resíduos tóxicos não biodegradáveis, pela resistência desenvolvida pelos microrganismos a esses compostos (Reis *et al.*, 1995), custo alto e número de dias de espera após a aplicação, afim de evitar resíduos nas plantas que serão consumidas por animais. A presença de doenças também é um problema que afeta a persistência, podendo reduzir drasticamente o estande da pastagem. As limitações no crescimento de alfafa são provavelmente resultado de uma interação complexa de uma ou mais doenças com outras restrições, tais como estresse hídrico, fertilidade do solo, pressão de pastejo e competição (Latch & Skipp 1987).

Plantas resistentes, rotação de culturas, fertilidade do solo e épocas de cortes adequadas podem auxiliar no controle dessas pragas. Problemas de pragas e doenças dependem do clima da região onde a pastagem está sendo cultivada e da estação (Colhoun, 1973; Jahufer 1994), portanto, os meses mais quentes (25 a 30°C) e com alta umidade são um grave problema para algumas culturas (Maffia *et al.* 1980).

O melhoramento genético, visando à resistência às moléstias, requer um entendimento sobre a interação patógeno-hospedeiro e também como os efeitos ambientais afetam o desenvolvimento da doença. A seleção recorrente fenotípica, por exemplo, tem sido utilizada com sucesso no desenvolvimento de populações de alfafas resistentes (Frosheiser & Barnes, 1973). A alfafa possui potencial para ampliar a sua utilização no país, porém são necessários maiores investimentos na área de melhoramento genético visando a obtenção de cultivares com maior resistência a doenças, aptidão ao pastejo e diminuição de problemas com plantas invasoras.

A criação de novas cultivares no Brasil, com tais características, possibilitaria o seu cultivo em diferentes regiões brasileiras, com conseqüente incremento da produção de forragem de alto valor nutricional. Atualmente, a Crioula é a única variedade cultivada no Brasil, com boa adaptabilidade e boa estabilidade na região centro-sul (Pereira & Ferreira, 2008).

Nos Estados Unidos e na Argentina, o progresso do melhoramento de alfafa para resistência a doenças contribuiu muito com a expansão de sua utilização e produtividade (Hill *et al.*, 1969; Vance *et al.*, 1988; Erwin, 1990; Rhodes, 1990; Hijano & Navarro, 1995; Hijano & Perez Fernandez, 1995). A resistência aos fatores bióticos representa muitas vezes a diferença entre o fracasso e o estabelecimento de um alfafal produtivo e persistente (Frosheiser & Barnes, 1973). Dessa forma, os 'entraves' fitopatológicos devem ser encarados com seriedade, para que a alfafa possa ser inserida e ampliada em sistemas sustentáveis e competitivos de produção de forragem no País (Kimati, 1999).

Os fungos constituem o grupo de microrganismos que mais ataca a alfafa (Honda e Honda, 1990). Os gêneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Aphanomyces*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Rhizopus* ocorrem com alta frequência em plântulas de alfafa (Grau, 1990; Erwin, 1990; Honda e Honda, 1990). Segundo Graham *et al.* (1979) e Thal & Campbell (1987b), os principais patógenos causadores de desfolha em alfafa, encontrados com frequência na América do Norte, são *Leptosphaerulina briosiana*, *Phoma medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Stemphylium botryosum* e *Cercospora medicaginis*. Ainda os autores Leath *et al.* (1988), *Colletotrichum trifolii* relatam que o principal fungo causador de doença em alfafa nos Estados Unidos e em outras regiões do mundo. Nos Estados Unidos da América, foram identificados aproximadamente 50 agentes patogênicos que danificam a alfafa, destacando-se fungos, bactérias, nematóides e vírus (Graham *et al.* 1979), e foi grande o avanço em relação à resistência de alfafa a doenças. O Oídio, causado por *Peronospora trifoliorum* e a ferrugem, causada por *Uromyces striatus* Schroet. var. *medicaginis* (Pass.) Arth. podem causar desfoliação em cultivos estabelecidos. No entanto, cultivares resistentes a ambos os patógenos são

disponíveis e devem ser cultivadas em áreas onde estas doenças são problemas (Leath et al., 1988, Elgin et al., 1988).

As doenças causadas por fungos podem ser a maior causa da redução da produtividade e valor nutritivo em alfafa (Frate & Davis, 2007). Por isso, melhoristas de plantas do país responsável pela maior produção mundial de alfafa – Estados Unidos, estão sempre à frente em relação ao lançamento de cultivares resistentes a diversos tipos de doenças. Na Argentina, detectaram ao redor de 25 doenças que podem afetar a cultura, mas com diferente grau de importância no País (Hijano e Perez Fernandez, 1995). No Brasil, Oliveira (1986) constatou a presença das doenças cercosporiose (*Cercospora medicaginis*), ferrugem (*Uromyces striatus*), antracnose (*Colletotrichum trifolii*) e mosaico [AMV- vírus do mosaico da alfafa]. Pozza & Souza (1994), em trabalho conduzido em Lavras-MG para a avaliação da ocorrência de doenças na cultura da alfafa, identificaram os seguintes patógenos: *Colletotrichum trifolii*, *Cercospora medicaginis*, *Uromyces striatus*, *Leptosphaerulina briosiana*, *Peronospora trifoliorum* e *Fusarium oxysporum*, sendo os quatro primeiros responsáveis por queda de folhas na cultura. Para Porto (2008), as doenças mais importantes são a antracnose, a mancha-das-folhas, a ferrugem e o mosaico-da-alfafa. A severidade, que é uma proporção de área foliar doente resultante do tamanho e número de lesões, é uma condição para desfolhamento das partes infectadas e disseminação da doença através da planta. Esses componentes podem atuar independentemente durante o progresso da doença (Boff *et al.* 1991), logo, a porcentagem de folhas infectadas da planta seria consequência de maior ou menor suscetibilidade demonstrada pelas folhas de uma mesma planta, relacionada com o estágio fenológico e o efeito de diferentes quantidades de inóculo produzido pelo patógeno (Mello 1995). As doenças que afetam as folhas e as hastes são comuns na alfafa, causando frequentemente reduções significativas de rendimento (Rizvi e Nutter, 1993). Conforme Campbell & Madden (1990), as duas forças competitivas – desfolha causada pela doença e rebrote do hospedeiro – são mecanismos que resultam na manutenção de níveis de severidade de doenças relativamente baixos durante a incidência de epidemias de doenças foliares.

No Brasil, as informações sobre as doenças que ocorrem na alfafa são restritas, mas, em função do interesse crescente por esta cultura é fundamental o desenvolvimento de pesquisas a fim de definir as principais moléstias que ocorrem nas diferentes regiões brasileiras bem como estimar os danos causados por elas e selecionar cultivares produtivas e resistentes a patógenos.

2.3.1 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

O gênero *Alternaria* engloba espécies que merecem atenção no meio agrícola pois são agentes causais de doenças importantes que afetam algumas culturas. Cada organismo patogênico apresenta sua forma particular de colonizar seus hospedeiros. As espécies de *Alternaria* são preferencialmente patógenos foliares e com isso provocam perdas na planta pela redução de seu potencial fotossintético. Além disso, fungos do gênero

Alternaria incluídos taxonomicamente na Subdivisão Deuteromycotina – Classe Hyphomycetes, Ordem Hyphales, Família Dematiaceae – infectam sementes e podem destruí-las completamente causando perdas na germinação, bem como podem ser transmitidos às plântulas causando doenças (Rotem, 1994). Após realizar-se a identificação dos patógenos encontrados em folhas de alfafa (cv. Crioula), foi possível quantificar a incidência e severidade das doenças encontradas à campo e posteriormente a realização dos Postulados de Koch no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ambos os patógenos, *C. geniculata* e *A. alternata* demonstraram maior ocorrência e severidade de lesões nas plantas de alfafa.

As alternarioses caracterizam-se por infectar plântulas, folhas, caules, hastes, flores e frutos de várias culturas, além disso, de maneira geral, são doenças típicas de primavera e verão apresentando alto poder destrutivo nas condições de temperaturas e umidade elevadas. Os sintomas aparecem primeiramente nas folhas mais velhas e evoluem para as partes mais novas da planta onde se expressam através de lesões foliares necróticas com característicos anéis concêntricos e bordos bem definidos. A ocorrência de epidemias severas está sempre associada às temperaturas diárias de 25 a 32°C. As temperaturas mínimas, ótimas e máximas necessárias para a germinação dos conídios são as entre 5 - 7, 25 - 27 e 30 - 32°C, respectivamente. O crescimento micelial de *Alternaria alternata* f. sp. citri nas temperaturas de 25°C, 28°C e temperatura ambiente não apresentou diferenças significativas, sendo a temperatura de 25°C a que mostrou crescimento mais acentuado da colônia. Na temperatura de 30°C, observa-se uma redução no crescimento enquanto que na temperatura de 37°C não ocorreu crescimento algum (Canhos et al. 1999; Timmer, 2000; Prates, 2004).

Os resultados obtidos no experimento realizado por Rotem (1994) demonstram que na temperatura de 28°C os conídios apresentaram os melhores índices, tanto em comprimento e largura quanto em número de conídios/mL, caracterizando-a como a melhor temperatura para obtenção de esporos. Além disso, a umidade, que pode ser conferida pela chuva, água de irrigação ou orvalho, é um fator fundamental para a germinação, infecção e esporulação do fungo (Tófoli et. al, 2013). Havendo umidade e calor suficientes, os conídios germinam e infectam as plantas rapidamente podendo o fungo penetrar diretamente pela cutícula, por ferimentos ou através dos estômatos. A colonização é intercelular, invadindo tecidos do hospedeiro, provocando alterações em diversos processos fisiológicos que se exteriorizam na forma de sintomas. Para a exibição dos sintomas, um ou dois dias são necessários após a germinação dos esporos (Timmer et al., 2000).

A alta severidade da doença, em geral, é caracterizada por intensa redução da área foliar, queda do vigor das plantas, quebra de hastes, depreciação de frutos e tubérculos, morte de plantas e conseqüente redução da produção e qualidade (Furtado et al., 2008). Em folhas jovens, os sintomas iniciais caracterizam-se por pequenas manchas de cor marrom ou preta, circundadas ou não por halos amarelados que, posteriormente, estendem-se, podendo abranger grande área da folha (Akimitsu et al. 2003).

Nos pomares de tangerinas e híbridos, a mancha-marrom de alternaria, causada por *A. alternata*, foi considerada a principal doença fúngica

ocorrente (Peres et al., 2003). A alta severidade da doença em regiões de clima úmido, onde o controle é muito difícil, tem ocasionado o abandono de plantios comerciais de variedades; o que se mostra altamente suscetível nos Estados Unidos, por exemplo (Timmer et al., 2000). A mancha-marrom de alternaria também tem sido relatada na África do Sul (Swart et al., 1996), Espanha (Vicent et al., 2000), Itália (Bella et al., 2001), Argentina (Peres et al., 2003), entre outros (Bastianel et al., 2005).

Além disso, Sales (1992) constatou que a *Alternaria alternata* reduziu a germinação e o desenvolvimento das plântulas de ipê-amarelo e Mallmann et al. (2013) constataram que a *Alternaria* sp. está entre os fungos com maior incidência nas sementes da safra 2009/2010 de *Brachiaria* sp. e *Panicum maximum* em diferentes regiões do Brasil.

Finalmente, também detectou-se a presença de *A.alternata* em sementes assintomáticas de forrageiras coletadas em áreas de campo no leste de Washington e oeste de Idaho, EUA (Dugan & Lupien, 2003). No Brasil, para alfafa, o primeiro relato de *A. alternata* no Sul do Brasil foi constatado durante o estudo desta Tese.

2.3.2 *Curvularia geniculata*

O gênero *Curvularia* atualmente é composto por mais de 40 táxones que se distinguem por diferenças relativamente evidentes na morfologia dos conídios, número de septos e aspectos culturais (Sivanesan 1987, Hosokawa et al. 2003, Zhang-Meng & Zhang 2003, Zhang-Meng et al. 2004, Chung, 2005). A variabilidade morfológica observada nos fungos enquadrados em *Curvularia* levou à divisão das espécies em três grupos durante a criação do gênero sendo eles: a) 'geniculata', com a espécie-tipo *C. geniculata* (Tracy & Earle) Boedijn; b) 'lunata', com a espécie-tipo *C. lunata* (Tracy & Earle) Boedijn; e c) 'maculans', com a espécie-tipo *C. maculans* (Bancroft) Boedijn (= *C. eragrostidis* (Henn.) Mey.), que se diferenciaram pela forma dos conídios e número de septos (Corbetta 1964).

Com relação à mancha causada por *Curvularia geniculata*, os relatos de danos são escassos ou de difícil acesso no meio científico. Os primeiros sintomas da mancha de *Curvularia* causada por *C. geniculata* manifestam-se em formas de pequenas necroses nas folhas e partem do centro das extremidades em direção das mesmas. Incidência de *Curvularia* sp. em Aveia-preta tem sido observada em diferentes municípios do Rio grande do Sul (Bevilaqua et al., 1995; Farias et al., 2002), sendo encontradas principalmente após períodos de chuvas seguidos por altas temperaturas. Foi relatada a ocorrência de *Curvularia* sp. em sementes e folhas de alfafa na Arábia Saudita (Al-Askar, 2012), Estados Unidos (Kommedahl & Ohman, 1960; Uddin & Knous, 1991), Índia (Rao et al., 1992 Nitharwal et al., 1991) , Suécia (Muller, 2012) e em fenos de alfafa no sudeste do Brasil (Freitas, 2002). Na Nova Zelândia registrou-se a presença de *Curvularia* sp. em sementes e folhas de cereais (Sheridan, 1977), na China em *Lolium perenne* (Tian & Spangenberg, 2008) e na Índia em sorgo (Rizvi, 2006).

