



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

MARLON CRISTIANO DE BORBA

**PERFIL DE METABÓLITOS E EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA
INDUZIDOS POR POLISSACARÍDEOS ALGAIS EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)
CONTRA *Zymoseptoria tritici***

Florianópolis-SC

2021

MARLON CRISTIANO DE BORBA

**PERFIL DE METABÓLITOS E EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA
INDUZIDOS POR POLISSACARÍDEOS ALGAIS EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)
CONTRA *Zymoseptoria tritici***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências, área de concentração de Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Marciel J. Stadnik, Dr.

Coorientador: Prof. Ali Siah, Dr.

Florianópolis-SC

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Borba, Marlon Cristiano

Perfil de metabólitos e expressão de genes de defesa induzidos por polissacarídeos algais em trigo (*Triticum aestivum* L.) contra *Zymoseptoria tritici* / Marlon Cristiano de Borba ; orientador, Marciel J. Stadnik, coorientador, Ali Siah, 2021.

55 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Indução de resistência. 3. Polisacarídeos algais. 4. Trigo *Zymoseptoria tritici*. 5. Metabolômica. I. Stadnik, Marciel J.. II. Siah, Ali. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

MARLON CRISTIANO DE BORBA

**PERFIL DE METABÓLITOS E EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA
INDUZIDOS POR POLISSACARÍDEOS ALGAIS EM TRIGO (*Triticum aestivum* L.)
CONTRA *Zymoseptoria tritici***

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Philippe Reignault, Dr.
Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO)

Prof^a. Franceli Rodrigues Kulcheski, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a. Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Prof. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Dr.
Coordenador do Programa

Prof. Marciel J. Stadnik, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021

Aos meus queridos pais e familiares pelo apoio em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de realização do doutorado;

Ao Institut Supérieur d'Agriculture (ISA-Lille) pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo de doutorado e doutorado sanduíche;

Ao professor Dr. Marciel J. Stadnik pelos seus ensinamentos, orientação, confiança e incentivo ao longo de todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Dr. Ali Siah pelos ensinamentos, coorientação, suporte e incentivo durante todo o doutorado;

Ao professor Dr. Philippe Reignault pelos ensinamentos, suporte e incentivo;

Aos professores da UFSC, do ISA, e da ULCO pelos ensinamentos;

Ao grupo de estudos do projeto Bioestimalg (Capes-Cofecub) pelo apoio e parceria durante a realização do trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UFSC (Aline, César, Mateus, Felipe, Alessandro, Paula, Vanessa, Ana Carolina, Ana Cláudia, Elinton) e do Laboratório BIOGAP (ISA-Lille) (Samara, Rémi, Maxime, Justine, Myriam, Hélène, Alice) pela colaboração, amizade e convivência;

Aos meus pais e familiares, que nunca mediram esforços para a realização dos meus sonhos, agradeço a compreensão e o incentivo ao longo da minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, o meu muito obrigado!

*“A imaginação é mais importante que a ciência,
porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”*
Albert Einstein.

RESUMO

A mancha salpicada da folha, causada pelo fungo *Zymoseptoria tritici*, é uma das principais doenças do trigo em todo o mundo. Atualmente, a principal forma de controle é o uso de fungicidas convencionais e cultivares resistentes. Contudo, devido a variabilidade genética, *Z. tritici* frequentemente desenvolve resistência aos fungicidas e supera a resistência do hospedeiro. Neste cenário, novas alternativas de controle, como a indução de resistência, precisam ser consideradas. Polissacarídeos algais, como a ulvana e laminarana, extraídos das paredes celulares de algas verdes e marrons, respectivamente, têm demonstrado potencial em induzir respostas de defesa de plantas contra patógenos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da ulvana e da formulação de laminarana, Vacciplant[®], na proteção do trigo contra *Z. tritici* bem como determinar a expressão de genes de defesa e o perfil de metabólitos associados à resistência. Para isso, plantas de trigo cultivadas em casa-de-vegetação foram pulverizadas separadamente com os produtos dois dias antes da inoculação com o fungo. Uma aplicação foliar preventiva de ulvana ou Vacciplant[®] reduziu significativamente a severidade da doença e a densidade de picnídios em torno de 50% aos 21 dias após a inoculação. Ambos os tratamentos também reduziram a colonização subestomática e a formação de picnídios nas folhas de trigo. Observações microscópicas revelaram que Vacciplant[®], mas não a ulvana, possui atividade antifúngica direta contra *Z. tritici* em condições *in vitro* e *in planta*. Ensaio moleculares revelaram que o tratamento com ulvana ou Vacciplant[®] possui efeito elicitor, mas não efeito priming, na expressão de genes envolvidos em várias vias de defesa do trigo. Ambos os polissacarídeos induziram a expressão de genes relacionados à patogênese (β -1,3-endoglucanase e quitinase) e da via dos octadecanóides (lipoxigenase e óxido aleno sintase), a ulvana aumentou a expressão do gene oxalato oxidase envolvido no metabolismo das espécies reativas de oxigênio enquanto que o Vacciplant[®] elicitou os genes da biossíntese da via dos fenilpropanóides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase). Por fim, a análise de metabolômica, quantificando 83 metabólitos relacionados à defesa do trigo, demonstrou que o tratamento foliar com ulvana ou Vacciplant[®] não causou maiores alterações no metabolismo geral das plantas, sugerindo um baixo custo metabólico associado à indução de resistência.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L., septoriose do trigo, algas verdes e marrons, indutores de resistência, expressão gênica, metabolômica.

ABSTRACT

Septoria tritici blotch, caused by the hemibiotrophic fungus *Zymoseptoria tritici*, is one of the main wheat diseases worldwide. Currently, disease control relies on the use of conventional fungicides and resistant cultivars. However, due to high genetic variability, *Z. tritici* often develops resistance to fungicides and overcomes host resistance. In this scenario, new control measures such as induction of plant resistance need to be considered. Algal polysaccharides, such as ulvan and laminarin, extracted from the cell walls of green and brown algae, respectively, have demonstrated potential to induce plant defense responses against pathogens. Thus, the present work aimed to evaluate the potential of ulvan and formulation of laminarin, Vacciplant[®], in protecting wheat against *Z. tritici*, as well as determine the expression of defense-related genes and metabolite profiling associated with resistance induction. For that, wheat plants grown in greenhouse conditions were sprayed separately with the products two days before fungal inoculation. A preventive foliar application of ulvan or Vacciplant[®] significantly reduced both disease severity and pycnidium density by *c.* 50% at 21 days after inoculation. Both treatments also reduced substomatal colonization and pycnidium formation on wheat leaves. Microscopic observations revealed that Vacciplant[®], but not ulvan, exhibited a direct antifungal activity against *Z. tritici* both *in vitro* and *in planta* conditions. Molecular assays revealed that treatment of ulvan or Vacciplant[®] elicits, but does not prime, the expression of genes involved in several wheat defense pathways. Both polysaccharides induced the gene expression of pathogenesis-related proteins (β -1,3-endoglucanase and chitinase) and octadecanoid pathway (lipoxygenase and allene oxide synthase), ulvan increased the expression of oxalate oxidase gene involved in the metabolism of reactive oxygen species while Vacciplant[®] elicited the expression of genes related to phenylpropanoid pathway (phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase). Finally, the metabolomic analysis, quantifying 83 metabolites related to wheat defense, showed that foliar treatment with ulvan or Vacciplant[®] did not cause major changes in plant metabolism, suggesting a low metabolic cost associated with induction of resistance.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici* blotch, green and brown algae, resistance inducers, gene expression, metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura de um picnídio (A), formação de cirro do picnídio sobre a superfície foliar (B), picnidiósporos (C), e hifas (D) de *Zymoseptoria tritici*. Barra: 10 µm (A e D) e 100 µm (B e C). Fotos: A) e C) PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011. B) VRANCKEN *et al.*, 2010. D) STEINBERG, 2015.21
- Figura 2. Crescimento de *Zymoseptoria tritici* em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (A), conídios septados não germinado (B), conídio germinado (C) e crescimento de hifas (D) sobre folhas de trigo observados por microscopia de fluorescência corados com calcofluor. Barra: 1 cm (A), 100 µm (B), 10 µm (C e D). Fotos: Autor.22
- Figura 3. Ascas contendo ascósporos (A) e ascósporos (B) de *Mycosphaerella graminicola*. Barra: 10 µm. Fotos: HALAMA, 1996.22
- Figura 4. Sintomas típicos da mancha salpicada caracterizados por lesões necróticas delimitadas pelas nervuras (A-B) e formação de picnídios (C) em folhas de trigo após a infecção com *Zymoseptoria tritici*. Fotos: A) Autor; B) MACCREEK, 2021; C) STEINBERG, 2015.23
- Figura 5. Ciclo de vida de mancha salpicado da folha do trigo causada por *Zymoseptoria tritici*. Fonte: SIDHU, 2015.24
- Figura 6. Fases de infecção de *Zymoseptoria tritici* em folhas de trigo. A-B) Ascósporos ou picnidiósporos aderem na epiderme da folha (fase de germinação). C-D) Hifa penetra através dos estômatos e começa a colonizar a cavidade subestomática (fase de colonização). E-F) Os picnídios são formados nas cavidades subestomáticas colonizadas (pré-formação de picnídios) (E-F), amadurecem e produzem picnidiósporos que são liberados por respingo de chuva e espalham a infecção para outras plantas (maturação dos picnídios) (G-H). dai: dias após a inoculação. Barra: 10 µm. Fonte: A, C, E, G) STEINBERG, 2015; B, D, F, H) Autor.26
- Figura 7. Macroalga verde *Ulva fasciata* crescendo em costões rochosos na praia da Barra da Lagoa em Florianópolis (A), talos da alga (B) e polissacarídeo ulvana extraído das paredes celulares da alga (C). Fotos: Autor.29
- Figura 8. Estrutura dos dois principais dissacarídeos constituintes da ulvana, o ácido ulvanobiurônico (A) e a ulvanobiose (B). Fonte: KIDGELL *et al.* (2019).30
- Figura 9. Macroalga marrom *Laminaria digitata* crescendo em águas frias do hemisfério norte (Galway, Irlanda) (A), talos da alga (B) e rizoides ancorados nas rochas (C). Fotos: GUIRY, 2021.33
- Figura 10. Estrutura da laminarana formada por unidades repetidas de glicose. Fonte: VERA *et al.* (2011).34
- Figura 11. Principais efeitos da ulvana no patossistema trigo-*Zymoseptoria tritici*. NCS: cavidades subestomáticas não colonizadas, CS: cavidades subestomáticas colonizadas, P: picnídio, Pi: Picnidiósporos, dat: dias após o tratamento, dai: dias após a inoculação, ni: plantas não inoculadas, i: plantas inoculadas, PR-2: β-1,3-endoglucanase, PR-3: quitinase, OXO:

oxalato oxidase, *LOX*: lipoxigenase, *AOS*: óxido aleno sintase, *CHS*: chalcona sintase. Barra: 10 um: microscopia, 100 um: sintomas da doença. 41

Figura 12. Principais efeitos de Vacciplant® no patossistema trigo-*Zymoseptoria tritici*. NC, cavidade subestomática não colonizada; H, cavidade subestomática colonizada com hifa; P: picídio; Pi: Picnidiósporos; ni: plantas não inoculadas; i: plantas inoculadas; *PAL*, fenilalanina amônia-liase; *CHS*, chalcona sintase; *LOX*, lipoxigenase; *AOS*, óxido aleno sintase; *PR-2*, β -1,3-endoglucanase; *PR-3*, quitinase; *OXO*, oxalato oxidase; Met, metionina; Asp, ácido aspártico; Hyd, hidroxiprolina; Arg, arginina; Lys, lisina; Trp, triptofano; ET, etileno; NO, óxido nítrico; hex, hexoside; HCAAs, amidas do ácido hidroxicinâmico; Couagm, coumaroilagmatine; Sinagm, sinapoilagmatine; Cafput, cafeoilputrescine. Barra: 10 um. Foto de *Laminaria digitata*: GUIRY, 2021. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da aplicação foliar de ulvana ou do extrato de <i>Ulva</i> spp. contendo ulvana sobre severidade de doenças em diferentes patossistemas.....	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AOS	Óxido de aleno sintase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHS	Chalcona sintase
dai	Dias após a inoculação
dat	Dias após o tratamento
LOX	Lipoxigenase
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de massas de dessorção/ionização a laser assistida por matriz
OXO	Oxalato oxidase
PAL	fenilalanina amônia-liase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PetA	Apetala 2 classe A
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
PR-2	β -1,3-endoglucanase
PR-3	Quitinase
TUB	β -tubulina
UHPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Cultura do trigo.....	19
3.2. Mancha salpicada da folha do trigo	20
3.2.1. Etiologia	20
3.2.2. Sintomatologia.....	23
3.2.3. Ciclo da doença	24
3.3. Processo infeccioso de <i>Zymoseptoria tritici</i>	25
3.4. Indução de resistência.....	27
3.5. Ulvana.....	28
3.6. Laminarana	32
3.7. Expressão de genes relacionados à defesa do trigo contra <i>Zymoseptoria tritici</i>	34
3.8. Metabolômica no trigo.....	35
4. CAPÍTULO 1 – THE ALGAL POLYSACCHARIDE ULVAN INDUCES RESISTANCE IN WHEAT AGAINST <i>Zymoseptoria tritici</i> WITHOUT MAJOR ALTERATION OF LEAF METABOLOME	37
4.1. RESUMO.....	37
4.2. INTRODUÇÃO	38
4.3. METODOLOGIA	39
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.5. CONCLUSÃO	41
5. CAPÍTULO 2 – A LAMINARIN-BASED FORMULATION PROTECTS WHEAT AGAINST <i>Zymoseptoria tritici</i> VIA DIRECT ANTIFUNGAL ACTIVITY AND ELICITATION OF HOST DEFENSE-RELATED GENES.....	43
5.1. RESUMO.....	43
5.2. INTRODUÇÃO	44
5.3. METODOLOGIA	44
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.5. CONCLUSÃO	47
6. CONCLUSÕES GERAIS	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A mancha salpicada da folha, também conhecida como septoriose, causada pelo fungo hemibiotrófico *Zymoseptoria tritici*, é uma das principais doenças do trigo (*Triticum aestivum* L.) em todo o mundo (FONES; GURR, 2015). Atualmente, o controle da doença depende principalmente do uso de fungicidas convencionais (TORRIANI *et al.*, 2015) e do emprego de genótipos resistentes (ORS *et al.*, 2018). No entanto, a aplicação desses produtos químicos é cada vez mais controversa devido seus potenciais impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana. Além disso, o fungo frequentemente desenvolve resistência aos fungicidas e supera a resistência do hospedeiro, tornando-se um dos patógenos mais difíceis de se manejar no campo (SIAH *et al.*, 2010b; TORRIANI *et al.*, 2015). Assim, a busca por alternativas complementares, como o uso de indutores de resistência, é hoje altamente encorajada e surge como uma estratégia ecológica para o manejo integrado de doenças.

