



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

Camile Pissoli

Eficiência de compostos bioativos para o controle da brusone em arroz (*Oryza sativa* L.)

Florianópolis
2018

Camile Pissoli

Eficiência de compostos bioativos para o controle da brusone em arroz (*Oryza sativa* L.)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marciel João Stadnik

Coorientador: Dr. Klaus K. Scheuermann

Florianópolis
2018

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

Pissoli, Camile

Eficiência de compostos bioativos para o controle da brusone em arroz (*Oryza sativa* L.)
p. 56.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Magnaporthe oryzae*. 3. Compostos bioativos. 4.
ASM.

I Stadnik, Marciel João. II. Scheuermann, Klaus Konrad. III. Universidade do Estado de
Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV.
Título.

Camile Pissoli

Eficiência de compostos bioativos para o controle da brusone em arroz (*Oryza sativa* L.)

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

Prof^a. Dra. Paula Robert
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Robson M. Di Piero
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Mateus Brusco de Freitas
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências obtido pelo Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Souza Soares
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Marciel João Stadnik
Orientador

Florianópolis, 2018.

Este trabalho é dedicado ao meu pai (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade e pela disponibilização da estrutura para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina pelo aprendizado e pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa parcial de estudos.

Ao professor Dr. Marciel João Stadnik, pela oportunidade de convívio.

Ao Dr. Klaus Konrad Scheuermann, da Estação Experimental de Itajaí/Epagri, por todo o suporte oferecido durante o período do mestrado.

Aos meus pais Leonir e Edite A. B. Pissoli, por me auxiliarem todo o tempo e entenderem minhas escolhas.

Aos integrantes do Laboratório de Fitopatologia, por todo o aprendizado e convívio.

A Diana, estagiária colombiana, por me auxiliar no período mais difícil da condução experimental.

Aos amigos, simplesmente pela alegria de tê-los. Agradecimentos especiais a Aline, Ariana, Bruna, Guilherme e Rafaela.

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

“Treine seus olhos a enxergar detalhes, pois as mãos só serão capazes de reproduzir o que a mente foi capaz de enxergar. “

(Luiz Narciso Baratieiri)

EFICIÊNCIA DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA O CONTROLE DA BRUSONE EM ARROZ (*Oryza sativa* L.)

RESUMO

A brusone causada por *Magnaporthe oryzae*, é a principal doença da cultura do arroz. Embora a resistência genética seja a principal forma de controle recomendada, o desenvolvimento e lançamento de novas cultivares têm sido dificultado pela alta variabilidade do patógeno. Nesse contexto, novas alternativas de controle precisam ser estudadas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial dos compostos bioativos ι -carragenana, λ -carragenana, e laminarana, ulvanas depolimerizadas (UDP1-UDP4) no controle de brusone em diferentes cultivares de arroz, bem como o efeito sobre o crescimento micelial e formação de estruturas pré-infectivas. Em casa-de-vegetação, foram testados 11 compostos bioativos, divididos em dois ensaios. A pulverização foliar foi realizada 48 h antes da inoculação com a segunda folha totalmente expandida. *In vitro*, foi avaliado o crescimento micelial do fungo a cada 2 dias até o décimo dia de incubação. Adicionalmente, foram avaliados o percentual de germinação de conídios e formação de apressórios melanizados em lâminas de poliestireno com períodos de incubação de 8, 16 e 24 horas. Apenas a pulverização foliar de ASM reduziu significativamente a severidade da doença comparado com as plantas testemunhas. O ASM reduziu o crescimento micelial nas concentrações 0,15 e 0,3 mg mL⁻¹ e diminuiu a porcentagem de emissão de apressórios melanizados.

Palavras-chave: *Magnaporthe oryzae*. Compostos bioativos. Polissacarídeos algais. ASM.

EFFICIENCY OF BIOACTIVE COMPOUNDS FOR THE CONTROL THE BLAST RICE
(*Oryza sativa* L.)

ABSTRACT

The rice blast, caused by *Magnaporthe oryzae*, is the most important disease of rice worldwide. Although the genetic resistance has been the main recommended measure, the development and release of new rice cultivars has been difficult because of the high pathogen variability. The present study was aimed at evaluating the potential of bioactive compounds in controlling of rice blast different rice cultivars, as well as the effect on mycelial growth and the emission of pre-infective structures. In the greenhouse, 11 bioactive compounds including ι-carragenan, λ-carragenan, laminaran, ulvan, depolymerized ulvans (UDP1-UDP4), were tested, divided into two trials. Foliar spraying was performed 48 h before inoculation with a fully expanded second leaf. *In vitro*, mycelial growth was assessed every 2 days until the tenth day of incubation period. In addition, the percentage of conidial germination and the melanized appressoria formation on polystyrene slides were determined after a incubation period of 8, 16 and 24 hours. Only one foliar spray of ASM reduced significantly the severity of the disease over time in comparison to control plants. ASM at 0.15 and 0.3 mg mL⁻¹ decreased mycelial growth and decreased the percentage of melanized appressoria formation.

Keywords: *Magnaporthe oryzae*. Bioactive compounds. Algal polysaccharides. ASM.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição mundial da brusone do arroz. Pontos em vermelho demarcam 85 países ou regiões onde a doença foi identificada. Fonte: Wang et al., 2014.....29
- Figura 2 - Ciclo da doença de *Magnaporthe oryzae*. (a) Os conídios estão aderidos em conidióforos simpodiais. Uma única lesão foliar com múltiplos conidióforos pode descarregar até 20000 conídios por noite durante 20 dias; (b) O conídio de três células se adere ao hospedeiro via mucilagem exsudada pela célula do fungo; (c) O conídio requer água livre para germinar - um pequeno tubo germinativo emerge e forma um apressório; (d) O apressório melanizado se forma em resposta aos sinais do hospedeiro, como superfície rígida e hidrofóbica, além de ausência de nutrientes; (e) o apressório melanizado se desenvolve e faz pressão de turgescência dentro do apressório empurrando um pino de penetração atravessando a cutícula e a parede celular; as hifas se espalham de célula para célula provavelmente via plasmodesmata. A doença epidêmica é causada pelo vasto número de conídios que são liberados das lesões da doença no arroz; a doença é policíclica. Adaptado de (EBBOLE, 2007).....32
- Figura 3 - Sintomas de brusone em folhas de *Oryza sativa* causado por *Magnaporthe oryzae*. Fonte: Próprio autor, (2015).....33
- Figura 4 – Sintomas da brusone no terço médio das folhas de arroz (*Oryza sativa*) causada por *Magnaporthe oryzae* aos 3 dias após inoculação de plantas das cv. Epagri 106, SCS 118 Marques e Epagri 109 pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM - 0,15 mg mL⁻¹) 48 h horas antes da inoculação, nos ensaios I (A) e II (B).....49
- Figura 5 - Diâmetro da colônia tratadas com acibenzolar-S-metil - ASM nas concentrações 0,15 mg mL⁻¹ (A) e 0,30 mg mL⁻¹ (B) aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após transferência de *M. oryzae* para o meio de cultivo BDA. As linhas representam a regressão linear da colonização ao longo do tempo. Os valores médios (y) de todos os tempos foram calculados para cada colônia. Letras ao lado de valores de r indicam significância estatística pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).50
- Figura 6 – Diâmetro da colônia tratadas com água destilada – testemunha (A) e acibenzolar-S-metil - ASM nas concentrações 0,15 mg mL⁻¹ (B) e 0,30 mg mL⁻¹ (C) aos 10 dias após transferência de *M. oryzae* para o meio de cultivo BDA.....51
- Figura 7– A. Porcentagem de germinação de conídios; B. Germinação de conídios com apressórios melanizados; de *M. oryzae* quando tratados com ASM (acibenzolar-S-metil) e submetidos à temperatura média de ± 25 °C e luz contínua. As barras representam média ± desvio padrão.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições em que a ulvana foi submetida para a degradação de H ₂ O ₂ e obtenção das oligoulvanas.....	43
Tabela 2 - Tratamentos, concentração e referência dos compostos bioativos que foram testados para o controle de <i>M. oryzae</i> em plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i>).....	44
Tabela 3 - Severidade da brusone em plantas de arroz tratadas com polissacarídeos algais aos 20 dias após a semeadura (segunda folha totalmente expandida).	47
Tabela 4 – Severidade da brusone em plantas de arroz tratadas com compostos bioativos aos 20 dias após a semeadura (segunda folha totalmente expandida).	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE – Água destilada esterelizada

AS – Ácido Salicílico

ASM – Acibenzolar-S-Metil

BDA – Batata dextrose ágar

BTH - Ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7 carbotióico

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

DPI - Dots Per Inch (Pontos Por Polegada)

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

EUA – Estados Unidos da América

FAO - Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)

ICBN - International Code of Botanical Nomenclature (Código Internacional de Nomenclatura Botânica)

IRGSP - International Rice Genome Sequencing Project (Projeto Internacional de Sequenciamento do Genoma do Arroz)

HAI – Horas após a inoculação

PVC – Policloreto de vinila

NUV – Radiação próxima ao ultravioleta

SAR – Resistência Sistêmica Adquirida

UDP – Ulvana despolimerizada

USDA - United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)

UV- Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. GERAL.....	27
2.2. ESPECÍFICOS	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3.1. O HOSPEDEIRO: <i>ORYZA SATIVA</i> L.	28
3.2. BRUSONE DO ARROZ	29
3.3. ETIOLOGIA	29
3.4. CICLO DE VIDA	31
3.5. SINTOMATOLOGIA.....	32
3.6. MECANISMOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA.....	33
3.7. CONTROLE.....	34
3.7.1. USO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. ORIGEM E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS	40
4.2. OBTENÇÃO DE CONÍDIOS	40
4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS PLANTAS	41
4.4. TRATAMENTOS.....	41
4.5. TESTE “ <i>IN VIVO</i> ”	43
4.6. TESTES “ <i>IN VITRO</i> ”	45
4.6.1. AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>M. ORYZAE</i>	45
4.6.2. DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS.....	45
4.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSSÃO	53
7. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado e consumido em larga escala no mundo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. Segundo o levantamento da CONAB (2015), a produção do Brasil é superior a 12 milhões de toneladas. No entanto, esta cultura ainda apresenta baixa produtividade média, cerca de 5,4 mil kg ha⁻¹, (CONAB, 2015) decorrente, principalmente, de perdas ocasionadas por doenças (MIAH et al.,2017). Dentre essas, a brusone é considerada a principal doença de importância econômica e científica mundial. Essa doença tem grande importância econômica, pois é fonte de calorias para mais de 3 bilhões de pessoas, logo, o patógeno pode ter efeitos catastróficos no cenário mundial, além disso, o patógeno é um modelo muito utilizado para o estudo das interações planta-patógeno (DEAN et al., 2012). A brusone do arroz é uma doença de difícil controle, pois o patógeno *Magnaporthe oryzae* B. Couch sp. Nov. apresenta alta variabilidade genética e ampla gama de hospedeiros. Os principais métodos de controle atualmente consistem no uso de cultivares resistentes e de fungicidas, utilizados de forma integrada no manejo da cultura. A utilização de cultivares resistentes tem sido o método mais eficaz (EPAGRI, 2010), porém a alta variabilidade genética do fungo dificulta o desenvolvimento de novas cultivares com uma resistência genética duradoura (SCHEUERMANN; RAIMONDI, 2012).