De um modo geral, as doenças das plantas reduzem a sobrevivência e a produtividade das culturas forrageiras (Pratt, 1999). lida &

Takahashi (1967) descreveram os principais aspectos do fungo *Curvularia* sp. quanto aos fatores ambientais favoráveis para o desenvolvimento. Segundo os autores, a germinação do esporo ocorre entre 15°C e 37,5°C, sendo 30°C a temperatura ótima; a temperatura ideal para crescimento do micélio em meio de cultura é de 27,5°C; a doença ocorre em uma ampla escala de temperatura (15°C a 38°C) e se torna mais severa entre 25°C e 30°C; a infecção é acelerada em uma condição escura; a severidade da doença foi aumentada mantendo as plantas em alta umidade dois dias antes da inoculação, sendo mais severa em folhas jovens. Em resumo, pode-se dizer que o maior desenvolvimento dessa doença ocorre com as altas temperaturas após períodos de chuva, ou seja, em clima quente e úmido. Como uma possível solução, o pastejo ou cortes na pastagem, geralmente, tendem a diminuir a severidade dela (Leath, 1988).

Embora as informações a respeito de cultivares com resistência à *Curvularia* sp. sejam ainda incipientes, sabe-se que a resistência genética é a maneira mais eficiente e, também econômica, para se combater ou evitar as doenças e pragas (Lima, 1996). Portanto, nos programas de melhoramento genético, a seleção de genótipos resistentes às principais doenças é de fundamental importância (Leath et al. 1988).

3. HIPÓTESES

- Existe variabilidade genética nas populações de alfafa para resistência a doenças fúngicas foliares.
- É possível realizar seleção de plantas de alfafa resistentes à *Curvularia geniculata* em experimentos de campo e casa de vegetação através de inoculação e posteriores avaliações.
- A cultivar 'Crioula', por ser mais adaptada à Região Sul do Brasil, tem maior probabilidade de possuir genes de resistência e adequados índices de produções de forragem.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Realizar coletas de alfafa cultivadas a campo a fim de identificar as principais doenças fúngicas foliares ocorrentes no estado e verificar a sua patogenicidade para dar início ao trabalho de melhoramento genético para resistência às principais doenças diagnosticadas.

Verificar a variabilidade genética existente para resistência às principais doenças fúngicas foliares em diferentes genótipos no Rio Grande do Sul para dar início ao processo de seleção de plantas visando resistência a tais doenças.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar as principais doenças fúngicas foliares ocorrentes em alfafa no Rio grande do Sul.
- Analisar morfológicamente e identificar molecularmente o patógeno mais agressivo em alfafa no Sul do Brasil.
- Verificar a existência de variabilidade genética em populações da alfafa e selecionar plantas com resistência à *Culvularia geniculata*.
- Avaliar a produção de forragem e competição com plantas invasoras de diferentes genótipos de alfafa.

CAPÍTULO II³

³ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista African Journal of Agricultural Research (Apêndice 1) já publicado e apresentado no Apêndice 3.

FIRST REPORT IN SOUTHERN BRAZIL OF *ALTERNARIA ALTERNATA* CAUSING ALTERNARIA LEAF SPOT IN ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

Mariana Rockenbach de Ávila^{1*}, Miguel Dall' Agnol¹, Érika Sayuri M. Koshikumo², José Antônio Martinelli², Gerarda Beatriz Pinto da Silva², Raquel Schneider-Canny¹

¹Department of Forage Plants and Agrometeorology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ²Department of Plant Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. *Corresponding Author. Email: marianaravila@gmail.com.

Received 6 October 2014; Accepted 22 January, 2015

ABSTRACT

Alfalfa plants with symptoms of *Alternaria* leaf spot from the Atlantic forest biome and Pampa biome, Brazil, were collected to identify the pathogen associated in this disease. The pathogen was isolated, analyzed morphologically according to literature and later molecularly identified. After that, pathogenicity tests were conducted in a greenhouse to confirm the Koch's postulates. The first symptoms occurred after five days of inoculation. Initially the symptoms were dark formations becoming rounded blotches about 1 mm to 3 mm in diameter that appeared on both edges and in the center of the leaflets. From this data, we concluded that this is the first report of *Alternaria alternata* in Brazil.

Keywords: Forage legumes, fungal disease, inoculation, pathogenicity.

INTRODUCTION

Alfalfa stands out from other forage legumes species in terms of its nutritive value, but it is susceptible to attack from more than 70 different pathogens (Thal and Campbell, 1987). In Brazil, there are few studies and only thirteen fungal diseases have been detected (Iamauti and Massola, 2005). When alfalfa plants are attacked by foliar pathogens, losses in quality of hay, reduction in green forage production and limitations on the development of plants occur. Information about diseases occurring in alfalfa in Brazil is restricted and because of the growing interest in this species, it is essential to do more research to better understand these diseases. To our knowledge, this is the first report in Southern Brazil of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* leaf spot (ALF) in alfalfa. These contributions are very important for breeding and selection of productive cultivars that are resistant to pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Symptoms of ALF were observed in *Medicago sativa* cv. Crioula plants in the highland (Atlantic forest biome) and lowland (Pampa biome) regions of Rio

Grande do Sul State, Southern Brazil. The symptomatic leaves were collected from six farms located in the highland region and from Embrapa Pecuária Sul, a research institution using conventional tillage in the lowland region. Samples were collected in winter (July and August) and spring (October) of 2013 which are periods of high relative humidity.

Morphological characterization and molecular identification

Based on morphological analysis using literature with a descriptive key (Barnett and Hunter, 1987), all isolates were identified as being *A. alternata*. The identification of the isolates from both regions was confirmed by the Biological Institute of São Paulo. The isolated DNA was extracted according to the method described by Doyle and Doyle (1987) from the mycelium produced in Potato Dextrose Agar (PDA). The extracted genomic DNA samples were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of the ITS (Internal transcribed spacer) rDNA region and part of the RPB2 gene (encoding the second largest subunit of RNA polymerase II). The primers for the ITS region were ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') and ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (White et al., 1990) and for gene segment rpb2 were RPB2-5F2 (5' – GGGGWGAYCAGAAGAAGGC – 3') (Sung et al., 2007) and fRPB2-7cR (5' – CCCATRGCTTGYTTRCCCAT – 3') (Liu et al., 1999). Samples of the two isolates were deposited in the fungal collection of the Biological Institute of São Paulo in June 2014 (register number: MMBF 12/14).

Fungus isolation and Koch's postulates

The fungus was isolated from necrotic leaf tissue, grown in PDA and incubated at 25 °C for ten days. Pathogenicity was confirmed based on Koch's postulates using twelve plants from five different cultivars and genotypes (CUF 101, Crioula, ABT 805, E1C4 and Chile). Eight weeks after emergence alfalfa plants were grown in pots containing autoclaved soil. The plants were inoculated with spore suspension (106 conidia/ml). The spore suspension of *Alternaria alternata* was prepared by brushing plates containing PDA medium colonized by the pathogen for ten days into distilled water. The concentration of the suspension was determined using a Neubauer chamber. Inoculation was conducted in the greenhouse and plant growth chamber with two repetitions using two types of isolates (highland and lowland). Measurements of length and width of spores (800 for each isolate: highland and lowland) of *Alternaria alternata* were conducted on the stereoscopic microscope Leica MZ-12, with a graduated ocular lens under 80 times magnification.

RESULTS AND DISCUSSION

In 80% of the plants collected, the symptoms occurred in the lower leaves, probably due to higher humidity. Plants with symptomatic leaves died faster than healthy plants and there was senescence only in injured plants. Symptoms began five days after inoculation and developed in all inoculated plants with a subsequent increase in the frequency and size of lesions. Leaf symptoms were

initially dark formations. After some time, they became rounded blotches about 1 mm to 3 mm in diameter that appeared on both edges and in the center of the leaflets (Figure 1). Symptomatic plants showed reduced vigor, premature senescence and foliar chlorosis. The initial lesions were small, circular to oval, sunken and medium brown, but later became necrotic and dark brown as the disease progressed, showing concentric zones encircled with a chlorotic halo. Intense dark sporulation was observed on the lesions.

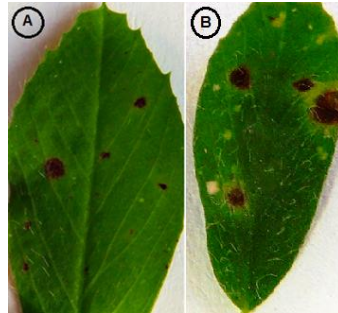


Figure 1. Evolution of the symptoms of foliar injury in random leaves of alfalfa (cv. Crioula). A) 7 days after inoculation; B) 14 days after inoculation.



Figure 2. *Alternaria alternata* spores. A) Spores from the highland area; B) Spore from the lowland area. Mean size for both isolates was 12.6 x 21.2 µm.

Long chains of pale to light brown clavate conidia were observed with up to three longitudinal septa, and one to seven transverse septa which vary in size according to the source of the isolates; with the highland isolates being 5 x 28 µm (mean 13.7 µm) by 5 x 37.5µm (mean 23.6 µm) and the lowland isolates 5 x 22.5 µm (mean 11.5 µm) by 7,5x 32 µm (mean 11.5 µm). Conidiophores were elongated, straight, septate, and light to olive golden brown with a conidial scar (Figure 2). In molecular identification, the sequenced region showed 99% similarity with a reference sequence for *Alternaria alternata*. The RPB2 sequences isolated are 100% identical *Alternaria alternata* (GenBank JQ811952 and JQ911953). These sequences of *A. alternata* were submitted to mycologist Dr. Barry Pryor, University of Arizona, (Pryor and Gilbertson, 2000).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial institution of this study Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) and Embrapa Pecuária Sul.

REFERENCES

Barnett HC, Hunter BB (1987). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd ed. Minneapolis: Burgess Publ., p. 218.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* (19) p.11-15.

Iamauti MT, Salgado CL (1997). Diseases of alfalfa. *Manual of plant pathology: diseases of cultivated plants*. 3.ed. São Paulo: Agron. Ceres (2) p.26-32.

Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* (16) p.1799–1808.

Pryor BM, Gilbertson RL (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi upon analysis of nuclear ITS and my SSu rDNA sequences. *Mycol. Res.* (11) p.1322-1321 DOI: <http://dx.doi.org/>.

Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW (2007). A multigenephylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Mol. Phylogenet. Evol.* (44) p.1204–1223.

Thal WM, Campbell CL (1987). Assesment of resistance to leaf diseases among alfafa cultivars in North Carolina fields. *Phytopathology* (77) p.964-968.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogeneticsIn: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York. p.315-322.

CAPÍTULO III⁴

⁴ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista (Apêndice 2) à qual já foi submetido.

SELECTION OF ALFALFA GENOTYPES FOR RESISTANCE TO THE FOLIAR PATHOGEN *CURVULARIA GENICULATA*

Ávila, M. R¹; Dall'Agnol, M.¹; Martinelli, J.A.²; Silva, G. B. P. da²; Bremm, C.³; Nunes, T.¹

¹Department of Forage Plants and Agrometeorology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ²Department of Plant Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ³State Foundation for Agricultural Research, Porto Alegre, Brazil.

ABSTRACT

Foliar diseases impose severe restrictions on the persistence and productivity of *Medicago sativa*, both of which may be increased by developing disease resistant and more competitive genotypes that can improve pasture quality. We found *Curvularia geniculata* as the principal alfalfa foliar pathogen in the Brazilian state of Rio Grande do Sul (RS). Growth chamber experiments evaluated the resistance of alfalfa genotypes 'E₁C₄', 'CPPSul', 'ABT 805' and 'CUF-101' to *C. geniculata* as compared the control 'Crioula' genotype. These genotypes were also evaluated in field trials at a sea level site in Eldorado do Sul in central RS and at two sites ~200 m above sea level, one in Bagé municipality in south west RS and the other at a farm near the town of Alto Feliz in north east RS. Plants were spray-inoculated with 1.6×10^6 ml⁻¹ of *C. geniculata* spores and visually evaluated for leaf damage 14 days later. The *C. geniculata* infection rates varied from zero to 100%. Alfalfa persistence and forage mean dry mass (DM) production at the Eldorado site were measured during different seasons from November 2013 to January 2015 by calculating the incidence of invasive plants and morphologically separating leaves from stems and calculating both leaf and stem DM. Data were analysed using mixed statistical models. The best results for persistence and forage DM were shown by the 'CPPSul' genotypes (DM = 16,600 kg ha⁻¹) and 'Crioula' (DM = 15,750 kg ha⁻¹). These two genotypes will be used for subsequent investigations and selection cycles.

Keywords: lucerne, invasive plants, foliar pathogen, forage legumes

INTRODUCTION

Alfalfa (*Medicago sativa* L. ssp. *sativa*), also known as lucerne, is a high quality persistent legume cultivated as a monoculture or intercropped with grasses for use as green forage, silage or hay (Jung et al., 1997). Although

alfalfa is considered the 'queen of forages' and one of the most globally cultivated forage legumes (Michaud et al., 1988), it has some specific requirements before it can reach high productivity and persistence. Since alfalfa is susceptible to more than 70 different types of fungi, 30 of which are considered limiting for its growth and productivity (Thal and Campbell, 1987), the low persistence of alfalfa could partly be linked to foliar diseases (Beuselinck et al., 1994, Barnes, 1991 and Sheaffer et al., 1992). However, alfalfa growth can also be limited by complex interactions between one or more diseases and other constraints (Gossen, 1994) such as fertility and soil drainage (Smith, 1989) or competition (Buhler, 1998).