Estudos têm demonstrado que polissacarídeos algais, tais como a ulvana e laminarana, podem induzir respostas de defesa contra fitopatógenos em diversas culturas (STADNIK, DE FREITAS, 2014). A ulvana, por exemplo, um polissacarídeo extraído de algas do gênero *Ulva*, tem potencial para controlar várias doenças do feijoeiro, incluindo a ferrugem (BORSATO; DI PIERO; STADNIK, 2010), a antracnose (PAULERT *et al.*, 2009; SCHONS; DE FREITAS; STADNIK, 2011; DE FREITAS; STADNIK, 2012) e o oídio (JAULNEAU *et al.*, 2011), além de reduzir transitoriamente a severidade da Murcha-de-Fusarium (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019). Além disso, a ulvana mostrou capacidade em estimular respostas de defesa e proteger plantas de macieira contra *Colletotrichum gloeosporioides* (mancha foliar de Glomerella) (ARAÚJO *et al.*, 2008), trigo e cevada contra *Blumeria graminis* (oídio) (PAULERT *et al.*, 2010) e tomateiro contra *Fusarium oxysporum* (EL MODAFAR *et al.*, 2012). Contudo, até o presente momento, nenhum estudo tem investigado a eficácia da ulvana no controle da septoriose do trigo.

A laminarana, extraída de algas marrons como a *Laminaria digitata*, é provavelmente o polissacarídeo mais bem explorado para indução de resistência. A formulação à base de laminarana, Vacciplant[®], foi o primeiro produto contendo um polissacarídeo algal disponível no mercado para o controle de doenças e provavelmente o único até hoje registrado para o controle biológico em cereais. Um único tratamento foliar do produto de forma preventiva pode reduzir a severidade do oídio em trigo (RENARD-MERLIER *et al.*, 2007), enquanto que aplicações semanais protegem as plantas de videira (PUGLIESE *et al.*, 2018; NERVA *et al.*,

2019). Contudo, embora o Vacciplant[®] seja atualmente o único indutor de resistência registrado na França para o controle da septoriose no trigo, faltam informações sobre sua eficácia, modo de ação e mecanismos de defesa induzidos na planta contra *Z. tritici*.

Diante dos resultados promissores da indução de resistência por polissacarídeos algais, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de ulvana e da formulação de laminarana, Vacciplant[®], no controle de *Zymoseptoria tritici* em trigo (*Triticum aestivum* L.) e determinar a expressão de genes de defesa e o perfil de metabólitos envolvidos na resistência durante a fase biotrófica de infecção fúngica em condições de casa-de-vegetação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência de polissacarídeos algais no controle de *Zymoseptoria tritici* em trigo (*Triticum aestivum* L.) e determinar a expressão de genes de defesa e o perfil de metabólitos envolvidos na indução de resistência.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a eficiência de ulvana e da formulação de laminarana (Vacciplant[®]) no controle de *Z. tritici* no trigo;
- ✓ Avaliar *in vitro* o efeito de ulvana e Vacciplant[®] na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Z. tritici*;
- ✓ Avaliar *in planta* o efeito de ulvana e Vacciplant[®] na germinação de conídios e crescimento epifítico de *Z. tritici*, e na colonização das cavidades subestomáticas;
- ✓ Determinar a expressão de genes de defesa e o perfil de metabólitos induzidos em plantas de trigo após o tratamento com ulvana e Vacciplant[®] contra *Z. tritici*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cultura do trigo

O trigo (*Triticum* spp.) é uma planta anual, autógama e pertence à família *Poaceae* (*Gramineae*) (PIANA; CARVALHO, 2008). As espécies do gênero *Triticum* possuem sete cromossomos e podem ser divididas de acordo com o nível de ploidia: diplóides ($2n=2\times=14$; genoma AA; *T. monococcum*), tetraplóides ($2n=4\times=28$; genomas AABB, *T. turgidum*) e hexaplóides ($2n=6\times=42$; genomas AABBDD, *T. aestivum*). Atualmente, as espécies cultivadas em grande escala são o trigo de panificação hexaplóide *T. aestivum* L. (90% do total) e o trigo duro tetraplóide *T. turgidum* L. (cerca de 10%) (PIANA; CARVALHO, 2008).

As evidências mais remotas da utilização do trigo datam de 17.000 a.C., onde foi encontrado o tetraplóide silvestre *T. dicoccoides* em Israel (KISLEV; NADEL; CARMI, 1992). A domesticação do trigo iniciou há cerca de 10.000 anos na região da Mesopotâmia (Sudeste da Ásia, região entre Egito e Iraque), sendo introduzido na Índia, China e Europa por volta de 5000 a.C. (PIANA; CARVALHO, 2008). No Brasil, o trigo foi introduzido provavelmente por Martim Afonso de Souza, em 1534, e expandiu-se da Capitania de São Vicente (São Paulo) principalmente para a região sul do país (PIANA; CARVALHO, 2008).

Com mais de 215 milhões de hectares plantados anualmente, o trigo é o segundo cereal mais cultivado no mundo (765 milhões de toneladas), atrás do milho, e fornece cerca de 20% das calorias globais para consumo humano (FAO, 2021). A China é o maior produtor mundial de trigo (133 milhões de toneladas na safra de 2019), seguido da Índia (103), Rússia (74), Estados Unidos da América (52) e França (41) (FAO, 2021). O Brasil produz cerca de 1% da produção mundial (6,9 milhões de toneladas), sendo o Paraná e Rio Grande do Sul os estados que mais contribuem para essa produção (90% do volume total produzido), numa área plantada de 2.530.200 hectares (IBGE-LSPA, 2017; CONAB, 2021). Porém, devido ao elevado consumo nacional, o Brasil importa anualmente cerca de 6,4 milhões de toneladas de trigo principalmente da Argentina (CONAB, 2021).

O trigo apresenta características morfológicas semelhante às dos demais cereais de inverno (cevada, aveia, centeio e triticale). A planta de trigo é estruturada em raízes (seminais, permanentes e adventícias), colmo, folhas e inflorescência (SCHEEREN; CASTRO; CAIERÃO, 2015). O desenvolvimento das folhas é iniciado com a emissão do coleóptilo, apresentando, no final, entre cinco e seis folhas. Contudo, variações de três e oito folhas são frequentes. Cada folha é composta pela bainha, lâmina, lígula e um par de aurículas,

normalmente pilosas. A disposição das folhas é alternada, formando ângulos de 180° entre uma folha e outra. O colmo normalmente é oco, cilíndrico, e tem de quatro a sete entrenós. Já a inflorescência é uma espiga composta, dística, formada por espiguetas alternadas e opostas na ráquis. O grão do trigo, chamado de cariopse, é pequeno (6-7 mm), seco e indeiscente (SCHEEREN; CASTRO; CAIERÃO, 2015).

3.2. Mancha salpicada da folha do trigo

A mancha salpicada da folha, também conhecida septoriose do trigo, é causada pelo fungo hemibiotrófico *Zymoseptoria tritici* (teleomorfo *Mycosphaerella graminicola*), anteriormente classificado como *Septoria tritici* (KEMA *et al.*, 1996; QUAEDVLIEG *et al.*, 2011). A septoriose é atualmente a principal doença do trigo na Europa (FONES; GURR, 2015; TORRIANI *et al.*, 2015), e vem causando perdas econômicas anuais que podem exceder os 50% em plantações com materiais suscetíveis (TORRIANI *et al.*, 2015).

3.2.1. Etiologia

A espécie *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Mycosphaerellales, família Mycosphaerellaceae, gênero *Zymoseptoria*. A conexão da fase sexual *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schrö com *Septoria tritici* (*Z. tritici*) foi descrito pela primeira vez na Nova Zelândia por Sanderson em 1972 (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011).

Os picnidiósporos (conídios) de *Z. tritici* são hialinos e alongados, e são produzidos dentro de picnídios (Figura 1A) (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011), e se constituem na forma mais comum de esporos e responsáveis pelas epidemias. Os picnidiósporos são liberados dos picnídios em cirros (Figura 1B) (massa espiralada de esporos saindo pelo ostíolo), os quais são geralmente de coloração esbranquiçada a amarelo-claro (VRANCKEN *et al.*, 2010; PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011). Cada conídio possui geralmente entre 3-7 septos e mede aproximadamente $2,6 \times 62 \mu\text{m}$ (Figura 1C) (KEMA *et al.*, 1996; STEINBERG, 2015). As hifas de *Z. tritici* são de coloração hialina e septadas (Figura 1D).

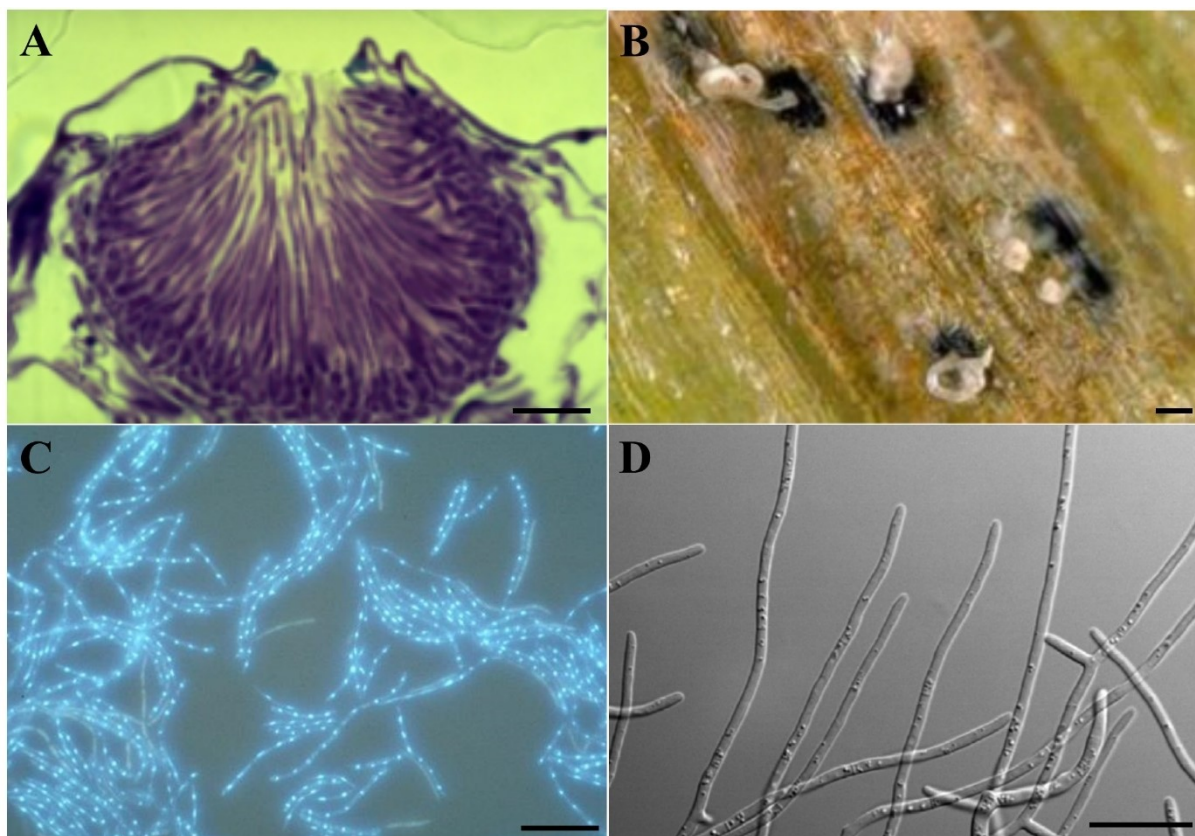


Figura 1. Estrutura de um picnídio (A), formação de cirro do picnídio sobre a superfície foliar (B), picnidiósporos (C), e hifas (D) de *Zymoseptoria tritici*. Barra: 10 μm (A e D) e 100 μm (B e C). Fotos: A) e C) PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011. B) VRANCKEN *et al.*, 2010. D) STEINBERG, 2015.

Z. tritici cresce abundantemente em meio de cultura batata dextrose ágar, formando micélio de coloração rosa entre 5-10 dias após a incubação no escuro a 18 °C (Figura 2A). Os conídios septados (Figura 2B) germinam (Figura 2C) normalmente entre 12-24 h após a adesão na superfície foliar em condições de alta umidade relativa, e em seguida, formam hifas (Figura 2D) as quais vão penetrar e colonizar as cavidades subestomáticas (SIAH *et al.*, 2010a).

