

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da saúde
Instituto Biomédico
Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Respostas de defesa em *Nicotiana tabacum* cv. SR1
induzidas pela peptidogalactomanana presente na parede
celular de *Fusarium oxysporum*

Natália Cipriano Monteiro



Monografia apresentada
ao Instituto de Biomedicina
da Universidade Federal
do Estado do Rio de
Janeiro (UNIRIO), visando
a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedina.

Rio de Janeiro

Julho 2017

Natália Cipriano Monteiro

Respostas de defesa em *Nicotiana tabacum* cv. SR1 induzidas pela
peptideogalactomanana presente na parede celular de *Fusarium*
oxysporum

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Tavares Haido

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Maite Vaslin de Freitas Silva

Data: 31/07/2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rubens Clayton da Silva Dias

Dr^a. Anna Karoline Fausto da Silva

MSc. Caroline de Barros Montebianco

FICHA CATALOGRÁFICA

Monteiro, Natália Cipriano.

Respostas de defesa em *Nicotiana tabacum* cv. SR1 induzidas pela peptideogalactomanana na parede celular de *Fusarium oxysporum*. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UNIRIO, Rio de Janeiro, 2013.

LXXXVII, 87 p.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosa Maria Tavares Haido

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Instituto Biomédico – Curso de Biomedicina, 2017.

1. *Fusarium oxysporum*. 2. Glicoproteína. 3. *Nicotiana tabacum*. 4. Resposta de Hipersensibilidade. 5. Resposta Adquirida Sistêmica

I. Haido, Rosa Maria Tavares e Silva, Maite Vaslin de Freitas. II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. III. Respostas de defesa em *Nicotiana tabacum* cv. SR1 induzidas pela peptideogalactomanana presente na parede celular de *Fusarium oxysporum*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, no Laboratório de Química Biológica de Microrganismos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ e no Laboratório de Virologia Molecular Vegetal do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Tavares Haido (UNIRIO) e da Prof^a. Dr^a. Maitê Vaslin de Freitas Silva (UFRJ).

A minha mãe, minha irmã e meu pai: pelo amor, apoio e carinho incondicionais.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King Jr.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e perseverança em prosseguir neste caminho.

À minha mãe, Iná Lúcia, a responsável por me colocar no caminho que eu sigo hoje. Seu amor e dedicação por mim não tem limites, e por isso sou eternamente grata.

À minha irmã Déborah, o melhor presente que Deus me proporcionou até o momento, por tornar os momentos estressantes mais leves e me fazer enxergar o pote do ouro no final do arco-íris.

Agradeço à minha orientadora Dr^a Rosa, pela paciência na orientação, pelo convívio, confiança e por ter acreditado em mim.

À minha co-orientadora, Dr^a Maite Vaslin, por me iniciar no mundo da biologia molecular e fazer eu me apaixonar por esse mundo.

À professora Dr^a Eliana Barreto Bergter do Laboratório de Química Biológica de Microorganismos – UFRJ, por ter cedido o espaço de seu laboratório e pela disponibilidade em ajudar.

À Dr^a Maria Inês Sarquis, da FIOCRUZ, pela doação da cepa de *Fusarium oxysporum*

Aos meus amigos, César, Danielly, Eric Aguiar, Eric Oliveira, Isabel, Jade, Leonardo, Mariana, Mariele, Pamella, Taiza e Vinícius, que são a família que Deus me deixou escolher.

A todos os professores do curso que contribuíram para minha formação acadêmica.

A todos do Laboratório de Química Biológica de Microorganismos - UFRJ, Livia, Jardel, Giulia, Caroline, Mariana Colodetti, Mariana Xisto, Rodrigo e Leonardo. Cada um da sua maneira contribuiu para a minha formação durante esse período.

A todos do Laboratório de Virologia Molecular Vegetal – UFRJ, Alice, Leandro, Marianna, Rhuana e Vinícius. Vocês me ajudaram a descomplicar e entender a biologia molecular.

Ao CNPq e UNIRIO pelo apoio financeiro.

RESUMO

Fusarium oxysporum é um fungo fitopatogênico muito estudado devido a sua capacidade de infectar safras de grande importância econômica, sendo descrito também como um patógeno emergente causador de doenças oportunistas em hospedeiros humanos imunocomprometidos. Sua parede celular é composta principalmente por polissacarídeos (80-90%) e glicoproteínas, muitas das quais possuem uma ampla ação imunológica, sendo capazes de induzir respostas imune/de defesa no hospedeiro infectado. O microrganismo utilizado foi a cepa 4247 de *F. oxysporum* cuja manutenção foi feita em meio de cultura Sabouraud modificado sólido inclinado. Nesse trabalho, um extrato glicoproteico (GBP) obtido por extração a quente com tampão fosfato foi fracionado com CETAVLON originando uma fração em pH 8.8 (Fração B), caracterizada como uma peptídeogalactomanana (PGM) por conter glicose, manose e galactose. A PGM foi utilizada em ensaios fitopatogênicos em *Nicotiana tabacum* cv. SR1 com o intuito de detectar diferentes tipos de resposta de defesa presentes na planta. A resposta de hipersensibilidade foi avaliada em folhas de tabaco através da produção de compostos fenólicos, onde, com auxílio de luz UV, foi detectado que a PGM induz uma resposta de hipersensibilidade tempo e dose dependente em folhas de tabaco, apesar de não causar necrose no tecido foliar, até 72h após o tratamento com a molécula. Em raízes de plântulas de tabaco foi avaliada a resposta adquirida sistêmica por dois parâmetros: a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a expressão de genes de resistência (PR1 e PAL). O H₂O₂ foi microscopicamente detectado pela deposição de 3,3 – diaminobenzidina (DAB) no tecido radicular. A expressão dos genes de resistência foi analisada pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), onde foi utilizado RNA extraído de raízes de plântulas tratadas com PGM de *F. oxysporum*. PR1 apresentou um perfil de expressão tempo dependente até 72h quando tratado com 400µg/ml de PGM. Esse mesmo gene apresentou um perfil dose dependente até 72h após tratamento com a PGM. O gene PAL teve sua expressão aumentada em função do tempo até 72h após o tratamento com as duas concentrações de PGM – 200 e 400µg/ml. Esses dados sugerem a ação fitopatogênica da PGM de *F. oxysporum* e sua possível utilização com um elicitador de respostas de defesa em plantas.

Palavras chave: *Fusarium oxysporum*, PGM, Resposta de Hipersensibilidade, Resposta Adquirida Sistêmica, PR1 e PAL.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum is a phytopathogenic fungus highly studied due to its ability to infect harvests of great economic importance. It is also described as an emerging pathogen causing opportunistic diseases in immunocompromised human hosts. Its cell wall consists mainly of polysaccharides (80-90%) and glycoproteins, many of which have a broad immunological action, and are capable of inducing immune / defense responses in the infected host. The microorganism used was the 4247 strain of *F. oxysporum*, whose maintenance was done in an inclined solid modified Sabouraud culture medium. In this work, a glycoprotein extract (GBP) obtained by hot extraction with phosphate buffer was fractionated with CETAVLON giving a fraction at pH 8.8 (Fraction B), characterized as a peptideogalactomannan (PGM) because it contains glucose, mannose and galactose. PGM was used in phytopathogenic trials in *Nicotiana tabacum* cv. SR1 in order to detect the different types of defense responses present in the plant. The hypersensitivity response was evaluated in tobacco leaves through the production of phenolic compounds where, with the aid of UV light, it was detected that PGM induces a time and dose-dependent hypersensitivity response in tobacco leaves, although it does not cause necrosis in the leaves foliar tissue up to 72 h after treatment with the molecule. In tobacco plant roots, the systemic acquired response was evaluated by two parameters: the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and the expression of resistance genes (PR1 and PAL). H₂O₂ was microscopically detected by the deposition of 3,3-diaminobenzidine (DAB) in the root tissue. The expression of the resistance genes was analyzed by the real-time PCR technique (qRT-PCR), where RNA extracted from roots of *F. oxysporum* PGM-treated seedlings was used. PR1 showed a time dependent expression profile up to 72 h when treated with 400µg / ml PGM. This same gene showed a dose-dependent profile up to 72 h after PGM treatment. The PAL gene had its expression increased in function of time up to 72h after treatment with the two concentrations of PGM - 200 and 400µg / ml. These data suggest the phytopathogenic action of PGM of *F. oxysporum* and its possible use as an elicitor of defense responses in plants.

Key words: *Fusarium oxysporum*, PGM, Hypersensitivity Response, Systemic Acquired Resistance, PR1 and PAL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia das células fúngicas	02
Figura 2: Representação da morfologia de estruturas de <i>F. oxysporum</i>	04
Figura 3: Ensaios fitopatogênicos com <i>F. oxysporum</i>	05
Figura 4: Infecções por <i>Fusarium</i>	07
Figura 5: Estrutura da parede celular	09
Figura 6: Parede celular de <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
Figura 7: Estrutura de glicoproteína	12
Figura 8: Esquema representativo do reconhecimento de patógenos	16
Figura 9: Esquema do mecanismo de <i>burst</i> oxidativo em plantas	20
Figura 10: Esquema das vias de produção de metabólitos secundários	22
Figura 11: Esquema representando s resistencia sistêmica em planta	26
Figura 12: Estabelecimento de SAR	27
Figura 13: Esquema de extração da GPB e fracionamento com CETAVLON	37
Figura 14: Esquema de infiltração.	40
Figura 15: Placa com plântulas de <i>N. tabacum</i>	41
Figura 16: Análise da composição de monossacarídeos	48
Figura 17: Análise de folha de <i>N. tabacum</i> cv. SR1 infiltrada com PGM	49
Figura 18: Observação da resposta oxidativa em raízes de plântulas de <i>N. tabacum</i> cv. SR1	50
Figura 19: Expressão do gene relacionado à patogênese 1	52
Figura 20: Expressão do gene Fenilalanina amônia liase	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Famílias identificadas de proteínas relacionadas à patogênese . . .	30
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores dos genes constitutivos	45
Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores de genes de resistência	45
Tabela 4: Conteúdo de açúcares e proteínas da GPB e da PGM	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

avr – Genes de avirulência
BA – Ácido benzóico
BSA – Soro albumina bovina
BTH – 1,3-Benzotiazol
Ca²⁺ – ion cálcio
CETAVLON – Hexadeciltrimetilamônio
DAB – 3,3-diaminobenzidina
ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
ET – Etileno
G3P – Gliceraldeído 3-fosfato
GPB – Glicoproteína bruta
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HR – *Hypersensitivity Response*
ICS – Isocorismato-sintase
INA – Ácido 2,6-dicloro isonicotínico
ISR – *Induced Systemic Resistance*
JA – Ácido jasmônico
MAMP – *Microorganisms Associated Molecular Pattern*
MeSA – Metil salicilato
MS – Murashige & Skoog
nahG – salicilato hidroxilase
NaOH – Hidróxido de sódio
NO – Óxido nítrico
O₂⁻ – Anion superóxido
OH⁻ – Radical hidroxila
PAL – Fenilalanina amonia liase
PAMP – *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PCD – *Programmed Cell Death*
PGM – Peptideogalactomanana
PP2A – *Protein phosphatase 2*
PR – *Pathogenesis Related*

PRR – *Pattern Recognition Receptors*

qRT-PCR – *Quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction*

R – Genes de resistência específicos

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SA – Ácido salicílico

SABP – *Salicylic Acid Binding Protein*

Sab-M – Meio de cultura Sabouraud modificado

SAMT – *Salicylic Acid Methyltransferase*

SAR – *Systemic Acquired Resistance*

TMV – *Tobacco Mosaic Virus*

UV – Ultravioleta

ÍNDICE

Resumo	viii
Abstractix
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xii
Introdução	1
1. Taxonomia, morfologia e distribuição do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .	2
2. Patogênese de <i>Fusarium oxysporum</i>	4
3. Parede celular	8
4. Glicoproteínas	11
5. <i>Nicotiana tabacum</i>	14
6. Imunidade em plantas	15
6.1. Resistência a patógenos	17
6.2. Reação de Hipersensibilidade	18
6.3. Mudanças bioquímicas e fisiológicas	19
6.4. Metabólitos primários e secundários	21
6.5. Fitohormônios	23
6.6. Resistência Sistêmica Adquirida	25
7. Justificativa	32
8. Objetivos	33
Material e Métodos	34
1. Microrganismo e condições de cultivo	35
2. Obtenção do micélio de <i>Fusarium oxysporum</i>	35
3. Extração da glicoproteína bruta (GPB)	35
4. Fracionamento da GPB com CETAVLON	36
5. Análises químicas e estruturais	38
5.1. Análises colorimétricas	38