Plant diseases have been estimated to be responsible for a ten percent loss in global animal production, mainly due to limiting the total energy available to plants rather than killing them (Chakraborty et al., 1996). Losses in forage yield could be reduced by controlling foliar diseases (Gray and Fernandez, 1987), the investigation of which is one of the more important aspects in the selection and development of plant genotypes (Pozza, 1994). Genetic resistance is the most practical and widely used disease control strategy (Skipp and Hampton 1996) because it is not only the most economical and efficient mechanism for such control but is also environmentally friendly.

Alfalfa fungal foliar pathogens cause damage by reducing the general performance of the plant as forage by affecting factors such as the life cycle and population density of the plant and hence forage quality (Elgin et al., 1988). Pathogens also increase production costs by using some of the inputs

destined for the plants and sometimes necessitating the frequent replanting of alfalfa problem areas. (Elgin et al., 1988).

The hyphomycete fungus *Curvularia* is a facultative foliar pathogen for many plant species, including alfalfa, in Brazil and other countries. In Florida, for example, *Curvularia* species have been found colonizing the majority of grass samples, including those from apparently healthy plants, and *Curvularia geniculata* has been shown to compete aggressively for plant tissue and sporulate most rapidly at 30°C, a temperature commonly attained in southern Brazil (Brecht, 2005). Germination and optimal growth of *C. geniculata* occurs above 15 °C (Hodges, 1972) and when high temperatures are associated with heavy rains (Nelson, 1964). Chlorosis caused by this pathogen begins at the tips of leaves and proceeds downwards to the leaf sheath, with chlorotic infected leaves becoming progressively necrotic so that when conditions are optimal the fungus can colonize the leaf sheath (Brecht, 2005).

Brazil is the world's largest producer of beef cattle (USDA, 2016), having risen from second place in 2012 (USDA 2012), cattle mainly being pasture reared on about 197 million hectares (FAO, 2010). However, Brazilian producers have been compelled to improve their productivity (Costa, 2010) due to increased land prices (Anualpec, 2010) and the increased global demand for food (FAO, 2011; Foresight, 2011). Even at current levels of productivity there is still a need to incorporate more productive forage genotypes into pasture production systems, but it is important that intensification of such systems should be guided by the efficient use of genetic resources to minimize the risk of economic losses (Barcellos et al., 2008).

Rio Grande do Sul (RS), the southernmost Brazilian state, is a major agricultural producer with the sixth largest cattle herd in Brazil of about 14.5 million head with an annual aggregate value of beef production in the region of US\$ 900 million, about US\$ 100 million of which is for export (SDPI, 2013). The cattle are mainly reared on 8 million hectares of natural pastures within the Pampa biome (FEE, 2015). This biome consists mainly of grasslands with some shrubs and trees and occupies about 17.6 million hectares situated between latitudes 28° 00' S and 34° 00' S and longitudes 49° 30' W and 58° 00' W in the South Temperate Zone, which has subtropical and temperate climates with four distinct seasons (Roesch et al. 2009). The climate in the Brazilian Pampa is unique (Overbeck et al., 2007) in that it allows grazing throughout the year (Williams et al., 1968). However, the quality of pastures can limit productivity and this may be improved by adding alfalfa may be increased by developing more competitive, disease-resistant and persistent alfalfa genotypes (Bouton, 2012).

Many pests and diseases affect alfalfa in Brazil, but the damage caused by such attacks has been largely undocumented (Porto, 1990) and few attempts have been made to investigate variation within or between alfalfa genotypes in their response to pathogen attack. However, such studies are crucial for understanding the role of fungi in plant community dynamics (Burdon, 1980).

Globally, little is known regarding the interaction between foliar diseases and individual alfalfa genotypes and how these factors relate to forage production. We investigated these factors in Rio Grande do Sul as a model

ranchers in other parts of the world with similar geographical and climatic conditions. Our objectives were: 1. to identify the foliar diseases affecting selected alfalfa genotypes in Rio Grande do Sul, 2. evaluate the genetic resistance of alfalfa genotypes to the main foliar pathogen, *Curvularia geniculata*, and 3. estimate alfalfa persistence and forage production under field conditions.

MATERIAL AND METHODS

Isolation and pathogenicity of *C. geniculata*

Isolation and pathogenicity testing of *Curvularia geniculata* was undertaken during mid-June to mid-September (winter) and mid-September to mid-December (spring) of 2013. Alfalfa (*Medicago sativa* L. cv Crioula) leaves exhibiting lesions were collected from four farms in two different geographic regions of the Brazilian state of Rio Grande do Sul (RS): the Campanha, a pampa region in the south west of the state, (farms at 31° 19' 43"S, 54° 6' 26"W and 30°52'23"S, 54°40'36"W) and the mountainous Serra region in the north of the state (farms at 29°27'5"S, 51°18'24"W and 29°23'56"S, 51°15' 15"W).).

The leaves were transported to our laboratory in Porto Alegre within 24 h, being maintained at 20-22 °C during the journey before being examined for fungal pathogens. We identified the principal alfalfa pathogens associated with leaf lesions using microscopy to determine fungal morphology and conidial dimensions (Barnett and Hunter, 1999) along with standard

mycological methods (Thirumalachar and Narasimhan, 1953), the lesions mostly being caused by the fungi *Curvularia geniculata* and *Alternaria alternata*. To obtain pure cultures of *C. geniculata* and *A. alternata* from the lesioned leaves, they were disinfested for 30 seconds in 70 % v/v alcohol followed by 1 minute in 1 % w/v sodium hypochlorite, washed in sterile distilled water and placed in a moist chamber at > 95% rh for 48 h., after which a small portion of cotton mycelium was transferred to plates containing Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, Michigan, USA) which were incubated at 25 °C for 5 days. The directly isolated cultures were transferred to PDA slopes, which were incubated appropriately and then stored at 25 °C until needed.

Growth chamber pathogenicity testing

To investigate *C. geniculata* and *A. alternata* isolates for pathogenicity towards alfalfa genotype 'Crioula', we used PDA slope, incubated at 25 °C for 7 days, to prepare a suspension of conidia ($1.6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) for each fungal isolate, the suspensions being used to inoculate 30 plants 30 days old with *C. geniculata* and 30 with *A. alternata*, with 10 uninoculated plants serving as controls for each fungus. After inoculation, the plants were kept in a growth chamber at >95% rh at 22 °C to 25 °C for 24 hours and then at > 95% rh at a mean temperature of 25 °C until the appearance of symptoms, the presence of which was taken as confirmation of Koch's postulates for the isolate under investigation. Both isolates were pathogenic, but we decided to use only *C.*

geniculata for the studies described in this paper because this fungus was more frequent and more aggressive to alfalfa growing in Rio Grande do Sul.

In June 2014 we deposited reference samples of both *C. geniculata* and *A. alternata* isolated from all the regions in a plant pathology reference culture collection (Micoteca Mario Barreto Figueiredo (MMBF), Instituto Biológico, Laboratório de Patologia de Sementes, Av. Cons. Rodrigues Alves 1252, São Paulo, Brasil 04014-002), where their identities were confirmed as *C. geniculata* Tracy and Earle and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler using a rapid DNA isolation procedure (Doyle and Doyle, 1987) and standard mycological methods (Sung et al., 2007; Liu et al., 1999; White et al., 1990). The MMBF accession numbers for the *C. geniculata* isolate from the Serra region was MMBF 12/14 whilst that from the Campanha was MMBF 13/14.

Growth chamber resistance selection

Laboratory selection for plant resistance to *C. geniculata* isolates was carried out from January 2014 to April 2015 in a growth chamber at the Department of Plant Pathology and Department of Forage Plants and Agrometeorology, Agronomy Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil.

Single isolate inocula were prepared from virulent isolates of *C. geniculata* from the Serra and the Campanha by transferring colonies of individual isolates to PDA plates and incubated them at 25 °C for 10 days to achieve maximum growth and sporulation (Hodges, 1972), after which they

were washed twice in 5 ml of sterile distilled water containing 0.01 ml ml⁻¹ of Tween-20 (Synth, São Paulo, Brazil) to produce conidial suspensions which were counted in a Neubauer chamber and appropriately diluted to produce a final total conidial count of 1.6 x 10⁶ ml⁻¹.

We evaluated five alfalfa genotypes for resistance to the fungal isolates, the genotypes being: the Brazilian largest commercial cultivar 'Crioula' (used as control), 'E₁C₄' and 'CPPSul' (both grazing tolerant genotypes) plus the US cultivars 'ABT-805' (grazing tolerant) and 'CUF-101' (a US west coast non-dormant). Seeds of each genotype were obtained from South Brazil for 'Crioula', 'E₁C₄' and CPPSul and from United States of America for 'ABT-805' and 'CUF-101'. All seeds were disinfested for 30 seconds in 70% v/v alcohol followed by 1 minute in 1% w/v sodium hypochlorite, washed in sterile distilled water, mechanically scarified with sand paper to break dormancy and then placed on water-agar plates in a growth chamber at 25 °C until the radicles of the seedlings were about 10 mm long, after which they were planted into styrofoam trays filled with autoclaved commercial substrate (composition: sphagnum peat, expanded vermiculite, dolomitic limestone, agricultural gypsum, and NPK fertilizer. Density 101 kg m⁻³).

On the 12 of March 2014, when the plants were 30 days old and at stage vegetative with the 2nd – 3rd trifoliolate, the leaves of 300 replicate plants were inoculated with a hand sprayer containing one of the conidial suspensions, this being repeated for each fungal isolate. After inoculation, the plants were kept in a growth chamber at > 95 % rh and 25 °C for 24 hours and then at a mean daily 85 % rh and temperature of 25 °C until the appearance of

symptoms. The presence or absence of *C. geniculata* was periodically assessed microscopically and the plants evaluated for disease severity 14 days after inoculation.

The experiment was arranged in a completely randomised design with 300 replicates, with each seedling being considered one replicate of each population. The percentage of leaf area damaged was visually estimated for the 6 to 9 leaflets on each seedling, 25 plants showing more than 30 % damage comprising the susceptible genotype group, 25 plants showing between 0.1 to 1% the resistant genotype group and 25 plants showing no symptoms the highly resistant or immune genotype group. Seed from the three groups will be used for future crosses and their F1 seeds tested.

Field evaluation of forage yield and competition

The evaluation of forage yield and competition in the field was carried out in the Central Depression Region of Rio Grande do Sul at the Agricultural Experimental Station (Estação Experimental Agronômica, EEA), UFRGS, Eldorado do Sul (30°05' S, 51°39' W), this region having a humid subtropical climate characterised by hot and usually humid summers with mild to cool winters (Köppen climate classification Cfa) (Bergamaschi et al., 2003). The soil of the experimental area belongs to the São Gerônimo Mapping Unit and is classified as Rhodic Paleudult (Red Distrofic Argisil) by the Brazilian Soil Classification System (Embrapa, 2006). The monthly temperature average and precipitation are shown in Figure 1. Meteorological data during experimental

period was acquired from the Brazilian National Institute of Meteorology (INMET).

On the 29 of June 2013 we disinfested and CaCO_3 pelletised seeds of the five alfalfa genotypes cited above and inoculated them with the nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium meliloti* strain 'SEMIA 116' before manually sowing them at an equivalent density of 20 kg ha^{-1} . The soil had been analysed 60 days before application of fertilizer and, based on this analysis, dolomite liming was performed in April 2013 to raise base saturation to 85 %. A cover fertilization was carried out with superphosphate (100 kg ha^{-1}) and potassium chloride (100 kg ha^{-1}), with subsequent yearly application of superphosphate (100 kg ha^{-1}) and three-monthly application of KCl (50 kg ha^{-1}) (120 kg ha/year of K_2O). Irrigation was provided twice in August and September.

We used a completely randomized bloc statistical design with three replicates. The normal width between alfalfa lines is 20 cm but we used 50 cm to facilitate the evaluations and harvesting, being each line one alfalfa genotype. In our experiments, where cuts were made each block consisted of 1 m long lines, 50 cm between lines and 50 cm borders with 1 m between blocks. The forage production values were converted to kg ha^{-1} based on a standard width between lines of 20 cm.

Cuts and evaluations were made from spring 2013 (November) to summer 2015 (January), as follows: two cuts in spring 2013 (22nd November and 10th December), two in summer 2014 (20th January and 10th February), one in autumn 2014 (25 April), two in winter 2014 (14th June and 04th

September) two in spring 2014 (14th November and 08th December) and one in summer 2015 (14th January).

Ten cuts were made, with an average sward height of 45 cm and leaving 10 cm of residue to accelerate regrowth and increase the number of new shoots. Along with the mass evaluations and sward height, the occurrence of invasive plants on all lines was measured using a visual scale of 0-10. The rate of invasive plants was obtained by visual estimation before making the cuts to obtain the average output over the years.

Material from each cut was separated into leaves and stems and dried in a forced-air oven at 60 °C for 72 hours before weighing and determining stem dry mass (kg ha⁻¹) and leaf dry mass (kg ha⁻¹) and total dry mass (kg ha⁻¹), the latter being the sum of stem dry mass plus leaf dry mass. The leaf to stem ratio was determined from the stem dry mass and leaf dry mass values.