O aumento no número de consumidores que optam por produtos livres de agroquímicos, a elevação nos custos da produção e a contaminação do ambiente por agroquímicos demonstra a necessidade de procurar métodos alternativos para o controle de doenças. Neste contexto, a indução de resistência tem se mostrado uma alternativa promissora e complementar ao controle químico e genético convencional (MISHRA, 2011). Dentre os indutores, o ASM mostrou-se particularmente efetivo em plantas dicotiledôneas como pepino, fumo e feijão. Em plantas monocotiledôneas, o composto reduziu a severidade de oídio do trigo entre 64 e 77 % em experimentos de campo (STADNIK; BUCHENAUER, 1999).

Os polissacarídeos algais, caracterizados como indutores naturais, são abundantes na natureza. As algas têm grande potencial para geração de novas tecnologias agrícolas, uma delas, é a capacidade de estimular o crescimento das plantas e protegê-las contra patógenos (STADNIK; DE FREITAS, 2014). Alguns trabalhos demonstram resultados promissores com polissacarídeos algais em espécies de plantas, tais como no controle de *Colletotrichum* sp. em macieira (*Malus domestica*) (ARAÚJO

et al. 2008) *Blumeria graminis* em trigo (*Triticum aestivum*) e cevada (*Hordeum vulgare*) (PAULERT et al., 2010). Nesse contexto, os polissacarídeos algais mostram grande potencial comercial para atender as necessidades do mercado agrícola como a produção de alimentos livres de agrotóxicos. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial dos compostos bioativos, na maioria polissacarídeos, no controle da severidade da brusone em plantas de arroz.

2. OBJETIVOS

2.1.GERAL

Avaliar o efeito de compostos bioativos, na maioria polissacarídeos, na redução da severidade da brusone do arroz (*Oryza sativa*);

2.2.ESPECÍFICOS

- Testar o efeito de compostos bioativos na severidade de brusone plantas de arroz;
- Avaliar o efeito da concentração dos ASM sobre o crescimento micelial de *M. oryzae* “*in vitro*”;
- Monitorar o desenvolvimento de estruturas pré-infectivas do fungo *M. oryzae* em lâminas de poliestireno;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.O HOSPEDEIRO: *Oryza sativa* L.

O arroz (*Oryza Sativa* Linnaeus) é uma espécie anual classificada como planta de sistema fotossintético C3, pertencente à família Poaceae (KHUSHI, 1997). É o segundo cereal com maior produção mundial (USDA, 2017), sendo cultivado e consumido em todos os continentes, destaca-se por ser um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, servindo de base alimentar para bilhões de pessoas (SOSBAI, 2014).

O arroz desempenha papel de importância social e econômica, sendo capaz de suprir 20 % da energia e 15 % da proteína necessária para um indivíduo adulto, além de conter vitaminas e sais minerais. Além disso, a cultura é muito versátil, adaptando-se a diferentes condições ambientais e apresentando grande potencial para o combate da fome no mundo (FAO, 2016).

Segundo informações da FAO (2017) a produção mundial é de 741 milhões de toneladas, das quais a China contribui com 27 % da produção, seguida pela Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã e Tailândia que produzem 203, 159, 71, 52, 44 e 39 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil situa-se em 9º lugar, com uma produção correspondente a 1,6 % da mundial.

A produção brasileira é de 10,6 milhões de toneladas de arroz na última safra, maior produtor no Mercosul (FAO, 2016). Dentre as regiões produtoras do país, a região Sul é responsável por 87,6 % da produção nacional, sendo que o Rio Grande do Sul responsável por mais de 76 % do total produzido no Brasil. Santa Catarina é o segundo maior produtor de arroz (8 a 9 %), a alta produtividade é um dos pontos fortes do estado, chegando a 15 mil kg ha⁻¹ (CONAB, 2016).

A expansão expressiva na produção do arroz deve-se a crescente necessidade de alimentos, evidenciando um grande desafio de alcançar altos padrões de qualidade e de produtividade. (MIELEZRSKI et al., 2009). Estima-se que a produção de arroz deverá aumentar em 30 % nos próximos 20 anos para acompanhar o crescimento da população e da economia. Portanto, o aumento do potencial de produtividade desta cultura é de extrema importância para que o arroz possa continuar a ter ampla disponibilidade para toda a população (PENG et al., 1999; RABELLO et al., 2006). Contudo, as doenças, principalmente as causadas por fungos, são os principais problemas da orizicultura mundial, reduzindo a produtividade e afetando a qualidade dos grãos e sementes

(PRABHU et al., 2006). Entre as inúmeras doenças que prejudicam a cultura do arroz irrigado, a brusone é a mais agressiva, em lavouras com cultivares suscetíveis e condições favoráveis, as perdas podem chegar a 100 % (SANTOS et al., 2002).

3.2. BRUSONE DO ARROZ

A brusone foi relatada pela primeira vez como “febre do arroz” na China, em 1637 (OU, 1972). A doença foi registrada em quase todas as regiões do mundo que cultivam arroz, sendo considerada a doença mais importante da orizicultura mundial (Figura 1).



Figura 1 - Distribuição mundial da brusone do arroz. Pontos em vermelho demarcam 85 países ou regiões onde a doença foi identificada. Fonte: Wang et al., 2014.

3.3. ETIOLOGIA

O fungo *Magnaporthe oryzae* é classificado da seguinte forma (INDEX FUNDORUM, 2018):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Sordariomycetidae

Família: Magnaporthales

Gênero: Magnaporthaceae

Espécie: *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch

Anamorfo: *Pyricularia oryzae* Cavara 1892

No arroz, a brusone é causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*, primeiramente descrito por Cavara em 1891 (OU, 1985), seu teleomorfo é o ascomiceto filamentosos *Magnaporthe oryzae* originalmente descrito por Herbert em 1971. Durante muitos anos, o descritor específico dos isolados do patógeno que infectavam o arroz eram denominados *oryzae* e os isolados que afetam outras espécies como *grisea*. Essa classificação não tinha embasamento científico para diferenciar morfológicamente os isolados de arroz de isolados de outras espécies, então, foi estabelecido que todos os membros do grupo seriam designados como *M. grisea* ou *P. grisea* (ROSSMAN et al., 1990). Entretanto, Couch & Kohn (2002) realizou estudos usando genealogias de genes multilocus e demonstrou que isolados do patógeno que infectavam *Digitaria* spp. eram diferentes, assim, o Comitê Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN) estabeleceu que esses isolados seriam designados como *M. grisea*, enquanto os isolados que afetam o arroz e as demais espécies seriam identificados como *M. oryzae*.

O anamorfo *P. oryzae* infecta mais de 80 gêneros de espécies vegetais, em especial nas culturas do arroz e do trigo (PURCHIO; MUCHOVEJ, 1994). O fungo é heterotático e apresentam conidióforos longos, septados, simples ou em fascículas, raramente ramificados, simpodiais, geniculados com a parte basal do conidióforo mais larga (ELLIS, 1971; HAMER et al., 1988; APUD PRABHU; FILIPPI, 2006). Os conídios produzidos são periformes, hialinos, com base circular e ápice fino, normalmente com dois septos transversais, raramente sendo encontrados conídios com um ou três septos, ligam-se ao conidióforo pelo lado mais dilatado, medindo entre 17-23 µm de comprimento por 8-11 µm de largura (BEDENDO, 1997; PRABHU; FILIPPI, 2006). O teleomorfo *M. oryzae* nunca foi encontrado na natureza, porém foi reproduzido em laboratório. Essa fase produz ascósporos hialinos, tipicamente fusiformes com três septos e envolvidos por asco unitunicado (SCHEUERMANN; RAIMONDI, 2012).

3.4.CICLO DE VIDA

O fungo ataca plantas de arroz em todas as fases de desenvolvimento e pode infectar folhas, caules, nós e panículas. O patógeno é hemibiotrófico, passando por uma fase biotrófica inicial, na qual o sistema imunológico da planta é anulado, e então torna-se necrotrófico, causando a morte celular do tecido (PRABHU et al., 2002; 2009).

A maturação do conídio ocorre enquanto ainda ligado ao conidióforo (HAMER, et al., 1988). Para provocar infecção nas plantas, o conídio deve primeiro aderir à superfície foliar hidrofóbica, composta de uma cutícula cerosa. Os conídios tricelulares produzem uma mucilagem na célula apical ou basal, que em contato com a água, adere o conídio à superfície hidrofóbica da folha de arroz. A germinação de esporos é rápida, dentro de duas horas após a deposição na folha um tubo germinativo é formado (YAN; TALBOT, 2016).

O tubo de germinativo normalmente emerge de uma das células apicais dos conídios e estende-se para a uma curta distância antes de formar o apressório em forma de cúpula. O apressório tem parede celular rica em quitina e uma camada de melanina entre a parede celular e a membrana plasmática, essencial para a geração de turgor, pois fornece uma camada impermeável contra o efluxo de soluto do apressório. O turgor celular é expressado em força mecânica, forçando a hifa através da cutícula dos tecidos das folhas. A penetração ocorre de forma biotrófica, as hifas invasivas são envolvidas por uma membrana que a separa do citoplasma do hospedeiro e colonizam a célula (TALBOT, 2003).

Após a colonização inicial, as hifas migram para as células vizinhas por plasmodesmatas, sem causar danos a parede celular. Essa migração, faz com que a primeira célula infectada perda sua efetividade, iniciando a fase necrotrófica (Figura 2). As primeiras lesões são observadas dentro de 4 a 5 dias. A alta umidade relativa do ar ($\leq 93\%$) faz com que os conídios sejam liberados em menos de 24 h após o aparecimento das lesões. A disseminação dos esporos ocorre rapidamente através do vento e pelo respingo das gotas de orvalho (SCHEUERMANN; RAIMONDI, 2012).