Corpos de frutificação de origem sexuada, denominados de pseudotécios, também são produzidos no interior das lesões (QUAEDVLIËG *et al.*, 2011) e são responsáveis pela geração de variabilidade. Os pseudotécios são formados abaixo da epiderme da folha, e são de coloração marrom ou castanho escuros, globosos e medem entre 68-114 μm de diâmetro. Os ascos (Figura 3A), contendo normalmente oito ascósporos (Figura 3B), medem 11-14 \times 30-40 μm (HALAMA, 1996; PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011). Os ascósporos são hialinos, elípticos, e medem de 2,5-4 \times 9-16 μm de tamanho. Os ascósporos são ejetados dos ascos quando adultos devido a flutuações no nível de umidade relativa seguida por períodos de molhamento foliar (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011).

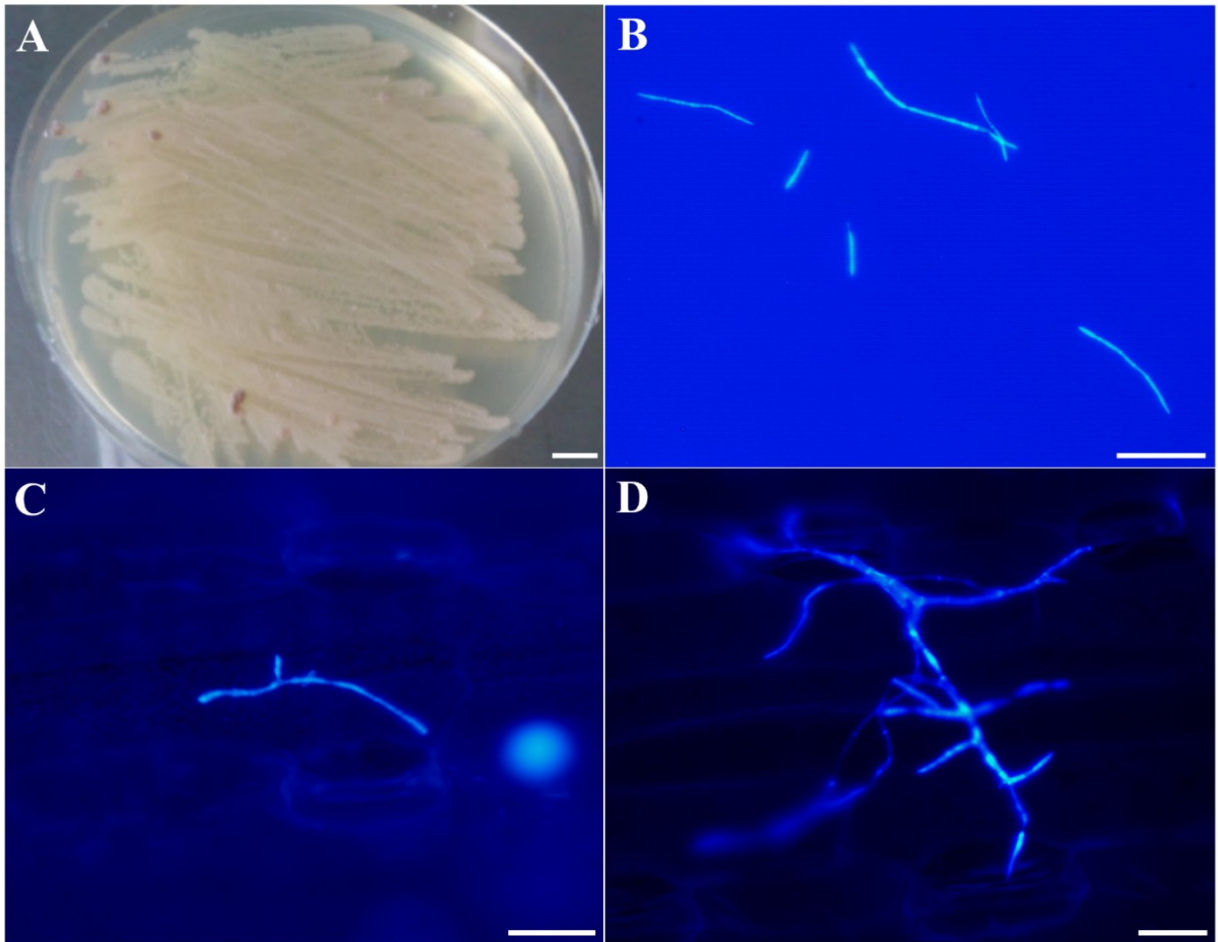


Figura 2. Crescimento de *Zymoseptoria tritici* em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (A), conídios septados não germinado (B), conídio germinado (C) e crescimento de hifas (D) sobre folhas de trigo observados por microscopia de fluorescência corados com Calcofluor. Barra: 1 cm (A), 100 um (B), 10 um (C e D). Fotos: Autor.

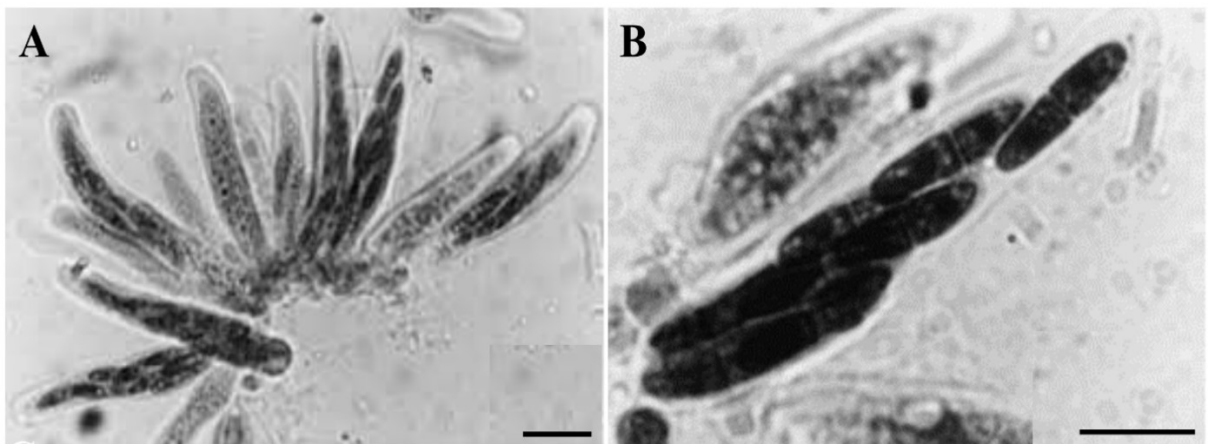


Figura 3. Ascis contendo ascósporos (A) e ascósporos (B) de *Mycosphaerella graminicola*. Barra: 10 um. Fotos: HALAMA, 1996.

3.2.2. Sintomatologia

Os primeiros sintomas da septoriose do trigo são caracterizados por pequenas manchas cloróticas nas folhas que aparecem logo após a emergência das plantas (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011). As lesões ao aumentarem de tamanho tornam-se marrom-claro (Figura 4A), geralmente longas, estreitas e delimitadas pelas nervuras (Figura 4B), mas podem ter também formato elíptico ou irregular, principalmente quando folhas jovens são infectadas (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011). Os picnídios (Figura 4C) se desenvolvem dentro das cavidades subestomáticas colonizadas da folha e são espaçados regularmente sobre as lesões da doença (STEINBERG, 2015).



Figura 4. Sintomas típicos da mancha salpicada caracterizados por lesões necróticas delimitadas pelas nervuras (A-B) e formação de picnídios (C) em folhas de trigo após a infecção com *Zymoseptoria tritici*. Fotos: A) Autor; B) MACCHEEK, 2021; C) STEINBERG, 2015.

3.2.3. Ciclo da doença

A infecção primária da doença ocorre principalmente no outono, por ascósporos dispersos pelo vento a partir de pseudotécios (Figura 5). Os tubos germinativos penetram diretamente via estômatos, e por vários dias, as hifas crescem intercelularmente sem aumento significativo de biomassa. Neste momento, *Z. tritici* utiliza seus próprios estoques de lipídios e ácidos graxos (KEON *et al.*, 2007; RUDD *et al.*, 2015) e carboidratos solúveis disponíveis no apoplasto (ROHEL *et al.* 2001) para crescimento. Após o colapso das células do mesófilo, as lesões se formam inicialmente por pequenas manchas cloróticas de coloração amarela. Ao se expandirem, as manchas se tornam necróticas, estreitas e longas, delimitadas pelas nervuras da folha. Em seguida, corpos de frutificação chamados de picnídios se desenvolvem sobre as lesões necróticas (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011; SIDHU, 2015).

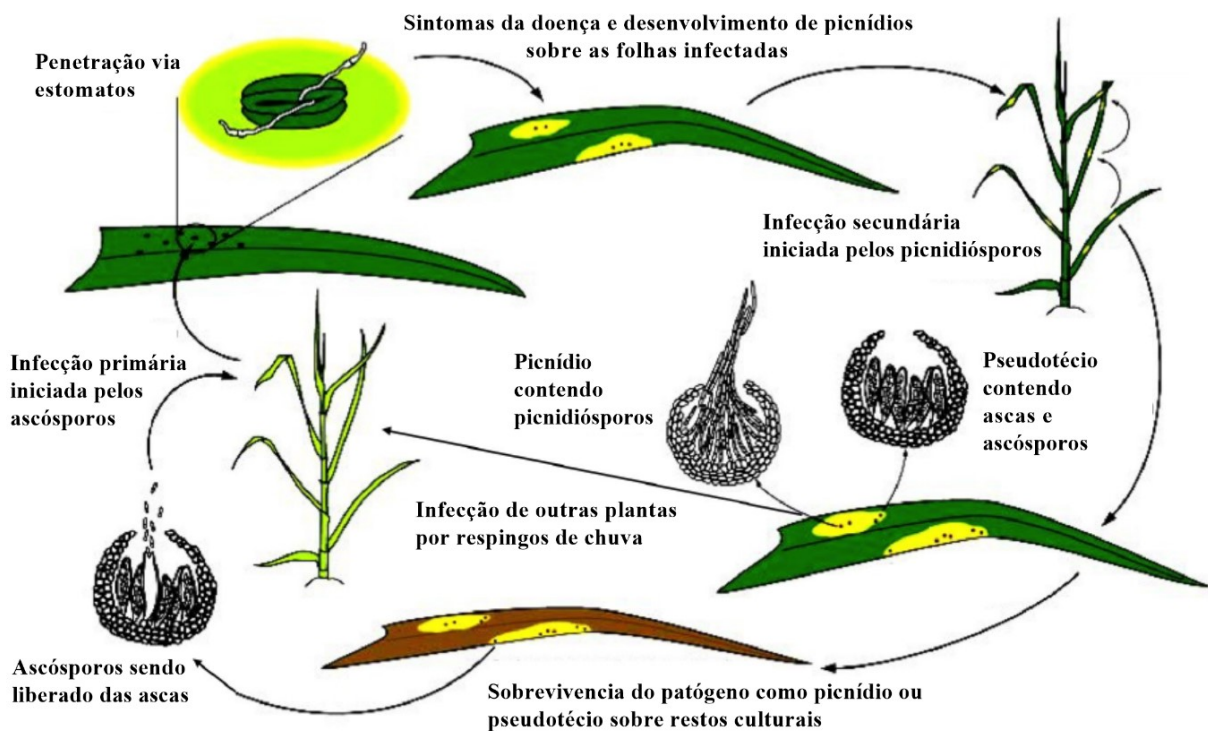


Figura 5. Ciclo de vida de mancha salpicada da folha do trigo causada por *Zymoseptoria tritici*. Fonte: SIDHU, 2015.

A infecção secundária ocorre normalmente na primavera (momento em que as condições de umidade e temperatura são favoráveis para o desenvolvimento da doença), pelos picnidiósporos (massa de conídios que saem do ostíolo do picnídio em forma de cirros) dispersos por respingos de chuva de uma planta para outra, ou de uma folha para outra folha da

mesma planta. Em seguida, novas infecções ocorrem e, entre duas e três semanas, os primeiros sintomas da doença aparecem. Por fim, o patógeno sobrevive em forma de picnídios sobre restos de cultura, ou na ausência do hospedeiro, em forma de pseudotécios (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011; SIDHU, 2015).

3.3. Processo infeccioso de *Zymoseptoria tritici*

O processo de infecção de *Z. tritici* envolve a germinação de ambos os conídios (picnidiósporos) e/ou ascósporos na superfície foliar do trigo (KEMA *et al.*, 1996). A germinação ocorre pela extremidade ou pela parte intermediária do conídio e leva à formação de tubos germinativos ramificados (KEMA *et al.*, 1996; SIAH *et al.*, 2010a). Às vezes, estruturas semelhantes ao do apressório (chamadas de almofadas de infecção) também são diferenciadas nos locais de penetração (KEMA *et al.*, 1996; SIAH *et al.*, 2010a).

A penetração de *Z. tritici* em folhas de trigo ocorre principalmente via estômatos (KEMA *et al.*, 1996; SOMAI-JEMMALI *et al.*, 2017) ou, as vezes, diretamente pelas células anticlinais (SIAH *et al.*, 2010a). A infecção é iniciada por ascósporos dispersos pelo ar e por conídios normalmente dispersos por respingos de chuva (PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011). Após a colonização da cavidade subestomática, as hifas se proliferam extracelularmente no mesófilo (SIAH *et al.*, 2010a; STEINBERG, 2015).

Do ponto de vista biológico, o ciclo de infecção de *Z. tritici* pode ser dividido em quatro fases: 1) entrada do fungo, 2) colonização do tecido vegetal, 3) pré-formação de picnídios e 4) maturação e esporulação dos picnídios (Figura 6) (STEINBERG, 2015). Inicialmente, *Z. tritici* infecta via estômatos (Figura 6A,B) e coloniza as cavidades subestomáticas (Figura 6C,D). Os primeiros sintomas da doença geralmente aparecem após aos 7-15 dias de infecção do fungo, quando as células colonizadas do mesófilo morrem abruptamente (SIAH *et al.*, 2010a; PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011; STEINBERG, 2015). Após o colapso das células, as lesões são formadas e inicialmente caracterizadas por pequenas manchas cloróticas de coloração amarela (STEINBERG, 2015). Essas lesões então se expandem paralelamente as nervuras da folha e tornam-se longas, estreitas e necróticas (KEMA *et al.*, 1996; SIAH *et al.*, 2010a). Dez a 21 dias após a infecção, os picnídios se desenvolvem sobre as lesões (Figura 6E,F), amadurecem e liberam os picnidiósporos (Figura 6G,H) em estruturas chamadas de cirros (VRANCKEN *et al.*, 2010; PONOMARENKO; GOODWIN; KEMA, 2011). Os picnidiósporos são disseminados por respingos de chuva e iniciam outros sítios de infecção (STEINBERG, 2015).