Field evaluation of alfalfa resistance to *C. geniculata*

Evaluation of resistance to *C. geniculata* in the field was undertaken in the following three physiographic regions of Rio Grande do Sul:

1. The Southern Brazilian Center for Livestock Research (Embrapa Pecuária Sul, CPPSUL) (31°20'S, 54°06'W), in Bagé Municipality, where the soil belongs to the Plano series and the climate is cold subtropical (hot summers and frequent frosts in winter) with a mean annual temperature of 18 °C and a mean total annual rainfall of 1465 mm;

2. EEA Eldorado do Sul (30°05'S, 51°39'W), where the soil belongs to the Typic Dystrophic and the climate is subtropical (hot summers and eventual frosts in winter) with a mean annual temperature of 19.5 °C °C and a mean total annual rainfall of 1.335 mm;

3. A farm near the town of Alto Feliz (29°23'56"S and 51°15'15"W), where the soil belongs to the Association between Neosol and latosol and the climate is subtropical humid (hot summers and humid winter) with a mean annual temperature of 17 °C °C and a mean total annual rainfall of 1603 mm.

The alfalfa genotypes Crioula, E₁C₄, CPPSul, ABT-805 and CUF-101, the *C. geniculata* isolate and experimental design at CPPSUL and EEA were the same as those used for the forage yield and competition experiments described above. In the second week of October 2014 (spring), seven days after a standardization cut was made, when the alfalfa plants were 25 cm tall, we inoculated the each plot of genotypes with a *C. geniculata* conidial suspension ($1.6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). We covered each inoculated plot with plastic film to produce a moist environment and facilitate conidia germination. Evaluation was made 15 days after inoculating the four central plants of each plot. The percentage of lesioned leaf area of each inoculated leaflet was visually estimated on a 0 % to 100 % scale. In Alto Feliz, the main region using alfalfa, the experimental area consisted of a 3x3 meter plot of the 'Crioula' cultivar because it was the one already cultivated in the farm.

Statistical analysis

Statistical analysis was done using mixed models (SAS Inst. Inc., Cary, NC) with fixed effects for genotypes, seasons (years) and interaction between genotypes and seasons (year), and random effects for block and genotypes, characterizing the observation with a temporal correlation. The evaluation periods were considered to be repeated measures, where each period represented the measurement of the same experimental unit under a different condition. Compound symmetry (CS) was the covariance matrix that best fit the data. The covariance matrices were compared by the Akaike's information criterion (AIC). The variable resistance model included the fixed effects of region, genotype and interaction between regions and genotypes. The plant (line) was considered a random effect. When statistical differences were detected in the analysis of variance at $P < 0.05$, means were compared by the Tukey honestly significant difference (HSD) test at 5% of significant level. The variables were tested for a normal distribution using the Shapiro-Wilk test at $P > 0.05$ and the variable invasive plants did not fit the normal distribution. Thus, a generalized linear mixed model was used to study the invasive plants, considering the same effects included in the mixed models. Correlation analysis between TDM and invasive plants were also conducted.

RESULTS

The results of the alfalfa leaf damage field trials are shown in figure 2. The alfalfa leaf, stem and total dry matter yield in kg ha^{-1} for spring 2013,

summer, autumn, winter and spring 2014 and summer 2015 are given in Table 1. Correlation between invasive plants and total dry matter of alfalfa genotypes in the field are shown in Figure 3.

DISCUSSION

Isolation and pathogenicity of *C. geniculata*

During the selection and evaluation of genotypes for resistance, the first symptoms seen on the leaves of the genotypes were yellowish spots that quickly turned brown, indicating dead tissue, and became characteristic v-shaped lesions radiating from the leaf vein. These symptoms appeared about four days after inoculation in the growth chamber and six days in the field, with many leaves being already partially dead two weeks after inoculation. Damage was more extensive in younger leaves than in older ones. Once the petiole was infected, necrosis soon lead to the death of the whole leaf, and when severe infection occurred the whole plant appeared to be burned and the yield was affected.

We found that the North American cultivars 'ABT-805' and 'Cuf-101' had, as expected, a higher incidence of leaf lesions in the field ($p < 0.001$) and were more susceptible to *Curvularia* spot ($p < 0.001$), because they were not adapted to the local conditions, whereas the Brazilian genotypes were adapted and hence more resistant. There is little published information about the occurrence of *C. geniculata* in Brazil or its effects in regard to Brazilian

pastures. However, southern Brazil does have a hot and humid climate favourable to the spread of this pathogen, which mainly occurs in late spring and early summer, the period preceding the critical stage for the persistence of alfalfa. Furthermore, it has been reported that the severity of *Curvularia* spot is considerably increased when high temperatures occur after the rainy season (Falloon, 1976; Kim, J.C., 2000).

It is known that leaf lesions caused by diseases in periods of unfavorable climate for the growth of forages contributes to decreased production and debility and death of the plant (Nelson and Campbell, 1993), so it is possible that *C. geniculata*, associated with other pathogens, can reduce both the productivity and persistence of alfalfa in Rio Grande do Sul pastures. A study of grass diseases in Kansas (Rogerson, 1956) showed that *C. geniculata* can attack Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*), while other research has detected its presence on the seeds of native grasses in Florida (Bailey and Muchovej, 2001), rice in China (Jin, 1989), various cereals in Uzbekistan (Khasanov et al., 1990) and on the leaf and stems of Bermuda grass in Mississippi (Pratt, 2005).

Growth chamber and field evaluation of alfalfa resistance to *C. geniculata*

In the growth chamber evaluations, 'Crioula' presented the highest number of immune plants. The genotypes selected for their susceptibility could be distinguished from the genotypes selected for their resistance ($p < 0.01$), (Figure 2A; 2B). We found that 'CUF-101' showed the highest susceptibility of

all the genotypes evaluated, with 35% disease severity at the EEA field site and 40% disease severity in the growth chamber experiments (Figure 2A; 2B). At the CPPSUL and EEA field sites the 'Crioula' and 'E₁C₄' genotypes presented smaller lesions and were more resistant to, while in the growth chamber experiments 'Crioula' was 15 % more resistant and 'E₁C₄' 20% more resistant. In the growth chamber experiments, there was no difference between the genotypes 'ABT805' (38% disease severity) and 'CUF-101' (40% disease severity).

Despite the fact that 'CPPSul' showed about 25 % susceptibility (Figure 2 B) in the spring it showed high yields late in the summer in 2015, when the negative effect of springtime disease seems to have been compensated for (Table 1). It would be interesting to know the potential of this genotype if no disease had occurred early in its development.

When the damage caused by a disease is quantified, measures are needed to mitigate the negative effects on crops. Such measures may include better disease control, pasture management and, most importantly, selection of genotypes with greater resistance, the latter being important in maintaining and improving the quality and productivity of Rio Grande do Sul pastures. Although it is not known whether *C. geniculata* has a large effect on the persistence of alfalfa in Brazil, it is likely that greater resistance of 'Crioula' is needed in relation to other diseases. Further studies are needed to investigate this hypothesis.

As far as we know, this is not only the first study in southern Brazil regarding the importance of foliar diseases in reducing forage yield but also the

first to investigate the potential disease resistance and persistence of different genotypes. Our results are encouraging, in that they indicate the high degree of variability present in alfalfa genotypes, a factor that can be exploited to select genotypes resistant to *C. geniculata*, with 'Crioula' and 'E₁C₄' appearing to be especially useful resources for future work.

Field Evaluation of forage yield and competition

The field trials to assess competition and forage production showed that during the cold and rainy winter of 2014 (Figure 1) there was no statistically significant difference in terms of total dry mass forage production between the 'Crioula' (2600 kg ha⁻¹), 'E₁C₄' (2250 kg ha⁻¹) and 'CPPSul' (2150 kg ha⁻¹) genotypes (Table 1), important to forage producers because prices vary widely between summer and winter. Regarding the overall totals for all seasons combined, total leaf dry mass production was highest for 'Crioula' (12750 kg ha⁻¹) and 'CPPSul' (12250 kg ha⁻¹), lower for 'E₁C₄' (5650 kg ha⁻¹) and lowest for 'ABT-805' and 'CUF-101' (Table 1). Stem dry matter showed the same tendency. Favourable rainfall occurred at the site in the spring and autumn of 2014 (Figure 1), during which the highest leaf dry matter values were seen with the 'Crioula' and 'CPPSul' genotypes (Table 1). This is important because leaves are the most valuable nutritional component of alfalfa. In the first period evaluated, spring 2013, 'ABT-805' showed a reasonable initial production of leaf dry matter (900 kg ha⁻¹), higher than 'CPPSul' (800 kg ha⁻¹). However, with the

establishment of invasive plants the production declined dramatically in comparison with the other genotypes (Figure 1, Table 1).

The genotypes with the highest production of overall total dry matter were 'CPPSul' (16,600 kg ha⁻¹) and Crioula (15,750 kg ha⁻¹). Not only this, but these two genotypes stand out for presenting the highest total dry matter production in the spring and summer of 2014, even when inoculated with *C. geniculata* (Table 1). Our results are similar to those observed in Brazil by Ruggieri et al (2001), who found that 'Crioula' was the most productive genotype in terms of forage yield.

The low total dry matter production was associated with the high incidence of invasive plants present in the alfalfa crop, due to the fact that no chemical or mechanical weed control was used. North America annual grasslands heavily infested with medusahead (*Taeniatherum caput-medusae* (L.) Nevski) have been reported to show reductions in livestock carrying capacity of as much as 75 % to 80 % (Major et al. 1960; Hironaka 1961; George 1992), reinforcing the need to select forage plants with higher competitiveness. In our research, the correlation between total dry matter and invasive plants was negative and significant ($p < 0.005$). The 'Crioula' cultivar seemed to be very competitive, showing only 10 % of invasive plants after ten months of evaluation. In all evaluations, the Brazilian cultivar, selected for grazing tolerance, showed a higher incidence of invasive plants (minimum, 15%) than the 'Crioula' cultivar. This explains the low forage total dry matter value of 'E₁C₄' seen in most of the evaluations (Figure 3). This correlation was also observed for the US cultivar 'CUF-101', which also demonstrated high incidence of

invasive plants and low forage production, probably because it is not well adapted to conditions in southern Brazil. In relation to seasonal variation, we observed a higher occurrence of invasive plants (Figure 3) during the summer months ($p < 0.005$).

In our future selection experiments, we intend to use plants showing some level of disease resistance coupled with good agronomic traits. In the study described in the present paper, we observed intermediate results with genotype 'E₁C₄' and the best results for the 'Crioula' and 'CPPSul' genotypes. These will be the plants which we will cross to produce F₁ seeds which will be assessed for their potential to produce better genotypes.

Our results may have relevance to agriculturalists and ranchers not only in Rio Grande do Sul but also in other parts of the globe where alfalfa is planted and where economic pressures necessitate ever increasing productivity gains.

REFERENCES

- Anualpec (2010). Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP. (p. 360).
- Bailey, C. C., and Muchovej, J.J. (2001). Seed pathology of native scrub grasses. Proceedings of the 114th Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society, Stuart, Florida, 10-12 June. Vol. 114 (p. 236-237).
- Barcellos, A. O, Ramos, A.K.B; Vilela, L.; Junior, G. B. M. (2008). Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. R. Bras. Zootec. vol.37 On-line version ISSN 1806-9290. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008001300008>.
- Barnes, D. K. (1991). Minnesota fall dormancy and its relationship to winter injury. In: Proceedings of the 21st National Alfalfa Symposium, February (p. 14–16), Rochester, MN. Cert. Alfalfa Seed Council, Inc., Davis, CA.

- Barnett, H. J. and Hunter, B. B. (1999). Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. Minnesota: American Phytopathology Society, (p. 218).
- Bergamaschi, H, Guadagnin, M. R, Cardoso, L. S., and Silva, M. I. G. (2003). Clima da Estação Experimental da UFRGS (e região de abrangência). Porto Alegre: UFRGS, (p. 77).
- Beuselinck, P. R., Bouton, J. H., Lamp, W. O., Matches, A. G., McCaslin, M. H., Nelson, C. J., Rhodes, L. H., Sheaffer, C. C., and Volenec, J. J. (1994). Improving legume persistence in forage crop systems. J. Prod. Agric. (p. 311–322).
- Bouton, J. H., Breeding lucerne for persistence. (2012). Crop and Pasture Science (p. 95-106) <http://dx.doi.org/10.1071/CP12009>. Ardmore, OK, USA.
- Brecht, M. O., Stiles, C.M., and Datnoff, L.E. (2005). Evaluation of Pathogenicity of *Bipolaris* and *Curvularia* spp. on Dwarf and Ultradwarf Bermuda grasses in Florida. Plant Management Network. doi:10.1094/PHP-2007-0119-02-RS.
- Buhler, D. D., Netzer, D. A., Riemenschneider, D. E., and Hartzler, R. G. (1998). Weed management in short rotation poplar and herbaceous perennial crops grown for biofuel production. Biomass and Bioenergy. Vol. 14, No. 4 (p. 385-394).
- Burdon, J. J. (1980). Variation in disease resistance within a population of *Trifolium Repens*. Journal of Ecology, Vol. 68 (p. 737-744).
- Chakraborty, S., Leath, K. T., Skipp, R. A., Pederson, G. A., Bray, R. A., Latch, G. C. M., and Nutter, F. W. Jr. (1996). Pasture and Forage Crop Pathology. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. (p. 653).
- Costa, F. P. (2010). Natureza econômica e impacto das pastagens no custo de produção da pecuária de corte. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte (p. 2) Documentos, 181.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. (p. 11-15).
- Elgin, J. R.; Welty, R. E., and Gilchriti, D. B. (1988). Breeding for disease and nematode resistance. En: alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy (p. 827 – 858).
- EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Second ed. (2006). Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro (p. 306).
- Falloon, R. E. (1976). *Curvularia trifolii* as a high-temperature turfgrass pathogen. New Zealand Journal of Agricultural Research, v. 19.