5.2. Análise quantitativa da composição monossacarídica da GPB e da PGM.	39
6. Avaliação da Resposta de Hipersensibilidade (HR) em plantas de tabaco.	39
6.1. Germinação e crescimento de plantas.	39
6.2. Interação de folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SR1 com a PGM de <i>Fusarium oxysporum</i> pela técnica de infiltração	40
7. Avaliação da Resposta Sistêmica Adquirida (SAR) em plântulas de tabaco após o tratamento com a PGM	41
7.1. Germinação das sementes e crescimento de plântulas	41
7.2. Avaliação do efeito da PGM de <i>Fusarium oxysporum</i> nas raízes de plântulas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SR1.	42
7.3. Avaliação da expressão de genes de resistência induzidos pelo tratamento das raízes com a PGM por PCR em tempo real	43
8. Análises estatísticas.	45
 Resultados	 46
1. Isolamento e purificação parcial da glicoproteína de <i>Fusarium oxysporum</i>	47
2. Análises colorimétricas	47
3. Análise qualitativa dos monossacarídeos componentes da GPB e da PGM	47
4. Avaliação da resposta de Hipersensibilidade de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SR1 após tratamento das folhas com a PGM de <i>Fusarium oxysporum</i>	48
5. Avaliação da resposta oxidativa em plântulas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SR1 após tratamento com a PGM de <i>Fusarium oxysporum</i> (<i>in vitro</i>).	50
6. Avaliação da resposta sistêmica adquirida em raízes de plântulas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SR1 tratadas com PGM de <i>Fusarium oxysporum</i>	51
 Discussão	 53
 Conclusões	 59
 Referencias Bibliográficas	 61

Introdução

1. Taxonomia, morfologia e distribuição do fungo *Fusarium oxysporum*

Fungos pertencem a uma classe de organismos eucarióticos e saprófitos de matéria orgânica em decomposição. Mais de 10.000 espécies são conhecidas pelas suas habilidades fitopatogênicas (patógenos de plantas), enquanto apenas cerca de 400 espécies são conhecidas como patógenos oportunistas de mamíferos (PAUW, 2011).

Como os outros seres vivos, os fungos são identificados com base em sua forma, estrutura e propriedades comportamentais. Morfologicamente, podem se apresentar sob duas formas: leveduras (seres microscópicos unicelulares) e fungos filamentosos (filamentos de células cilíndricas e multinucleadas) (Figura 1). Os fungos filamentosos possuem diversas funções, dentre as quais se podem citar a reprodução e a capacidade de se fixar ao tecido de um hospedeiro (KAVANAGH, 2011).

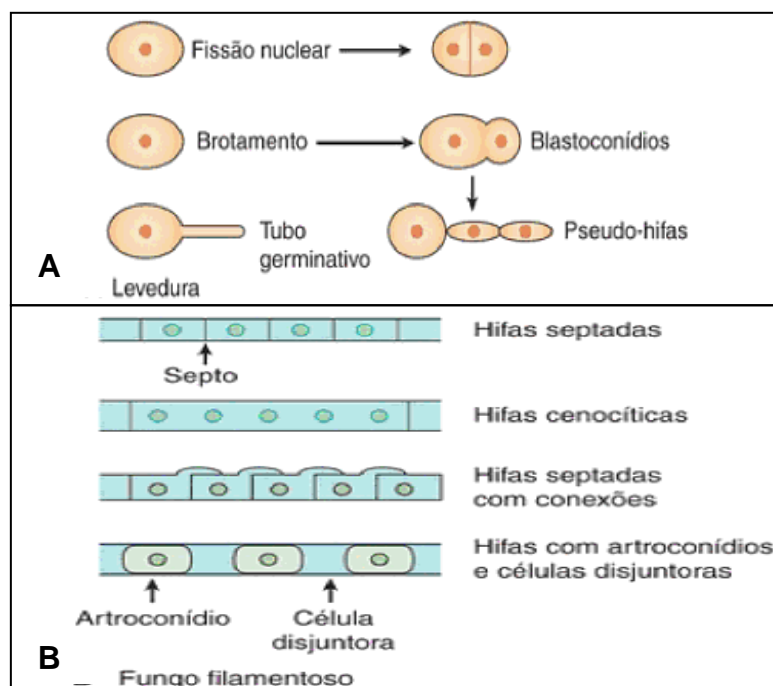


Figura 1: Morfologia das células fúngicas: A) Processos de reprodução observados em leveduras B) Tipos de hifas observadas em espécies de fungos filamentosos (Adaptado de MURRAY, 2006).

O gênero *Fusarium* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae (MA *et al.*, 2013). Encontra-se amplamente distribuído, tanto no solo quanto no ar, sendo encontrado em ambientes com distintas condições climáticas (regiões tropicais, temperadas, desérticas, alpinas e árticas). Sua distribuição generalizada pode ser atribuída à capacidade de crescer em uma ampla gama de substratos e aos seus mecanismos eficientes de dispersão (DIGNANI E ANAISSIE, 2004; NUCCI E ANAISSIE, 2007; MUHAMMED *et al.*, 2014).

Fusarium sp. está entre um dos mais diversos e amplamente disseminados fungos fitopatogênicos, causando ressecamento de folhas e apodrecimento de raízes. Algumas espécies, como *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*, têm uma variedade pequena de hospedeiros, infectando predominantemente cereais. Em contrapartida, *Fusarium oxysporum* infecta um conjunto muito diversificado de hospedeiros, desde plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas até mamíferos, tendo se tornado um fungo emergente no ambiente clínico pela sua capacidade de causar infecções disseminadas em hospedeiros humanos imunocomprometidos (MA *et al.*, 2010; PRADOS-ROSALES *et al.*, 2012; SEVER *et al.*, 2012). Nesses últimos, as infecções por este fungo se instalam principalmente pela inalação de conídios no ar ou através do rompimento do tecido do hospedeiro. Ademais, podem causar intoxicação alimentar através do consumo de alimentos contaminados com toxinas fúngicas (DIGNANI E ANAISSIE, 2004).

O gênero *Fusarium* foi descrito por Link & Grey em 1821 e abrange um grupo de fungos filamentosos com micélio vegetativo (complexo de hifas) e reprodução assexuada (onde há a produção de conídios). Tem como característica principal a produção de macroconídios (conídeos fusóides e multiseptados), podendo também produzir microconídeos e clamidoconídeos, estruturas de resistência com paredes duplas e espessas que desempenham um papel importante como inóculo primário para a infecção das raízes das plantas (Figura 2) (DIGNANI E ANAISSIE, 2004; OHARA E TSUGE, 2004; SCHÄFER *et al.*, 2014).

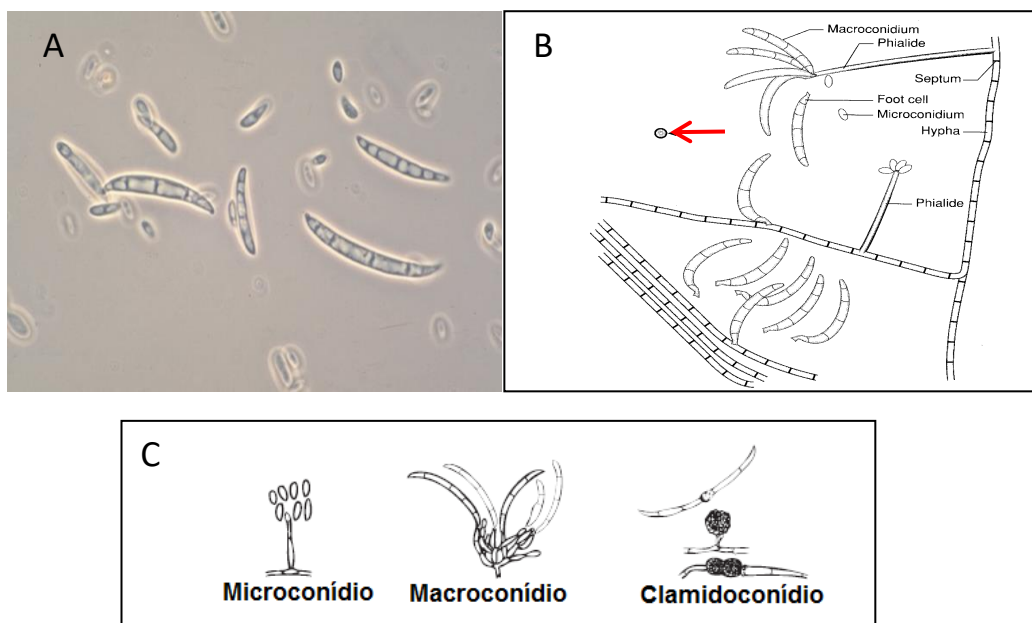


Figura 2: Representação da morfologia de estruturas de *Fusarium oxysporum*. (A) Aparência microscópica. (B) Referência às dimensões do fungo comparado a um eritrócito (seta - 7 μm) (adaptado de FISHER E COOK, 2001); (C) Morfologia dos Conídios (Adaptado de MA *et al.*, 2013).

2. Patogênese de *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum é uma espécie que tem sido estudada devido à sua capacidade fitopatogênica e importância agrônômica, uma vez que é capaz de devastar várias culturas alimentícias, como milho, tomate e pepino (Figura 3) (BURGESS *et al.*, 1989; HAFIZI *et al.*, 2013; SCHÄFER *et al.*, 2014), e por estar emergindo como um importante fungo oportunista causador de doenças em hospedeiros humanos imunocomprometidos (WALSH *et al.*, 2004; HAFIZI *et al.*, 2013; SCHÄFER *et al.*, 2014).

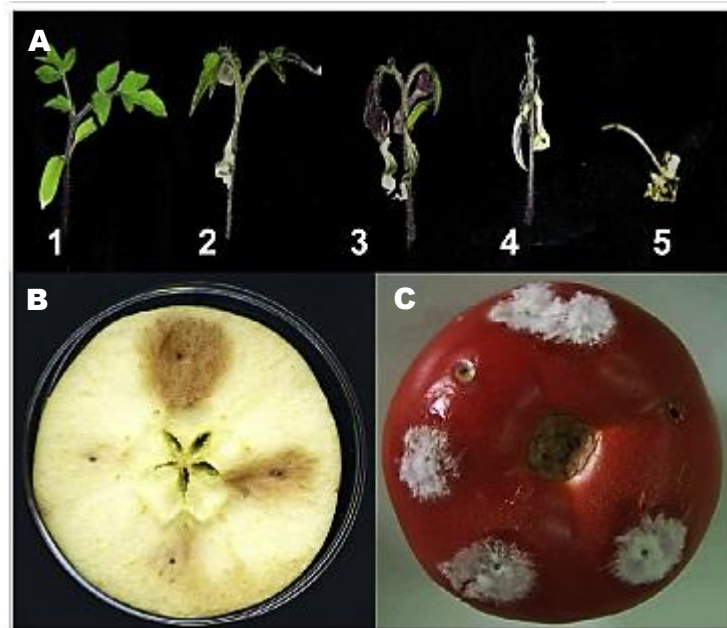


Figura 3: Ensaios fitopatogênicos com *Fusarium oxysporum* em plantas de tomate (A): 1 - planta saudável e 2 – 5 - planta infectada. Ensaios de crescimento fúngico invasivo em maçã (corte transversal) (B) e tomate (C) (Adaptado de PEREZ-NADALES *et al.*, 2014).

Em plantas, *F. oxysporum* é uma espécie cosmopolita que está amplamente disseminada em todos os tipos de solo. Pode causar doenças em diversas delas, incluindo muitas culturas comercialmente importantes. Esse fungo é mais conhecido pela sua característica fitopatogênica, sendo responsável pelo ressecamento vascular de um enorme conjunto de plantas, o que pode resultar em grandes perdas econômicas (PIETRO *et al.*, 2003).

Como habitante do solo, *F. oxysporum* pode sobreviver por períodos prolongados na ausência de um hospedeiro, principalmente na forma de clamidoconídeos. Causa frequente da doença de murcha vascular, os esporos de *F. oxysporum* presentes no solo germinam em resposta aos sinais da planta hospedeira e diferenciam-se em hifas. Por sua vez, as hifas germinadas aderem às raízes das plantas, penetrando-as diretamente sem a necessidade de estruturas de infecção especializadas. Uma vez dentro da raiz, as hifas crescem no meio intracelular e extracelular, com o intuito de invadir o córtex e atravessar a endoderme até atingir os vasos do xilema. O fungo então usa o xilema como um canal para a colonização do hospedeiro (PIETRO *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2014; PEREZ-NADALES *et al.*, 2014).