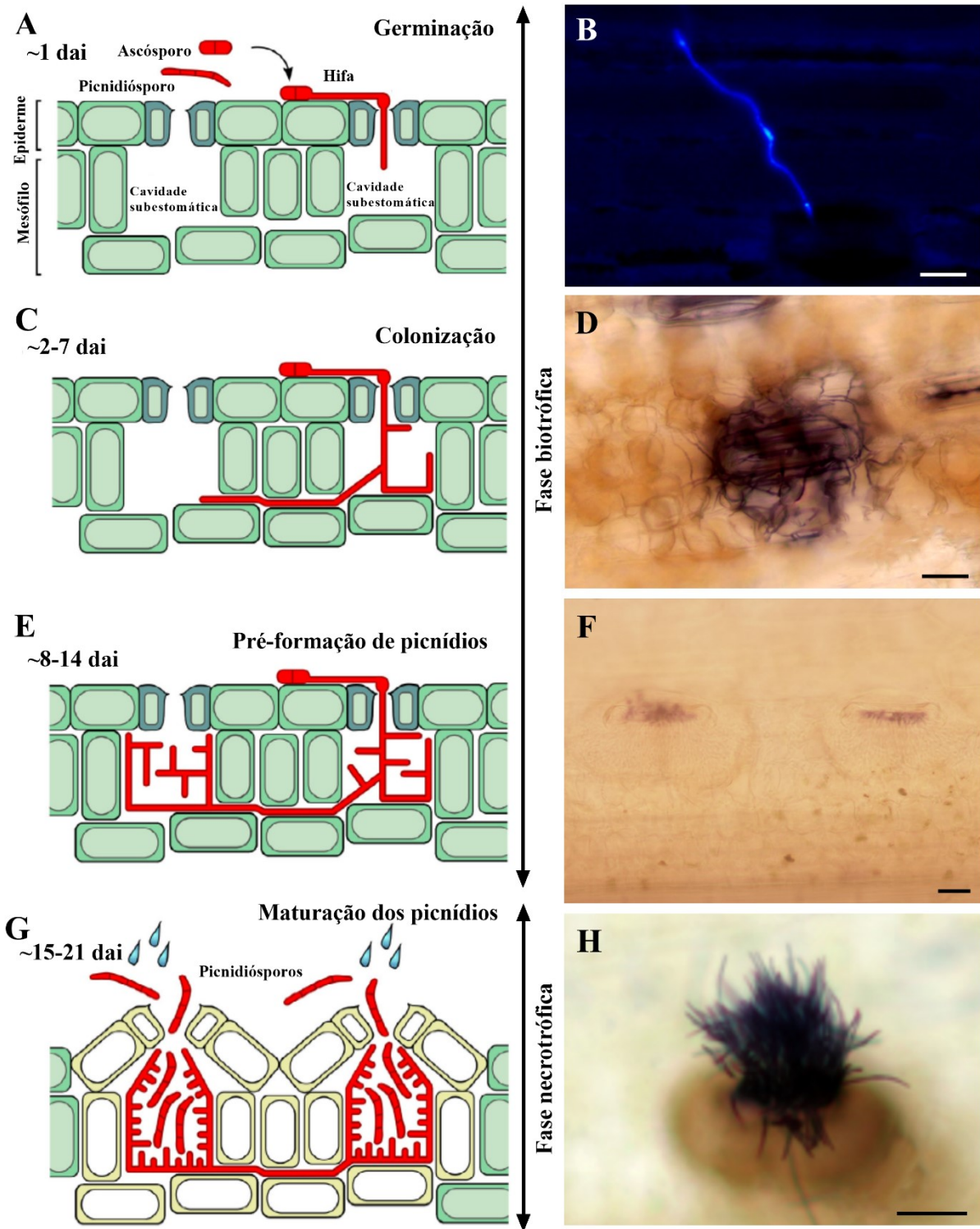


Figura 6. Fases de infecção de *Zymoseptoria tritici* em folhas de trigo. A-B) Ascósporos ou picnidiospores aderem na epiderme da folha (fase de germinação). C-D). Hifa penetra através dos estômatos e começa a colonizar a cavidade subestomática (fase de colonização). E-F) Os picnídios são formados nas cavidades subestomáticas colonizadas (pré-formação de picnídios) (E-F), amadurecem e produzem picnidiospores que são liberados por respingo de chuva e espalham a infecção para outras plantas (maturação dos picnídios) (G-H). Estruturas do fungo foram coradas com Calcofluor (B) ou Tripian blue (D, F, H). dai: dias após a inoculação. Barra: 10 μ m. Fonte: A, C, E, G) STEINBERG, 2015; B, D, F, H) Autor.

3.4. Indução de resistência

As plantas são frequentemente expostas a uma grande quantidade de microorganismos patogênicos, o que levou ao desenvolvimento de complexos mecanismos de defesa (AGRIOS, 2005). De forma geral, as plantas possuem mecanismos físicos e químicos pré-existentes, tais como: camadas de cera, cutícula, adaptações em estômatos e compostos fungitóxicos (AGRIOS, 2005). Além disso, as plantas possuem mecanismos pré-existentes que são ativados após o reconhecimento do patógeno, levando formação de tiloses, papilas, camadas de cortiça e de abscisão, produção de compostos como as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (AGRIOS, 2005).

A habilidade das plantas se defenderem contra infecção por patógenos está intimamente relacionada com a sua capacidade de detectá-los (AGRIOS, 2005; WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). A percepção de moléculas sinalizadoras, conhecidas como de elicitores, geralmente iniciam com um influxo de cálcio e uma explosão oxidativa, seguido da síntese do ácido salicílico, ácido jasmônico e/ou etileno (CLUZET *et al.*, 2004; STADNIK; DE FREITAS, 2014).

Uma gama de moléculas, incluindo oligo- e polissacarídeos algais, extratos de plantas, algas e produtos sintéticos podem induzir resistência local ou sistêmica (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). De acordo com Cluzet *et al.* (2004), um indutor de resistência em potencial deve disparar várias respostas de defesa, não causar grandes alterações no metabolismo primário da planta e assegurar ampla proteção. Em termos gerais, a resistência induzida pode ser basicamente dividida em duas categorias: a resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR). A SAR pode ser induzida por uma variedade de agentes, incluindo produtos químicos, como por exemplo, acibenzolar-S-metil, e são caracterizados pelo acúmulo de PR-proteínas e normalmente mediada por uma via dependente do ácido salicílico (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). Já o segundo tipo de resistência, a ISR, ocorre sistemicamente geralmente em resposta à colonização das raízes de plantas por certas bactérias promotoras de crescimento sendo mediada pela via do ácido jasmônico e/ou etileno (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

A indução da resistência em plantas é geralmente baseada nos efeitos elicitor ou priming. "Elicitor" é um termo que descreve uma ativação direta das respostas de defesa da planta após a aplicação de um indutor de resistência em condições não inoculadas, ou seja, na ausência de infecção, enquanto o termo "priming" se refere a uma sensibilização da planta para

responder mais rápido e/ou mais forte quando exposto ao ataque de patógenos (CONRATH *et al.*, 2006).

A resistência induzida raramente controla completamente a doença, porém, reduz o tamanho e/ou número de lesões causadas pelo patógeno, levando assim, a um atraso em seu desenvolvimento (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). Seus princípios podem ser aplicados na proteção de plantas contra um amplo espectro de doenças causadas por vírus, bactérias e fungos.

Os indutores de resistência podem ser classificados quanto à sua origem em: naturais ou sintéticos. Dentre os indutores naturais, destaca-se a pulverização de extratos ou polissacarídeos algais, tais como as carragenanas, laminaranas e ulvanas (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013, STADNIK; DE FREITAS, 2014). Já entre os sintéticos, destaca-se a utilização de sacarina e compostos químicos tais como derivados do ácido salicílico, β -aminobutírico, probenazole e acibenzolar-S-metil (Bion[®], Syngenta), dentre outros (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

3.5. Ulvana

A ulvana é um heteropolissacarídeo sulfatado solúvel em água, extraído da parede celular de macroalgas marinhas verdes do gênero *Ulva* (Figura 7), representando de 8 a 29% do peso seco da alga (PAULERT *et al.*, 2009; STADNIK, DE FREITAS, 2014). Espécies deste gênero, popularmente conhecidas como “alface do mar”, encontram-se distribuídas ao redor do mundo e vêm sendo utilizadas, ainda em pequena escala, na alimentação humana, medicina e agricultura. Por outro lado, essas algas estão frequentemente envolvidas em problemas ecológicos, devido a sua grande proliferação em ambientes eutrofizados, principalmente em regiões de clima quente (LAHAYE; ROBIC, 2007; PAULERT *et al.*, 2009; STADNIK, DE FREITAS, 2014).

A ulvana é composta principalmente por ramnose (16,8-45,0%), xilose (2,1-12,0%), glicose (0,5-6,4%), ácido urônico (6,5-19,0%), ácido idurônico (1,1-9,1%) e sulfato (16,0-23,2%) (PAULERT *et al.*, 2009; DE FREITAS *et al.*, 2015). Manose e galactose também têm sido encontradas em ulvanas de algumas espécies do gênero *Ulva* (LAHAYE; ROBIC, 2007). Estes açúcares estão estruturalmente agrupados em dois principais dissacarídeos repetitivos, os ácidos ulvanobiurônicos-3-sulfato do tipo A (β -D-GlcA (1 \rightarrow 4) α -L-Rha3S \rightarrow 1) e do tipo B (α -L-IdoA (1 \rightarrow 4) α -L-Rha3S \rightarrow 1) (Figura 8A) e como ulvanobioses que são compostos de ramnose-3-sulfato ligados a xilose (Figura 8B) (STADNIK, DE FREITAS, 2014; KIDGELL *et*

al., 2019). No entanto, a composição da ulvana pode ser mais complexa e variações sazonais de ordem taxonômica e/ou ecofisiológica (LAHAYE; ROBIC, 2007).



Figura 7. Macroalga verde *Ulva fasciata* crescendo em costões rochosos na praia da Barra da Lagoa em Florianópolis (A), talos da alga (B) e polissacarídeo ulvana extraído das paredes celulares da alga (C). Fotos: Autor.

Diversos trabalhos demonstram que a ulvana tem potencial para controlar várias doenças do feijoeiro, incluindo a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) (BORSATO; DI PIERO; STADNIK, 2010), a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) (PAULERT *et al.*, 2009; SCHONS; DE FREITAS; STADNIK, 2011; DE FREITAS; STADNIK, 2012) e o oídio (*Erysiphe polygoni*) (JAULENEAU *et al.*, 2011), além de reduzir transitoriamente a severidade da Murcha-de-Fusarium causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019). Além disso, o polissacarídeo tem mostrado resultados

promissores no controle de doenças em outras espécies de plantas, tais como mancha foliar de *Glomerella* (*C. gloeosporioides*) em macieira (ARAÚJO *et al.*, 2008), oídio em trigo e em cevada (PAULERT *et al.*, 2010) e *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) em tomateiro (EL MODAFAR *et al.*, 2012) (Tabela 1).

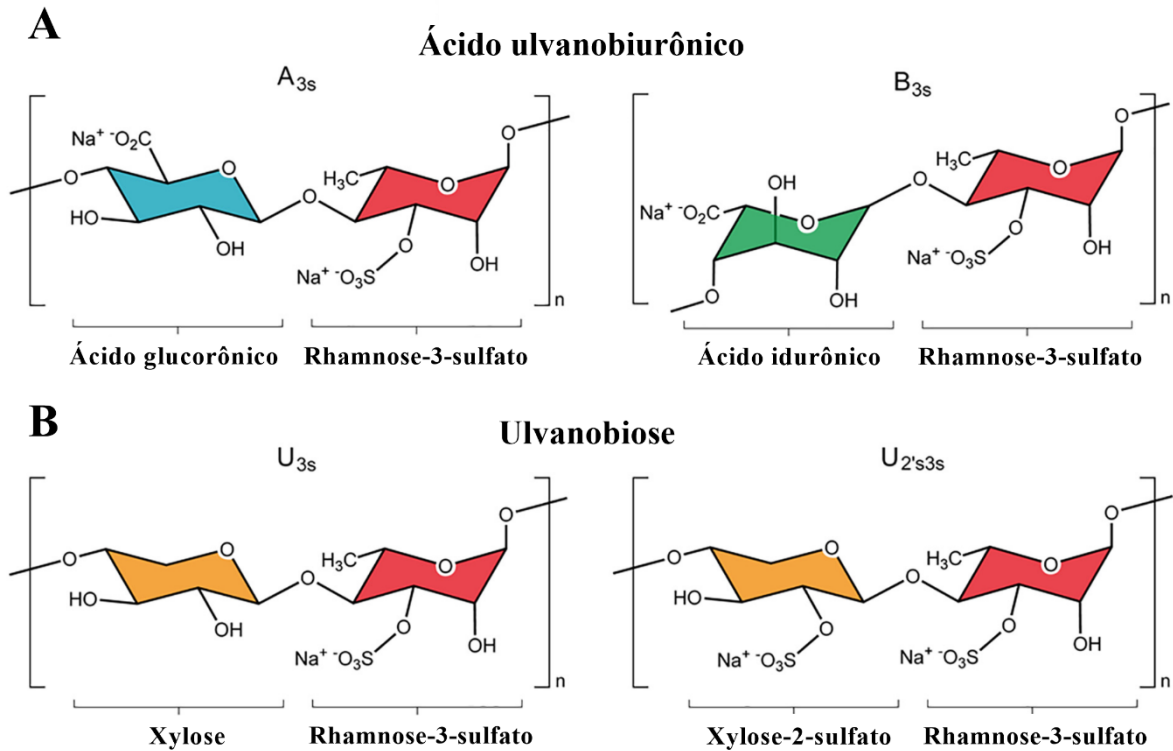


Figura 8. Estrutura dos dois principais dissacarídeos constituintes da ulvana, o ácido ulvanobiurônico (A) e a ulvanobiose (B). Fonte: KIDGELL *et al.* (2019).