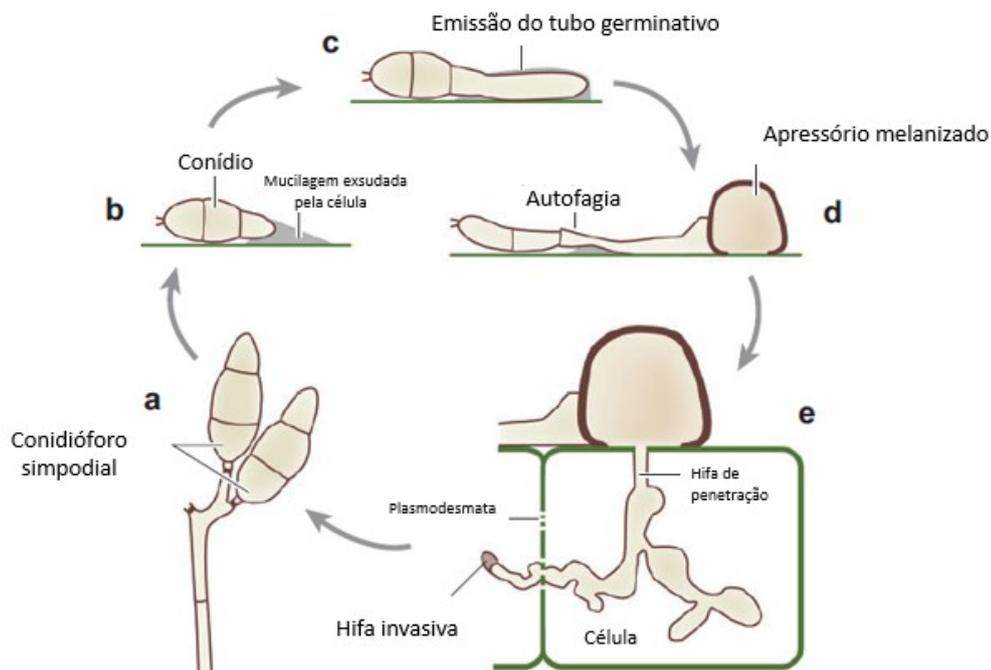


Figura 2 - Ciclo da doença de *Magnaporthe oryzae*. (a) Os conídios estão aderidos em conidióforos simpodiais. Uma única lesão foliar com múltiplos conidióforos pode descarregar até 20000 conídios por noite durante 20 dias; (b) O conídio de três células se adere ao hospedeiro via mucilagem exsudada pela célula do fungo; (c) O conídio requer água livre para germinar - um pequeno tubo germinativo emerge e forma um apressório; (d) O apressório melanizado se forma em resposta aos sinais do hospedeiro, como superfície rígida e hidrofóbica, além de ausência de nutrientes; (e) o apressório melanizado se desenvolve e faz pressão de turgescência dentro do apressório empurrando um pino de penetração atravessando a cutícula e a parede celular; as hifas se espalham de célula para célula provavelmente via plasmodesmata. A doença epidêmica é causada pelo vasto número de conídios que são liberados das lesões da doença no arroz; a doença é policíclica. Adaptado de (EBBOLE, 2007).

3.5.SINTOMATOLOGIA

A brusone pode causar sintomas em toda a parte aérea das plantas, manchas nas folhas, colmos, panículas e grãos (TALBOT, 2003). Nas folhas, os sintomas iniciam por pequenas manchas azul-esverdeadas ou castanho-esverdeadas, circundados por um halo amarelo. Após, evoluem para manchas alongadas de diamante, com bordos irregulares e de coloração marrom ou avermelhadas, com centro acinzentado ou esbranquiçado (Figura 3) (BEDENDO, 1997). A área necrótica na junção da área foliar e da bainha pode levar a morte de toda a folha, chamada de "podridão do colo". O fungo pode infectar o nó logo abaixo da panícula resultando em uma lesão marrom ou preta que circunda o nó inteiro, podendo comprometer a estruturação da panícula e/ou a qualidade dos grãos (WEBSTER; GUNNEL, 1994).



Figura 3 - Sintomas de brusone em folhas de *Oryza sativa* causado por *Magnaporthe oryzae*. Fonte: Próprio autor, (2015).

3.6.MECANISMOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA

O patógeno apresenta um grande número de raças (OU, 1972). Tharreau et al. (2009) estudou a estrutura populacional e a migração e a diversidade de *Pyricularia oryzae*, foram genotipados mais de 1.700 isolados de 40 países. O estudo mostra que existe alta diversidade genética do fungo entre os continentes, e que, por exemplo, em países europeus os isolados são significativamente diferentes de Indonésia e Madagascar. Isso sugere migrações limitadas entre essas regiões.

A existência de alta diversidade genética e surgimento de novas raças virulentas do fungo sugerem que mecanismos diferentes atuam sobre o modo de criação de variabilidade genética em *M. oryzae*. Entre os mecanismos de variabilidade genética de *M. oryzae* estão a recombinação sexual, a parassexualidade e a ocorrência de mutações, deleções de genes avirulência e inserções de outros elementos. A parassexualidade envolve a formação de tubos de anastomose, resultando em células heterocarióticas, que podem sofrer cariogamia (fusão de núcleo), tornando-se uma célula diploide, que pode realizar a recombinação mitótica. Esse evento, apesar de raro, é um indício de que a recombinação parassexual esteja ocorrendo na natureza, sendo um dos possíveis

responsáveis pelo surgimento de novos patótipos (SCHEUERMANN; RAIMONDI, 2012).

A interação *M. grisea* – arroz é regida pela teoria gene-a-gene proposta por Flor (1947). O modelo da interação gene-a-gene propõe uma interação do tipo receptor-elicitador. Assim, o gene de resistência do hospedeiro codifica uma proteína receptora que reconhece determinada molécula elicitora (efetores Avr) produzida pelo patógeno (Camargo, 1995).

Os efetoras Avr são moléculas que o patógeno secreta no citoplasma da célula do hospedeiro e podem ser reconhecidas direta ou indiretamente pelas plantas por uma proteína de resistência (R) de mesma origem, causando uma resposta de hipersensibilidade efetiva. Segundo Liu et al. (2013) já foram identificadas algumas proteínas efetoras de *M. oryzae* e caracterizadas, incluindo efetores Avr (PWL1, PWL2, AvrPi-ta, AvrPiz-t, AvrPia, AvrPii, Avr-Pik/km/kp, ACE1 e AVR1-CO39) e BAS (Biotrophy-associated secreted proteins) BAS1, BAS2, BAS3, BAS4, Slp1 e MC69.

3.7.CONTROLE

O controle da doença pode ser obtido através da nutrição de plantas, práticas culturais, uso de variedades resistentes e o controle químico (MIAH, 2017).

A severidade da brusone é influenciada pela fertilidade do solo. Os níveis elevados de matéria orgânica ou excesso de nitrogênio (maior que 60 kg ha⁻¹) aumenta o risco de resistência não-específica, assim como, a falta desse elemento pode aumentar a suscetibilidade da planta a doença (PHABRU et al., 1996). Portanto, o tipo e a quantidade de fertilizante devem ser aplicados conforme a necessidade, além de adotar práticas culturais como a semeadura em épocas recomendadas e o controle de plantas invasoras, evitando a presença de plantas hospedeiras (SOSBAI, 2014).

A resistência genética é um grande desafio, segundo Monaco et al., (2013) mais de 90 genes de resistência (R) para *M. oryzae* já foram identificados. Desses genes, foram clonados e caracterizados Pib, Pi-ta, Pi9, Pi2, Piz-t, Pi36, Pi37, Pikm, Pit, Pi5, Pid3, Pi54 (Pikh), Pish, Pik, Pik-p, Pia, Pi25, Pb1, Pi1, Pi-d2 e Pi21 (LIU et al., 2013). Esse fato pode ser explicado por estudos realizados no Brasil, demonstrando que as cultivares brasileiras de arroz apresentam uma base genética muito pequena que resulta em 68% dos pools genéticos, considerando as extensas áreas de cultivo de arroz brasileiro (SCHEUERMANN; RAIMONDI, 2012).

A engenharia genética tem avançado nos últimos anos, uma vez que, o controle químico tradicional das doenças tem se deparado com o surgimento de isolados de patógenos resistentes, forçando a busca contínua por novos agentes químicos (STADNIK, 2000).

O controle químico é um método complementar no controle da brusone. No Brasil, os principais grupos químicos utilizados para o controle da doença são triazol, estrobirulina e benzotiazol (AGROFIT, 2016). Recomenda-se, quando há alta incidência, realizar duas aplicações, a primeira no final da fase de emborrachamento (final de R2), e a segunda no pleno florescimento (entre R3 e R4). Em situações de incidência moderada recomenda-se uma única aplicação, quando cerca de 5 % das plantas estiverem florescidas (Estádio R3) (EPAGRI, 2018).

A conscientização cada vez maior da população em relação à conservação do meio ambiente e saúde humana, bem como a utilização demasiada de agroquímicos têm pressionado o setor produtivo para que ocorra uma redução ou eliminação do uso de agrotóxicos. Portanto a busca por novas estratégias para a proteção das plantas contra as doenças torna-se uma necessidade (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995). Nesse contexto, a indução de resistência tem mostrado grande potencial no controle de doenças (STADNIK, 2000). A resistência induzida envolve a ativação de mecanismos de resistência latentes nas plantas em resposta ao tratamento prévio com agentes naturais ou sintéticos (STADNIK, 2000).

3.7.1. USO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA

As plantas estão em contato contínuo com inúmeros patógenos, levando ao desenvolvimento de complexos mecanismos de defesa. Esses mecanismos podem ser físicos e químicos pré-existentes, tais como: camadas de cera, cutícula, adaptações em estômatos e compostos fungitóxicos (AGRIOS, 2005).

As plantas também possuem mecanismos que são ativados após o reconhecimento do patógeno, os quais envolvem a 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 (AGRIOS, 2005). A percepção de moléculas sinalizadoras é iniciada com um influxo de cálcio e uma explosão oxidativa, seguido da síntese do ácido salicílico, ácido jasmônico e/ou etileno (CLUZET et al., 2004). Assim, a resistência induzida pode ser evidenciada pela

redução no tamanho e/ou número de lesões causadas no hospedeiro pelo patógeno, resultando em um atraso no desenvolvimento da doença (STADNIK; MARASCHIN, 2004; VAN LOON et al., 2006).

Existem inúmeras moléculas que podem induzir localmente ou sistematicamente resistência contra patógenos (WALTERS et al., 2013). Os indutores de resistência podem ser classificados, quanto à origem, em naturais e sintéticos. Dentre os indutores naturais, podem ser citados dissacarídeos glicosídicos como a trealose (ARGUELLES, 2000) e polissacarídeos algais, como laminaranas, carragenanas e ulvanas (STADNIK; DE FREITAS, 2014). Dentre os indutores sintéticos, destaca-se a utilização de sacarina e derivados do ácido salicílico como o acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion®, Syngenta) (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

Estudos têm mostrado que o ácido salicílico (AS) é um sinal endógeno e chave de respostas de defesa da planta. A aplicação exógena de AS ativa a resistência adquirida sistêmica e local e uma ampla variedade de espécies de plantas, conferindo uma proteção sistêmica da planta à infecção por uma ampla gama de patógenos, requerendo para tal, uma molécula sinalizadora de baixo peso molecular, como o ácido salicílico (REYMOND; FARMER, 1998; DURRANT; DONG, 2004). Essas moléculas, ativam genes relacionados à patogênese (PR-genes) que, por sua vez, se expressam através da síntese de proteínas relacionadas à patogênese (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; VLOT et al., 2009). As plantas reagem efetivamente contra patógenos biotróficos, barrando a infecção causada por fitopatógenos, este mecanismo é conhecido como reação de hipersensibilidade (HR). A HR é um processo que responde com a morte rápida e programada das células no entorno dos sítios de infecção, restringindo a colonização do patógeno e impedindo o estabelecimento da doença. Esta reação acontece por meio da expressão de genes de defesa, que realizam a síntese de lignina e principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CAMEJO et al., 2016).