Durante a invasão e colonização da raiz, *F. oxysporum* é exposto a vários mecanismos de defesa da planta, como barreiras físicas e compostos antifúngicos (MICHIELSE E REP, 2009). Um mecanismo de defesa da planta é a modificação química de sua parede celular devido à produção de compostos fenólicos. Esses compostos solúveis se acumulam na parede celular da planta desafiada por patógenos fúngicos ou elicitores derivados de fungos. Em plantas de tomate e culturas de raízes, por exemplo, extratos de *F. oxysporum* induzem um aumento no fortalecimento da parede celular através da deposição de lignina, bem como uma concentração aumentada de outros compostos fenólicos, como ácido ferúlico, ácido 4-hidrobencóico e ácido 4-cumárico (MANDAL E MITRA, 2008).

F. oxysporum detecta a presença desses compostos fenólicos e reage a eles aumentando a produção de micotoxinas e a atividade de enzimas hidrolíticas, como pectinase, celulose e amilase. Esses compostos podem ter uma ação protetora para a planta, apresentando um efeito inibitório no crescimento e/ou na germinação do fungo e, conseqüentemente, auxiliando na redução da doença. Entretanto, também podem apresentar uma função contrária, promovendo a doença, pelo aumento nos níveis de micotoxinas e o aumento na produção de enzimas hidrolíticas (MANDAL E MITRA, 2008; MICHIELSE E REP, 2009).

Micotoxinas são moléculas de baixo peso molecular que podem proporcionar ao fungo uma vantagem seletiva em alguns ambientes, apesar de não serem essenciais para a sua sobrevivência. Podem atuar como pigmentos ou regular o crescimento da planta hospedeira, além de serem tóxicas para seres humanos quando ingeridas. As micotoxinas de *Fusarium sp.* contribuem para a patogênese das plantas, notadamente observada pela produção de tricotecenos. Os tricotecenos atuam na inibição da síntese proteica e de DNA, possuindo atividades semelhantes às moléculas que promovem morte celular na planta. Outro exemplo de micotoxina é a giberelina produzida por *Fusarium fujikuroi*, agente responsável pela fusariose no arroz, que causa alterações no desenvolvimento do hospedeiro durante o curso da doença (HIROOKA E YAMAGUCHI, 1994; MA *et al.*, 2013).

Fusarium sp. também é o causador de um amplo espectro de doenças em humanos, desde infecções superficiais e localizadas em hospedeiros saudáveis tais como: infecções cutâneas e subcutâneas, onicomicoses, endofitalmite, otites, sinusites, artrites, osteomielites, e abscessos cerebrais até fusariose disseminada: aquela na qual dois ou mais sítios distintos estão envolvidos, sendo geralmente observadas em hospedeiros com neutropenia severa, ou seja, em hospedeiros imunocomprometidos (SCHÄFER *et al.*, 2014).

Dentre os fungos filamentosos o gênero *Fusarium* é o segundo maior causador de infecções em hospedeiros imunocomprometidos, perdendo apenas para o gênero *Aspergillus*. Ademais, as espécies de *Fusarium* estão entre os patógenos fúngicos mais resistentes a drogas, estando associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, fazendo-se necessário um diagnóstico rápido para o sucesso da terapia antifúngica e sobrevivência do hospedeiro (SCHÄFER *et al.*, 2014).

Estudos mostram que os sítios de entrada para uma infecção disseminada não estão claros, tendo sido reportados onicomicoses, trato respiratório (particularmente os sinus paranasais), trato gastrointestinal, e cateteres venosos centrais (SCHÄFER *et al.*, 2014). Entretanto, a porta de entrada usual são as vias aéreas, levando-nos a concluir que a fusariose invasiva seja adquirida pela inalação de conídios de *Fusarium sp.* Além disso, tecidos degradados ou rompidos também já foram descritos como uma possível porta de entrada (NUCCI *et al.*, 2013). Feridas, úlceras digitais, onicomicoses e paroníquia (infecção de pele circundante a unha) são as portas de entrada cutâneas mais típicas (Figura 4) (ROMANO *et al.*, 2010).



Figura 4: Infecções por *Fusarium sp.* (A) Onicomicose por *Fusarium solani* (NUCCI *et al.*, 2013). (B) Úlcera de córnea por *Fusarium spp.* (ESCARIÃO *et al.*, 2013).

3. Parede celular

A parede celular é uma estrutura vital para todos os fungos, conferindo forma e estando envolvida na reprodução, morfogênese, aderência a substratos, interação célula-célula, interação célula-matriz, proteções osmóticas e físicas, compatibilidade vegetativa e na proteção da célula. Apesar de esta ser uma estrutura rígida, deve ser dinâmica para permitir o crescimento e adaptação do fungo ao estresse ambiental. A composição e estrutura da parede são amplamente reguladas e variam em resposta a condições ambientais (PINTO, BARRETO-BERGTER & TABORDA, 2008). Um estudo mostrou que moléculas do citosol e da membrana (ex: glicolipídeos, melanina, proteína do choque térmico e histonas) migram para a parede celular, juntamente com proteínas secretadas, tornando esta estrutura dinâmica e imunorreativa (NIMRICHTER *et al.*, 2005; LATGE, 2010).

A parede celular fúngica é prevalentemente composta por carboidratos – polissacarídeos (80-90%), uma menor proporção de glicoproteínas (10-15%) e um menor percentual de lipídeos (CABIB *et al.*, 1997). Sua composição pode mudar substancialmente entre espécies de fungos, apresentando uma estrutura de polissacarídeo muito semelhante, porém diferindo significativamente em sua composição proteica, o que indica a importância das proteínas da parede celular para a patogênese fúngica (PINTO, BARRETO-BERGTER & TABORDA, 2008; PAUW, 2011).

A colonização fúngica de um hospedeiro leva as células de ambos os organismos a um contato próximo. Por conseguinte, é concebível que as moléculas da parede celular fúngica desempenhem um papel relevante na interação com o seu hospedeiro (SCHOFFELMEER *et al.*, 1999).

A parede celular pode ser esquematicamente organizada em duas camadas: uma camada interna estrutural e uma camada externa, cuja composição varia de acordo com o morfotipo, o estágio de crescimento e a espécie do fungo (LATGÉ, 2010). Sua estrutura corresponde a um esqueleto fibrilar, insolúvel em solução alcalina, constituído por polissacarídeos como glucanas β -(1→3) e β -(1→6) ligadas e quitina (polímero linear de *N*-acetilglucosamina β -(1→4) ligadas). Além dos polissacarídeos, a parede celular

contém diversas proteínas, porém apenas uma pequena parcela está covalentemente ligada à parede celular e, por estarem presentes nas camadas mais externas da parede, podem ser extraídas por soluções a quente ou fracamente alcalinas (CABIB *et al.*, 1997; LATGÉ, 2010).(Figura 5).

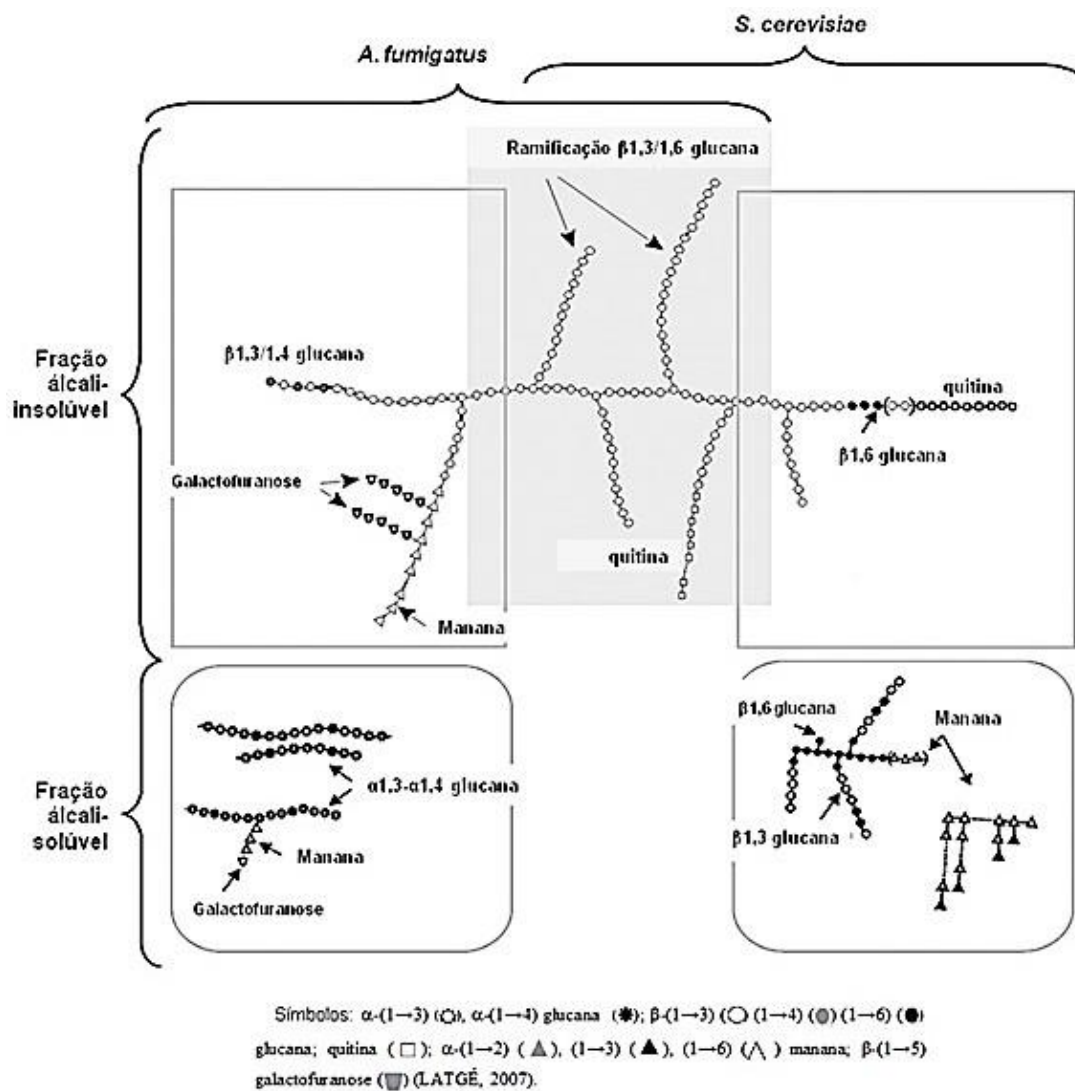


Figura 5: Estrutura da parede celular. Esquema representativo dos polissacarídeos conservados e espécie-específicos que podem ser encontrados nas paredes celulares do fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* e do fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae*. Os componentes das frações álcali-solúvel e insolúvel também são representados (Adaptado de LATGÉ, 2007).

Um importante recurso da parede celular é a sua capacidade de responder a estímulos ambientais e mudanças do ciclo celular. Modificações estruturais significativas são observadas durante o processo de dimorfismo celular associadas à modificação da camada externa da parede. Estudos prévios desenvolvidos por LATGÉ (2010) evidenciaram uma modificação na parede celular durante a transição morfológica em *A. fumigatus*. Seus conídios (forma infecciosa) são recobertos por hidrofobinas e melanina, retardando a resposta do hospedeiro, porém durante a germinação passam a expor em sua superfície moléculas imunorreativas como: α -(1,3)-glucana, galactomanana, galactosaminogalactana e proteínas *N*-glicosiladas (Figura 6). Essas modificações nos componentes da parede celular têm impacto direto na resposta imune montada pelo hospedeiro contra as infecções fúngicas (LATGÉ, 2010).