Em casa-de-vegetação, a aplicação foliar preventiva com ulvana ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) reduziu significativamente a severidade da antracnose (*C. lindemuthianum*) em cerca de 50% e protegeu as plantas por até 9 dias após o tratamento (SCHONS; DE FREITAS; STADNIK, 2011). Considerando que a ulvana possui efeito sistêmico, mas não possui efeito antifúngico direto contra o fungo em ensaios *in vitro* e *in planta*, o controle da doença tem sido atribuído à indução de resistência (PAULERT *et al.*, 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012). Em alfafa, a aplicação preventiva de ulvana elicita eficientemente múltiplas respostas de defesa em resposta à infecção por *C. trifolii*, incluindo expressão de PR-proteínas e síntese de fitoalexinas (CLUZET *et al.*, 2004).

Tabela 1. Efeitos da aplicação foliar de ulvana ou do extrato de *Ulva* spp. contendo ulvana sobre severidade de doenças em diferentes patossistemas.

Hospedeiro	Patógeno	Efeito	Referência
Abobrinha	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	reduz	JAULNEAU <i>et al.</i> (2011)
Alfafa	<i>Colletotrichm trifolii</i>	reduz	CLUZET <i>et al.</i> (2004)
Arabidopsis	<i>Alternaria brassicicola</i>	reduz	DE FREITAS <i>et al.</i> (2015)
	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	reduz	DE FREITAS <i>et al.</i> (2015)
Cebola	<i>Burkholderia cepacia</i>	não afeta	WORDELL FILHO; MARTINS; STADNIK, 2007
	<i>Peronospora destructor</i>	não afeta	WORDELL FILHO; MARTINS; STADNIK, 2007
Cebolinha	<i>Alternaria porri</i>	reduz	ARAÚJO; PERUCH; STADNIK (2012)
Cevada	<i>Blumeria graminis</i>	reduz	PAULERT <i>et al.</i> (2010)
Feijoeiro	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	reduz	PAULERT <i>et al.</i> (2009); DE FREITAS; STADNIK, 2012
	<i>Erysiphe polygoni</i>	reduz	JAULNEAU <i>et al.</i> (2011)
	<i>Uromyces appendiculatus</i>	reduz	BORSATO; DI PIERO; STADNIK, (2010)
	<i>Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli</i>	reduz transitoriamente	DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK (2019)
Macieira	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	reduz	ARAÚJO <i>et al.</i> (2008)
	<i>Penicillium expansum</i>	reduz	ABOURAÏCHA <i>et al.</i> (2015)
Maçã (fruto)	<i>Botrytis cinerea</i>	reduz	ABOURAÏCHA <i>et al.</i> (2015)
	<i>Verticillium dahliae</i>	reduz	BEN SALAH <i>et al.</i> (2018)
Pepino	<i>Sphaceloma ampelinum</i>	reduz	GALVÃO <i>et al.</i> (2006)
Tomateiro	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	reduz	EL MODAFAR <i>et al.</i> (2012)
	<i>Blumeria graminis f. sp. tritici</i>	reduz	PAULERT <i>et al.</i> (2010)
Videira	<i>Erysiphe necator</i>	reduz	JAULNEAU <i>et al.</i> (2011)
	<i>Plasmopara viticola</i>	reduz	GALVÃO <i>et al.</i> (2006)
	<i>Plasmopara viticola</i>	não afeta	PERUCH <i>et al.</i> (2007)
	<i>Sphaceloma ampelinum</i>	reduz	GALVÃO <i>et al.</i> (2006)

Atualizado de STADNIK; DE FREITAS, 2014.

A elicitação de respostas de defesa pela aplicação de ulvanas parece ser dependente do genótipo e patógeno envolvidos. Por exemplo, a pulverização foliar de ulvana aumentou a atividade de glucanases em plantas de feijoeiro moderadamente suscetível (cv. Pérola) a ferrugem, mas não naquelas altamente suscetíveis (Juriti) (BORSATO; DI PIERO; STADNIK, 2010). Da mesma forma, a ulvana elevou a atividade de peroxidases em plantas de feijoeiro resistente a antracnose, mas não nas suscetíveis (DE FREITAS; STADNIK, 2012).

A indução de resistência está frequentemente associada ao efeito *priming*, onde a planta tratada com o agente indutor torna-se sensibilizada (*primed*) podendo ativar respostas de defesa mais rápidas e intensas quando submetidas ao ataque de patógenos (CONRATH *et al.*, 2006; PAULERT *et al.*, 2010). A capacidade da ulvana de induzir o *priming* foi recentemente relatada em culturas celulares de trigo, onde o pré-tratamento com o polissacarídeo induziu drasticamente a explosão oxidativa pela aplicação posterior de quitina (PAULERT *et al.*, 2010). Por outro lado, em plantas de feijoeiro, o tratamento com ulvana promoveu, por si só, um incremento na atividade de glucanases e peroxidases (DE FREITAS; STADNIK, 2012), indicando efeito elicitor da ulvana.

Estudos tem indicado que a via de sinalização do ácido jasmônico está envolvida na indução de resistência pela aplicação de ulvana (JAULNEAU *et al.*, 2010). No entanto, a literatura relata que a ulvana pode controlar, além de patógenos necrotróficos (ARAÚJO; PERUCH; STADNIK, 2012; EL MODAFAR *et al.*, 2012), biotróficos (BORSATO; DI PIERO; STADNIK, 2010; PAULERT *et al.*, 2010) e hemibiotróficos (PAULERT *et al.*, 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012). Desta forma, sugere-se que a ulvana possa atuar em mais de uma via sinalização já que a expressão da proteína relacionada à patogênese PR-1 (marcador da via do ácido salicílico) (CLUZET *et al.*, 2004) e a própria indução do ácido salicílico (EL MODAFAR *et al.*, 2012) tem sido observados após tratamento com ulvana.

3.6. Laminarana

A laminarana é um polissacarídeo de reserva encontrado em algas marrons, como *Laminaria digitata* (Hudson) Lamouroux, que cresce em águas frias no hemisfério norte (Figura 9) (STADNIK, DE FREITAS, 2014). Esta molécula solúvel em água é composta por unidades de glicose com ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 6) em uma proporção de 11: 1 (Figura 10). Laminarana tem um grau médio de polimerização de 25 unidades de glicose e três ramificações simples de β -glicose na posição C-6 (VERA *et al.*, 2011; STADNIK, DE FREITAS, 2014).

A laminarana estimula as respostas de defesa em suspensões celulares de monocotiledôneas (INUI; YAMAGUCHI; HIRANO, 1997) e dicotiledôneas (KLARZYNSKI *et al.*, 2000; AZIZ *et al.*, 2003), incluindo a ativação de proteínas quinases, influxo de cálcio, explosão oxidativa e alcalinização do meio extracelular. Quando pulverizada sobre as plantas, a laminarana estimulou a atividade de β -1,3-glucanases e quitinase, expressão de PR-proteínas, tais como a PR-1 (antifúngica), PR-2 (β -1,3-glucanases) e PR-3 (quitinases), e o acúmulo de fitoalexinas, geralmente em 48 horas após o tratamento (KLARZYNSKI *et al.*, 2000; AZIZ *et*

al., 2003). Esse aumento dos mecanismos de defesa foi associado à redução da severidade da doença causada por *Erwinia carotovora* no tabaco (KLARZYNSKI *et al.*, 2000) e *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* em videira (AZIZ *et al.*, 2003).



Figura 9. Macroalga marrom *Laminaria digitata* crescendo em águas frias do hemisfério norte (Galway, Irlanda) (A), talos da alga (B) e rizoides ancorados nas rochas (C). Fotos: GUIRY, 2021.

Vacciplant[®] é o primeiro produto comercial formulado (45 g.L⁻¹ de laminarana) contendo um polissacarídeo de algas para proteção de culturas e provavelmente o único até o momento registrado para controle biológico em cereais. Foi lançado no mercado em 2002 como Iodus[®] 40 pela empresa Goëmar (Saint-Malo, França) para estimulação das defesas naturais do trigo. Em 2014, a Goëmar foi adquirida pela Arysta LifeScience (Tóquio, Japão), que posteriormente foi incorporada ao grupo UPL (Mumbai, Índia). Como consequência

Vacciplant[®] foi introduzido em muitos países ao redor do mundo e recomendado para a proteção de um grande número de vegetais, frutas e cereais.

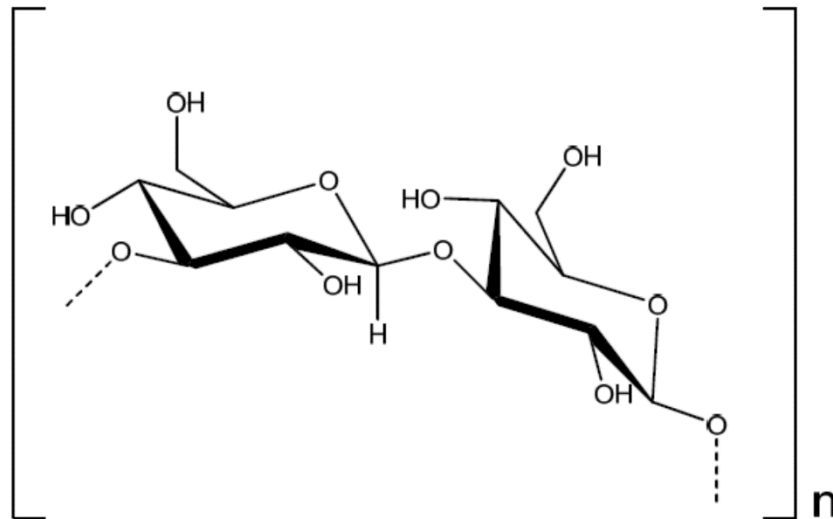


Figura 10. Estrutura da laminarana formada por unidades repetidas de glicose. Fonte: VERA *et al.* (2011).

Uma única aplicação foliar de Vacciplant[®] de forma preventiva reduz a severidade do oídio em trigo (RENARD-MERLIER *et al.*, 2007). Da mesma forma, aplicações semanais do produto protegeram as plantas de videira contra *Erysiphe necator* (PUGLIESE *et al.*, 2018; NERVA *et al.*, 2019). Estudos tem relatado que Vacciplant[®] atua indiretamente por meio da estimulação das respostas de defesa da planta (NERVA *et al.*, 2019), também pode apresentar atividade antifúngica direta por inibir o desenvolvimento de *Blumeria graminis* conforme descrito por Renard-Merlier *et al.* (2007). Contudo, embora Vacciplant[®] seja atualmente o único indutor de resistência registrado na França para controlar a septoriose no trigo, faltam informações sobre sua eficácia, modo de ação e os mecanismos de defesa ativados.

3.7. Expressão de genes relacionados à defesa do trigo contra *Zymoseptoria tritici*

Os mecanismos de defesa do trigo contra *Z. tritici* são complexos. Estudos têm indicado que a regulação positiva dos genes *PR-2* (β -1,3-glucanase) e *PR-3* (quitinase) (ADHIKARI *et al.*, 2007; SHETTY *et al.*, 2009) junto com o metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) incluindo a expressão de oxalato oxidase (*OXO* ou *PR-15*) (SHETTY *et al.*, 2007) desempenham um papel importante nas interações incompatíveis, enquanto a indução de fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase, *PAL*; chalcona sintase, *CHS*) é observada em

cultivares de trigo parcialmente resistentes (ORS *et al.*, 2018). Por outro lado, a expressão de genes envolvidos na via octadecanoides (lipoxigenase, LOX; óxido aleno sintase, AOS) parece ser negativamente regulada logo após a infecção fúngica e posteriormente acumulada (RUDD *et al.*, 2015; SOMAI-JEMMALI *et al.*, 2020). Contudo, poucos são os estudos examinando a expressão desses genes em trigo após a aplicação de indutores de resistência (SOMAI-JEMMALI *et al.*, 2020).

3.8. Metabolômica no trigo

Um número limitado de estudos tem abordado as respostas metabólicas do trigo contra *Z. tritici* (RUDD *et al.*, 2015; SEYBOLD *et al.*, 2020). Um dos primeiros trabalhos relacionando a metabolômica do trigo com a infecção por *Z. tritici* indicou que mais de 300 metabólitos foram diferencialmente regulados ao longo das diferentes fases de infecção e colonização do fungo (RUDD *et al.*, 2015). Neste estudo, pouca evidência foi dada para a aquisição de nutrientes da planta pelo fungo durante a sua fase biotrófica de colonização, o que pode, em vez disso, estar utilizando os próprios estoques de lipídios e ácidos graxos para o crescimento e desenvolvimento. No entanto, o fungo manipulou subsequentemente carboidratos vegetais específicos, incluindo metabólitos de frutose, durante a mudança da fase biotrófica para a necrotrófica. Esta mudança coincidiu com o aumento da expressão de genes da biossíntese do ácido jasmônico e ativação em larga escala de outras respostas de defesa da planta. Adicionalmente, genes fúngicos que codificam supostos aglomerados de metabólitos secundários e proteínas efetoras foram identificadas, embora muitos deles possuem funções sobrepostas e/ou redundantes na virulência do patógeno (RUDD *et al.*, 2015).