Nesse contexto, a Alemanha produziu e liberou comercialmente um produto chamado de éster S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7 carbotióico (Bion, BTH, ASM) como o primeiro ativador de defesa vegetal (REZENDE et al., 2005). O produto foi originalmente comercializado para o controle de oídio em trigo e cevada na Europa, e, de fato, mostraram reduzir a severidade de oídio no trigo entre 64 e 77 % em experimentos de campo (STADNIK; BUCHENAUER, 1999). Em trabalhos realizados

com tabaco, o ASM controlou 99 % da doença contra *Pseudomonas syringae* pv. tabaci (COLE, 1999), 91% *Cercospora nicotiana* (PEREZ et al., 2003), e 89 % *Alternaria alternata* (PEREZ et al., 2003).

O ASM, análogo do AS, mostrou-se particularmente efetivo em plantas dicotiledôneas como pepino, tabaco e feijão, e em plantas monocotiledôneas com várias aplicações do produto, sendo que uma única aplicação do ASM em arroz propiciava uma proteção bastante longa contra *M. grisea* (CAVALCANTI et al., 2005). Entretanto, segundo os estudos de Kogel & Laugen (2005) o indutor não foi eficiente, pois essa Poaceae já possui uma alta concentração endógena de AS livre e o aumento nos níveis dessa substância quando as plantas são infectadas pelo patógeno não é observado.

A sacarina (ortho sulphobenzamide) é um adoçante artificial muito utilizado na indústria alimentícia. Além disso, tem sido usada para induzir resistência em leguminosas diversos patógenos (DELGADO et al., 2013). Sendo um dos principais metabolitos de probenazole (C₁₀H₉NO₃S), esse fungicida triazol vem sendo utilizado para estimular os mecanismos de defesa em plantas de arroz contra cretamento bacteriano causado por *Xanthomonas oryzae* e a brusone causada por *M. grisea* (IWATA, 2001).

Dentre os indutores naturais, a trealose (α -D-glucopyranosyl-[1-1]- α -Dglucopyranoside) é um dissacarídeo não redutor constituído por duas unidades de glicose com ligação α 1-1 comumente encontrado como um carboidrato de armazenamento em células eucarióticas (ARGUELLES, 2000) e associado a vários estresses ambientais (THEVELEIN, 1984). Em plantas de trigo, a trealose reduziu a severidade de oídio (*Blumeria graminis* f. sp. tritici) em 50 % e 95 % com uma e três aplicações foliares, respectivamente (REIGNAULT et al. 2001).

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais de unidades monossacarídeas geralmente de seis carbonos (C₆H₁₀O₅) n onde "n" está entre 20 e 3000. Pontualmente, os polissacarídeos contêm mais de 20 unidades de monossacarídeos tais como glucose e frutose. Esses carboidratos podem ser hidrolisados em oligossacarídeos, dissacarídeos ou monossacarídeos usando métodos químicos, físicos ou bioquímicos (STADNIK, 2014)

A laminarana é um polissacarídeo linear constituído por 25 a 50 unidades de glicose ligadas por ligações β -1,3-glicosídicas e, em alguns casos, com ligações β -1,6-glicosídicas, encontrada em algas marrons. Esse polissacarídeo é capaz de estimular

reações de defesa em uma ampla gama de espécies vegetais, tais como fumo (*Nicotiana tabacum*) (KLARZYNSKI et al., 2000), videira (*Vitis vinifera*) (AZIZ et al., 2003) e arroz (*Oryza sativa*) (INUI et al., 1997). Estas respostas típicas incluem a ativação de proteínas quinases, influxo de Ca^{2+} , explosão oxidativa e alcalinização do meio extracelular, expressão de genes relacionados à defesa da planta, aumento da atividade quitinase e glucanase e, a produção de fitoalexinas. Quando aplicada em fumo ou videira, a laminarina induz, sem desencadear reação de hipersensibilidade, o acúmulo de fitoalexinas e a expressão de um conjunto de proteínas PR (KLARZYNSKI et al., 2000; AZIZ et al., 2003).

As carragenanas são colóides hidrofílicos extraídos de espécies de algas vermelhas, principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Eucheuma* e *Kappaphycus* (TRONO, 1997), representando 30 a 75 % do peso seco das algas. São polissacarídeos sulfatados lineares constituídos por um esqueleto central de D-galactose sulfatada em diferentes posições ligadas a unidades de anidrogalactose em alguns casos. A carragenana lambda é formada por uma D-galactose sulfatada em C2 ligada a uma D-galactose sulfatada em C2 e C6 e a carragenana iota é constituída por uma galactose sulfatada em C4 ligada a uma anidrogalactose sulfatada em C2 (MOENNE, 2009).

A ulvana, por sua vez, é um heteropolissacarídeo sulfatado solúvel em água, extraído das paredes celulares de algas marinhas dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*, composta por ramnose, xilose, glicose manose, galactose e ácidos urônicos (LAHAYE; ROBIC, 2007; ROBIC; SASSI; LAHAYE, 2008; PAULERT et al., 2009).

Estudos recentes demonstram que a via de sinalização do ácido jasmônico está envolvida na indução de resistência pela aplicação de ulvana (JAULNEAU et al., 2010). A ulvana pode controlar, além de patógenos necrotróficos (ARAÚJO et al., 2012), biotróficos (BORSATO et al., 2010; PAULERT et al., 2010) e hemibiotróficos (PAULERT et al., 2009; DE FREITAS; STADNIK, 2012).

Alguns trabalhos demonstram resultados promissores com polissacarídeos algais em espécies de plantas, tais como no controle de *Colletotrichum* sp. em macieira (*Malus domestica*) (ARAÚJO et al. 2008) *Blumeria graminis* em trigo (*Triticum aestivum*) e cevada (*Hordeum vulgare*) (PAULERT et al., 2010). Segundo Schons et al. (2011), a aplicação foliar preventiva de ulvana (10 mg mL^{-1}) reduziu a severidade da antracnose (*C. lindemuthianum*) em cerca de 50 % e protegeu as plantas de feijão por um período prolongado.

A capacidade da ulvana de induzir respostas de defesa mais rápidas e intensas se submetidas ao ataque de patógenos foi recentemente relatada (PAULERT et al., 2010), onde a pré-incubação de culturas de células de trigo e arroz com o polissacarídeo amplifica drasticamente a explosão oxidativa elicitada pela aplicação posterior de quitina (DE FREITAS; STADNIK, 2012).

Além disso, alguns estudos têm indicado que a composição, estrutura primária, alta conformação, solubilidade, viscosidade e distribuições de peso molecular de polissacarídeos tem grande influência sobre suas atividades (CHEN; WANG, 1997). No trabalho de Qi et al. (2005) foram testadas ulvanas despolimerizadas por peróxido de hidrogênio, resultando em superóxidação significativa e atividade de eliminação de radicais. A ulvana UDP₃ (menor peso molecular) mostrou-se com maior atividade antioxidante. Esses produtos derivados da despolimerização de ulvana podem ser testados para indução de resistência, uma vez que, existem resultados promissores com a ulvana no controle de doenças.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ORIGEM E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS

O isolado patogênico LFEEI08 pertencente à raça IC-14 de *Magnaporthe oryzae* foi fornecido pelo pesquisador Klaus Konrad Scheuermann da Estação Experimental da Epagri (Itajaí/SC) e utilizado em todos os ensaios.

Para conservar o fungo, o isolado foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultivo de aveia (60 g de aveia: 12 g de ágar) e papel de filtro (Unifil - 125 mm) de aproximadamente 1 cm² esterilizado sobre o meio de cultura de aveia. Após a colonização do papel de filtro, este foi transferido para a placa de Petri vazia e esterilizada, para secagem em dessecador a vácuo de vidro sob temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C por 10 dias. Os fragmentos do papel inoculados foram armazenados em tubos de centrifugação tipo Falcon, devidamente identificados, e armazenados em freezer sob temperatura de aproximadamente -10 °C. (SONE et al., 2013).

4.2. OBTENÇÃO DE CONÍDIOS

Para a recuperação do isolado, os fragmentos de papel de filtro armazenados em freezer foram depositados, em condições assépticas, imediatamente sobre meio de cultura 60 g de aveia (Quaker®): 12 g de ágar (Dinâmica®), adaptado de (AGRAWAL et al., 2001). Após 10 dias de incubação do isolado à temperatura média de 25 °C e 12 h de fotoperíodo (lâmpada de luz ultravioleta, Sylvania, F15T12/LN), micélios de coloração cinza-esverdeados desenvolveram recobriram o meio de cultura

Para obtenção da suspensão conidial foram transferidos dois discos de micélios com 10 mm de diâmetro para uma placa de Petri, contendo meio de cultura aveia: ágar. O isolado foi incubado por 10 dias em câmara de crescimento com luz NUV (330-360 nm) à temperatura média de 25 °C e sob luz contínua, adaptado de Urashima et al. (2004). Posteriormente, foi adicionado água destilada estéril sobre os micélios, removendo-os por fricção suave da superfície da colônia com alça de Drigalsky, as placas de Petri ficaram inclinadas sobre um papel toalha até a secagem, foram vedadas com plástico filme PVC e perfuradas para permitir aeração.

As colônias ficaram expostas a condições de luz fluorescente contínua por 3 dias em câmara de crescimento com luz NUV, à temperatura média de 25 °C, para a indução da esporulação. Os conídios foram removidos por fricção suave da

superfície da colônia com alça de Drigalsky e a suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze estéril (RIOS et al., 2014). A concentração de conídios na suspensão foi ajustada para $2,5 \times 10^5$ conídios mL⁻¹, com auxílio de hemacitômetro tipo Neubauer.

4.3.CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS PLANTAS

As plantas de arroz foram cultivadas em casa-de-vegetação nas dependências físicas da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. As cultivares de arroz irrigado utilizadas foram Epagri 106, SCS 118 Marques e Epagri 109, classificadas por Vieira et al., (2007), como resistente, mediamente resistente e suscetível, respectivamente.