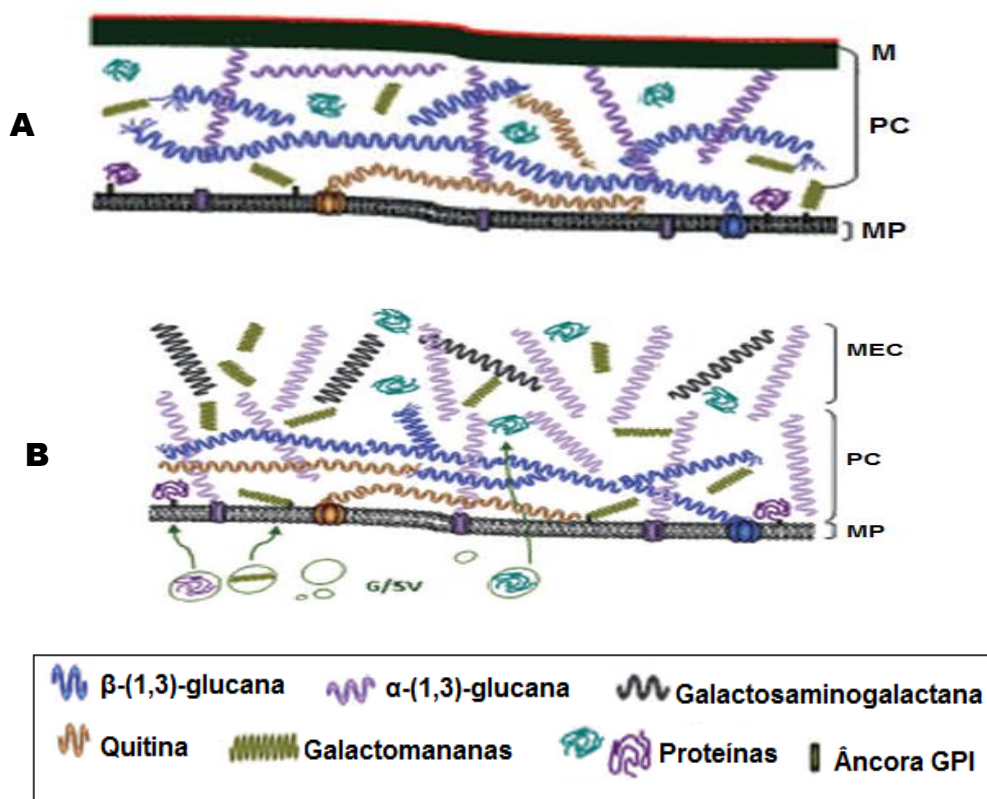


Figura 6: Parede celular de *Aspergillus fumigatus*. (A) Organização da parede celular no conídio. (B) Organização da parede celular na hifa. M, melanina; PC, parede celular; MP, membrana plasmática; MEC, matriz extracelular (Adaptado de LATGÉ, 2010).

A parede celular de *Fusarium sp.* é quimicamente composta por N-acetilglucosamina, glicose, galactose, manose, ácido glucurônico e proteínas, além de polissacarídeos como a quitina e a β -glucana. Os carboidratos da parede celular deste fungo foram identificados como quitina, β -1,3-glucano e α -1,3-glucano, moléculas que contribuem para rigidez da parede celular em fungos filamentosos (SCHOFFELMEER *et al.*, 1999).

As cadeias laterais de glicano das glicoproteínas presentes na parede celular de *Fusarium sp.* contêm ácidos urônicos em conjunto com manose, galactose e glicose. Essas glicoproteínas, juntamente com manose, galactose e ácido urônico, constituem aproximadamente 60% da parede celular do fungo (SCHOFFELMEER *et al.*, 1999).

Estudos microscópicos eletrônicos revelam que a camada externa da parede celular de *F. oxysporum* é composta em sua maioria por proteínas e uma pequena porcentagem de β -1,6-glucano, enquanto a camada mais interna é composta por quitina e β -1,3-glucano. As glicoproteínas presentes na parede celular determinam as propriedades antigênicas e adesivas das hifas desse fungo, além de estimular o sistema imune do hospedeiro (SCHOFFELMEER *et al.*, 1999; NARASIMHAN *et al.*, 2003).

Para os fungos, a parede celular rica em polissacarídeos é uma importante fonte de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), e compreende a estrutura inicial reconhecida pelas células do sistema imune. O reconhecimento de polissacarídeos da superfície fúngica inicia respostas imediatas como fagocitose, produção de compostos antimicrobianos e indução de citocinas pró-inflamatórias que ativam e recrutam células efectoras imunes (PINTO, BARRETO-BERGTER & TABORDA, 2008).

4. Glicoproteínas

Glicoproteínas são moléculas imunorreativas expostas na camada mais externa da parede celular dos fungos. Estão envolvidas em processos importantes como interação das células com o ambiente extracelular e regulação da patogênese fúngica. Tendo isso em vista, bloquear tais moléculas

com anticorpos pode influenciar a interação do fungo com o hospedeiro e facilitar processos de fagocitose por células do sistema imune (LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004; PINTO, BARRETO-BERGTER & TABORDA, 2008).

Nas glicoproteínas, a porção carboidrato, inserida por um processo de glicosilação, pode contribuir para a conformação, estabilidade e direcionamento apropriado da molécula, alterando sua estrutura e função (BIERMANN, 1989). Essa porção pode estar ligada à proteína através de dois tipos de ligações: *N*-glicosídica (açúcar está ligado a uma molécula de asparagina) ou *O*-glicosídica (açúcar está ligado a uma hidroxila exposta na serina ou treonina) (BIERMANN, 1989; HAMILTON & GERNGROSS, 2007) (Figura 7). O reconhecimento dessas moléculas por células do sistema imune do hospedeiro é capaz de ativar resposta de fagocitose, além de iniciar a produção de compostos antimicrobianos, e indução de citocinas pró-inflamatórias que ativam e recrutam outras células efetoras do sistema imune (LOPES *et al.*, 2011).

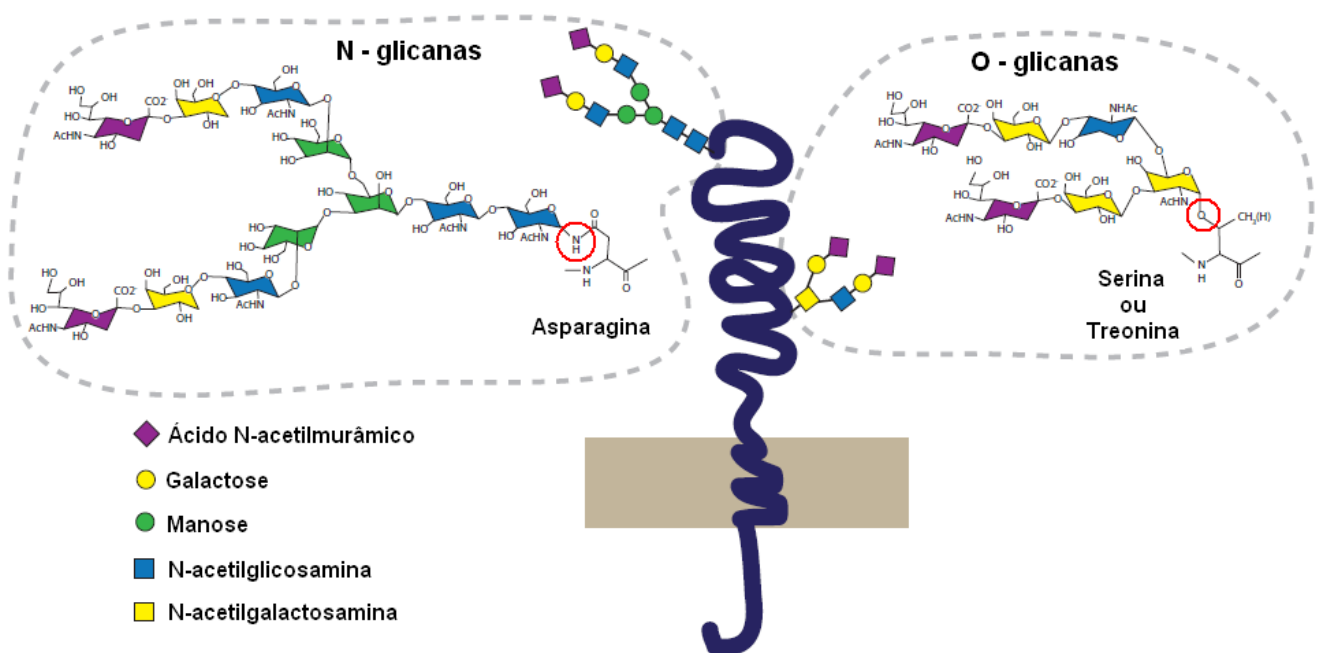


Figura 7: Estrutura de glicoproteína apresentando oligossacarídeos *N*- e *O*-ligados. A ligação da porção carboidrato à proteína está assinalada em vermelho (Adaptado de KOOYK & RABINOVICH, 2008).

A clivagem das ligações glicosídicas das glicoproteínas e análise dos oligossacarídeos gerados tem sido o principal método de estudo desses carboidratos. As ligações O-glicosídicas são clivadas por reações de β -eliminação através de tratamento alcalino suave, enquanto, as N-ligações são clivadas em condições mais agressivas, com altas concentrações de base e temperaturas mais elevadas (BIERMANN, 1989).

Dentre os tipos de glicoproteínas encontradas na parede celular dos fungos podemos citar as peptideogalactomananas (PGM). Em 1981, BARRETO-BERGTER, GORIN & TRAVASSOS isolaram PGM de duas cepas de *A. fumigatus*. Essas moléculas apresentaram diferenças estruturais entre si, em relação ao grau de ramificação e à proporção das unidades terminais não redutoras de α -D-Manp e β -D-Galf.

A presença de uma PGM antigênica foi observada na parede celular de *A. fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Cladosporium resinae* quando testadas por experimentos de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). A redução da reatividade dessa molécula, após a sua oxidação com metaperiodato de sódio, mostrou que a porção carboidrato contém importantes epítomos, sendo responsável pela antigenicidade dessa molécula (HAIDO *et al.*, 1998; DA SILVA BAHIA *et al.*, 2003; CALIXTO *et al.*, 2010).

O estudo dos oligossacarídeos-O-ligados da PGM de *A. fumigatus* confirmou a presença de galactofuranose como constituinte dos epítomos imunodominantes em aspergilose. (HAIDO *et al.*, 1998; LEITÃO *et al.*, 2003) Além de participar como determinante antigênico em *Aspergillus sp.*, a galactofuranose presente na PGM e em outros glicoconjugados foi apontada como um importante fator de virulência em casos de aspergilose invasiva. A importância desse açúcar na virulência foi demonstrada a partir de um estudo com *A. fumigatus* mutantes que não expressavam a enzima responsável pela conversão da UDP-galactopiranosose em UDP-galactofuranose (UDP-galactopiranososemutase). Nesse estudo, cepas mutantes apresentavam virulência atenuada em modelo animal de aspergilose invasiva, além disso, a ausência da galactofuranose nesses mutantes levava a produção de uma

parede celular alterada, relacionada a uma maior susceptibilidade a antifúngicos (SCHMALHORST *et al.*, 2008).

O envolvimento de moléculas de superfície na interação de conídios com macrófagos foi demonstrado tanto em *F. oxysporum* (CANEPPIA, 2010; DE OLIVEIRA, 2016) como em *A. flavus* (FILLIZZOLA, 2010), *Pseudallescheria boydii* (PINTO *et al.*, 2004) e *Scedosporium prolificans* (DA SILVA, 2009). SERRANO-GÓMEZ e colaboradores (2004) observaram que galactomananas eram capazes de inibir a fagocitose dos conídios de *A. fumigatus* por células dendríticas, indicando que o reconhecimento dessas moléculas expressas na superfície da célula é necessário para a ligação e internalização do fungo.

5. *Nicotiana tabacum*

Nicotiana tabacum, conhecido popularmente como tabaco, é uma planta herbácea da família *Solanaceae*, originária das Américas, Austrália, África do Sul e Pacífico Sul. São comumente encontradas no cultivo, onde suas folhas são processadas e utilizadas para fabricação de tabaco, sendo também cultivadas como plantas ornamentais. Seu crescimento é sensível às alterações climáticas (temperatura, humidade do ar), à humidade do solo e ao tipo de terra, sendo reportado que suas condições ótimas de crescimento são temperaturas entre 20-30° C e solo com baixo teor de nitrogênio (ZULOAGA *et al.*, 2015).

O tabaco foi amplamente utilizado e cultivado para fins medicinais e rituais em muitas culturas nativas em todas as Américas. Também foi levado para Europa nos anos 1500 para fins medicinais, embora no início fosse considerado um veneno, pois contém compostos que podem ser tóxicos quando utilizados em grandes quantidades. No entanto, o uso do tabaco eventualmente se expandiu de um tratamento medicinal para rotina de tabagismo e mastigação (comum em países andinos), e seu cultivo se espalhou amplamente nas colônias norte-americanas, onde se tornou uma importante cultura comercial, bem como na Europa, Índia e China (FUNK *et al.*, 2007; FORZZA, 2012).

Acredita-se que *Nicotiana tabacum* seja um derivado híbrido de *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis* e possivelmente *Nicotiana otophora*, porém não existem estudos que confirmem tal hipótese. *N. tabacum* é uma planta robusta que pode alcançar até 2,5 m de altura, com folhas grandes e flores longas brancas ou rosadas em forma de trompete. No cultivo comercial, a inflorescência é geralmente cortada antes de ser totalmente desenvolvida para incentivar um maior crescimento foliar. Toda a planta é recoberta por pequenas estruturas glandulares, semelhantes à pêlos, responsáveis pela produção de uma secreção que contém nicotina (FORZZA, 2012). O gênero *Nicotiana*, assim como o gênero *Arabidopsis*, é considerado planta modelo para diversos estudos moleculares, sendo frequentemente adotado para ensaios imunológicos e microbiológicos (ZULOAGA *et al.*, 2015).