Em seu estudo, Seybold *et al.* (2020) demonstrou que *Z. tritici* suprime a produção de metabólitos relacionados ao sistema imunológico em plantas de trigo suscetíveis. Usando uma abordagem metabolômica comparativa, os autores identificaram que a biossíntese de metabólitos secundários, como os benzoxazinoides e os fenilpropanoides, foram suprimidos e induzidos em plantas suscetíveis e resistentes, respectivamente. De forma geral, os autores sugerem que a supressão dessas vias metabólicas impacta o metabolismo vegetal, altera as comunidades microbianas do limbo foliar e torna o trigo vulnerável a novas infecções.

Muitas respostas das plantas são conservadas contra a infecção de patógenos, incluindo a produção de fitohormônios como o ácido jasmônico e ácido salicílico, contudo, ainda não são bem definidas contra *Z. tritici*. Embora existam várias exceções, ácido salicílico é frequentemente considerado desencadeador de defesas eficazes contra patógenos biotróficos

envolvendo morte celular programada e a produção de PR-proteínas, enquanto ácido jasmônico desencadeia defesas geralmente mais eficazes contra patógenos necrotróficos (RUDD *et al.*, 2015; SEYBOLD *et al.*, 2020).

4. CAPÍTULO 1 – THE ALGAL POLYSACCHARIDE ULVAN INDUCES RESISTANCE IN WHEAT AGAINST *Zymoseptoria tritici* WITHOUT MAJOR ALTERATION OF LEAF METABOLOME¹

O polissacarídeo algal ulvana induz resistência no trigo contra Zymoseptoria tritici sem maiores alterações do metaboloma da folha

4.1. RESUMO

Este estudo teve como objetivo examinar a capacidade da ulvana em induzir resistência no trigo contra o fungo *Zymoseptoria tritici*. A análise de MALDI-TOF-MS indicou que a ulvana é composta principalmente por monossacarídeos insaturados (ramnose, ramnose-3-sulfato e xilose) e vários resíduos de ácido urônico. Em casa-de-vegetação, a aplicação foliar de ulvana a 10 mg.mL⁻¹ dois dias antes da inoculação com o fungo reduziu a severidade da doença e a densidade de picnídios em 45% e 50%, respectivamente. A ulvana não exibiu nenhuma atividade antifúngica direta contra *Z. tritici in vitro* ou *in planta*. Por outro lado, o tratamento com ulvana reduziu significativamente a colonização subestomática e a formação de picnídios. Ensaios moleculares revelaram que ulvana possui efeito elicitor, mas não efeito priming, na expressão de genes envolvidos na defesa do trigo, incluindo proteínas relacionadas à patogênese (β -1,3-endoglucanase e quitinase), metabolismo de espécies reativas de oxigênio (oxalato oxidase) e octadecanoides (lipoxigenase e óxido de aleno sintase). Não foi registrado regulação positiva para os genes marcadores da via dos fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase). A análise de UHPLC-MS, quantificando 83 metabólitos relacionados com a defesa do trigo, demonstrou que a ulvana não causa maiores alterações no metaboloma da folha do trigo em condições inoculadas ou não inoculadas, sugerindo um baixo custo metabólico associado à resistência induzida. Nossos resultados fornecem evidências de que a ulvana protege e desencadeia respostas de defesa no trigo contra *Z. tritici* sem maiores alterações na fisiologia da planta.

Palavras-chave: Septoriose do trigo, algas verdes, indução de resistência, expressão gênica, metabolômica, UHPLC-MS, MALDI-TOF-MS.

¹Artigo publicado no periódico *Frontiers in Plant Science* (Frontiers Media S.A., All Rights Reserved). doi:10.3389/fpls.2021.703712

4.2. INTRODUÇÃO

A mancha salpicada da folha, ou septoriose do trigo, causada por *Zymoseptoria tritici* é uma das principais doenças do trigo em todo o mundo (FONES; GURR, 2015). A infecção pelo fungo pode levar a perdas de rendimento de até 50% ou de 5-10% quando o manejo integrado da doença é implementado (FONES; GURR, 2015). Atualmente, o controle da septoriose ocorre principalmente pelo uso de fungicidas (TORRIANI *et al.*, 2015) e cultivares resistentes (ORS *et al.*, 2018). No entanto, devido à alta diversidade genética e adaptabilidade do fungo, *Z. tritici* frequentemente desenvolve resistência aos fungicidas e supera a resistência do hospedeiro (FONES; GURR, 2015; TORRIANI *et al.*, 2015). Neste contexto, buscar alternativas complementares, como o uso de indutores de resistência, é altamente encorajada.

A ulvana, um polissacarídeo sulfatado solúvel em água e extraído das paredes celulares da macroalga verde *Ulva* spp., é composto principalmente por ramnose, xilose, glicose, ácido urônico e sulfato (PAULERT *et al.*, 2009; DE FREITAS *et al.*, 2015). A ulvana apresenta um amplo espectro de atividades, incluindo a estimulação do crescimento da planta e respostas de defesa (STADNIK; DE FREITAS, 2014). Por exemplo, quando aplicada em folhas de feijão, a ulvana é capaz de reduzir a severidade da antracnose, da ferrugem e do oídio (STADNIK; DE FREITAS, 2014). Além disso, têm mostrado resultados promissores no controle de *Blumeria graminis* em trigo e em cevada (PAULERT *et al.*, 2010). No entanto, o potencial deste polissacarídeo para o controle da septoriose no trigo nunca foi examinado.

Abordagens moleculares e de metabolômica têm sido usadas para decifrar a resistência do trigo contra a infecção causada por *Z. tritici* (ORS *et al.*, 2018; RUDD *et al.*, 2015). Estudos têm reportado que a indução de genes de defesa, como as proteínas relacionadas à patogênese, espécies reativas de oxigênio, e via dos octadecanoides e fenilpropanoides desempenham papel fundamental na resistência do hospedeiro (ORS *et al.*, 2018). Contudo, até hoje, pouco é conhecido sobre a modulação de genes de defesa e o perfil de metabólitos induzidos no trigo usando polissacarídeos algais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da ulvana em proteger plantas de trigo contra *Z. tritici* e determinar seu efeito na expressão de genes de defesa e no perfil de metabólitos durante a fase biotrófica do fungo.

4.3. METODOLOGIA

A ulvana foi obtida conforme descrito por PAULERT *et al.* (2009). A composição dos monossacarídeos da ulvana foi avaliada por espectrometria de massas de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS) usando o espectrômetro AutoflexSpeed™ (Bruker, Berlim, Alemanha) e executando o software Flexcontrol 3.4 (Bruker).

Plantas de trigo (*Triticum aestivum* L., cv. Alixan) foram cultivadas em casa-de-vegetação ($18 \pm 3^\circ\text{C}$, 16 h de fotoperíodo) em vasos plásticos (3 L) contendo solo orgânico (Gamm Vert, França) como substrato. Plantas com três semanas de idade (terceira folha totalmente expandida) foram pulverizadas com ulvana ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ou água (controle). Dois dias após o tratamento (dat), as plantas foram inoculadas com suspensão de 1×10^6 conídios. mL^{-1} de *Zymoseptoria tritici* (isolado monospórico T02596) e mantidas em câmara úmida por três dias (SIAH *et al.*, 2010a). A severidade da doença e a densidade de picnídios foi avaliada aos 21 dias após a inoculação (dai) (ORS *et al.*, 2018).

Para avaliar o efeito *in vitro* na germinação de conídios e no crescimento micelial, placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar suplementado com ulvana ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ou água (controle) foram incubadas com *Z. tritici* conforme SIAH *et al.* (2010b). Para avaliar o efeito *in planta* da ulvana na germinação de conídios, no crescimento epifítico e na colonização das cavidades subestomáticas, segmentos de 4 cm da terceira folha coletados aos 1, 5 e 21 dai, respectivamente, foram imediatamente processados (SIAH *et al.*, 2010a).

Para análise da expressão gênica e metabolômica, 100 e 200 mg de tecido fresco, respectivamente, foram coletados aos 2 e 7 dat de plantas não inoculadas e aos 7 dat (correspondendo aos 5 dai) de plantas inoculadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Para a extração do RNA, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C , e para extração dos metabólitos, foram liofilizadas, pesadas e armazenadas a -20°C até o uso.

O RNA total foi extraído usando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Holanda). A transcrição reversa do RNA foi realizada com High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, Estados Unidos) de acordo com protocolo do fabricante. As reações de PCR para amplificar e quantificar a expressão dos genes fenilalanina amônia-liase (*PAL*), chalcona sintase (*CHS*), lipoxigenase (*LOX*), óxido aleno sintase (*AOS*), β -1,3-endoglucanase (*PR-2*), quitinase (*PR-3*) e oxalato oxidase (*OXO*) foram realizadas no termociclador C1000T (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França) (ORS *et al.*, 2018). β -tubulina 4 (*TUB*) (TAYEH *et al.*, 2013) e Apetala 2 classe A (*PetA*) foram usados como genes de referência.

Os metabólitos polares foram extraídos com 25 mL de metanol por mg de peso seco e analisados por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (UHPLC-MS) usando o sistema Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos), calibrado internamente com dibutil-fosfalato (m/z : 279,1591). A identificação dos metabólitos foi baseada numa lista de metabólitos de interesse usando abordagem direcionada (KRAUSS *et al.*, 2010; FLAMINI *et al.*, 2013). A quantificação relativa dos metabólitos foi realizada usando o software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Os ensaios *in vitro* foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Todos os experimentos realizados *in planta* foram em delineamento fatorial inteiramente casualizado com dois fatores: tratamento (ulvana ou água) e inoculação (*Z. tritici* ou água). Três repetições (vasos), cada uma com doze plantas, foram usadas em cada condição.

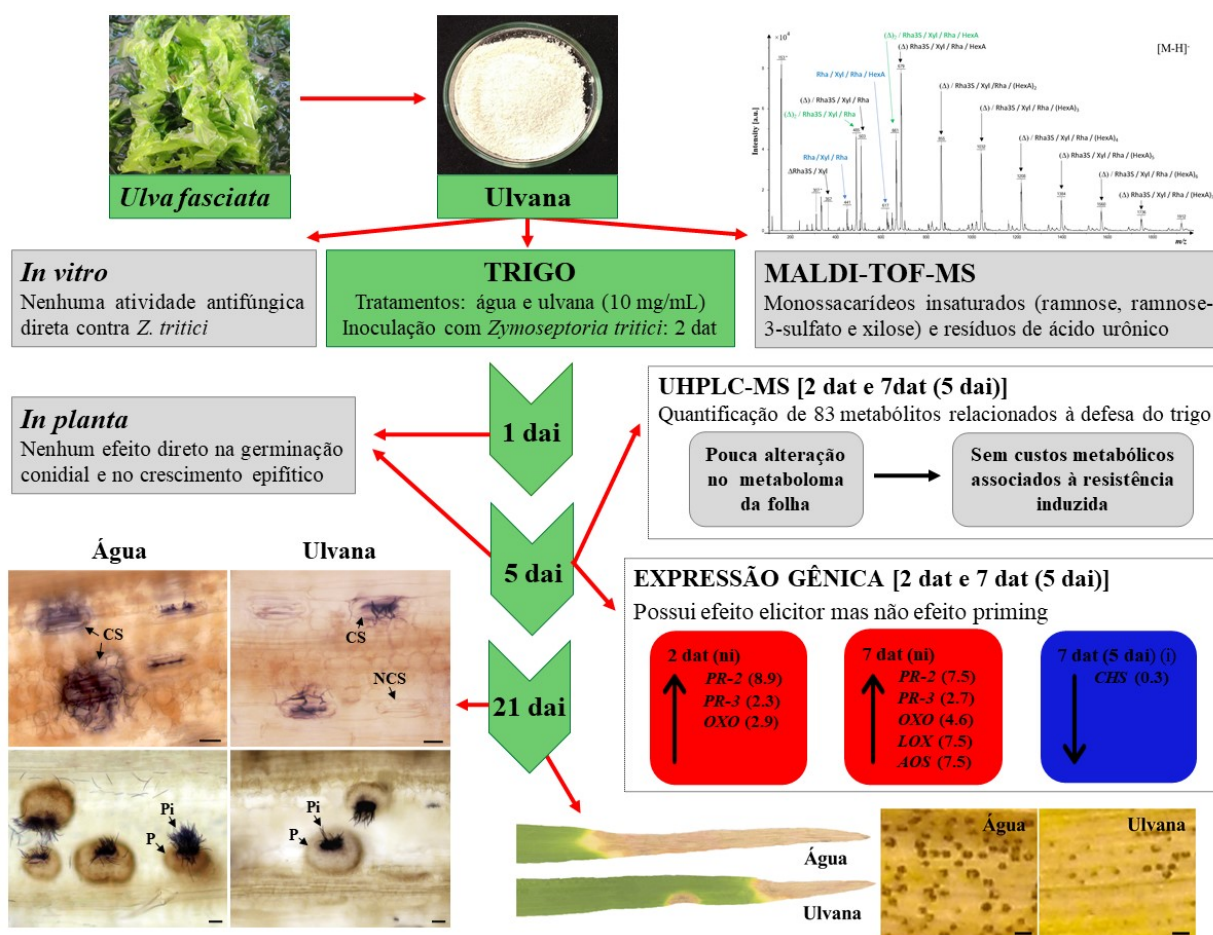
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de MALDI-TOF-MS revelou que a ulvana é composta por monossacarídeos insaturados (ramnose, ramnose-3-sulfato e xilose) e resíduos de ácido urônico. Conforme evidenciado por JAULNEAU *et al.* (2010), nosso trabalho reforça a proposição de que o reconhecimento da planta pela ulvana pode estar associado com ramnose e/ou ácido urônico.

A ulvana não apresentou efeito antifúngico direto contra *Z. tritici in vitro* e *in planta*, corroborando com trabalhos anteriores (DE FREITAS *et al.*, 2015). Por outro lado, a ulvana reduziu a severidade da doença (45%) e a densidade de picnídios (50%) (Figura 11), indicando que a proteção observada deve estar associada com aumento das respostas de defesa da planta.