FAO. (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acesso em: sep 2010.

FORESIGHT. The future of food and farming. (2011). Final project report. London: The Government Office for Science. Available at: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/288329/11-546-future-of-food-and-farming-report.pdf Accessed 12 December 2016.

FEE. (2015). Fundação de Economia e Estatística, Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil. Características da agropecuária do RS. Available at: <http://www.fee.rs.gov.br/sinteseilustrada/caracteristicas-da-agropecuaria-do-rs/>. Accessed 12 December 2016.

George, M. R. (1992) Ecology and management of medusahead. *Range Science Report*. Dept. Agronomy and Range Science, Agr. Exp. Stat. Series 32 (p. 3).

Gossen, B. D. (1994) Field Response of Alfalfa to Harvest Frequency, Cultivar, Crown Pathogens, and Soil Fertility: II. *Crown Rot*. Vol. 86 No. 1 (p. 88-93).

Gray, F. A., and Fernandez, J. A. (1987) Efficacy of chlorothalonil for control of spring black stem and common leaf spot of alfalfa. *Plant Disease* 71 (p. 752–755).

Hironaka, M. (1961) The relative rate of root development of cheatgrass and medusahead. *Journal of Range Management*, Vol. 5 (p. 463-267).

Hodges, C. F. (1972). Interaction of culture age and temperature on germination and growth of *Curvularia geniculata* and on virulence. *Canadian Journal of Botany*, 50(11) (p. 2093-2096) 10.1139/b72-271.

Jin, M. Z. (1989). Preliminary study of discoloured rice grains caused by *Curvularia*. *Journal Acta Phytopathologica Sinica Zhejiang*, China. Vol. 19 No. 1, (p. 21-26).

Jung, H. G., Sheaffer, C. C., Barnes, D. K., and Halgerson, J. L., (1997). Forage Quality Variation in the U.S. Alfalfa Core Collection, *Crop Sci.* 37 (p. 1361–1366) (doi: 10.2135/cropsci1997.0011183X003700040054x).

Khasanov, B. A., Shavarina, Z. A., Vypritskaya, A.A., and Terent'ev, D. V., (1990) Characteristics of the fungi from the genus *Curvularia Boedijn* and their pathogenicity to cereals. USSR. *Journal Mikologiya & Fitopatologiya* 1990 Vol. 24 No. (p. 2) 165-173 ISSN 0026-3648.

Kim, J. C., Choi, G. J., Kim, H. T., Kim, H. J., and Cho, K. Y. (2000) Pathogenicity and Pyrenocine Production of *Curvularia inaequalis* Isolated from Zoysia Grass, *Plant disease* (p. 305-606), Korea.

Liu, Y. J., Whelen, S. and Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 16 (p. 1799–1808).

Major, J., Mckell, C. M., and Berry, L. (1960) Improvement of medusahead infested rangeland. California Agricultural Experiment Station, Extension Service. *Division of Agricultural Sciences*, University of California, Berkeley.

Michaud R, Lehman WF and Rumbauch MD. (1988). World distribution and historical development. In: *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes & R.R. Hill, Agronomy, Series of Monographs. Vol. 29 (p. 25-91).

Nelson, S. C., and Campbell, C. L. (1993). Disease progress, defoliation, and spatial pattern in a multiple-pathogen disease complex on white clover. *Phytopathology*. Vol. 83 (p. 419-429).

Nelson, R. R. (1964). The perfect stage of *Curvularia geniculata*. *Mycologia*. Vol. 56 (p. 777-779).

FAO (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations. How to feed the world in 2050. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf Accessed 12 December 2016.

Overbeck, G. E. , Muller, S.C. Fidelisa, A., Pfadenhauera J., Pillar, V.P., Blanco, C.C, Boldrini, I., Bothd, R., Forneckd, E.D. (2007) Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9 101–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ppees.2007.07.005>.

Porto, M. D. M., (1990). Problemas Fitopatológicos. In Nuernberg NJ, Milan PA and Silveira CAM. Ed.. *Manual de produção de alfafa*. Florianópolis: Empasc, (p. 345-349).

Pozza, E. A., and Souza, P. E. (1994). Ocorrência de Doenças em Alfafa (*Medicago sativa* L.) na região de Lavras, MG. *Ciência e Prática*, Lavras, Vol. 18, n. 2 (p. 186-188).

Pratt, R. G. (2005) Variation in occurrence of dematiaceous hyphomycetes on forage bermudagrass over years, sampling times, and locations; *Phytopathology*. Volume 95, Issue 10, October 2005, (p. 1183-1190).

Rogerson, C. T. (1956) Diseases of grasses in Kansas: 1953-55. *Journal Plant Disease Reporter*. Vol. 40 No. 5 (p. 388-397).

Roesch, L. F. W., Vieira, F. C. B., Pereira, V. A., Schünemann, A. L., Teixeira, I. F., Senna, A. J. T., and SVM (2009). The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity*, 1, 182-198; doi:10.3390/d1020182 Available at:

<https://pdfs.semanticscholar.org/d2d3/21c599de15bc01978479c881b93887fb6e6b.pdf> Accessed 12 December 2006.

Ruggieri, A. C.; Shimidek, A.; Bombowato, E. M.; Figueiredo, L. A. (2001) Produção de 35 cultivares de alfafa com quatro anos de cultivos em Sertãozinho, SP. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 38., Botucatu, Anais... Botucatu, SBZ, 2001 np (CD-ROM).

Sheaffer, C. C., Barnes, D. K., Warnes, D. D., Lueschen, W. E., Ford, H. J., and Swanson, D. R., (1992) Seeding-year cutting affects winter survival and its association with fall growth score in alfalfa. *Crop Science*, Vol. 32 (p. 225–231).

SDPI (2013) Secretaria de Desenvolvimento e Promoção do investimento, Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil. *Programa Sectorial Agroindústria Carne Bovina*. Revisão 2013 [http://www.sct.rs.gov.br/upload/20131101115431\[revisao_2013\]_\[espanhol\]_agroindustria___carne_bovina_\[red\].pdf](http://www.sct.rs.gov.br/upload/20131101115431[revisao_2013]_[espanhol]_agroindustria___carne_bovina_[red].pdf) Accessed December 12, 2016.

Skipp, R. A., and Hampton, J. G. (1996). Fungal and bacterial diseases of pasture plants in New Zealand (p. 213– 236) In: *Pasture and Forage Crop Pathology*. Eds. Chakraborty, S.; Leath, K.T.; Skipp, R.A.; Pederson, G.A.; Bray, R.A.; Latch, G.C.M.; Nutter, F.W. ASA, CSSA, SSSA. Madison, Wisconsin.

Smith, S. R., Bouton, J. H., and Hoveland, C. S. (1989). Alfalfa persistence and Regrowth Potential under Continuous Grazing. *Agronomy Journal*. Vol. 81 No. 6 (p. 960-965).

Sung, G. H, Sung, J. M, Hywel-Jones, N. L., and Spatafora, J. W. (2007) A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 44 (p.1204–1223).

Thal, W. M., and Campbell, C. L. (1987). Assessment of resistance to leaf diseases among alfalfa cultivars in North Carolina fields. *Phytopathology*, vol.77, n.6 (p.964-968).

Thirumalachar, M. J. and M. J. Narasimhan. (1953) Notes on Some Mycological Methods. *Mycologi*, v.45, n.3 (p. 461-468) (May - Jun., 1953). Published by: Mycological Society of America. Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/4547715>.

USDA (2012) United Stated Department of Agriculture. Livestock and poultry: world markets and trade. Available at <http://www.thefarmsite.com/reports/contents/lipoct12.pdf> Accessed 12 December, 2016.

USDA (2016) United States Department of Agriculture. Livestock and poultry: world markets and trade. Available at https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf Accessed 12 December 2016.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics (p. 315-322) In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

Williams, R. E., B. W. Allred, Denio, R.M. and Junior, H.A.P. (1968) Conservation, Development, and Use of the World's Rangelands. *Journal of Range Management*. Vol. 21, No. 6 (p. 355-360). Published by: Society for Range Management. DOI: 10.2307/3896081 Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/3896081>.

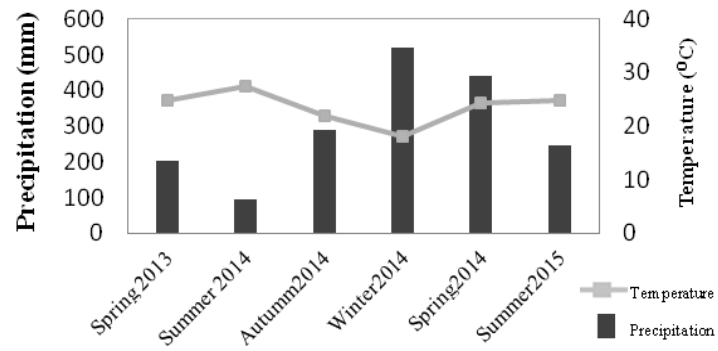


Figure 1: Mean seasonal temperature and precipitation during November 2013 to January of 2015. Data from the Brazilian National Meteorology Institute (Instituto Nacional de Meteorologia, INMET).

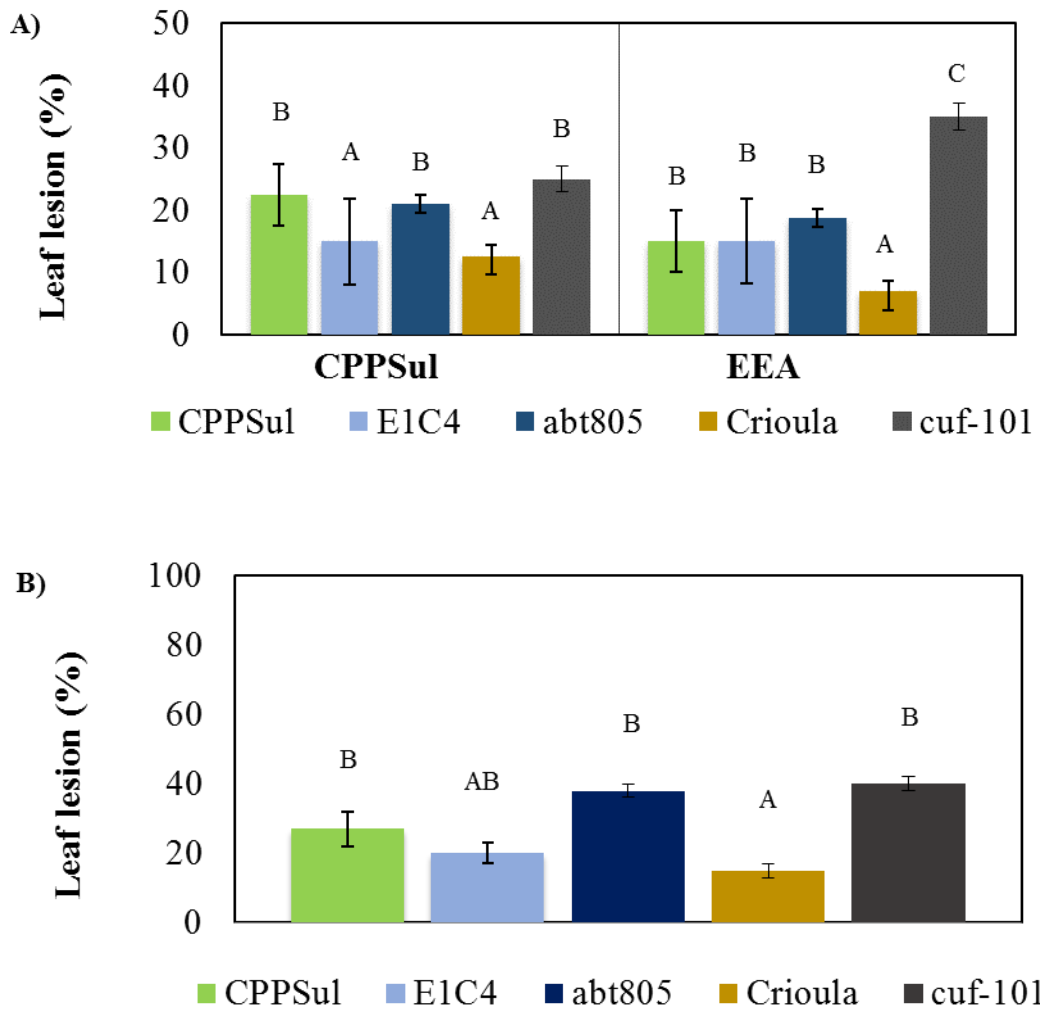


Figure 2: A) Alfalfa leaf damage field trials 15 days after inoculation with *Curvularia geniculata* at the CPPSUL and EEA field sites; B) Alfalfa Leaf damage growth chamber experiments 15 days after inoculation with *C. geniculata*. Alfalfa genotypes: ‘Crioula’ (Brazilian, control commercial cultivar); ‘E₁C₄’ (Brazilian, grazing tolerant); ‘CPPSul’ (Brazilian, grazing tolerant); ‘ABT-805’ (US, grazing tolerant); and ‘CUF-101’ (US, west coast non-dormant). Site key: CPPSUL, Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sul-Brasileiros (Southern Brazilian Centre for Livestock Research) Bagé; EEA, *Estação Experimental Agrônômica* (Agricultural Experimental Station) Eldorado do Sul.