6. Imunidade em plantas

Inúmeras são as moléculas capazes de ativar o sistema imune de plantas. Os glicoconjugados, amplamente estudados pela sua capacidade patogênica em humanos, têm sido mais recentemente estudados na fitopatologia. O reconhecimento desses glicoconjugados por células vegetais induz a produção de resposta de defesa a patógenos como o *burst* oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumento do pH intracelular, espessamento da parede celular da célula vegetal e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese. Assim como em humanos, o reconhecimento desses glicoconjugados que, por seu caráter conservado, são considerados padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP), é mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) (NEWMAN *et al.*, 2013). Esse reconhecimento envolve respostas como modificações fisiológicas, moleculares e genéticas como o fluxo alterado de íons, produção de espécies reativas de oxigênio, acúmulo de calose para o espessamento da parede celular e a expressão de genes codificadores de proteínas relacionadas com a patogênese (GÖHRE & ROBATZEK, 2008) (Figura 8).

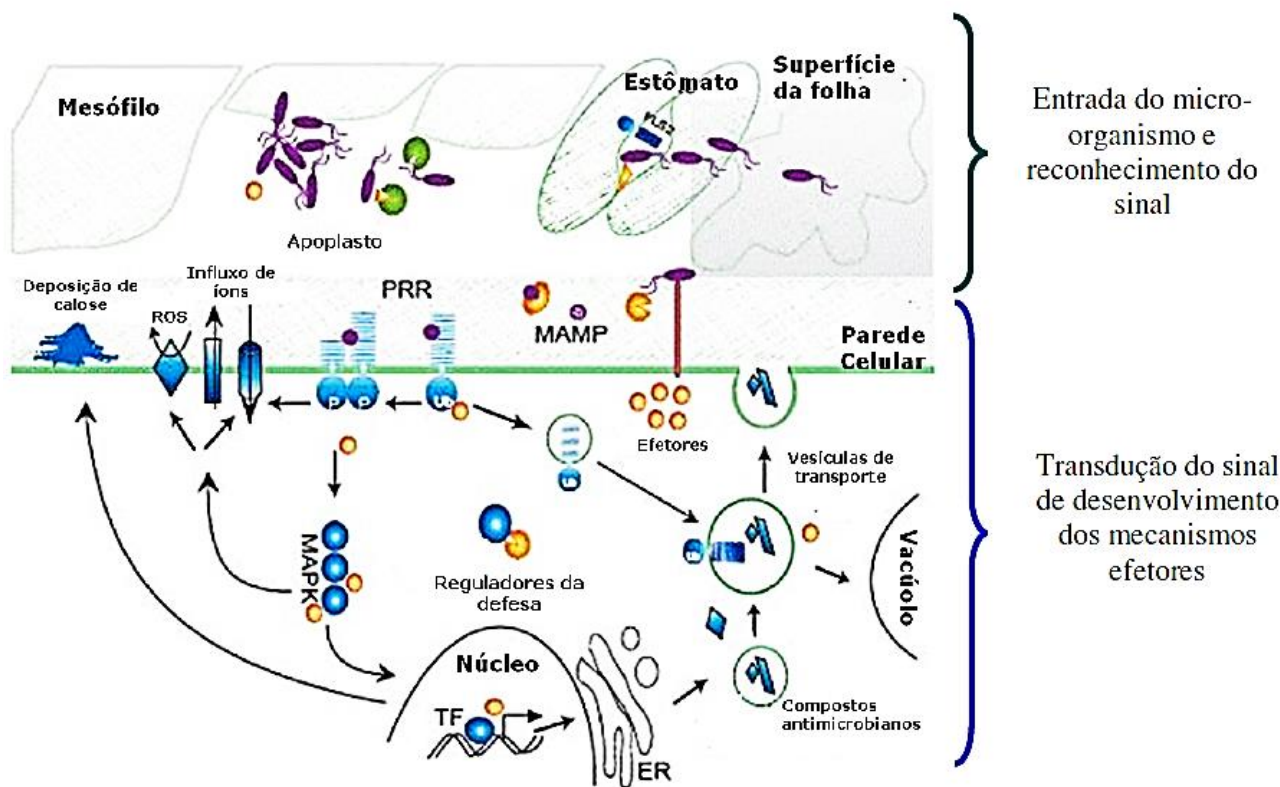


Figura 8: Esquema representativo do reconhecimento de patógenos através de MAMP por PRR em plantas (adaptado de GOHRE & ROBATZEK, 2008).

A primeira descrição detalhada do fenômeno de sensibilização em plantas foi elaborada por MUR e colaboradores em 1996. Os autores relataram que plantas de tabaco transgênicas pré-tratadas hidropônicamente com ácido salicílico (SA) não expressaram significativamente genes de defesa *PR1* (*Pathogenesis Related Protein 1*) ou *PAL* (fenilalanina amônia liase). No entanto, após a infecção por patógeno, a ativação desses genes foi aumentada. A sensibilização poderia ser um componente comum que medeia interações entre defesa contra patógenos e respostas de estresse mecânico e osmótico da planta. A forte correlação entre uma resposta sistêmica adquirida (SAR) e a presença de sensibilização, enfatizou a suposição de que a sensibilização é um mecanismo crucial na resposta SAR em plantas. A conclusão foi ainda mais apoiada pela estreita correlação entre a capacidade de vários produtos químicos de induzir SAR contra o vírus do TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) em tabaco e sua capacidade de estimular a expressão de *PAL*. Além disso, uma atenuação da sensibilização e a perda concomitante de

indução do *burst* oxidativo foram associadas à falta de resistência contra a infecção por patógenos avirulentos no tabaco (CONRATH, 2006).

Com o intuito de detalhar o sistema imune das plantas, foram descritos a seguir os diferentes processos que ocorrem em um vegetal após o contato primário com um patógeno.

6.1. Resistência a patógenos

No meio ambiente, as plantas podem estar expostas a estresses biótico (ex: alteração microbiológica da rizosfera) e abiótico (ex: alterações de temperatura e pH). Para resistir a esses estresses as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, mecanismos de defesa como o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (SPOEL E DONG, 2012).

Em contraposição com os animais, plantas são desprovidas de um sistema circulatório, elas não podem usar receptores imunes circulantes (como receptores presentes em monócitos e células dendríticas de humanos) para detectar moléculas estranhas. Mesmo assim, elas são capazes de estabelecer respostas imunes que são altamente específicas, com auto-reatividade restrita e que muitas vezes geram resposta semelhante à “memória” contra os patógenos encontrados (NÜRNBERGER *et al.*, 2004; SPOEL E DONG, 2012).

O obstáculo inicial enfrentado pelos fitopatógenos é a parede celular da planta, que pode ser reforçada pela deposição de calose (polímeros de glucano) após a ativação das vias de defesa do hospedeiro. A primeira linha ativa de defesa ocorre na superfície celular da planta quando os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP) – como peptidoglicanos – são detectados por receptores de reconhecimento de padrões (PRR). O reconhecimento de PAMP induz respostas da defesa nas plantas, como o *burst* oxidativo (a ativação de respostas de defesa local mediadas por ROS são essenciais para bloquear a penetração de fungos em espécies de plantas resistentes.), a produção de óxido nítrico (NO), o aumento do pH extracelular, o fortalecimento da parede celular e o acúmulo de proteínas relacionadas ao

patógeno (PR) (NÜRNBERGER *et al.*, 2004; SILIPO *et al.*, 2010; SPOEL E DONG, 2012).

Um dos pontos de acesso dos patógenos a planta é a raiz. A região apical das raízes abriga meristemas que são necessários para o desenvolvimento radicular, e quando a invasão por patógenos ocorre, o desenvolvimento da raiz cessa de forma irreversível dentro de poucas horas mesmo na ausência de necrose severa. Porém as plantas desenvolveram um mecanismo de defesa onde o patógeno parece ser impedido de entrar em contato íntimo com a superfície radicular. Em vez disso, as células do meristema em contato com o patógeno se separam da superfície radicular formando uma espécie de manto ao redor da raiz e, conseqüentemente, impedem a invasão pelo patógeno. Caso essa invasão seja bem sucedida, o patógeno será reconhecido por PRR da planta, gerando uma resposta mais rápida e resistente no local da infecção. Essa resposta, que é regulada por fitohormônios e metabólitos produzidos à nível basal pela planta, deve ser finamente regulada com o intuito de não alterar outras vias bioquímicas e fisiológicas da planta (WEN *et al.*, 2009).

6.2. Reação de Hipersensibilidade

Interações entre planta e patógeno podem ser classificadas em compatíveis (onde o patógeno é virulento e o hospedeiro suscetível) e incompatíveis (onde o patógeno é avirulento e o hospedeiro resistente). Nas interações incompatíveis o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado e, em consequência, a resistência contra o patógeno é desenvolvida. Já em interações compatíveis o sistema de defesa não é ativado, ou é tardiamente ativado, condicionando um quadro de doença (RESENDE, SALGADO E CHAVES, 2003).

Uma característica de resistência em plantas é a indução de morte celular ao redor do local de ataque pelo patógeno (reação de hipersensibilidade – HR). Essa resposta ocorre quando uma planta reconhece especificamente um patógeno durante uma interação do tipo incompatível. Supõe-se que a HR

seja conceitualmente e mecanicamente semelhante à morte celular programada em células animais (PONTIER, BALAGUÉ E ROBY, 1998; NÜRNBERGER, 2004). Estudos recentes desenvolvidos por JIAO e colaboradores (2013) demonstraram que o ácido fusarico é capaz de induzir uma morte celular programada (PCD) em suspensão de células de *N. tabacum* cv. NC89.

A resistência das plantas é determinada por genes de resistência específicos (*R*) que as capacitam em reconhecer patógenos portadores de genes de avirulência (*avr*). Essa reação desencadeia uma resposta de defesa rápida e localizada que geralmente inclui a morte de células que estão em contato com o patógeno (HR). Dificuldades na detecção de interações diretas entre as proteínas *R* e *avr* (produtos dos genes de resistência e de avirulência) levaram à hipótese de que as proteínas *R* protegem as plantas que são alvos de proteínas patogênicas *avr* secretadas por patógenos, desencadeando HR e outras respostas quando interações *avr-R* são detectadas (GLAZEBROOK, 2001).

Durante a HR são produzidas ROS no local de ataque do patógeno e em níveis elevados. Estipula-se que radicais de oxigênio agressivos, bem como SA, causem peroxidação lipídica e danos à membrana, ocasionando morte celular. Acredita-se que a morte celular desencadeada pela HR seja responsável pela limitação do crescimento e propagação de patógenos, uma vez que matam a célula antes da multiplicação bem-sucedida do patógeno (PONTIER, BALAGUÉ E ROBY, 1998).

6.3. Mudanças bioquímicas e fisiológicas

Nas plantas, a PCD ocorre em decorrência da senescência da folha e como parte da resposta imune inata desencadeada por interações planta-patógeno. A PCD induzida por ROS foi descrita como um mecanismo de dano fotoxidativo, uma vez que plantas estressadas pela luz apresentam PCD decorrente de toxicidade causada por um aumento nos níveis de oxigênio (LEHMANN *et al.*, 2015).

O *burst* oxidativo é uma resposta de defesa gerada após o reconhecimento do patógeno, levando a uma HR e produção de ROS, um importante componente microbicida da imunidade inata em animais e plantas. A produção extracelular de ROS durante o *burst* oxidativo das plantas depende do aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólicos (envolvido em diversas vias de sinalização de defesa em plantas), (Figura 9) e parece ser mecanicamente similar ao *burst* respiratório de fagócitos humanos, que é catalisado por um complexo de proteína NADPH oxidase (NÜRNBERGER, 2004; ALAGARASAN E ASWATHY, 2017).

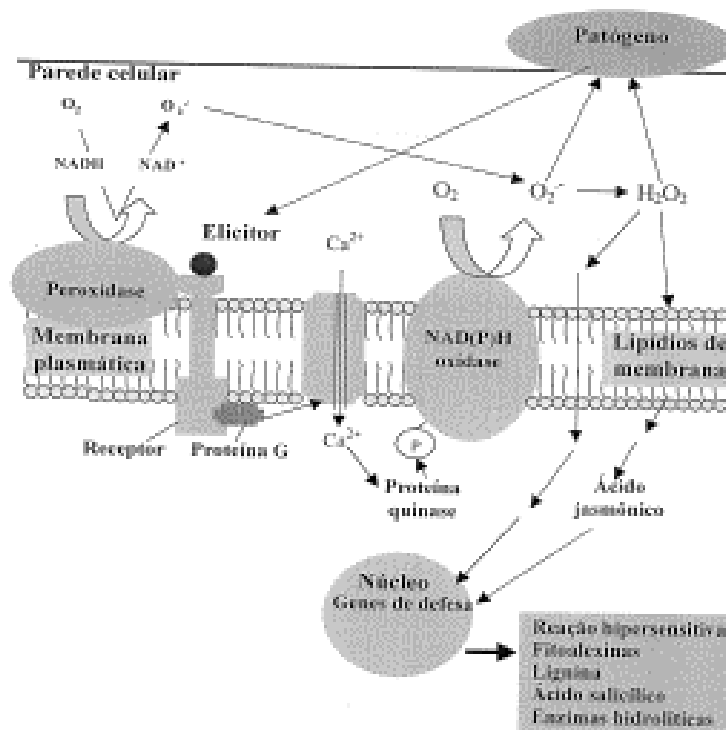


Figura 9: Esquema do mecanismo de *burst* oxidativo em plantas (RIZZARDI *et al.*, 2003).