Investigações moleculares revelaram que a ulvana induziu a expressão de vários genes relacionados à defesa do trigo em plantas não inoculadas, incluindo *PR-2*, *PR-3*, *OXO*, *LOX* e *AOS*. Curiosamente, alguns desses genes, como *PR-2*, *PR-3* e *OXO* foram regulados positivamente aos 2 e 7 dat, sugerindo um efeito elicitor desencadeado pela ulvana, conforme anteriormente observado em *Medicago truncatula* (CLUZET *et al.*, 2004). Por outro lado, não foi observado, em nosso estudo, uma regulação positiva desses genes-alvo nas plantas inoculadas. Em conjunto, esses resultados indicam que os mecanismos de defesa induzidos pela ulvana no trigo contra *Z. tritici* estão provavelmente associados com efeito elicitor do que com efeito priming. Contudo, dado evidência de que ulvana exibe efeito priming células de trigo (PAULERT *et al.*, 2010) é importante verificar a expressão desses genes em tempos anteriores à infecção fúngica para elucidar um possível efeito priming nas plantas de trigo.

A metabolômica indicou que a ulvana não causou maiores alterações no perfil de metabólitos da folha do trigo em plantas tratadas inoculadas ou não com o fungo. De fato, somente de uma ligeira regulação negativa da espermidina foi observada aos 2 dat. Esta observação reforça o interesse pela ulvana como um promotor de defesa, visto que a proteção conferida pela ulvana no trigo não parece estar associada à custos metabólicos para a planta.



Ulvana reduz a colonização subestomática (55%), a severidade da doença (45%) e a densidade de picnídios (55%)

Figura 11. Principais efeitos da ulvana no patossistema trigo-*Zymoseptoria tritici*. NCS: cavidades subestomáticas não colonizadas, CS: cavidades subestomáticas colonizadas, P: picnídio, Pi: Picnidiósporos, dat: dias após o tratamento, dai: dias após a inoculação, ni: plantas não inoculadas, i: plantas inoculadas, PR-2: β -1,3-endoglucanase, PR-3: quitinase, OXO: oxalato oxidase, LOX: lipoxigenase, AOS: óxido aleno sintase, CHS: chalcona sintase. Barra: 10 μ m: microscopia, 100 μ m: sintomas da doença.

5.5. CONCLUSÃO

A aplicação foliar preventiva de ulvana induz resistência no trigo contra *Zymoseptoria tritici* sem maiores custos metabólicos para a planta.

5. CAPÍTULO 2 – A LAMINARIN-BASED FORMULATION PROTECTS WHEAT AGAINST *Zymoseptoria tritici* VIA DIRECT ANTIFUNGAL ACTIVITY AND ELICITATION OF HOST DEFENSE-RELATED GENES²

Uma formulação baseada em laminarana protege o trigo contra Zymoseptoria tritici via atividade antifúngica direta e elicitação de genes relacionados à defesa do hospedeiro

5.1. RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial da formulação à base de laminarana, Vacciplant[®], em induzir resistência no trigo contra *Zymoseptoria tritici*. Em condições de casa-de-vegetação, uma única pulverização foliar do produto dois dias antes da inoculação com o fungo reduziu a severidade da doença e a densidade de picnídios em 42% e 45%, respectivamente. Vacciplant[®] exibiu uma atividade antifúngica direta na germinação de conídios de *Z. tritici* *in vitro* e *in planta*. Além disso, reduziu a colonização das cavidades subestomáticas e a formação de picnídios nas folhas tratadas. Investigações moleculares revelaram que Vacciplant[®] possui efeito elicitor, mas não efeito priming, na expressão de vários genes relacionados à defesa do trigo, incluindo fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase), octadecanoides (lipoxigenase e óxido aleno sintase) e proteínas relacionadas à patogênese (β -1,3-endoglucanase e quitinase). Em contraste, não modulou a expressão do gene oxalato oxidase envolvido no metabolismo das espécies reativas de oxigênio. Por fim, a aplicação preventiva do produto não causou maiores alterações no metaboloma da folha do trigo em plantas inoculadas ou não inoculadas, sugerindo um baixo custo metabólico associado à indução de resistência. Este estudo fornece evidências de que a formulação à base de laminarana confere proteção ao trigo contra *Z. tritici* por meio da atividade antifúngica direta e da elicitação de genes associados à defesa da planta.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L., septoriose do trigo, algas marrons, *Laminaria digitata*, indutores de resistência, expressão gênica, metabolômica.

² Artigo aceito para publicação no periódico Plant Disease (American Phytopathological Society). doi:10.1094/PDIS-08-21-1675-RE

5.2. INTRODUÇÃO

A mancha salpicada da folha, também conhecida como septoriose do trigo, causada por *Zymoseptoria tritici* é uma das principais doenças foliares do trigo (FONES; GURR, 2015). Atualmente, o controle desta doença depende principalmente do uso de fungicidas (TORRIANI *et al.*, 2015) e materiais resistentes (ORS *et al.*, 2018). Contudo, *Z. tritici* têm frequentemente desenvolvido resistência aos fungicidas e quebrado a resistência do hospedeiro (SIAH *et al.*, 2010b). Nesse contexto, a busca por alternativas complementares às atuais estratégias de controle, como o uso de indutores de resistência, é hoje amplamente incentivada.

O Benzotiadiazol (BTH), ou Acibenzolar-S-Metil (Bion[®], Syngenta), foi o primeiro indutor de resistência sintético registrado na Alemanha em 1996, originalmente para controlar o oídio no trigo (STADNIK; BUCHENAUER, 1999). Uma década depois, entretanto, o BTH foi retirado do mercado europeu devido seus efeitos colaterais e pela alta competição com fungicidas estabelecidos. Desde então, produtos de origem natural, como o Vacciplant[®] foram desenvolvidos na tentativa de controlar as doenças do trigo sem grandes custos associados.

Vacciplant[®] é o primeiro produto comercial formulado (45 g.L⁻¹ de laminarana, Goëmar) contendo um polissacarídeo algal registrado para controle biológico em cereais. Uma única aplicação foliar de forma preventiva controla *Blumeria graminis* no trigo (RENARD-MERLIER *et al.*, 2007). Similarmente, aplicações semanais reduzem a severidade do oídio em morango (MELIS *et al.*, 2017) e videira (PUGLIESE *et al.*, 2018). Contudo, embora o Vacciplant[®] seja atualmente o único indutor de resistência registrado na França para o controle da septoriose no trigo, faltam informações sobre sua eficácia e seu modo de ação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do Vacciplant[®] em induzir resistência no trigo contra *Z. tritici*, bem como investigar seu efeito na expressão de genes relacionados à defesa do hospedeiro e no perfil metabólico das plantas em condições de casa-de-vegetação.

5.3. METODOLOGIA

Plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) da cv. Alixan, suscetível à *Zymoseptoria tritici* (ORS *et al.*, 2018), foram cultivadas em casa-de-vegetação (18 ± 3°C, 16 h de fotoperíodo) em vasos plásticos (3 L) contendo solo orgânico (Gamm Vert, França) como substrato. Após três semanas de cultivo, as plantas foram pulverizadas com Vacciplant[®] (0,33%, produto líquido, Arysta LifeScience, França) ou água (controle). Dois dias após o tratamento (dat), as plantas foram inoculadas com suspensão de 1×10⁶ conídios.mL⁻¹ de *Z. tritici* e mantidas em câmara

úmida por três dias (SIAH *et al.*, 2010a). A severidade da doença e a densidade de picnídios foi avaliada aos 21 dias após a inoculação (dai) de acordo com ORS *et al.* (2018).

O efeito direto do produto na germinação de conídios e crescimento micelial *in vitro* foi avaliado de acordo com SIAH *et al.* (2010b). Para isso, foram usadas placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar suplementado com Vacciplant[®] (0,005-0,32%) ou água (controle). Para avaliar o efeito na germinação de conídios e na colonização das cavidades subestomáticas *in planta*, segmentos de 4 cm da terceira folha foram coletados aos 1 e 21 dai, respectivamente, e imediatamente processados conforme SIAH *et al.* (2010a).

Para a análise da expressão gênica e metabolômica, amostras de tecidos foliares foram coletados aos 2 e 7 dat de plantas não inoculadas e aos 7 dat (5 dai) de plantas inoculadas e congeladas em nitrogênio líquido. Para a extração do RNA, as amostras foram armazenadas a -80 °C, e para extração dos metabólitos, foram liofilizadas, pesadas e armazenadas a -20 °C.

A extração do RNA total foi realizada com RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Holanda), e a transcrição reversa usando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, Estados Unidos). As reações de PCR para quantificar a expressão dos genes fenilalanina amônia-liase (*PAL*), chalcona sintase (*CHS*), lipoxigenase (*LOX*), óxido aleno sintase (*AOS*), β -1,3-endoglucanase (*PR-2*), quitinase (*PR-3*) e oxalato oxidase (*OXO*) foram realizadas no termociclador C1000T (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França) de acordo com ORS *et al.* (2018). β -tubulina 4 (*TUB*) (TAYEH *et al.*, 2013) e Apetala 2 classe A (*PetA*) foram usadas como genes de referência.

Os metabólitos polares foram extraídos com metanol (25 mL por mg de peso seco) e analisados por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (UHPLC-MS) usando o sistema Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). A identificação e a quantificação relativa dos metabólitos foi realizada executando o software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) a partir de uma lista de metabólitos usando abordagem direcionada (KRAUSS *et al.*, 2010; FLAMINI *et al.*, 2013).

Os ensaios *in vitro* foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os experimentos *in planta* foram em delineamento fatorial inteiramente casualizado com dois fatores: tratamento (Vacciplant[®] ou água) e inoculação (*Z. tritici* ou água). Três repetições (vasos), cada uma com três plantas, foram usadas em cada condição. Após a verificação da normalidade e homogeneidade, os dados foram elaborados à análise de variância. O teste T de Student ou Wilcoxon-Mann-Whitney foi usado nas comparações pareadas, e Tukey HSD ou Kruskal-Wallis nas comparações múltiplas ($P \leq 0,05$).

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observações microscópicas revelaram que Vacciplant[®] exibe atividade antifúngica direta contra *Z. tritici* *in vitro* e *in planta* (Figura 12). Adicionalmente, plantas previamente tratadas com o produto exibiram uma menor severidade da doença (42%) e densidade de picnídios (45%) em comparação ao controle aos 21 dai. Estudos têm destacado que Vacciplant[®] atua indiretamente por meio da estimulação de respostas de defesa da planta (NERVA *et al.*, 2019), mas também pode inibir o desenvolvimento do patógeno (RENARD-MERLIER *et al.*, 2007). No entanto, saber se esse efeito antifúngico direto sobre o fungo poderia contribuir para o controle da doença em condições de campo ainda precisa ser investigado.

Investigações moleculares indicaram que Vacciplant[®] induziu a expressão de vários genes de defesa do trigo em plantas não inoculadas, incluindo fenilpropanoides (*PAL* e *CHS*) e octadecanoides (*LOX* e *AOS*) aos 2 dat, e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (*PR-2* e *PR-3*) aos 7 dat. A laminarana é conhecida por ativar uma bateria de reações em videira, incluindo aumento na atividade de β -1,3-glucanase e quitinase e acumulação de fitoalexinas (AZIZ *et al.*, 2003). Em nosso estudo, contudo, apenas uma regulação negativa de *CHS*, *LOX* e *AOS* foi registrada nas plantas inoculadas os 5 dai. Juntos, esses resultados sugerem que Vacciplant[®] induz resistência em trigo contra *Z. tritici* mais precisamente por meio de efeito elicitor, ao invés de efeito priming. No entanto, para confirmar essa hipótese, seria importante monitorar a expressão desses genes em outros momentos após a infecção com o patógeno e direcionar outros genes envolvidos nas vias de defesa do trigo.

A metabolômica indicou que Vacciplant[®] causa pouca alteração no metaboloma da folha do trigo. Alguns aminoácidos como hidroxiprolina, metionina e ácido aspártico foram regulados positivamente aos 2 dat, enquanto que os níveis de arginina, lisina e triptofano, espermidina (aminas), HBOA-hexoside, HMBOA, HMBOA-hexoside e DHBOA-hexosil-desoxihexoside (benzoxazinoides) diminuíram. Aos 7 dat, actilamina (poliamina) foi acumulado. Por outro lado, em condições inoculadas, apenas apigenina-6-C-hexosídeo, tricina-7-O-hexosídeo, DIM₂BOA e cafeoilputrescina foram negativamente modulados, enquanto que os níveis de coumaroylagmatine e sinapoylagmatine foram acumulados em plantas previamente tratadas com ulvana e inoculadas com *Z. tritici*. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a indução de respostas de defesa no trigo pela formulação de laminarana não parece causar custos metabólicos significativos para a planta.