As sementes das cultivares foram fornecidas por pesquisador Klaus Konrad Scheuermann da Estação Experimental da Epagri (Itajaí/SC) e semeadas em bandejas plásticas prestas de 15 células Nutriplan (2,7 L) com uma mistura de solo argiloso e composto orgânico (3:1; v/v) no sistema de cultivo mínimo e irrigado com a mesma quantidade de água nas parcelas de acordo com a necessidade da cultura. A semeadura foi realizada com profundidade inferior a 2 cm, segundo as recomendações de Arroz Irrigado (Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil). A fertilização foi realizada após o preparo do solo com 25 mL de uma solução nutritiva em cada parcela contendo N, P₂O₅, Mn, Zn com 10,8, 8, 0,1, e 2,5 mg L⁻¹, respectivamente. O desbaste ocorreu com dez dias após a emergência, deixando 15 plantas por parcela.

As temperaturas máximas (T °C máx) e mínimas (T °C mín) foram monitoradas através de um termômetro durante a condução dos experimentos em casa-de-vegetação entre o mês de março/maio (17 °C mín. /35 °C máx.) e agosto/setembro (16 °C mín/31 °C máx). A insolação total diária foi conferida através dos dados do INMET para Florianópolis/SC, a média entre os períodos de março/abril/maio foi aproximadamente de 6 h/dia e entre agosto/setembro de 8 h/dia.

4.4.TRATAMENTOS

O polissacarídeo ulvana foi obtido das algas verdes *Ulva* spp. e envolveu autoclavagem, filtração e precipitação em etanol, conforme metodologia descrita por Paulert et al. (2009).

Para a obtenção de frações contendo ulvanas despolimerizadas (UDP), a solução de ulvana (2,5 %, p/v) foi dissolvida em água destilada deionizada. A solução foi então colocada em um frasco reagente de vidro borosilicato e despolimerizada com H_2O_2 (8 %:8 mL de H_2O_2 a 30 % em 100 mL de água destilada). As temperaturas e os tempos no processo de despolimerização são mostrados na Tabela 1. Após a degradação, a solução foi arrefecida até à temperatura ambiente e liofilizada (FreeZone 6, EUA), adaptado de Qi et al., (2005).

Tabela 1 - Condições em que a ulvana foi submetida para a degradação de H₂O₂ e obtenção das oligoulvanas.

Amostras	Temperatura (°C)	Tempo (h)
UDP ₁	30	3
UDP ₂	30	5
UDP ₃	50	7
UDP ₄	30	9

UDP = Ulvanas despolimerizadas.

Os demais açúcares algais, isto é, ι-carragenana, λ-carragenana, e laminarana, foram adquiridos de Sigma-Aldrich, com grau de pureza mínimo de 99,5 %. O derivado de benzothiadiazole, isto é, o acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion[®] 500 WG, Münchwilen, Suíça) e sacarina foram adquiridos da Syngenta (São Paulo, Brasil) e Sigma-Aldrich (Missouri, EUA), respectivamente. O dissacarídeo trealose foi adquirido de Sigma-Aldrich com grau de pureza 98 % (São Paulo, Brasil).

4.5. TESTE “*IN VIVO*”

Os compostos bioativos foram testados em casa-de-vegetação. Antes da aplicação, os tratamentos foram completamente dissolvidos em água destilada sob agitação contínua com auxílio de um agitador magnético, durante 60 min, e temperatura ambiente. A concentração dos tratamentos foi baseada na literatura conforme indicado na Tabela 2:.

Tabela 2 - Tratamentos, concentração e referência dos compostos bioativos que foram testados para o controle de *M. oryzae* em plantas de arroz (*Oryza sativa*).

Tratamentos ^a	Concentração (mg mL ⁻¹)	Referência
H ₂ O (Testemunha)	-	-
ASM	0,15 (i.a.)	RIOS et al. (2014)
Sacarina	0,24	DELGADO et al. (2013)
Trealose	15	REIGNAULT et al.(2001)
Carragenana Iota	1	SANGHA et al. (2010)
Carragenana Lambda	1	SANGHA et al. (2010)
Laminarana	1	AZIZ et al. (2003)
Ulvana	10 (ps)	PAULERT et al. (2009); DE FREITAS et al. (2011)
UDP ₁	10 (ps)	-
UDP ₂	10 (ps)	-
UDP ₃	10 (ps)	-
UDP ₄	10 (ps)	-

^aASM, acibenzolar-S-metil; UDP = ulvanas despolimeridas; i.a., ingrediente ativo; ps, peso seco.

Para testar a eficiência dos compostos bioativos no controle da severidade de brusone, os tratamentos foram divididos em dois ensaios, o primeiro com ulvana, UDP₁, UDP₂, UDP₃ e UDP₄ e, o segundo, com ASM, ι-carragenana, λ-carragenana, laminarana, sacarina e trealose. Plântulas tratadas com água destilada serviram como testemunhas.

Os tratamentos foram aplicados quando as plântulas atingiram o estágio de segunda folha totalmente expandida (HOSHIKAMA, 1975). As plântulas foram pulverizadas 48 horas antes da inoculação com o auxílio de uma pistola acoplada a um compressor de ar (Schulz – Modelo Pinte Fácil).

As plântulas foram inoculadas com suspensão de $2,5 \times 10^5$ conídios mL⁻¹ (4 mL por planta) até o ponto de escorrimento superficial. A inoculação foi realizada com o auxílio de uma pistola acoplada a um compressor de ar (Schulz – Modelo Pinte Fácil). Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em câmara úmida, onde permaneceram a $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ e 100 % UR do ar durante 48 h.

4.5.1. AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DE BRUSONE

Os sintomas de brusone foram avaliados aos 5 dias após a inoculação. Para isso, as folhas foram destacadas e fixadas em uma lâmina transparente A4 (Maxprint). Em seguida, foram escaneadas com resolução de 600 DPI (Impressora Multifuncional EPSON XP - 4200, Japão) para determinar a área foliar necrosada utilizando o Software Quant® V.1.01 (Universidade Federal de Viçosa, 2003). Para montagem da prancha de figuras foi recortado fragmentos do terço médio da segunda folha de cada tratamento.

4.6. TESTES “*IN VITRO*”

4.6.1. AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE *M. ORYZAE*

O tratamento que mostrou eficiência *in vivo* (ASM) foi utilizado nos ensaios *in vitro*. As concentrações de ASM 0,3 e 0,6 mg mL⁻¹, foram adicionadas ao meio BDA (39 g BDA: 1 L de água) (Sigma-Aldrich) a 45 °C, assepticamente, com o auxílio de uma espátula esterilizada antes de vertê-lo.

Para cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de meio foi transferido para o centro um disco de 10 mm de diâmetro contendo meio de cultura e micélio de *M. oryzae*, retirado das bordas de colônias desenvolvidas em meio de aveia, obtido de acordo com metodologia descrita no item 3.2. O fungo foi incubado a 25 °C e luz contínua. Os diâmetros das colônias foram medidos em sentido diametralmente opostos, a intervalos de 2 dias por 10 dias com auxílio de um paquímetro digital (King Tools 150mm x 0,01mm - 502.150BL), adaptado de Oliveira et al., 2015.

4.6.2. DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS

Para avaliação microscópica da germinação de conídios e formação de apressórios, foram realizados ensaios sobre lâminas translúcidas de poliestireno (Euro Sings, São Paulo) de acordo com a metodologia modificada de Gonçalves e Stadnik (2012). As lâminas com 0,8 mm de espessura e dimensões de 25 x 76 mm foram devidamente lavadas em álcool e água destilada estéril, posteriormente esterilizadas com radiação UV por 1h.

Foram distribuídas três gotas de 10 µL de suspensão conidial sobre as lâminas, sendo que cada gota representou um tempo (6, 18 e 24 h), onde foram mantidas no

interior de placas de Petri de 9 mm de diâmetro, a temperatura média de 25 °C, luz contínua e 100 % de umidade relativa do ar. O desenvolvimento foi monitorado a cada duas horas após a incubação (ISHIKAWA *et al.*, 2010). Para microscopia de luz, o fungo foi corado com 10 µL de solução contendo Azul de Amann. A solução de Azul de Amann foi preparada pela adição de 10 mL ácido láctico, 10 mL de glicerina, 10 g de ácido fênico cristalizado, 0,1 g de azul de algodão e 10 mL de água destilada (Sigma-Aldrich®, EUA). Esta solução estoque foi diluída em etanol 96 % (1:2 v/v) (GONÇALVES; STADNIK, 2012)

Para a avaliação, foi selecionada uma gota e quantificado 100 conídios para as seguintes variáveis: a) percentual de germinação; b) percentual de conídios germinados com apressório. Considerou-se germinado o conídio que apresentava um tubo espesso, de comprimento igual ou maior que a largura do conídio ou apressório.

4.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No ensaio *in vivo*, os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, cada uma contendo 15 plantas. Após a verificação da homogeneidade da variância dos dados, estes foram submetidos à análise de variância e transformados ($\sqrt{}$) para atender os pressupostos. O teste de Tukey foi utilizado para a separação de médias ($P \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o software Sisvar (v. 5.6). Os experimentos foram repetidos três vezes, com resultados similares e os valores apresentados neste estudo representam a sua média.

Os dados de crescimento micelial foram analisados utilizando a inclinação (r) da regressão linear ($P \leq 0,05$) e submetidos ao Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o software Sisvar (v. 5.6). Os experimentos foram repetidos duas vezes, com resultados similares, e os valores apresentados neste estudo representam a sua média.

Para o ensaio de determinação de porcentagem de germinação de conídios e formação de apressório delineamento experimental foi completamente casualizado com quatro repetições de cada tempo dentro dos tratamentos. Cada repetição consistiu-se de 100 conídios. Para análise estatística foi utilizado o Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

Em condições de casa-de-vegetação, os primeiros sintomas de brusone foram observados três dias após a inoculação das plantas de arroz nas duas cultivares suscetíveis, isto é, SCS 118 Marques e Epagri 109. A ulvana e suas frações despolimerizadas (UDP₁-UDP₄) não afetaram a severidade da doença nas cultivares SCS 118 Marques e Epagri 109.

O ASM reduziu significativamente a severidade da doença na cultivar SCS 118 Marques (54,9 %) (Figura 4A), quando comparadas às plantas controle (Tabela 3). Não houve diferença significativa quanto à severidade da brusone entre as cultivares SCS 118 Marques e Epagri 109, tanto quando analisadas nos tratamentos individualizados como na média geral. A cultivar Epagri 106 mostrou-se resistente à doença em todos os ensaios, sem apresentar sintomas da doença ao decorrer do tempo.

Tabela 3 - Severidade da brusone em plantas de arroz tratadas com polissacarídeos algais aos 20 dias após a semeadura (segunda folha totalmente expandida).