Uma das primeiras vias de defesa da planta a ser ativada é a via de produção de espécies reativas de oxigênio, que compreendem moléculas reduzidas e quimicamente reativas como anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser diretamente tóxico ao patógeno, estando envolvido no fortalecimento da parede celular (participa do *cross-linking* oxidativo de proteínas da parede

celular), uma vez que ele é necessário para a biossíntese de lignina, e atuando também como mensageiro secundário responsável pela ativação da enzima responsável pela conversão do ácido benzoico em ácido salicílico (RESENDE, SALGADO E CHAVES, 2003; LEHMANN *et al.*, 2015).

Durante a interação entre planta e patógeno a produção de ROS acontece em três fases: na fase I ocorre o reconhecimento dos elicitores provenientes do patógeno, que podem ser carboidratos, proteínas ou porções peptídicas de glicoproteínas. Esse reconhecimento dispara os eventos de transdução de sinais. Na fase II são iniciados os eventos relacionados à defesa. As vias metabólicas ativadas na fase I conduzem a um aumento de compostos antioxidantes, ativação de lipoxigenases, produção de fitoalexinas, HR e SAR. A fase III compreende o processo de evolução da patogênese levando ao desenvolvimento de sintomas visíveis na planta (RESENDE, SALGADO E CHAVES, 2003).

ROS e NO são moléculas que atuam nas vias de transdução de sinais celulares, agindo como uma segunda linha de defesa por elevar a capacidade antioxidante da planta, aumentando assim a sua tolerância ao desenvolvimento de necroses causadas por patógenos ou estresses abióticos (ALAGARASAN E ASWATHY, 2017).

6.4. Metabólitos primários e secundários

As plantas produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos, divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários, que possuem função estrutural e de armazenamento de energia, são compostos fundamentais que consistem, em sua maioria, de ácidos graxos, aminoácidos e açúcares. Os metabólitos secundários, apesar de não serem essenciais para sobrevivência da planta, são de extrema importância, uma vez que possuem ação protetora contra estresses abióticos (PUSZTAHELYI, HOLB E POCSI, 2015).

Com base nas teorias de origem biossintéticas, os metabólitos secundários podem ser divididos em: terpenos, compostos fenólicos e

alcaloides (Figura 10). Os terpenos são compostos formados de múltiplas unidades de isopreno, podendo ser lineares ou cíclicos, saturados ou insaturados, sendo mais conhecidos pela sua função de proteção a planta (ex: saponinas). Saponinas são compostos com uma grande capacidade antifúngica. A α -tomatina é uma saponina encontrada em tomates capaz de ativar a fosfotirosinaquinase e vias de sinalização da proteína G, acarretando um aumento na produção de ROS e induzindo uma resposta de defesa (PUSZTAHELYI, HOLB E POCSI, 2015).

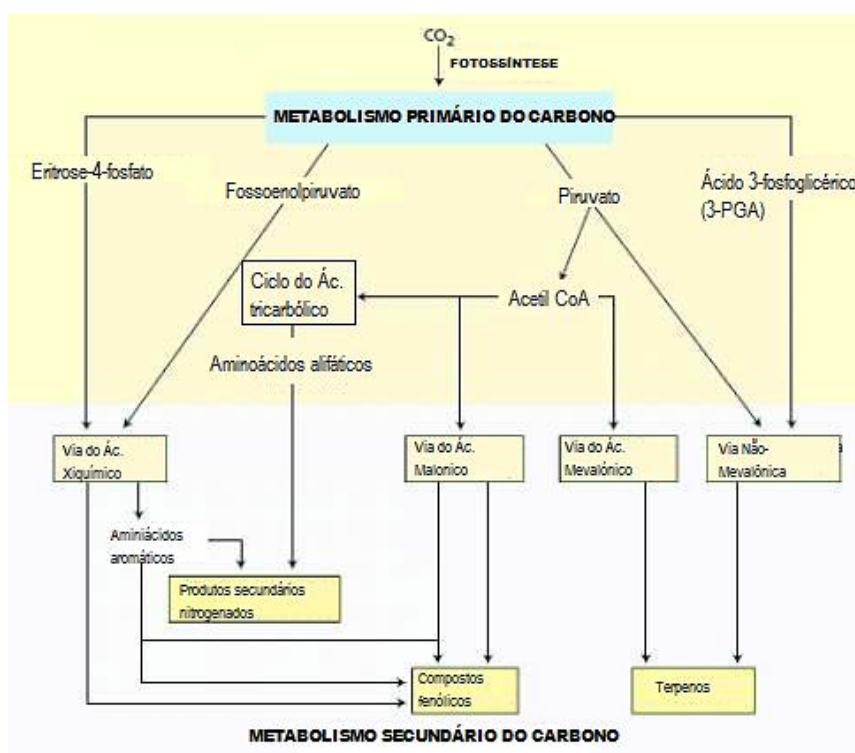


Figura 10: Esquema representativo das vias de produção de metabólitos secundários a partir de fontes de carbono geradas na fotossíntese da planta (adaptado de LINCOLN E ZEIGER, 2012).

Os compostos fenólicos formam um grande grupo de fitoquímicos, estando presentes em altas concentrações em folhas e frutos. Além disso, juntamente com a produção de ROS, também participam de processos de defesa importantes, como no reforço da parede celular de plantas através da deposição de lignina. Compostos fenólicos são derivados do fosfato de pentoses e da via de fenilpropanóides em plantas, sendo responsáveis pela

alteração da permeabilidade celular e pela interação com proteínas de membrana, alterando sua estrutura e funcionalidade (PUSZTAHELYI, HOLB E POCSI, 2015).

Os alcalóides ainda não têm sua ação fito-fisiológica completamente elucidada. A maioria de suas funções são relacionadas à proteção, podendo prevenir as plantas do herbivorismo causado por insetos e larvas e protegendo as raízes contra fungos parasitas (PUSZTAHELYI, HOLB E POCSI, 2015).

6.5. Fitohormônios

Os fitohormônios interferem nas interações entre plantas e patógenos, orquestrando respostas imunes do hospedeiro e modulando a virulência do patógeno. Os fitohormônios: SA, ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) são moduladores que atuam na resistência basal contra agentes patogênicos, pois são fundamentais na rede de sinalização que regula as respostas de defesa induzidas nas plantas. As plantas desenvolveram um elevado potencial regulatório através da intercomunicação entre as vias de sinalização dependentes de SA, JA e ET para se adaptarem de forma eficaz e eficiente a estresses bióticos e abióticos (VAN LOON, REP E PIETERSE, 2006; ZHANG *et al.*, 2010; ALAGARASAN E ASWATHY, 2017).

Sabe-se que existem dois tipos de respostas de resistência nas plantas, que podem ser ativadas por duas vias de sinalização distintas referidas como resistência adquirida sistêmica (SAR) e resistência induzida sistêmica (ISR). A SAR está associada principalmente à interação de plantas com patógenos biotróficos e hemi-biotróficos. O início da SAR é acompanhado do aumento da concentração de SA no floema. A remoção de SA pela expressão constitutiva de uma hidroxilase de salicilato cessa essa resposta de defesa, sugerindo que o SA seja um sinalizador imunológico transportado. Sabe-se que o acúmulo de SA local e sistêmico, após a infecção por patógenos, induz a expressão de genes relacionados à patogênese (*PR*), que são considerados marcadores da via de sinalização de SA. Os genes *PR* responsivos a SA incluem *PR-1* e *PR5* (CONRATH, 2006; SPOEL E DONG, 2012; LEONETTI *et al.*, 2017).

O SA é um componente central e crítico da SAR. A biossíntese de SA ocorre através de dois ramos da via do ácido xiquímico. Em um ramo, o ácido corísmico é convertido em SA via fenilalanina a ácido cinâmico e a conversão de fenilalanina em ácido cinâmico é catalisada por fenilalanina-amônio-liase (PAL). No outro ramo, o ácido corísmico é convertido em SA via ácido isocorísmico e este passo é catalisado por isocorismato-sintase (ICS). Em *Arabidopsis*, a via ICS é o principal contribuidor de SA sintetizado em resposta à infecção por patógenos, enquanto em tabaco, a via PAL é o principal contribuinte para SA basal e a induzida por patógenos (SINGH, LIM E KACHROO, 2017).

O SA é essencial para a indução adequada da SAR e as mutações nas vias ICS ou PAL são suficientes para comprometer esta indução. A maior parte de SA endógena é metabolizada em diversos derivados incluindo o éster metilado, metil SA (MeSA). Ao contrário do SA, MeSA é biologicamente inativo e só funciona quando convertido de volta ao SA. MeSA é volátil, podendo funcionar como um sinal de defesa aéreo. A conversão de SA para MeSA é mediada por SA metiltransferases (SAMT). MeSA acumula no floema após a indução da SAR de uma maneira dependente de SAMT. Após a translocação para o tecido distal, MeSA é convertido de volta para SA pela via de esterases da proteína de ligação SA (SABP). Mutações em SAMT ou SABP podem comprometer SAR, dificultando a eliminação do patógeno (SINGH, LIM E KACHROO, 2017).

Uma via distinta associada à resistência induzida em plantas é baseada nos hormônios vegetais JA e ET, que funcionam como moléculas de sinalização de ISR frente a estresses abióticos, como temperatura, pH e excesso de radiação solar. O JA foi inicialmente considerado um inibidor da germinação de sementes, desestimulando o crescimento de raízes e inibindo o desenvolvimento de plantas. Estudos posteriores provaram que o JA possui outras funções além da inibitória, agindo na resistência de plantas contra fungos patogênicos. O tratamento com JA exógeno resulta em um aumento da expressão de proteínas envolvidas na defesa (PR3, PR4 e PR12 são induzidas por JA em defesa contra patógenos necrotróficos) e de fitoalexinas (proteínas enzimáticas presentes na parede celular vegetal com propriedades

antimicrobianas). Este mesmo tratamento também diminui a expressão de genes envolvidos no crescimento e no metabolismo primário, para que assim os nutrientes sejam direcionados para a defesa da planta (TURNER, ELLIS E DEVOTO, 2012; SPOEL E DONG, 2012; LEONETTI *et al.*, 2017).

O ET atua em quantidades vestigiais durante a vida da planta através da estimulação ou da regulação do amadurecimento da fruta, abertura de flores e senescência programada de folhas. Este fitohormônio é conhecido por regular o crescimento e o desenvolvimento das plantas, adaptando-as as condições de estresse, além de agir no desenvolvimento de pelos radiculares e na nodulação de raízes (PONTIER, BALAGUÉ E ROBY, 1998; LIN, ZHONG E GRIERSON, 2009).

O Gliceraldeído 3-fosfato (G3P) é um composto gerado após a infecção dos tecidos primários e subseqüentemente translocado para regiões distais da planta para induzir a imunidade sistêmica. Esse hormônio é um derivado de açúcar fosforilado de três carbonos que serve como um componente obrigatório da glicólise e da biossíntese de glicerolípidos. Os níveis de G3P na planta são regulados por enzimas envolvidas em sua biossíntese e catabolismo. O acúmulo de G3P nos tecidos infectados e não infectados (sistêmicos) precede o acúmulo de SA (SPOEL E DONG, 2012; SINGH, LIM E KACHROO, 2017).