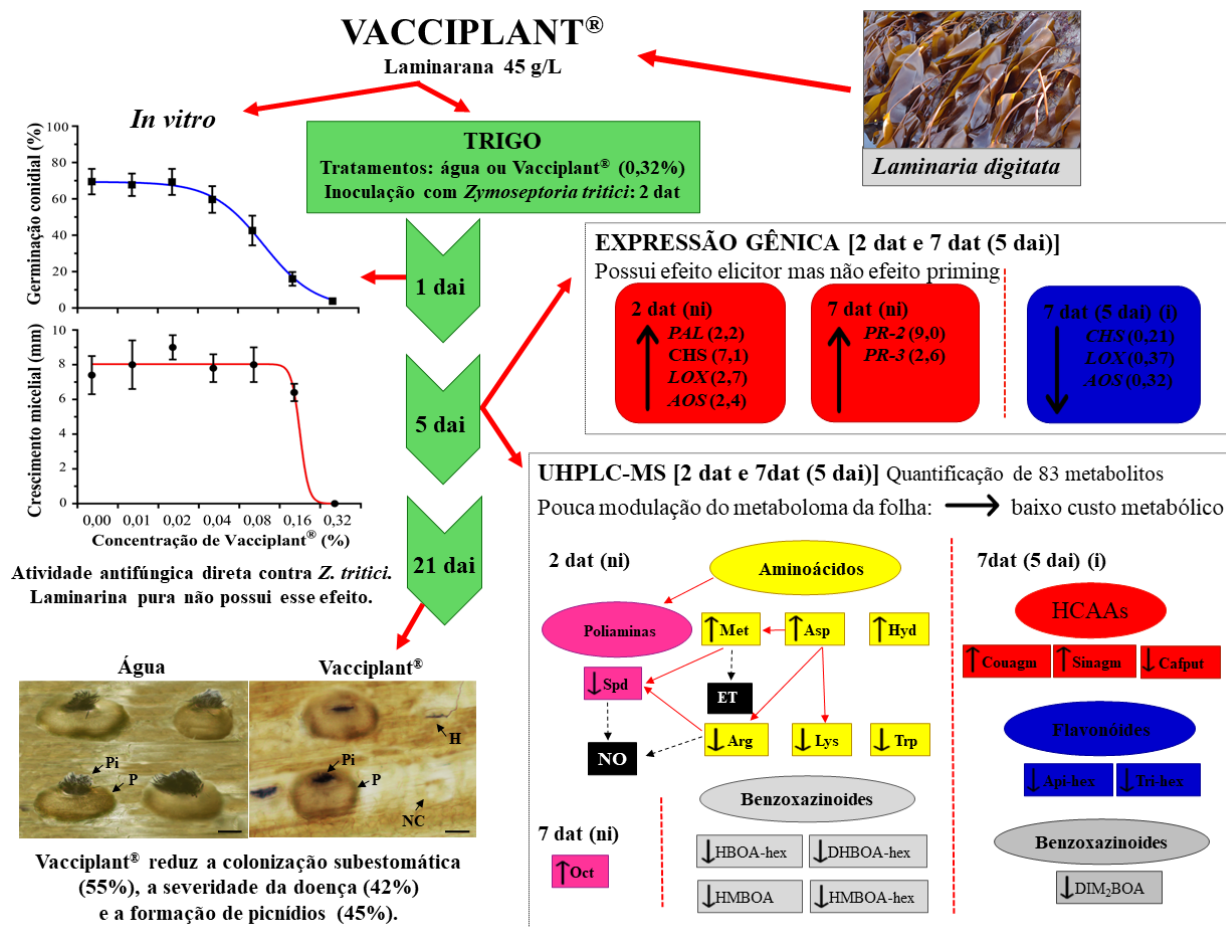


Figura 12. Principais efeitos de Vacciplant® no patossistema trigo-*Zymoseptoria tritici*. NC, cavidade subestomática não colonizada; H, cavidade subestomática colonizada com hifa; P: picnídio; Pi: Picnidiósporos; ni: plantas não inoculadas; i: plantas inoculadas; *PAL*, fenilalanina amônia-liase; *CHS*, chalcona sintase; *LOX*, lipoxigenase; *AOS*, óxido aleno sintase; *PR-2*, β-1,3-endoglucanase; *PR-3*, quitinase; *OXO*, oxalato oxidase; Met, metionina; Asp, ácido aspártico; Hyd, hidroxiprolina; Arg, arginina; Lys, lisina; Trp, triptofano; ET, etileno; NO, óxido nítrico; hex, hexoside; HCAAs, amidas do ácido hidroxicinâmico; Couagm, coumaroilagmatine; Sinagm, sinapoilagmatine; Cafput, cafeoilputrescine. Barra: 10 um. Foto de *Laminaria digitata*: GUIRY, 2021.

5.5. CONCLUSÃO

A formulação à base de laminarana, Vacciplant®, protege o trigo contra *Zymoseptoria tritici* via atividade antifúngica direta e elicitação de genes relacionados à defesa do hospedeiro.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo relata pela primeira vez o potencial da ulvana e da formulação de laminarana, Vacciplant[®], em proteger plantas de trigo contra *Z. tritici*. Não houve evidências de alteração importante no metaboloma da folha após tratamento com esses produtos, sugerindo que a indução de resistência altera pouco o metabolismo geral das plantas.

A proteção conferida pela ulvana parece depender exclusivamente da estimulação de mecanismos de defesa da planta uma vez que este polissacarídeo não apresentou nenhum efeito antifúngico direto contra o patógeno em condições *in vitro* e *in planta*. A expressão gênica indicou que a ulvana induz resistência no trigo contra *Z. tritici* mais provavelmente por meio de efeito elicitor, em vez de efeito priming, incluindo a indução de síntese de proteínas relacionadas a patogênese (β -1,3-endoglucanase e quitinase), metabolismo de espécies reativas de oxigênio (oxalato oxidase) e expressão de genes associados a via dos octadecanoides (lipoxigenase e óxido aleno sintase), mas não induziu a via dos fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase).

O produto comercial Vacciplant[®] formulado à base de laminarana apresentou efeito biológico duplo contra *Z. tritici*, levando a uma diminuição na severidade da doença e na densidade de picnídios nas folhas de trigo tratadas. Ensaios *in vitro* e *in planta* mostraram que este produto exibe uma atividade antifúngica direta na germinação de conídios. Provavelmente, esse efeito direto seja devido a outros componentes da formulação que não a laminarana, a qual não apresentou atividade *in vitro* contra o fungo. Por outro lado, a análise molecular revelou que Vacciplant[®] induz resistência no trigo mais provavelmente por meio de efeito elicitor do que efeito priming, induzindo a expressão de genes envolvidos com a síntese de PR-proteínas (β -1,3-endoglucanase e quitinase), fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase) e octadecanoides (lipoxigenase e óxido aleno sintase). Não foi observado modulação na expressão do gene oxalato oxidase envolvido no metabolismo de espécies reativas de oxigênio após o tratamento com esse produto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOURAÏCHA, E. *et al.* Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 121-128, 2015.

ADHIKARI, T. B. *et al.* Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 1-3, p. 55-68, 2007.

AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, p. 635, 2005.

ARAÚJO, I. B.; PERUCH, L. A. M.; STADNIK, M. J. Efeito do extrato de alga e da argila silicatada na severidade da alternariose e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 363-367, 2012.

ARAÚJO, L. *et al.* Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 148-152, 2008.

AZIZ, A. *et al.* Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 12, p. 1118-1128, 2003.

BEN SALAH, I. *et al.* Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against verticillium wilt of olive. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 248-255, 2018.

BORSATO, L. C.; DI PIERO, R. M.; STADNIK, M. J. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical plant pathology**, v. 35, n. 5, p. 318-322, 2010.

CLUZET, S. *et al.* Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, n. 7, p. 917-928, 2004.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Nono levantamento, junho 2021 – safra 2020/2021: Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 29 Jun. 2021.

CONRATH, U. *et al.* Priming: getting ready for battle. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.

DE BORBA, M. C.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan enhances seedling emergence and reduces Fusarium wilt severity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Protection**, v. 118, p. 66-71, 2019.

DE FREITAS, M. B. *et al.* Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 384-390, 2015.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 8-13, 2012.

EL MODAFAR, C. *et al.* Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 55-63, 2012.

FAO. FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 29 Jun. 2021.

FLAMINI, R. *et al.* An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. **Metabolomics**, v. 9, n. 6, p. 1243-1253, 2013.

FONES, H.; GURR, S. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. **Fungal Genetics and Biology**, v. 79, p. 3-7, 2015.

GALVÃO, S. *et al.* Avaliação da eficiência de produtos alternativos para o controle do míldio e da antracnose em videira, cultivar Niágara Branca. **Agropecuária Catarinense**, v. 19, n. 2, p. 91-93, 2006.

GUIRY, M. D. Foto de *Laminaria digitata*. Disponível em: https://www.seaweed.ie/descriptions/Laminaria_digitata.php Acesso em: 17 Ago. 2021.

HALAMA, P. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici* in France. **Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 135-138, 1996.

IBGE-LSPA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, v. 30, p1-32, 2017.

INUI, H.; YAMAGUCHI, Y.; HIRANO, S. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 975-978, 1997.

JAULNEAU, V. *et al.* An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 3, p. 393-401, 2011.

JAULNEAU, V. *et al.* Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

KEMA, G. H. J. *et al.* Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. **Phytopathology**, v. 86, n. 7, p. 777-786, 1996.

KEON, J. *et al.* Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 2, p. 178-193, 2007.

KIDGELL, J. T. *et al.* Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. **Algal research**, v. 39, p. 101422, 2019.

KISLEV, M. E.; NADEL, D; CARMI, I. Epipalaeolithic (19,000 BP) cereal and fruit diet at Ohalo II, Sea of Galilee, Israel. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 73, n. 1-4, p. 161-166, 1992.

KLARZYNSKI, Olivier *et al.* Linear β -1, 3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant physiology**, v. 124, n. 3, p. 1027-1038, 2000.

KRAUSS, M.; SINGER, H.; HOLLENDER, J. LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 943-951, 2010.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.

MACCHEEK. Foto de *Septoria tritici* em folhas de trigo. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Septoria-tritici.jpg>. Acesso em: 01 Set. 2021.

MELIS, P. *et al.* Integrated approach of powdery mildew control on strawberry cultivar 'Elsanta' in Belgium. **Acta Horticulturae**, 1709-714, 2017.

NERVA, Luca *et al.* Grapevine phyllosphere community analysis in response to elicitor application against powdery mildew. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 662, 2019.

ORS, M. E. *et al.* Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. **Plant Pathology**, v. 67, n. 3, p. 561-572, 2018.

PAULERT, R. *et al.* Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 6, p. 263-270, 2009.

PAULERT, R. *et al.* Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 634-642, 2010.

PERUCH, L. A. M. *et al.* Biomassa cítrica, extrato de algas, calda bordalesa e fosfitos no controle do míldio da videira, cv. Niágara Branca. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 6, n. 2, p. 143-148, 2007.

PIANA, C. F. de B.; CARVALHO, F. I. F. de. Trigo: a cultura que deu suporte à civilização. In: BARBIERI, R. L; STUMPF, E. R. T. Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília, DF: Embrapa Clima Temperado, 909 p., 2008.

PONOMARENKO, A; GOODWIN. S. B; KEMA, G. H. J. *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat. **Plant Health Instructor**, 2011. doi:10.1094/PHI-I-2011-0407-01

PUGLIESE, Massimo et al. Application of laminarin and calcium oxide for the control of grape powdery mildew on *Vitis vinifera* cv. Moscato. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, n. 5, p. 477-482, 2018.

QUAEDVLIEG, W. et al. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, p. 57, 2011.

RENARD-MERLIER, D. et al. Iodus 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1156-1164, 2007.

ROHEL, E. A. et al. Exploring infection of wheat and carbohydrate metabolism in *Mycosphaerella graminicola* transformants with differentially regulated green fluorescent protein expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 2, p. 156-163, 2001.

RUDD, J. J. et al. Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. **Plant physiology**, v. 167, n. 3, p. 1158-1185, 2015.

SCHEEREN, P. L.; CASTRO, R. L. DE CAIERÃO, E. **Botânica, morfologia e descrição fenotípica**. In: BORÉM, A.; SCHEEREN, P. L. (Ed.). Trigo: do plantio à colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV, Cap. 2, p. 35-55, 2015.

SCHONS, R. F.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Durabilidade da resistência induzida por ulvana e efeito da concentração de inóculo no controle da antracnose do feijão. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 4, 2011.

SEYBOLD, H. et al. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

SHETTY, N. P. et al. Effects of β -1, 3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 15, p. 4287-4300, 2009.

SHETTY, N. P. et al. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 637-647, 2007.

SIAH, A. et al. Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 661-670, 2010a.

SIAH, A. et al. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four *in vitro* bioassays and by screening of G143A substitution. **Crop Protection**, v. 29, n. 7, p. 737-743, 2010b.

SIDHU, Y. S. Molecular tools for functional genomic analyses of the stealth pathogenesis of wheat by *Zymoseptoria tritici*. 2015.

SOMAI-JEMMALI, L. *et al.* Brown alga *Ascophyllum nodosum* extract-based product, Dalgin Active®, triggers defense mechanisms and confers protection in both bread and durum wheat against *Zymoseptoria tritici*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 5, p. 3387-3399, 2020.

SOMAI-JEMMALI, L. *et al.* Similar infection process and induced defense patterns during compatible interactions between *Zymoseptoria tritici* and both bread and durum wheat species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 4, p. 787-801, 2017.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivative and modern fungicides. **Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 466-475, 1999.

STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 111-118, 2014.

STEINBERG, G. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 79, p. 17-23, 2015.

TAYEH, C. *et al.* Lipid metabolism is differentially modulated by salicylic acid and heptanoyl salicylic acid during the induction of resistance in wheat against powdery mildew. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 18, p. 1620-1629, 2013.

TILEY, A. M. M. *et al.* The ZtvelB gene is required for vegetative growth and sporulation in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2210, 2019.

TORRIANI, S. F. F. *et al.* *Zymoseptoria tritici*: a major threat to wheat production, integrated approaches to control. **Fungal Genetics and Biology**, v. 79, p. 8-12, 2015.

VERA, J. *et al.* Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. **Marine drugs**, v. 9, n. 12, p. 2514-2525, 2011.

VRANCKEN, C. *et al.* Azoxystrobin and epoxiconazole sensitivity profiles of *Mycosphaerella graminicola* populations from the Grand-Duchy of Luxembourg in 2007 and 2008. **EPPO workshop on azole fungicides and Septoria leaf blotch control**, p. 7-9, 2010.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.

WORDELL FILHO, J. A.; MARTINS, D. A.; STADNIK, M. J. Aplicação foliar de tratamentos para o controle do míldio e da podridão-de-escamas de bulbos de cebola. **Horticultura brasileira**, v. 25, p. 544-549, 2007.