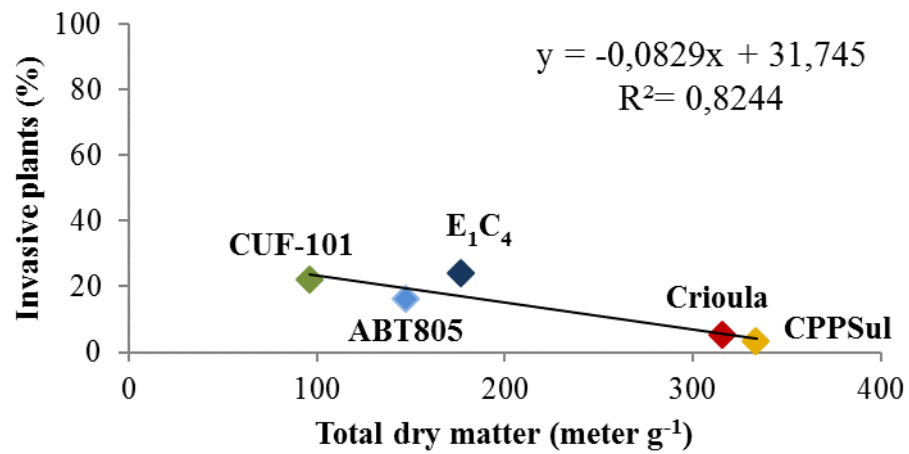


Figure 3: Correlation between invasive plants and total dry matter of alfalfa genotypes in the field at the Agricultural Experimental Station (Estação Experimental Agronômica, EEA), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. Alfalfa genotypes: ‘Crioula’ (Brazilian, control commercial genotype); ‘E₁C₄’ (Brazilian, grazing tolerant); ‘CPPSul’ (Brazilian, grazing tolerant); ‘ABT-805’ (US, grazing tolerant); and ‘CUF-101’ (US, west coast non-dormant).

Table 1: Alfalfa leaf, stem and total dry matter yield (kg ha^{-1}) for spring 2013, summer, autumn, winter and spring 2014 and summer 2015. The trials were carried out at the Agricultural Experimental Station (Estação Experimental Agronômica, EEA), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

Year and cuts (day and month)							
	Spring 2013 22 November 10 December	Summer 2014 20 January 10 February	Autumn 2014 25 April	Winter 2014 14 June 04 September	Spring 2014 14 November 08 December	Summer 2015 14 January	Overall totals for all seasons combine d
Genotype*	Leaf dry mass per season (kg ha^{-1})						Total leaf dry mass (kg ha^{-1})
ABT-805	900Aa	700Ab	750Aa	900Ab	1000Ab	800Aab	5050
CPPSul	800Ba	3350Aa	1100Ba	1300ABab	2800Aa	2900Aa	12250
Crioula	1150Ba	2200Aa	2200Ba	2050Aa	2900Aa	2250Aa	12750
CUF-101	400Aa	150Ab	550Aa	900Ab	200Ab	350Ab	2550
E ₁ C ₄	750ABa	700ABb	800ABa	1850Aa	500Bb	1050ABab	5650
	Stem dry mass per season (kg ha^{-1})						Total stem dry mass (kg ha^{-1})
ABT-805	1050Aa	800Aa	450ABa	250Bb	450Ba	800Aab	3800
CPPSul	400Ba	900Aa	550ABa	850Aa	550ABa	1050Aa	4300
Crioula	600Aa	750Aa	800Aa	550Aab	900Aa	500Aab	4100
CUF-101	600Aa	500Aa	450Aa	200Ab	600Aa	250Ab	2600
E ₁ C ₄	600Aa	700Aa	350Aa	400Aab	450Aa	700Aab	3200
	Total (leaf + stem) dry mass per season (kg ha^{-1})						Total stem + leaf dry mass (kg ha^{-1})
ABT-805	1450Aa	1500Abc	1150Aa	700Ab	950Ab	1600Aab	7350
CPPSul	1250Ba	4250Aa	1600Ba	2150ABa	3350Aa	4000Aa	16600
Crioula	1750Ba	2950ABab	1900Ba	2600ABa	3800Aa	2750ABa	15750
CUF-101	1000Aa	650Ac	1000Aa	650Ab	800Ab	650Ac	4750
E ₁ C ₄	1250Aa	1400Abc	1150Aa	2250Aa	950Ab	1750Aab	8750

Means followed by the same upper-case letters in the same line and the same lower-case letters in the same column do not differ significantly by the Tukey test ($p < 0.005$).

*Key: 'Crioula' (Brazilian, control commercial genotype); 'E₁C₄' and 'CPPSul' (both Brazilian grazing tolerant genotypes); 'ABT-805' (US, grazing tolerant); 'CUF-101' (US west coast non-dormant).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante evidenciar que a formação de pastagens com leguminosas contribui com o aumento da produtividade, qualidade da pastagem e redução de custos com adubação nitrogenada. Portanto, é fundamental avançar em relação ao manejo e melhoramento genético a fim de obter maior sucesso na utilização da alfafa sob pastejo. Alguns dos entraves na produção de alfafa do estado foram abordados nesta Tese, como por exemplo, resistência a doenças e competição com plantas invasoras.

De todas as doenças causadas por patógenos foliares as quais foram identificadas no presente estudo, apenas duas foram patogênicas. Estas são causadas por *Alternaria alternata* e *Curvularia geniculata*.

O primeiro artigo da Tese, relacionado ao primeiro relato de *A. alternata* em alfafa no Sul do Brasil foi importante para dar início ao reconhecimento de tal patógeno. Além do mais, os trabalhos identificando as principais doenças foliares com uma abordagem molecular e morfológica em alfafa no Sul do Brasil são nulos, sendo necessário dar o primeiro passo.

Na análise dos dados e elaboração do segundo artigo da Tese, algumas questões se evidenciaram. Entre elas, fundamentalmente, a diferença entre genótipos. Verificou-se a variabilidade genética para resistência à *C. geniculata* em três materiais, sendo eles 'Crioula', 'CPPSul' e 'E1C4'. Em relação a resistência à *C. geniculata*, estes apresentaram os melhores resultados em câmara de crescimento, porém, nos experimentos de campo, observamos os melhores resultados apenas para 'Crioula' e 'E1C4'. Para produção de forragem e competição com plantas invasoras, 'Crioula' e 'CPPSul' se destacaram positivamente, mas no entanto, 'E1C4' não mostrou-se eficiente em relação à competição com plantas invasoras.

Os resultados demonstram ser primordial dar continuidade a tal pesquisa, pois foi possível encontrar materiais com características que atendem as exigências dos produtores de alfafa. 'Crioula' e 'CPPSul' têm demonstrado alto desempenho agrônomico em relação à produção de forragem em trabalhos realizados no Rio Grande do Sul pela UFRGS e Embrapa Pecuária Sul. Ressalta-se que os materiais 'E1C4' e 'CPPSul' apresentam aptidão ao pastejo e a 'Crioula' apresenta persistência e adaptabilidade.

A metodologia utilizada no experimento de campo e em câmara de crescimento foi eficaz na seleção de populações divergentes de alfafa, possibilitando o diferimento de populações suscetíveis e resistentes, por exemplo.

Algumas das sementes F_1 oriundas dos cruzamentos intrapopulacionais realizados em casa de vegetação na UFRGS— Capítulo III desta Tese — foram avaliadas para aptidão ao pastejo no Instituto de Agrobiotecnologia em Pamplona, Espanha. Estes dados estão sendo analisados e portanto não foram abordados na presente Tese. Apesar disso, há extremo interesse em publicá-los em breve com o intuito de

continuar o estudo na área de melhoramento genético de alfafa para resistência a doenças e aptidão ao pastejo.

Este trabalho deve ser continuado com os genótipos que apresentaram melhores resultados, ou seja, 'Crioula', 'CPPSul' e 'E1C4', a fim de verificar qual o material mais promissor e realizar cruzamentos entre estes para avaliar o progresso da progênie e dessa forma desenvolver um genótipo que atenda os anseios do agronegócio.

6. REFERÊNCIAS

AL-ASKAR, A. A. A.; GHONEEM, K. M.; RASHAD, Y. M. Seed-borne mycoflora of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Riyadh Region of Saudi Arabia. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 62., n. 1, p. 273-281, 2002.

AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, Sheffield, v. 4, n. 6, p. 435-436, 2003. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00189.x.

BASIGALUP, D.; ROSSANIGO, R.; BALLARIO, M. V. Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. In: BASIGALUP, D. H. (Ed.). **El cultivo de la alfalfa en la Argentina**. Buenos Aires: Ediciones INTA, p. 15-25, 2007.

BASTIANEL, M. et al. Mancha-marrom: nova doença nos pomares de tangerineiras. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 27, p. 323-336, 2005.

BATES, G. W. et al. Plant persistence and animal performance for continuously stocked alfalfa pastures at three forage allowances. **Journal of Production and Agriculture**, Madison, v. 9, n. 3, p. 418-423, jan. 1996.

BELLA, P. et al. Severe infections of *Alternaria* spp on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 83, p. 231, 2001.

BEVILAQUA, G. A. P; PIEROBOM, C. R. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) da Zona Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 19-22, 1995.

BEUSELINCK, P. R. et al. Improving legume persistence in forage crop systems. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 7, n. 3, p. 311- 322, jan. 1994.

BOFF, P.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Escalas para avaliação de severidade de mancha de estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 280-283, 1991.

BOTREL, M. A.; ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F. Frequência de corte da alfafa (cv. crioula) na Zona da Mata de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Vicosa, v. 25, n. 3, p. 396-403, 1996.

BOTREL, M. A. et al. Cultivares de alfafa em área de influência da Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1437-1442, nov. 2001.

BOUTON, J. H. et al. Registration of 'Alfagraze' Alfalfa. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 479, 1991.

BOUTON, J. H. The economic benefits of forage improvement in the United States. **Euphytica**, Wageningen, v. 154, n. 3, p. 263-270, apr. 2007.

BOUTON, J. H. Alfalfa. In: PLANT Sciences Building. Athens: University of Georgia, 2001, p. 30602-7272,

BRANDOLI, M. A. A. **Utilização de marcadores morfológicos para a seleção precoce de alfafa com aptidão ao pastejo e avaliação da fixação biológica de nitrogênio**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BRISKE, D. D. Strategies of Plant Survival. In: HODGSON, J; ILLIUS, A. W. (eds.) **The Ecology and Management of Grazing Systems**. Wallingford: CAB International, 1996, p. 37-68

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New Jersey: J. Willey, 1990.

CAMPOS, A. T. et al. Balanço energético na produção de feno de alfafa em sistema intensivo de produção de leite. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 245-251, fev. 2004.

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**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 429- 433, maio 1990.

CHAO, Y. et al. Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding zinc finger protein from *Medicago sativa* L. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, n. 8, p. 2315-2321, 2009. DOI: 10.1007/s11033-009-9450-5.

CHUNG, W. H. A new species of *Curvularia* from Japan. **Mycotaxon**, Cambridge, v. 91, p. 49-54, 2005.

COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. **Annual Reviews Phytopathology**, Palo Alto, v. 11, p. 343-36, 1973.

CONRAD H. R.; KLOPFENSTEIN T. Role in livestock feeding - greenchop, silage, hay, and dehy. In: HANSON, A. A.; BARNES, A. A.; HILL JR., R. R. (eds.). **Alfalfa and Alfalfa Improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988, p. 539-551.

CORBETTA, G. Rassegna del specie del genere *Curvularia*. **Riso**, Milano, v. 4, p. 3-23, 1964.

COUNCE, P. A.; BOUTON, J. H.; BROWN, R. H. Screening and characterizing of alfalfa for persistence under mowing and continuous grazing. **Crop Science**, Madison, v. 24, n. 2, p. 282-285, 1984.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 1997.

CRUZ, C. D. **Genes: biometria**. Viçosa: Editora UFV, 2006.

DALL'AGNOL, M.; SCHEFFER-BASSO, S. M. Produção e utilização de alfafa. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 2000, p. 265-295.

DEL POZO, M. **La alfafa, su cultivo y aprovechamiento**. Madrid: Mundi-Prensa, 1983.

DOUGHERTY, C. T.; LAURIAULT, L. M. Herbage allowance and intake of cattle. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 112, n. 3, p. 395-401, 1999.

DRUMMOND, G. G. Lucerne cultivars tested on the near south coast. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v. 83, n. 2, p. 26-127, 1972.

DUGAN, F. M.; LUPIEN, S. L. Incidence, aggressiveness, and in planta interactions of *Botrytis cinerea* and other filamentous fungi quiescent in grape berries and dormant buds in central Washington state. **Journal of Phytopathology**, Jena, v. 150, n. 7, p. 375-381, 2002. DOI:10.1023/A:1021399301542.

ELGIN, J. H.; WELTY, R. E.; GILCHRIST, D. G. Breeding for disease and nematode resistance. In: HANSON, A. A.; BARNES, D. K.; HIL, R. R. (eds.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society Agronomy, VI, 1998, p. 827-858.

ERWIN, D. C. **Diseases caused by fungi phytophthora root-rot**. In: STUTEVILLE, D. L.; ERWIN, D. C. **Compendium of alfalfa diseases**. 2ª ed. St. Paul: APS Press, 1990, p. 37-38.

GRAU, C. R. Pythium seed rot, damping-off, and root-rot. In: STUTEVILLE, D. L.; ERWIN, D. C. **Compendium of Alfalfa Diseases**. 2ª ed. St. Paul: APS Press, 1990, p. 11-12.

EVANGELISTA, A. R. et al. Comportamento de 35 cultivares de alfafa (*Medicago sativa*) no Sul de Minas Gerais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001, p. 240-241.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). [Informações obtidas no site]. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: set. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **World Livestock 2011 – Livestock in food security**. Rome: FAO, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf>>. Acesso em: set. 2010.