6.6. Resistência Sistêmica Adquirida

As plantas desenvolveram diversos mecanismos de resistência para se adaptarem aos ataques de patógenos. O sistema de resistência da planta compreende defesas constitutivas e defesas induzidas, que são expressas em partes da planta distantes do local primário da infecção. A proteção sistêmica contra a invasão é referida como SAR (CHEOL SONG *et al.*, 2016). SAR é um sistema de defesa induzido por um contato local primário entre uma planta e um patógeno, e confere imunidade sistêmica a um amplo espectro de agentes patogênicos. Acredita-se que a infecção primária induz um estado de alerta duradouro em toda a planta (Figura 11), o que permite que esta reaja contra

infecções subsequentes por vários agentes patogênicos com uma resposta imune mais rápida e eficiente. (NÜRNBERGER *et al.*, 2004; MOLLA *et al.*, 2016)

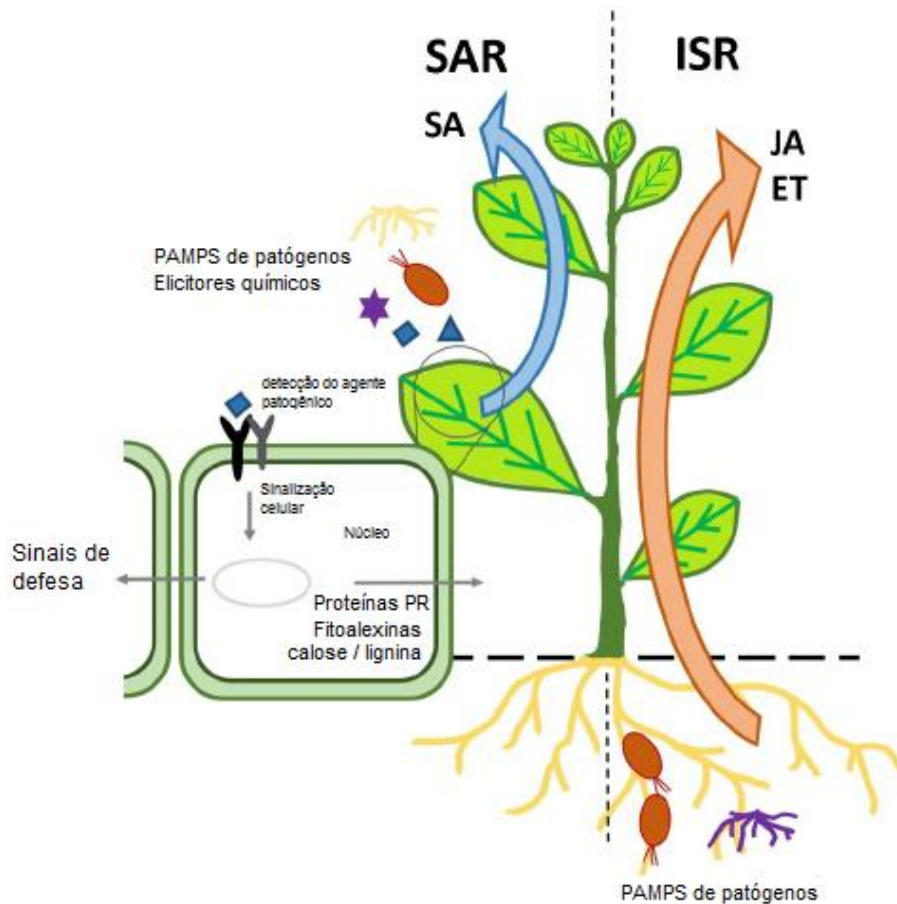


Figura 11: Esquema de diferentes tipos de resistência sistêmica. A resistência adquirida sistêmica (SAR) é desencadeada após o ataque de patógenos, pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP). Após o reconhecimento, a célula vegetal desencadeia respostas complexas de sinalização e defesa, incluindo a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR), fitoalexinas antimicrobianas ou fortificação da parede celular com calose ou lignina. As defesas locais são seguidas pela produção de sinais móveis, como o ácido salicílico (SA), que são transportados via xilema para partes distantes do local da infecção. A resistência sistêmica induzida (ISR) pode ser desencadeada pela colonização da raiz com rizobactérias ou fungos. ISR é independente de SA, sendo induzida principalmente por ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Tanto SAR como ISR estabelecem defesas melhoradas e aceleradas após estresses bióticos e abióticos subsequentes (adaptado de BURKETOVÁ *et al.*, 2015).

A SAR é biologicamente desencadeada por interações compatíveis e incompatíveis capazes de causar morte celular, mas pode ocorrer após o aparecimento de HR, uma vez que ambas as vias possuem etapas em comum

nas vias de sinalização (PONTIER, BALAGUÉ E ROBY, 1998). Dentre as características da SAR estão o desenvolvimento da resistência reforçada nos órgãos não inoculados e distais da planta e sua atividade contra um espectro amplo e distinto de agentes patogênicos como vírus, bactérias, oomicetos e fungos (CONRATH, 2006).

Durante a indução da SAR, sinais celulares são produzidos no tecido infectado e propagados por toda a planta pelo floema (Figura 12). Após a inoculação local de agentes patogênicos, tecidos não infectados apresentaram respostas de defesa similares às encontradas no tecido infectado, porém em nível mais moderado (BANDAY E NANDI, 2015).

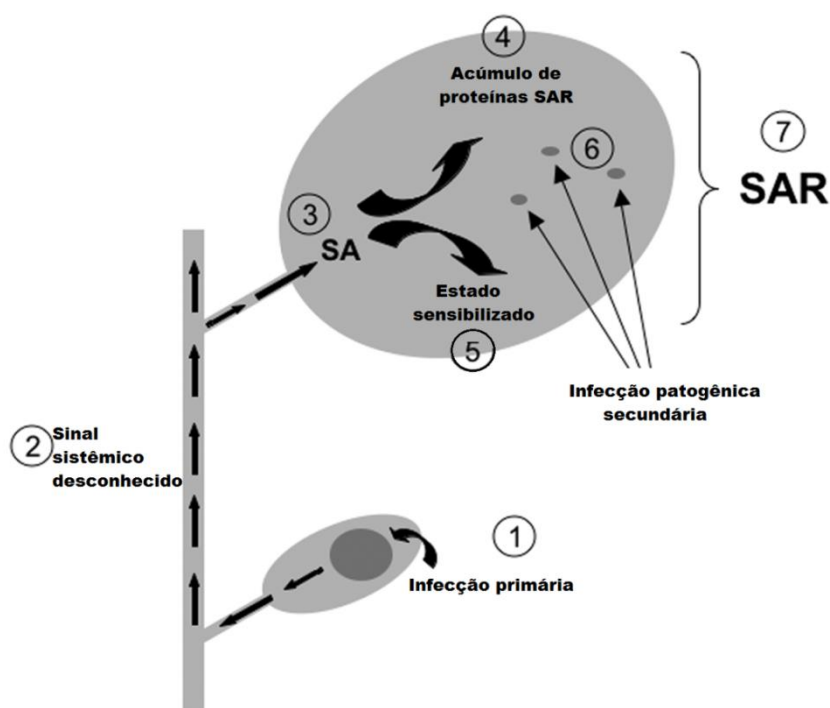


Figura 12: Estabelecimento da resistência sistêmica adquirida (SAR). Após uma infecção primária, um sinal sistêmico é enviado (via floema) para toda planta provocando um acúmulo de ácido salicílico (SA) e promovendo a expressão de genes SAR, que codificam enzimas com atividade antimicrobiana. (Adaptado de CONRATH, 2006)

Embora a identidade do sinal de longa distância para a SAR seja desconhecida, é considerado que SA seja necessário para estabelecer a SAR no tecido remoto. (GLAZEBROOK, 2001) As primeiras evidências convincentes para isso vieram de estudos com tabaco transgênico e plantas de *Arabidopsis*

que expressam constitutivamente uma hidroxilase de SA bacteriana. Essas plantas são incapazes de acumular altos níveis de SA e não adquirem resistência sistêmica após a infecção por patógenos necrotizantes, presumivelmente devido à destruição do sinal de SA. Um trabalho mais recente com mutantes de *Arabidopsis sp.* afetados na produção de SA ou na sinalização de SA confirmou o papel do SA como um sinal importante na SAR. Além disso, em plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis sp.*, a superprodução de SA aumentou a resistência a agentes patogênicos. (CONRATH, 2006) Muitos mutantes com níveis constitutivamente elevados de SA sofrem morte celular espontânea na ausência de ataque de patógenos. Alguns dos genes definidos por essas mutações podem funcionar como reguladores negativos da morte celular hipersensível, enquanto outros podem simplesmente perturbar o metabolismo celular de uma maneira que leva à morte celular, o que desencadeia a cascata de sinalização de SAR (GLAZEBROOK, 2001).

Além de HR, níveis crescentes de SA funcionam como reguladores da SAR, resultando na indução coordenada de um grupo heterogêneo de marcadores denominados proteínas PR, que conferem resistência geral contra patógenos biotróficos, como fungos, vírus e bactérias. Notavelmente, a indução de genes *PR* e SAR também podem ser desencadeadas pela aplicação exógena de SA ou dos análogos funcionais de SA – ácido benzóico (BA), ácido 2,6-dicloro isonicotínico (INA) e 1,3-benzotiazol (BTH) (MAIER *et al.*, 2011; CHEOL SONG *et al.*, 2016) – e aplicação da molécula de sinalização NO, que é capaz de induzir genes como o *PAL* e genes *PR* (ZHAO *et al.*, 2014).

Os genes marcadores da SAR, incluindo genes *PR*, foram identificados, caracterizados e sua indução correlacionada com o início da SAR (CHEOL SONG *et al.*, 2016).

As proteínas PR, observadas pela primeira vez no tabaco reagindo hipersensivelmente ao vírus TMV, são definidas como proteínas que se acumulam intra ou extracelularmente sob condições patológicas. A superexpressão de genes que codificam uma ou mais proteínas PR na planta

pode protegê-la contra o desenvolvimento sintomático de doenças (NARASIMHAN *et al.*, 2003; VAN LOON, REP E PIETERSE, 2006).

Enzimas tais como a PAL, peroxidase e polifenoloxidase, geralmente presentes constitutivamente e apenas aumentadas durante a maioria das infecções, muitas vezes também são chamadas PR (VAN LOON, REP E PIETERSE, 2006). PAL, especificamente, é uma enzima chave na defesa da planta, conduzindo a síntese de moléculas antimicrobianas, como fitoalexinas e outras PRs, e ao fortalecimento da parede celular através da deposição de polímeros de lignina e calose. Os produtos da via PAL limitam a disseminação de patógenos no tecido do hospedeiro e impedem a sua penetração, resultando em um estado de resistência a infecções (UMEMURA *et al.*, 2000; YEDIDIA *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2014; NAZ *et al.*, 2014; HADWIGER, 2015).

Em relação aos genes *PR*, há uma abundância de informações principalmente relacionadas a plantas modelo, como *Arabidopsis sp.*, tomate e tabaco (proteínas *PR* foram encontradas em genótipos de tabaco infectado com TMV) (ZHANG *et al.*, 2010; CHEOL SONG *et al.*, 2016).

Em tabaco e *Arabidopsis sp.*, o estabelecimento da SAR está associado à expressão de genes *PR*. Algumas proteínas codificadas por esses genes foram identificadas como β -1, 3-glucanases (*PR2*) e quitinases (*PR3*), possivelmente capazes de hidrolisar os componentes da parede celular microbiana (CONRATH, 2006). A família *PR2* age diretamente na inibição do crescimento de fungos e oomicetos, dado que agem sobre as β -1, 3-glucanas presentes na parede celular desses patógenos (VAN LOON, REP E PIETERSE, 2006).

As famílias de genes que codificam *PR3* e *PR5* (proteína similar a taumatina) têm sua expressão associada a infecção por patógenos e a estresses mecânicos (ferimentos) e químicos. As quitinases (*PR3*), bem como os inibidores de proteinase (*PR6*), também podem atacar nematóides e insetos herbívoros (VAN LOON, REP E PIETERSE, 2006).

Os membros da família *PR8* (quitinase tipo III) também possuem atividade de lisozima e podem ser direcionados contra bactérias, enquanto que

as defensinas (PR12) e as tioninas (PR13) possuem atividades antibacterianas e antifúngicas. Algumas proteínas de transferência de lipídeos (PR14) possuem atividades antifúngicas e antibacterianas e membros da família PR1 foram associadas à atividade contra oomicetos. Notavelmente, as proteínas PR1 são freqüentemente usadas como marcadores do estado defensivo reforçado conferido pela SAR, mas sua atividade biológica permanece indefinida. PR9 é um tipo específico de peroxidase que pode atuar no reforço da parede celular, catalisando a lignificação e aumentando a resistência contra múltiplos agentes patogênicos. PR10 mostra homologia com ribonucleases, e alguns membros possuem atividade de ribonuclease fraca (Tabela 1) (VAN LOON, REP E PIETERSE, 2006).

Tabela 1: Famílias identificadas de proteínas relacionadas à patogênese.