Tratamento ^a	Severidade (%) ^{bdez}		
	Epagri 106 ^k	SCS 118 Marques	Epagri 109
Testemunha	0	7,1Aa	4,7Aa
ASM	0	3,8Ab	4,6Aa
UDP ₁	0	6,0Aa	5,4Aa
UDP ₂	0	7,8Aa	5,5Aa
UDP ₃	0	7,2Aa	6,3Aa
UDP ₄	0	6,9Aa	6,2Aa
Ulvana	0	6,1Aa	5,7Aa
Média geral	0	6,4Aa	5,4Aa

^aASM (acibenzolar-S-matil), UDP₁, UDP₂, UDP₃, UDP₄ (UDP = Ulvanas despolimerizadas) e Ulvana.

^bPlantas foram tratadas com a segunda folha totalmente expandida 48 horas antes da inoculação com suspensão de $2,5 \times 10^5$ conídios mL⁻¹.

^bDados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, com resultados similares, cada um com três repetições.

^dLetras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa na linha (Teste de Student, $P \leq 0,05$) e coluna (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$), respectivamente. CV=16,15%.

^e Severidade da doença foi avaliada cinco dias após a inoculação (segunda folha totalmente expandida) usando o software QUANT.

^k A cv. Epagri 106 não foi inserida no teste estatístico devido seus valores serem constantemente zero.

No segundo ensaio em casa-de-vegetação, foi detectada uma interação significativa entre tratamento e cultivar (Tabela 4), onde, o ASM reduziu a severidade de brusone na cultivar de arroz Epagri 109 (50,6%) (Figura 4B), mas não na SCS 118 Marques. Os demais tratamentos λ -carragenana, laminarana, sacarina e trealose não afetaram significativamente a severidade de brusone, em nenhuma das cultivares suscetíveis.

Tabela 4 – Severidade da brusone em plantas de arroz tratadas com compostos bioativos aos 20 dias após a semeadura (segunda folha totalmente expandida).

Tratamentos ^a	Severidade da doença (%) ^{bdeh}		
	Epagri 106 ^k	SCS 118 Marques	Epagri 109
Testemunha	0	7,1Aa	7,7Aa
ASM	0	4,3Aa	3,9Ab
Sacarina	0	5,6Aa	4,9Aab
Trealose	0	6,7Aa	5,5Aab
ι -carragenana	0	6,2Aa	7,3Aa
λ -carragenana	0	5,9Aa	5,7Aab
Laminarana	0	4,5Aa	4,9Aab
Média geral	0	5,7Aa	5,7Aa

^aASM (acibenzolar-S-metil), sacarina, trealose, carragenana iota, carragenana lambda, laminarana.

^bPlantas foram tratadas com a segunda folha totalmente expandida 48 horas antes da inoculação com suspensão de $2,5 \times 10^5$ conídios mL⁻¹.

^bDados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, com resultados similares, cada um com três repetições.

^dLetras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa na linha (Teste de Student, $P \leq 0,05$) e coluna (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$), respectivamente. CV=17,61%.

^eSeveridade da doença foi avaliada cinco dias após a inoculação (segunda folha totalmente expandida) usando o software QUANT.

^k A cv. Epagri 106 não foi inserida no teste estatístico devido seus valores serem constantemente zero.

Não houve diferença significativa na severidade entre as cultivares SCS 118 Marques e Epagri 109 quando comparadas dentro de cada tratamento e analisado a média geral. A cultivar Epagri 106 mostrou-se resistente em todos os ensaios, sem apresentar nenhum sintoma da doença até 3 dias após a inoculação.

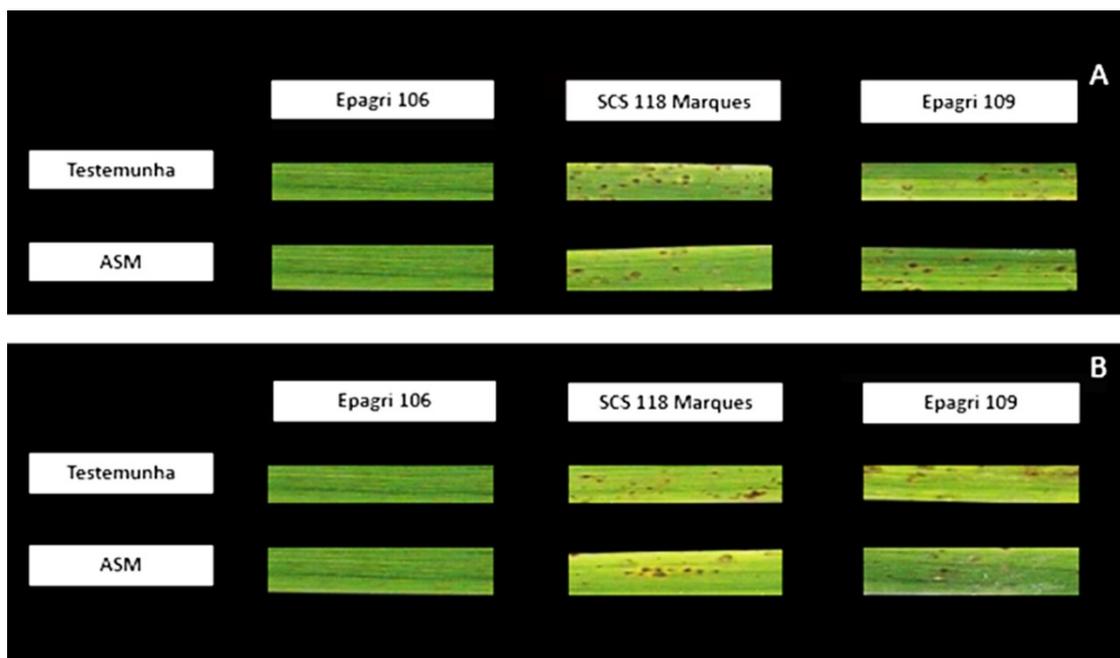


Figura 4 – Sintomas da brusone no terço médio das folhas de arroz (*Oryza sativa*) causada por *Magnaporthe oryzae* aos 3 dias após inoculação de plantas das cv. Epagri 106, SCS 118 Marques e Epagri 109 pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM - 0,15 mg mL⁻¹) 48 h horas antes da inoculação, nos ensaios I (A) e II (B).

A partir dos resultados dos ensaios *in vivo*, pode-se constatar que o ASM tem potencial biológico no controle da doença em casa-de-vegetação, assim foram feitos testes *in vitro* (crescimento micelial e porcentagem de germinação e formação de conídios).

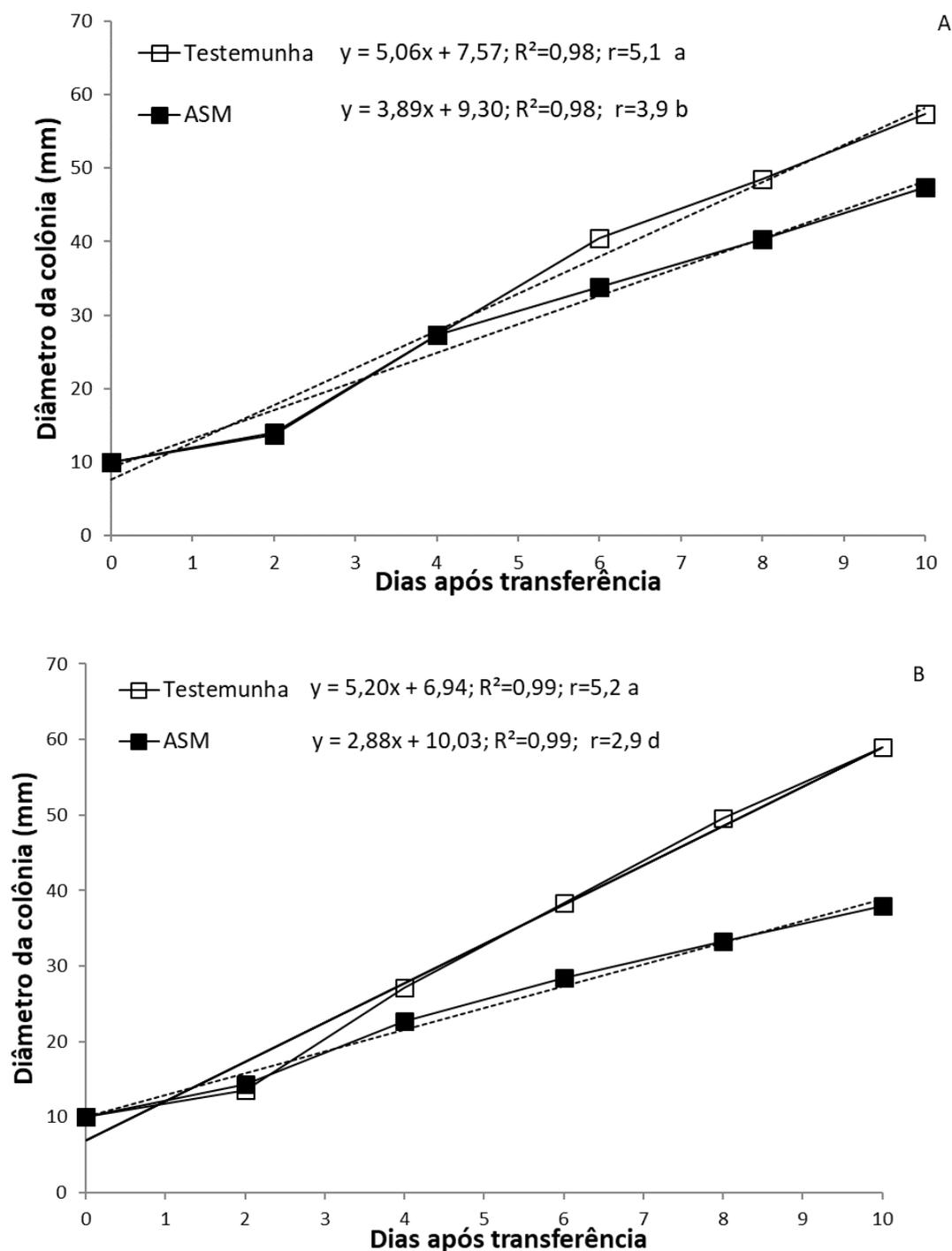


Figura 5 - Diâmetro da colônia tratadas com acibenzolar-S-metil - ASM nas concentrações 0,15 mg mL⁻¹ (A) e 0,30 mg mL⁻¹ (B) aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após transferência de *M. oryzae* para o meio de cultivo BDA. As linhas representam a regressão linear da colonização ao longo do tempo. Os valores médios (y) de todos os tempos foram calculados para cada colônia. Letras ao lado de valores de r indicam significância estatística pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

O cultivo do isolado de *M. oryzae* em meio BDA produziu colônias branco-acinzentadas, lisas e cotonosas. Além, decrescimento micelial linear até a última avaliação, aos 10 dias. A concentração ASM utilizada em casa de vegetação (0,15 mg mL⁻¹) (Figura 5A), reduziu o tamanho da colônia em 17 % em relação à testemunha aos

10 dias após a transferência (Figura 6B). No dobro da concentração (Figura 5B), ASM reduziu o crescimento da colônia ao longo do tempo, redução de 36 % aos 10 dias quando comparada a testemunha (Figura 6C).