FARIAS, C. R. J. et al. Qualidade sanitária de sementes de aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) produzidas no estado do Rio Grande do Sul, safra 1999/2000. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 1-4, 2002.

FAVERO, D. **Morfofisiologia comparada de populações de alfafa de diferentes hábitos de crescimento**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

FAVERO, D. et al. Desempenho de populações de alfafa sob distintos níveis de desfolhação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 4, p. 589-595, 2008.

FERREIRA R. P.; PEREIRA A. V. Melhoramento de forrageiras. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005, p. 781-812

FERREIRA, R. P. et al. Avaliação de cultivares de alfafa e estimativas de repetibilidade de caracteres forrageiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 995-1002, 1999.

FERREIRA, R. P. et al. Determinação do coeficiente de repetibilidade e estabilização genotípica das características agronômicas avaliadas em genótipos alfafa no ano de estabelecimento. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 5, p. 642-647, 2010.

FERREIRA, R. P. et al. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de alfafa em relação a diferentes épocas de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 265-269, 2004.

FERREIRA, R. P. et al. **Cultivo e utilização da alfafa em pastejo para alimentação de vacas leiteiras**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2015.

FONTES, P. C. R. et al. Produção e níveis de nutrientes em alfafa (*Medicago sativa* L.) no primeiro ano de cultivo na Zona da Mata de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 205-211, 1993.

FRAME, J.; CHARLTON, J. F. L.; LAIDLAW, A. S. Lucerne (syn, Alfafa). In: FRAME, J.; CHARLTON, J. F. L.; LAIDLAW, A. S. (eds.). **Temperate forage legumes**. New York: CAB International, p. 107-179, 1998.

FRATE, C. A.; DAVIS, R. M. Alfalfa diseases and management. In: SUMMERS, C. G.; PUTNAM, D. H. (eds.). **Irrigated alfalfa management for Mediterranean and Desertzones**. Oakland: University of California Agriculture and Natural Resources Publication, 2007. Chapter 10.

FREITAS, A. R. et al. **Prioridades de pesquisa com a cultura da alfafa no Brasil**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009.

FREITAS, D. et al. Avaliação de Fontes de Amônia para Conservação do Feno de Alfafa (*Medicago sativa* L.) Armazenado com Alta Umidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 866-874, 2002.

FERRAGINE, M. C. et al. Produção estacional, índice de área foliar e interceptação luminosa de cultivares de alfafa sob pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 1041-1048, 2004.

FURTADO, E. L. Doenças das folhas e do caule da seringueira. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Coord.) **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, 2008, p. 499-534.

FROSHEISER, F. I.; BARNES, D. K. Field and Greenhouse Selection for Phytophthora Root Rot Resistance in Alfalfa1. **Crop Science**, Madison, v. 13, n. 6, p. 735-738, 1973. DOI:10.2135/cropsci1973.0011183X001300060044x.

GIAVENO, C. D. **Comparacion de dos ciclos de selección en desarrollo de poblacions de alfalfa (*Medicago Sativa* L.) com menor potencial empastador**. Pergamino: INTA, 1996. (Dissertação de Magister Scientiae en Mejoramento Genético Vegetal).

GIECO, J. O.; BASIGALUP, D. H. Cultivares de alfafa no Brasil. In: FERREIRA, R. P.; BASIGALUP, D. H.; GIECO, J. O. (Ed.). **Melhoramento genético da alfafa**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2011, p. 106-143.

GRAHAM, J. H. et al. **Compedium of alfalfa diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1979.

GUAITA, M. S.; GALLARDO, M. **Utilización de la pastura de alfalfa en un sistema intensivo de producción de leche**. Rafaela: INTA, 1996, p. 93-100.

GUINES, F. et al. Genetic control of quality traits of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 53, p. 401-407, 2002.

GRAYER, R. J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: the search for

phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, New York, v. 56, n. 3, p. 253-269, 2001.

HILL, R. R.; HANSON, C. H.; BUSBUCE, T. H. Effect of Four Recurrent Selection Programs on Two Alfalfa Populations¹. **Crop Science**, Madison, v. 9, n. 3, p. 363-365, 1969. DOI: 10.2135/cropsci1969.0011183X000900030036x.

HIJANO, E. H.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, J. Enfermedades de la alfalfa. In: HIJANO, E. H.; NAVARRO, A. (Ed.). **La alfalfa em la Argentina**. Buenos Aires, AR: INTA, 1995. p. 125-146 (INTA: Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales, 11).

HIJANO, E. J.; NAVARRO, A. (Ed.). **La alfalfa en la Argentina**. Corrientes: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 1995.

HONDA, C. S. E.; HONDA, A. M. **Cultura da Alfafa**. Cambará: IARA Artes Gráficas Ltda., 1990.

HOSOKAWA, M.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Conidium morphology of *Curvularia geniculata* and allied species. **Mycoscience**, Tokio, v. 44, n. 3, p. 227-237, 2003.

HOVELAND, C. S. Problems and opportunities in grazing alfalfa. In: NATIONAL ALFAFA SYMPOSIUM, 22., 1992, Virginia. **Proceedings**. Virginia: Roanoke, 1992. p. 100-102.

IAMAUTI, M. T.; SALGADO, C. L. Doenças da alfafa. In: KIMATI, H. et al. (eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, p. 26-32.

IIDA, W.; TAKAHASHI, H. Relation of environmental factors and age of ladino clover plant to occurrence of *Curvularia* leaf spot of ladino clover. **Journal of Japanese Society of Grassland Science**, Nasushiobara, v. 13, n. 3, p. 199-204, 1967.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (INTA). **El Avance de la Soja en la Argentina y la Sostenibilidad de los Sistemas Agrícolas**. Santa Fe: Consejo del Centro Regional Santa Fe, 2003.

JAHUFER, M. Z. Z.; COOPER, M.; BRIEN, L. A. Genotypic variation for stolon and other morphological attributes of white clover (*Trifolium repens* L.) populations and their influence on herbage yield in the summer rainfall region of new south wales. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 45, p. 703-720, 1994.

JACQUES, A. V. A. Manejo de espécies do gênero *Medicago*. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DA PASTAGEM, 1975, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 1975.

JULIATTI, F. C. et al. Resistência de cultivares de alfafa à antracnose e à mancha de leptosphaerulina em Uberlândia-MG. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 37, n. 4, p. 169-173, 2011.

JULIER, B.; HUYGHE, C.; ECALE, C. Within and among cultivar genetic variation in alfalfa: Forage quality, morphology in a yield. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 2, p. 365-369, 2000.

KEPLIN, L. A. S.; SANTOS, I. R. Princípios e práticas para o estabelecimento e manejo da cultura da alfafa. **Jornal da Área de Assistência Técnica**, CCLPL, v. 84, p. 18-20, 1991.

KIMATI, H. Doenças. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 16., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 1999, p. 199-214.

KOMMEDAHL, T.; OHMAN, J. H. The role of *Agropyron repens* in the seedling blight epidemiology of Alfalfa and cereals. **Proceedings of the Minnesota Academy of Science**, St. Paul, v. 28, p. 10-15, 1960.

LANGER, A. M.; ALFALFA, I. **Evolution of crop plants**. Harlow: Logman, p. 283-286, 1995.

LATCH, G. M. C.; SKIPP, R. A. Diseases. In: BAKER, M. J.; WILLIAMS, W. M. (eds.) **White clover**. Wallingford: CAB, 1987, p. 421-460.

LEATH, K. T.; ERWIN, D. C.; GRIFFIN, G. D. Diseases and nematodes. Alfalfa and alfalfa improvement. **American Society of Agronomy**, Madison, p. 641-670, 1988.

LÉDO, F. J. S. et al. Introdução e avaliação de germoplasma de alfafa no ecossistema de Mata Atlântica de Minas Gerais. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. Recife, 2002. 1 CD-ROOM, p. 39.

LIMA, M. et al. Avaliação da resistência a ferrugem tropical em linhagens de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 2, p. 269- 273, 1996.

LOUČKA, R.; MACHAČOVÁ, E.; TYROLOVÁ, I. Differences between two Varieties of Alfalfa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION. 10, 2001, Prague, Czech Republic. **[Proceedings]**. Prague, Czech Republic: Research Institute of Animal Production, 2001, p. 88-89.

MAFFIA, L. A. et al. Doenças do tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, p. 42-60, 1980.

MALLMANN, G. et al. Fungos e nematoides associados a sementes de forrageiras tropicais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 39, n. 3, p. 201-203, 2013.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, R. J. **Doenças em plantas forrageiras**. Campo Grande - MS: Embrapa Gado de Corte, 2011. 187p. (Circular Técnica).

MELLO, S. C. M. **Resistência do tomateiro à mancha bacteriana**. 1995. 112 p. Tese (Doutorado) - Departamento de Fitotecnia, Universidade de Brasília, Brasília, 1995.

MELTON, B.; MOUNTRAY, J. B.; BOUTON, J. H. Geographic adaptation and cultivar selection. In: HANSON, A. A.; BARNES, D. K.; HILL, R. R. (Ed.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 596-618.

MICHAUD, R.; LEHMAN, W. F.; RUMBAUCH, M. D. World distribution and historical development. In: HANSON, A. A.; BARNES, D.; HILL, R. R. (Ed.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 25-92.

MITTELMANN, A.; LÉDO, F. J. S.; GOMES, J. F. **Tecnologias para produção de alfafa no Rio Grande do Sul**. Pelotas, RS/Juiz de Fora, MG: Embrapa, 2008.

MOREIRA, A. et al. **Fertilidade do solo e estado nutricional da alfafa cultivada nos trópicos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007, 40p.

MULLER, C. E. **Impact of harvest, preservation and storage conditions on forage quality**. Forages and grazing in horse nutrition. Wageningen: Academic Publishers 2012, p. 237-253 (EAAP publication, v. 132).

NITHARWAL, P. D.; GOUR, H. N.; AGARWAL, S. Effects of different factors on the production of cellulase by *Curvularia lunata*. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 36, n. 4, p. 357, 1991. DOI:10.1007/BF02814509.

NUERNBERG, N. J.; MILAN, P. A.; SILVEIRA, C. A. M. **Manual de produção de alfafa**. Florianópolis: EMPASC, 1990. 102 p.

OLIVEIRA, P. R. D. **Avaliação da produção e da qualidade de cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.)**. 1986, 67 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1986.

OLIVEIRA, P. P. A.; CORSI, M. Isolamento de Patógenos Causadores de "Damping-off" em Alfafa (*Medicago sativa*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n 1, p. 23-26, 1998.

OLIVEIRA, P. P. A. **Seleção preliminar de cultivares de alfafa sob pastejo em condições tropicais, no município de São Carlos, SP.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006, 9 p. (Comunicado Técnico – n. 68).

PAIM, N. R. Utilização e melhoramento da alfafa. In: WORKSHOP SOBRE POTENCIAL FORRAGEIRO DA ALFAFA (MEDICAGO SATIVA L.) NOS TRÓPICOS, 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1994, p. 141-158.

PASSOS, L. D. Indicadores Fisiológicos para Cultura da Alfafa nos trópicos. In: WORKSHOP SOBRE POTENCIAL FORRAGEIRO DA ALFAFA (MEDICAGO SATIVA L.) NOS TRÓPICOS, 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1994, p. 149-158.

PEDROSO, D. J.; VALÉRIO, M. A.; PEDROSO, R. **Beneficiamento e comercialização de alfafa no Município de Bandeirantes - PR.** [S.l.]: SEIC/FFALM, 1987, 36p.

PEREIRA, A. V. et al. Comportamento de alfafa cv. crioula de diferentes origens e estimativas dos coeficientes de repetibilidade para caracteres forrageiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 686-690, 1998.

PEREIRA, A. V. **Cultivares de alfafa.** In: FERREIRA, R. P. et al. (eds.) Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, p. 207-226, 2008.

PERES NETO, D. et al. Desempenho de vacas leiteiras em pastagem de alfafa suplementada com silagem de milho e concentrado e viabilidade econômica do sistema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, p. 399-407, 2011.

PERES, N. A. R.; AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W. Outbreaks of Aternaria brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, 2003, 750p.

PEREZ, N. B. et al. **Grazing Tolerance of crioula alfafa in Southern Brazil.** In: NORTH AMERICAN ALFAFA IMPROVEMENT CONFERENCE, 38, 2002, Sacramento. **Proceedings of North American Alfafa Improvement Conference.** Sacramento, 2002.

PEREZ, N. B. **Melhoramento genético de leguminosas de clima temperado – Alfafa (Medicago sativa L.) e cornichão (Lotus corniculatus L.) para aptidão ao pastejo.** 2003. 175p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

PEREZ, N. B.; DALL'AGNOL, M. Características morfológicas de plantas de alfafa relacionadas à aptidão ao pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 418-421, 2009.

PEREZ, N. B. et al. **Grazing Tolerance of crioula alfafa in Southern Brazil**. In: NORTH AMERICAN ALFAFA IMPROVEMENT CONFERENCE, 38, 2002, Sacramento. **Proceedings of North American Alfafa Improvement Conference**. Sacramento, 2002.

PETERS, E. J.; PETERS, R. A. Weeds and weeds control. In: HANSON, C. H. (Ed.). **Alfafa science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 1992, 812 p.

POZZA, E. A.; SOUZA, P. E. Ocorrência de Doenças em Alfafa (*Medicago sativa* L.) na região de Lavras, MG. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 18, n. 2, p.186-188, 1994.

PORTO, M. D. M. Doenças na cultura da alfafa. In: FERREIRA, R. P. et al. (Ed.). **Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos**. Brasília: Embrapa Transferência de Tecnologia, 2008, p. 345-378.

PRATES, H. S. Mancha de *Alternaria* nas tangerinas. **Revista Coopercitrus**, Campinas, n. 205, p. 12-14, 2004.

PRATT, R. G. Diseases Caused by Dematiaceous Fungal Pathogens as Potential Limiting Factors for Production of Bermudagrass on Swine Effluent Application Sites. **Crop Science**, Madison, v. 92, n. 3, p. 512-517, 1999.

QUEIROZ, C. F.; BAUCHAN, G. R. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: HANSON, A. A.; BERNES, D. K.; HILL, R. R. (Ed.). **Alfafa and alfafa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988, p. 25-92.

RAO, G. P.; SINGH, S. P.; SINGHT, M. Two new alternative hosts of *Curvularia pallescens* the leaf spot causing fungus of sugarcane. **Tropical Pest Management**, London, 1992, 38p. DOI: 10.1080/09670879209371688.

RASSINI, J. B.; FERREIRA, R. P.; MOREIRA, A. **Recomendações para o cultivo de alfafa na região Sudeste do Brasil**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. (Circular técnica, 46).

RASSINI, J. B. **Alfafa (*Medicago sativa*): Estabelecimento e cultivo no Estado de São Paulo**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1998, 22p. (Circular Técnica, 15).

REIS, A. et al. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 21, p. 16-20, 1995.

RIVZI, G. Deterioration of seed quality in relation to vigour by seed mycoflora in forage sorghum. **Indian Phytopath**, New Delli, v. 59, p. 515-517, 2006.

RODRIGUES, A. A.; COMERON, E. A.; VILELA, D. Utilização da alfafa em pastejo para alimentação de vacas leiteiras. In: FERREIRA, R. P. et al. (Ed.). **Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008, p. 345-378.

RHODES, L. H. Crown and root rot complexes. In: STUTEVILLE, D. L.; ERWIN, D. C. (eds.) **Compendium of Alfalfa Diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1990, p. 43-44.

ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1994, 326p.

RIZVI, S. S. A.; NUTTER, F. W. Seasonal dynamics of alfalfa foliar pathogens in Iowa. **Plant Disease**, St. Paul., v. 77, n. 11, p. 1126-1135, 1993.

RUMBAUGH, M. D.; CADDEL, J. L.; ROWE, D. E. Breeding and quantitative genetics. In: HANSON, A. A. (Coord). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1998, p. 777-808.

SAIBRO, J. C. **Avaliação preliminar de cultivares de alfafa (Medicago sativa L.) no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1972 (Relatório de Pesquisa).

SAIBRO, J. C. Produção de alfafa no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 7, 1984, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1984, p. 61-106.

SALES, N. L. **Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão**. 1992. 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1992.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; MUNIZ, A. M. Grazing resistance mechanisms in alfalfas of different aptitude in the juvenile stage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 8, p. 1684-1690, 2010.

SHERIDAN, J. E. Drechslera spp. and other seedborne pathogenic fungi in New Zealand. N.Z. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, n. 1, p. 91-93, 1977.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs. **Mycological Papers**, Cambridge, v. 158, p. 1-261, 1987.

SMITH JR., S. R.; BOUTON, J. H.; HOVELAND, C. S. Alfalfa persistence and regrowth potential under continuous grazing. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 6, p. 960-965, 1989.

SMITH JR., S. R.; BOUTON, J. H. Selection within alfalfa cultivars for persistence under continuous stocking. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1321-1328, 1993.

SPADA, M. C. Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Alfafa. **Avances en Alfalfa**, v. 15, 2005.

STUTEVILLE, L. D.; ERWIN, D. C. **Compendium of alfalfa diseases**. St Paul: APS, 1990.

SWART, S. H. et al. Brown spot of *Minneola* tangelo and efficacy of fungicidal sprays programmes for disease control in South Africa. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, South Africa, v. 1, p. 379-384, 1996.

THAL, W. M.; CAMPBELL, C. L. Sampling procedures for determining severity of alfalfa leaf spot diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 157-162, 1987a.

THAL, W. M.; CAMPBELL, C. L. Assesment of resistance to leaf diseases among alfalfa cultivars in North Carolina fields. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 964-968, 1987b.

TIAN, P. et al. Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. **European Journal of plant pathology**, Bari, v. 122, n. 4, p. 593-602, 2008.

TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; OROZCO-SANTOS, M. *Alternaria* Brown Spot of mandarins. In: TIMMER, L. H.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Minnesota: APS Press, 2000, 19p.

TÖFOLI, J. G. et al. Potato late blight and early blight: importancy, characteristics and sustainable management. **Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2013.

UDDIN, W.; KNOUS, T. R. *Fusarium* Species associated with Crown Rot of Alfalfa in Nevada. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p. 51-56, 1991.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Livestock and poultry**: world markets and trade. 2016. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em: 12 dez. 2016.

VANCE, C. P.; HEICHEL, G. H.; PHILLIPS, D. A. **Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation**. In: HANSON, A. A.; BARNES, O. K.; HILL JR., R. R.

(Eds.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988, p. 303-332.

VIANDS D. R.; SUN, P.; BARNES, D. K. Pollination control: mechanical and sterility. In: HANSON, A. A.; BERNES, D. K.; HILL, R. R. (Ed.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988, p. 931-960.

VICENT, A. et al. First report of *Alternaria* Brown Spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 9, p. 1044, 2000.

VIECELLI, L. C. **Melhoramento genético de trevo branco (*Trifolium repens* L.) visando persistência e produção**. 2000. 135p. Dissertação (Mestrado) - Programde Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

VILELA, D. Potencial do pasto de alfafa (*Medicago sativa*) para produção de leite. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DE ALFAFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) NOS TRÓPICOS, 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA - CNPGL, 1994, p. 171-185.

VILELA, D. Potencialidade da alfafa na região Sudeste do Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 175, p. 50-53, 1992.

VILELA, D. et al. Prioridades de pesquisa e futuro da alfafa no Brasil. In: FERREIRA, R. P. et al. (Ed.). **Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008, p. 441-455.

VINHOLIS, M. M. B. et al. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais de tecnologias da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006 (Documento, 60).

ZHANG-MENG, M.; ZHANG-TIAN, Y. A new species of *Curvularia* from China. **Mycosystema**, Beijing, v. 22, p. 357-358, 2003.

ZHANG-MENG, M.; ZHANG-TIAN, Y.; WU-YUE, M. A new name and a new variety in *Curvularia*. **Mycosystema**, Beijing, v. 23, p. 177-178, 2004.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Normas de acordo com a revista científica 'African Journal of Agricultural Research', utilizadas para escrever o Capítulo II desta tese.

AJAR - Instructions for Authors

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

Studies involving non human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the Animal Welfare Act, The Animals (Scientific Procedures) Act (Amendment) Order 1993, The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes, ARRP policies and guidelines, etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

See additional guidelines for reporting of health research.

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the IMRAD structure.

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in unstructured or structured format. The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Baumert J, Kunter M, Blum W, Brunner M, Voss T, Jordan A, Klusmann U, Krauss S, Neubrand M, Tsai YM (2010). Teachers` mathematical knowledge, cognitive activation in the classroom, and student progress. *Am. Educ. Res. J.* (1) p.133-180. <http://dx.doi.org/10.3102/0002831209345157>

Christopoulous DK, Tsionas EG (2004). "Finacial Development and Economic Growth: Evidence from Panel Unit Root and Cointegration Tests" *J. Dev.Econ.* p.55-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdeveco.2003.03.002>

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. *Pediatric. Emerg. Care* (17) p.130-131. <http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. *J. Laryngol. Otol.* (115) p.648-649. <http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the [manuscript management system](#), the payment option is only enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

We welcome manuscripts edited by the following organizations:

JOURNALS CONSORTIUM (www.journalsconsortium.org)

EDITAGE (www.editage.com)

BIOEDIT (www.bioedit.co.uk)

NARVAN (www.banarvan.com)

Apêndice 2. Normas de acordo com a revista científica 'Academia Brasileira de Ciências', utilizadas para escrever o Capítulo III desta tese.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The journal *Anais da Academia Brasileira de Ciências* from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

Types of Papers

Reviews

Reviews are published by invitation only. However, a proposal for a Review may be submitted in the form of a brief letter to the Editor at any time. The letter should state the topics and authors of the proposed review, and should state why the topic is of particular interest to the field.

Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 250 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6).

Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

Short communications

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

Tables and Illustrations

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines (maximum of 5 figures free of charge). Their tentative placement in the text should be indicated.

Digitalized figures

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator)

and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm. The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in, or. The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

Front page

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 areas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be provided.

Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith and Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

REFERENCES

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A. (1984a). Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* vol. 6 (p. 167-182).

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Deland-Sheer E, Giuffrida R And Cesaro P. (1984b). Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* vol.56 (p. 371-383).

Knowles RG and Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* Vol. 298 (p. 249-258).

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* vol.56 (p. 207-215).

Books and book chapters

Davies M. (1947). *An outline of the development of Science*. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, (214 p).

Prehn RT. (1964). Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, (p. 97-104).

Uytenbogaardt W And Burke EAJ. (1971). *Tables for microscopic identification of minerals*, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, (430 p).

Woody Rw. (1974). Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), *Peptides, polypeptides and proteins*, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, (p. 338-350).

Other publications

International Kimberlite Conference, 5, (1991). Araxá, Brazil. Proceedings... Rio de Janeiro: CPRM, 1994, (495 p).

Siatycki J. (1985). Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 1985, (55 p). Preprint No. 600.

**Apêndice 3. Informação online referente a publicação do artigo
apresentado no Capítulo II e primeira página no artigo publicado.**

Article Number - F89780D50171
Vol.10(6), pp. 491-493, February 2015
DOI: 10.5897/AJAR2014.9205
ISSN: 1991-637X

Short Communication

First report in Southern Brazil of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* leaf spot in alfalfa (*Medicago sativa*)

Mariana Rockenbach de Ávila^{1*}, Miguel Dall' Agnol¹, Érika Sayuri Maneti Koshikumo², José Antônio Martinelli², Gerarda Beatriz Pinto da Silva², Raquel Schneider-Canny¹

¹Department of Forage Plants and Agrometeorology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Department of Plant Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Received 6 October 2014; Accepted 22 January, 2015

Alfalfa plants with symptoms of *Alternaria* leaf spot from the Atlantic forest biome and Pampa biome, Brazil, were collected to identify the pathogen associated in this disease. The pathogen was isolated, analyzed morphologically according to literature and later molecularly identified. After that, pathogenicity tests were conducted in a greenhouse to confirm the Koch's postulates. The first symptoms occurred after five days of inoculation. Initially the symptoms were dark formations becoming rounded blotches about 1 mm to 3 mm in diameter that appeared on both edges and in the center of the leaflets. From this data, we concluded that this is the first report of *Alternaria alternata* in Brazil.

Key words: Forage legumes, fungal disease, inoculation, pathogenicity.

INTRODUCTION

Alfalfa stands out from other forage legumes species in terms of its nutritive value, but it is susceptible to attack from more than 70 different pathogens (Thal and Campbell, 1987). In Brazil, there are few studies and only thirteen fungal diseases have been detected (Iamauti and Massola, 2005). When alfalfa plants are attacked by foliar pathogens, losses in quality of hay, reduction in green forage production and limitations on the development of plants occur. Information about diseases occurring in alfalfa in Brazil is restricted and because of the growing interest in this species, it is essential to do more research to better understand these diseases. To our knowledge,

this is the first report in Southern Brazil of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* leaf spot (ALF) in alfalfa. These contributions are very important for breeding and selection of productive cultivars that are resistant to pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Symptoms of ALF were observed in *Medicago sativa* cv. Crioula plants in the highland (Atlantic forest biome) and lowland (Pampa

*Corresponding Author. Email: marianaravila@gmail.com. Tel: +555133086045.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

8. VITA

Mariana Rockenbach de Ávila é filha de Laci Rockenbach e Evandro Guilherme Bittencourt de Ávila. Nasceu em 31 de outubro de 1988 no município de Dom Pedrito, Rio Grande do Sul. cursou o ensino fundamental e o médio em Dom Pedrito, nas Escolas Nossa Senhora do Horto e Nossa Senhora do Patrocínio, respectivamente. O ensino médio concluiu no ano de 2005. Em 2006, ingressou no Curso de Tecnologia em Agropecuária da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), município de Bagé, RS, onde desenvolveu atividades como bolsista CNPq junto à Embrapa Pecuária Sul na área de nutrição animal e plantas forrageiras, durante meados de 2007 à início de 2010. Concluiu a faculdade de Tecnologia em Agropecuária em fevereiro de 2010. Em março de 2010 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de concentração de Plantas Forrageiras, com bolsa do Capes sob a orientação do Professor Doutor Carlos Nabinger. Em fevereiro de 2012 defendeu a dissertação intitulada “Efeito do nitrogênio sobre a dinâmica da composição florística de uma pastagem natural sobressemeada com azevém anual”. Em março de 2012 ingressou como bolsista de desenvolvimento tecnológico (DTI/CNPq) no grupo de pesquisa em Ecologia sob supervisão do Professor Doutor Valério de Patta Pillar. Em abril de 2013 ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de concentração de Melhoramento genético de Plantas Forrageiras, orientada do Professor Doutor Miguel Dall’Agnol. Em dezembro de 2014 deu início ao período de doutorado sanduíche na cidade de Pamplona, Espanha, no grupo de pesquisa de fisiologia vegetal e biotecnologia no Instituto de Agrobiotecnología e na Universidad Pública de Navarra, sob orientação do Professor Doutor José Fernando Morán Juez. Em julho de 2016 assumiu como docente do Curso de Agronomia na Faculdades IDEAU, Campus Bagé, Rio Grande do Sul.