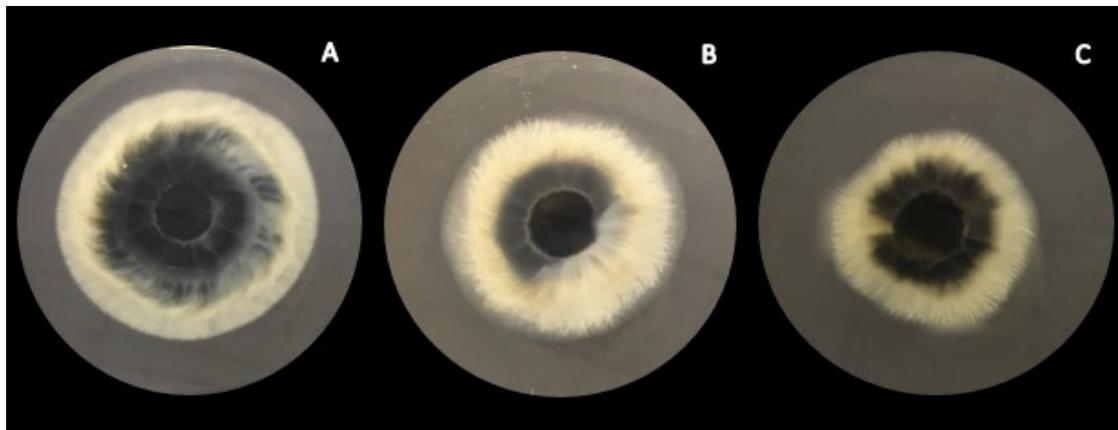


Figura 6 – Diâmetro da colônia tratadas com água destilada – testemunha (A) e acibenzolar-S-metil - ASM nas concentrações $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ (B) e $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$ (C) aos 10 dias após transferência de *M. oryzae* para o meio de cultivo BDA.

A evolução percentual da germinação de conídios foi linear e os tubos germinativos emergiram na célula apical ou basal dos conídios sem ramificações secundárias (Figura 7). O ASM não apresentou diferença na taxa de germinação de conídios quando comparada à testemunha, a taxa foi de 100% às 8 horas após a inoculação (HAI) (Figura 6A).

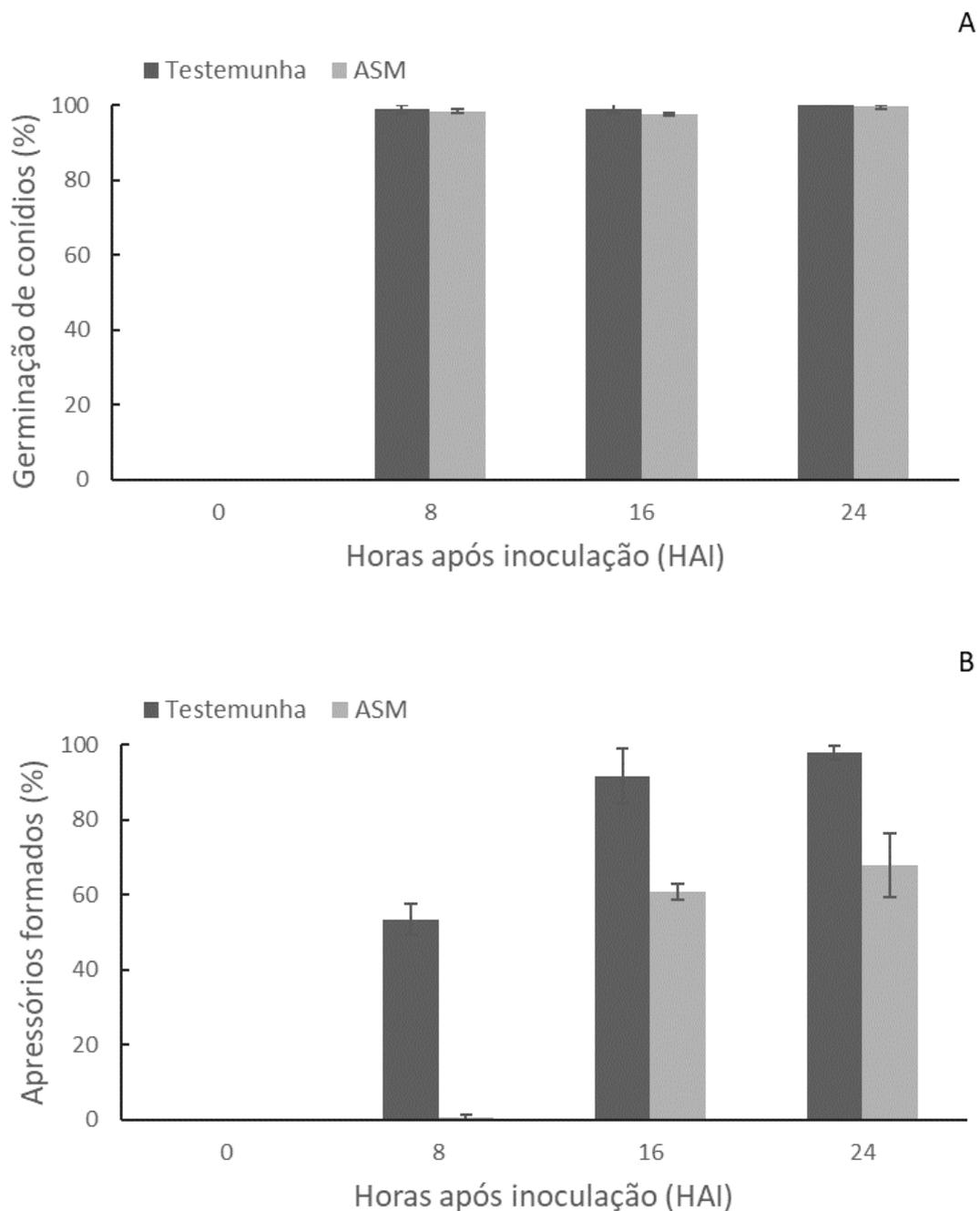


Figura 7– A. Porcentagem de germinação de conídios; B. Germinação de conídios com apressórios melanizados; de *M. oryzae* quando tratados com ASM (acibenzolar-S-metil) e submetidos à temperatura média de ± 25 °C e luz contínua. As barras representam média \pm desvio padrão.

Para formação de apressórios houve diferença significativa em todos os tempos avaliados. A formação de apressórios melanizados no isolado tratado com ASM foi de 68 % as 24 HAI (Figura 6B), os tubos germinativos formaram apressórios completamente melanizados e de forma regular, as 8 horas de incubação.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, as folhas tiveram que ser coletadas para avaliação da severidade da brusone às 72 horas após inoculação, pois a doença se desenvolveu rapidamente após o início da necrose foliar. Isso explica, a porcentagem da severidade da doença obtida. A amplitude térmica, em casa de vegetação, teve uma variação entre 15 a 38 °C, assim, o coeficiente de variação foi relativamente alto (aproximadamente 17 % - dados transformados por $\sqrt{\quad}$) dificultando a observação de diferenças estatísticas, caso elas existissem.

As cultivares testadas demonstraram, em casa-de-vegetação, diferentes níveis de resistência à infecção pela raça IC-14 de *M. oryzae*. Enquanto, a cv Epagri 106 foi totalmente resistente, as cv. SCS 118 Marques e Epagri 109 foram igualmente suscetíveis à brusone.

A cultivar SCS 118 Marques foi classificada como moderadamente resistente (SCHIOCCHET et al. 2014) e a Epagri 109 como suscetível (EPAGRI, 2007) à brusone, quando avaliadas à campo. No entanto, quando as cultivares foram testadas em casa-de-vegetação mostraram-se igualmente suscetíveis à doença. Uma das possíveis explicações, é que a resistência parcial na cultivar SCS 118 Marques possa aumentar gradualmente ao longo do desenvolvimento das plantas (DEVELEY-RIVIÈRE; GALIANA, 2007), uma vez que, a severidade foi avaliada no estágio de plântula. Além disso, sabe-se que as condições ambientais, tais como a temperatura, podem afetar a expressão da resistência parcial (DEADMAN, 2006).

Com exceção do ASM, os demais compostos bioativos não apresentaram eficiência no controle da brusone. O ASM, composto sintético, reduziu significativamente a severidade da doença. A redução da severidade foi de aproximadamente 54,9 % na cv. SCS 118 Marques e 50,6 % na cv. Epagri 109, quando as plantas foram tratadas 48 horas antes da inoculação. No trabalho de Xiuchun, Ge. et.al (1999), a aplicação foliar com ASM (concentração 0,5 mmol / L) reduziu significativamente a severidade da brusone nas plântulas de arroz.

Uma das possíveis explicações para a redução da severidade da doença é a ativação de mecanismos de defesa induzidos pelo análogo do AS. Frequentemente, a expressão da resistência induzida leva a uma redução no tamanho e/ou número de lesões causadas no hospedeiro pelo patógeno, causando um atraso no desenvolvimento da

doença. Estudos realizados por Shimono et al. (2012) em plantas de arroz demonstraram que o ASM induz parcialmente a resistência à brusone no arroz. A resistência induzida pode ser afetada por inúmeros fatores como genótipo, fenologia, idade da planta, nutrição e pressão da doença (WALTERS & FOUNTAINE, 2009).

O desenvolvimento do fungo antes da penetração pode influenciar na severidade da doença. Os resultados obtidos nos testes *in vitro* evidenciaram uma redução de 17 % do crescimento micelial, quando tratado com ASM. Porém, existem estudos comprovando que o composto não tem efeito direto sobre inúmeros patógenos, ou seja, o ASM não é um agente antimicrobiano (FRIEDRICH et al., 1996). No trabalho de Ge-Xiuchun et.al, (1999) os resultados indicaram que o ASM não teve supressão no crescimento micelial e na germinação de conídios de *M. grisea in vitro*.

O ASM não influenciou na taxa de germinação dos conídios, 100 % às 8 HAI. Porém, houve uma redução significativa de 32 % na taxa de formação de apressórios melanizados de *M. oryzae* em superfície hidrofóbica às 24 HAI. É possível que o ASM tenha atrasado a formação de apressórios, implicando na severidade da doença.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se a realização de pesquisas futuras mais aprofundadas na avaliação do efeito sistêmico do ASM em plantas de arroz, bem como, a investigação do seu efeito sobre a formação de apressórios melanizados.

7. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K. et al. **Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice OsPR1a and OsPR1b genes: A model illustrating components participating during defence/stress response.** *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001. v. 39, n. 12, p. 1095–1103.
- AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press. 2001. 635p.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. **Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar a gala em macieira.** *Tropical Plant Pathology*, v. 33, p. 148-152.
- AZIZ, A. et al. **Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopora viticola.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2008. v. 16, p. 1118-1128, 2003.
- BECKERS, G. J. M.; CONRATH, U. **Priming for stress resistance: from the lab to the field.** *Current Opinion in Plant Biology*. 2007. v. 10, p. 425-431.
- BEDENDO, I.P. **Manchas foliares.** In: KIMATI, H. et al. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Esalq. 1997. p. 848-858.
- BORSATO, L. C.; DI PIERO, R. M.; STADNIK, M. J. **Mecanismos de defesa elicitados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro.** *Trop Plant Pathology*. 2010. v. 35, p. 318-322.
- CAMARGO, L.E.A. **Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos.** In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIRM, L. *Manual de Fitopatologia: Fitopatologia: Princípios e conceitos*. São Paulo: Esalq. 1995. p. 455-469.
- CAVALCANTI, L.S, et al. **Indução de resistência a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ. 2005. p. 263
- 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*. 2004. v. 27, n. 7, p. 917–928.
- COLE, D.L. **The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco.** *Crop Prot.* 1997. p. 267–273.
- CONAB. **Acompanhamento safra brasileira grãos, v. 4 Safra 2014/15 - Sexto levantamento, Brasília.** 2015. p. 1-176.
- CONAB. **Acompanhamento safra brasileira grãos, v. 4 Safra 2016/17 - Sexto levantamento, Brasília.** 2017. p. 1-176.
- COUCH, B.C. & KOHN, L.M. **A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae* from *M. grisea*.** *Mycologia*. 2002. v. 94, n. 4 p. 683-693.
- CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. **Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast 'hot spot' site.** *Plant Disease, St. Paul*. 1993. v. 77, p. 1029-1034.

- DEADMAN, M. L. **Epidemiological consequences of plant disease resistance**. In: COOKE, B. M.; JONES, D. G.; KAYE, B. *The epidemiology of plant diseases*. 2. ed. Netherlands: Springer. 2006. p. 139-156.
- DEAN, R. et al. **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**. *Molecular Plant Pathology*. 2012. n.13, p.414–430.
- DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. **Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum***. *Physiological Molecular Plant Pathology*. 2012. v. 78, p. 8-13.
- DELGADO, D. Z.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. **Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*)**. *Crop Protection*. 2013. v. 47, p. 67-73.
- DEVELEY-RIVIÈRE, M. P.; GALIANA, E. **Resistance to pathogens and host developmental stage: A multifaceted relationship within the plant kingdom**. *New Phytologist*. 2007. v. 175, n. 3, p. 405–416.
- EBBOLE, D. J. **Magnaporthe as a Model for Understanding Host-Pathogen Interactions**. 2007.
- EMBRAPA. **Plantas Daninhas em Arroz. 2005**. Disponível em: <Irrigadohttp://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap11.htm>. Acesso em: 10 de julho de 2016.
- FAO. **FAOSTAT**. International year of rice. 2004. Disponível em: Acesso em: 04 abr. 2018.
- FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 12 fev. 2018.
- FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- FLOR, H.H. **Inheritance of reaction to rust in flax**. *Journal of Agricultural Research, Washington*. 1947. v.74, p.241-262.
- FRANCIS, S; KUMAR, M; VARSHNEY, L. **Radiation synthesis of superabsorbent poly(acrylic acid)-carrageenan hydrogels**. *Radiation Physics and Chemistry*. 2004. v. 69, p. 481- 486.
- GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. **Interferência de ulvana no desenvolvimento e melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides***. *Tropical Plant Pathology*. 2012. v. 37, n. 6, p. 431–437.
- HAMER, J. E. et al. **Mechanism for Surface Attachment in Spores of a Plant Pathogenic Fungus**. *Science*. 1998. v. 239, n. 4837, p. 288-290.
- HILLIOU, L. et al. **Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of κ/ι - hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus***. *Biomolecular Engineering*. 2006. v. 23, p. 201-208.
- HERBERT, T.T. **The perfect stage of *Pyricularia grisea***. *Phytopathology, St. Paul*. 1971. v. 61, n. 1, p. 83-87.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=484668>. Acesso em: 20 fev 2018.

- INUI, H.; YAMAGUCHI, Y.; HIRANO, S. **Elicitor actions of nacylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and l-phenylalanine ammonia-lyase induction in Rice suspension culture.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 1997. v. 61, p. 975-978.
- IWATA, M. **Probenazole e a plant defense activator.** *Pesticide Outlook.* 2001. v. 12, p. 28-31.
- JAULENEAU, V. et al. **Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid pathway.** *Journal of Biomed Biotech.* 2010.
- JAULENEAU V. et al. **An *Ulva armoricana* extract protects plants against powdery mildew pathogens.** *European Journal of Plant Pathology.* 2011. v.130.
- KHUSHI, G.S. **Origin, dispersal, cultivation and variation of rice.** *Plant Molecular Biology.* 1997. Vol.35. p. 25-34.
- KLARZYNSKI, O. et al. **Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco.** *Plant Physiology.* 2000. v. 124, n. 3, p. 1027-1038.
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. **Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds.** *Biomacromolecules.* 2007. v. 8, n. 6, p. 1765-1774.
- LIMA-FILHO, J. V. M. et al. **Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast.** *Brazilian Journal of Microbiology.* 2002. v.33, n. 4, p. 311-314.
- LIU, W. et al. **Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*.** *Molecular Plant.* 2013. v. 6, n. 3, p. 605-620.
- LEVY, M. et al. **Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia.** *Phytopathology, St. Paul.* 1993. v. 83, p. 1427-1433.
- MISHRA A. K., SHARMA K., MISRA R. S. **Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants.** *Plant Interact.* 2012. 7:95–120.
- MOENNE, A.; **Composition and Method to Stimulate Growth and Defense Against Pathogens in Plants.** US Patent. 2009.
- OU, S. H. **Fungus diseases – foliage diseases.** In: *RICE disease.* England : CAB. 1972. p. 97- 184.
- 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 Disease Protection.* 2009. v. 116, p. 263-70.
- 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.* 2010. v. 59, p. 634-42.
- PENG ZHAN, Y. et al. **Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity.** *Journal of Applied Phycology.* 2003. n. 15, p. 21-27.

- PEREZ, L. et al. **Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina***. 2003. Crop Prot. P. 405–413.
- PRABHU, A. S. & FILIPPI, M. C. C. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2006. 388 p.
- PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. & ARAUJO, L.G. **Pathotype diversity of *Pyricularia grisea* from improved upland rice cultivars in experimental plots**. Fitopatologia Brasileira. 2002. p. 468-473.
- PRABHU, A.S. et al. **An unprecedented outbreak of rice blast on a newly released cultivar BRS Colosso in Brazil**. In: WANG, G.L., VALENTE, B. (Eds.), *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer, New York. 2009. p. 257– 266.
- REIGNAULT, P. et al. **Trehalose induces resistance to powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in wheat**. New Phytologist. 2001. v. 149, p. 519-529.
- REZENDE, J.A.M.; MARTINS, M.C. **Doenças do mamoeiro**. In: KIMATI, H., AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed). *Manual de Fitopatologia. Doença das plantas cultivadas*. São Paulo. 2005. v. 2, p. 435-443.
- RIOS, J. A. et al. **Induction of resistance to *Pyricularia oryzae* in wheat by acibenzolar-S-methyl, ethylene and jasmonic acid**. Tropical Plant Pathology. 2014. v. 39, n. 3, p. 224–233.
- ROBIC, A.; SASSI, J. F.; LAHAYE, M. **Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan**. Carbohydrate Polymers. 2008. v. 74, p. 344-352.
- ROSSMAN, A.Y.; HOWARD, R.J. & VALENT, B. ***Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast fungus**. Mycologia. 1990. v.82, n. 4, p. 509–512.
- SANTOS, G.R. et al. **Resistência de genótipos de arroz a doenças no sul do Estado do Tocantins**. Bioscience Journal. 2002. v.18, p.3-12.
- SCHEUERMANN, K. K.; RAIMONDI, J. V. ***Magnaporthe oryzae* Genetic Diversity and Its Outcomes on the Search for Durable Resistance**. World largest Science, Technology & Medicine. 2012.
- 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, p. 544-551, 2011.
- SONE, T. et al. **Homologous recombination causes the spontaneous deletion of AVR-Pia in *Magnaporthe oryzae***. FEMS Microbiology Letters. 2013. v. 339, n. 2, p. 102–109.
- STADNIK, M. J., and BUCHENAUER, H. **Control of wheat diseases by benzothiadiazole-derivative and modern fungicides**. Z. Pflanzenkrankh. 1999. 106:466-475.
- STADNIK, M. **Indução de resistência a oídios**. In: *CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA*, Campinas. Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia. 2000. v. 23, p. 176-181.

- STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M.B. **Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers**. *Tropical of Plant Pathology*. 2014. v. 39, p. 111-118.
- STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 221-244. 2004.
- SOSBAI. **Arroz Irrigado**: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado. Gravatal, SC. 2014.
- TALBOT, N.J., 2003. **On the trail of a cereal killer**: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*. 2003. 57, 177-202.
- TRONO, G.C. **Eucheuma and Kappaphycus: taxonomy and cultivation**. In: Ohno M; Critchley A.T. (ed). *Seaweed cultivation and marine ranching*. 1997. p. 75-88.
- USDA Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=88421>. Acesso em: 28 fev 2018.
- VAN DE VELDE, F. **Structure and function of hybrid carrageenans**. *Food Hydrocolloids*. 2008. v. 22, p.727-734.
- VIEIRA, J.; MARSCHALEK, R.; SCHIOCCHET, M.A. **Cultivares de arroz da Epagri – Descrição e caracterização**. Epagri. Boletim Técnico, 138. 2007. p. 76.
- VERGNE, E. et al. **Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae***. *BMC Plant Biology*. 2010. v. 10.
- WANG, X. et al. **Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease**. In *Rice – Germplasm, Gene and Improvement*. Online publication. 2014.
- WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. **Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future**. *Journal of Experimental Botany*. 2013. v. 64, p. 1263-1280.
- WALTERS, D.R.; FOUNTAINE, J.M. **Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions**. *Journal of Agricultural Science*. 2009. v, 147 p. 523-535.
- WEBSTER, R. K.; GUNNEL, S. P.; **Compendium of rice disease**. St. Paul: APS. 62p.
- YAN, X.; TALBOT, N. J. **Investigating the cell biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae***. *Current Opinion in Microbiology*. 2016. v. 34, p. 147–153.