<u>Família</u>	<u>Propriedades</u>
PR-1	Possível ação contra oomicetos
PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Quitinase tipo I, II
PR-5	Proteína semelhante ataumatina
PR-6	Inibidor da proteinase
PR-7	Endoproteinase
PR-8	Quitinase tipo III
PR-9	Peroxidase
PR-10	Proteína semelhante aribonuclease
PR-11	Quitinase tipo I
PR-12	Defensina
PR-13	Tionina
PR-14	Proteína de transferência de lipídios
PR-15	Oxalato oxidase
PR-16	Proteína semelhante a oxalato-oxidase
PR-17	Desconhecida

(Adaptado de VAN LOON, REP E PIETERSE, 2006)

A proteína PR1 foi inicialmente identificada no tabaco como parte da resposta de defesa a infecções virais. PR1 é a classe mais expressa da família de proteínas PR. (NARASIMHAN *et al.*, 2003)

Em *Arabidopsis sp.*, o gene *PR1* é regulado somente por SA ou INA, mas não é induzido por MeSA ou ET. Em tabaco, este gene não é apenas induzido por SA, mas também por uma combinação de ET e MeSA. No entanto, PR1 não foi induzido quando utilizado apenas MeSA ou ET. O gene *PR1b* foi induzido fracamente por SA, mas foi fortemente ativado por JA exógeno em arroz. A expressão de um membro da família PR1 foi considerada constitutiva e não afetada por tratamentos com BTH ou ácido salicílico em plantas de pêra (ZHANG *et al.*, 2010).

A ativação da SAR correlaciona-se com a expressão dos genes *PR*. Embora as funções de alguns dos produtos dos genes *PR* sejam desconhecidas, algumas dessas proteínas parecem conferir vários graus de resistência ao patógeno. A ativação da expressão do gene *PR* e o estabelecimento de SAR exigem a sinalização por SA. O papel essencial de SA na SAR foi demonstrado em tabaco transgênico e plantas de *Arabidopsis* que expressam o gene bacteriano de salicilato hidroxilase (*nahG*). Nestas plantas, SA é convertido em seu composto inativo o catecol, e a indução da expressão do gene *PR* e de SAR é inibida (KINKEMA, FAN E DONG, 2000).

Argumenta-se que a administração de compostos biológicos, como SA e glicoproteínas, ou compostos químicos, como análogos de SA, conferem um estado de resistência à planta. A infiltração de uma glicoproteína a fim de causar a resposta de hipersensibilidade já foi descrita por BAILLIEUL e colaboradores (1995) e por CORDELIER e colaboradores (2003), usando uma glicoproteína do fungo *Phytophthora megasperma*. Esta molécula também foi capaz de induzir SAR em plantas de tabaco infectadas com TMV.

7. Justificativa

O gênero *Fusarium* tem sido amplamente estudado pois, devido à sua fitopatogenicidade, é capaz de devastar uma variedade de culturas alimentícias (BURGESS, NELSON & SUMMERELL, 1989; HAFIZI, SALLEH & LATIFFAH, 2013; SCHÄFER *et al.*, 2014). Ademais, tem sido descrito também como um importante patógeno oportunista que vem emergindo como causador de doenças em hospedeiros humanos imunocomprometidos (WALSH *et al.*, 2004; HAFIZI, SALLEH & LATIFFAH, 2013; SCHÄFER *et al.*, 2014).

Nos vegetais, *F. oxysporum* pode se instalar e se desenvolver em seus tecidos, devido à capacidade de penetração das hifas em tecidos vegetais e à produção de enzimas que degradam a parede celular vegetal.

O cultivo de tabaco tem sido uma das safras de valor econômico mais acometidas por pragas fúngicas. O gênero *Nicotiana*, depois do gênero *Arabidopsis*, é um dos mais utilizados para estudos de defesa fitopatológica, sendo consideradas plantas modelo.

Dentre os componentes da parede celular dos fungos, os polissacarídeos e as glicoproteínas têm se mostrado potentes estimuladores da resposta inata e adquirida. Estudos recentes do nosso grupo demonstraram o envolvimento de uma peptídeoramnomanana (PRM) de *Scedosporium prolificans* (XISTO *et al.* 2015) e de uma PGM de *F. oxysporum* (DE OLIVEIRA, 2016) na ativação de células fagocíticas humanas e determinaram o seu papel no direcionamento da resposta imune.

Tendo como base os aspectos destacados acima, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de determinar a participação da PGM isolada da parede celular de *F. oxysporum* na fitopatogênese em *Nicotiana tabacum*.

8. Objetivos

Objetivo Geral:

- Analisar o efeito da peptideogalactomanana (PGM) obtida da parede celular de *Fusarium oxysporum* na patogênese causada pelo fungo em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Objetivos Específicos:

- Obtenção glicoproteína (PGM) da parede celular de *F. oxysporum*.
- Avaliar o papel da PGM purificada de *F. oxysporum* na fitopatogênese da planta utilizando como modelo experimental a interação com folhas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1.
- Avaliar o papel da PGM purificada de *F. oxysporum* na fitopatogênese utilizando como modelo experimental a interação com raízes de plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1.
- Analisar a expressão de genes de resistência sistêmica adquirida em raízes de plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1 após tratamento com a PGM de *F. oxysporum*.

Material e Métodos

1. Microrganismo e condições de cultivo

O microrganismo utilizado foi da cepa nº 4247 de *F. oxysporum*, cedida pela Dra. Maria Inez Sarquis da Coleção de Cultura de Fungos da FIOCRUZ – RJ (CCFF). Sua manutenção foi feita em meio de cultura Sabouraud modificado (SAB-M) sólido inclinado (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura a 0,5% e ágar a 2%), com repiques semanais.

2. Obtenção do micélio de *F. oxysporum*

A massa de células foi obtida pelo crescimento dos fungos por inoculação de amostra oriunda do meio de manutenção em Erlenmeyers contendo 200 ml de meio SAB-M líquido, mantido sob agitação (1800 G) durante sete dias à temperatura ambiente (pré-inóculo). Partindo do pré-inóculo, o fungo foi novamente inoculado em Erlenmeyers contendo 1000 ml de meio SAB-M e mantido sob as mesmas condições de temperatura e agitação. O micélio foi obtido por filtração à vácuo em funil de Buchner com gaze estéril, lavado com água destilada e estocado a -20°C até ser processado.

3. Extração da glicoproteína bruta (GPB)

A GPB foi extraída a partir do micélio de *F. oxysporum* com tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2, sob refluxo por 2h a 100°C (HAIDO *et al.*, 1998). A amostra foi centrifugada (1800 G/ 10 min), o sobrenadante concentrado a um volume de 150 ml em evaporador rotatório a vácuo (Heidolph - Laborota 4003 control) e precipitado com 3 volumes de etanol 92,8%, durante a noite a 4°C. Após centrifugação, o precipitado recuperado foi ressuscitado em água destilada, dialisado contra a mesma por 48h e, em seguida, liofilizado (Liofilizador Labconco – FreezeDry/LyphLock 4.5), dando origem a GPB.

4. Fracionamento da GPB com CETAVLON

A GPB foi fracionada utilizando brometo de hexadeciltrimetilamônio (CETAVLON), segundo a metodologia de Lloyd (1970). Cem miligramas de GPB foram dissolvidos em 10 ml de água destilada e adicionados a 100 mg de CETAVLON diluídos em 5 ml de água destilada. O pH da solução foi ajustado a 7,0 com NaOH 2M e a mesma foi mantida à temperatura ambiente, em repouso, durante a noite. Após centrifugação foi adicionado 7,5ml de ácido bórico 1% ao sobrenadante da solução, o pH foi ajustado a 8,8 e a solução foi mantida à temperatura ambiente em repouso, durante a noite. O precipitado foi recuperado por centrifugação, lavado com ácido acético a 2% em água destilada e precipitado com três volumes de etanol 92,8%. A amostra foi centrifugada e o precipitado recuperado foi diluído em água destilada, dialisado contra a mesma por 48h e liofilizado, resultando na fração B correspondente à peptideogalactomanana (PGM) (Figura 13).

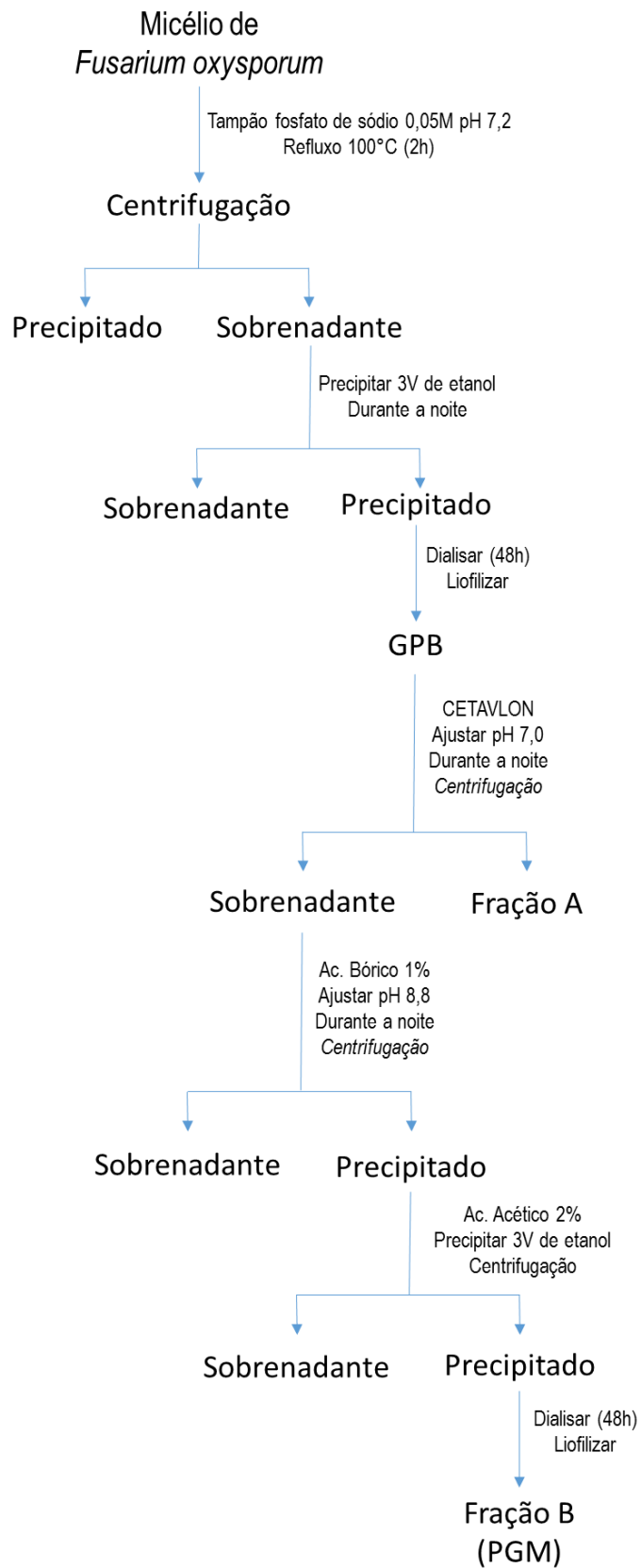


Figura 13: Esquema de extração da glicoproteína bruta (GPB) e fracionamento com CETAVLON para obtenção da Fração B (PGM)

5. Análises químicas e estruturais

5.1. Análises colorimétricas

- Dosagem de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956): Alíquotas de 50 µl de soluções contendo 1,0 mg/mL de GPB e de PGM foram adicionadas de 200 µl de água destilada. Em seguida, foram acrescentados 25 µl de fenol a 80% (p/v) e 1,5 ml de H₂SO₄ a 75% (v/v) e essa mistura foi aquecida a 80°C, por 20 min. A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro (Quimis) no comprimento de onda de 490 nm. Uma solução padrão de manose (1,5 mg/ml) foi utilizada na elaboração de uma curva padrão abrangendo a faixa de concentração de 37,5 a 150 µg/mL.

- Dosagem de proteínas (LOWRY *et al.*, 1951): Alíquotas de 20 µl de soluções contendo 1,0 mg/mL de GPB e de PGM foram adicionadas de 100 µl de uma mistura contendo Na₂CO₃ a 2% (p/v) em NaOH a 0,1M, CuSO₄.5H₂O a 1% (p/v) e tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆) a 2%, na proporção 100:1:1. As soluções foram mantidas em repouso, à temperatura ambiente, por 10 min e após esse tempo, 10 µl do reagente de Folin em H₂O destilada (1:1) foram adicionados. Passados 30 min à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura da densidade ótica em leitor de ELISA (Thermoplate) a 655 nm (faixa de comprimento de onda de 630-660 nm), utilizando-se uma solução de soroalbumina bovina (BSA – 1 mg/mL) na elaboração de uma curva padrão, abrangendo a faixa de 10 a 100 µg/ml.

- Dosagem de ácidos urônicos (BLUMENKRANTZ E ASBOC-HANSEN, 1973): Alíquotas de 60 µl de soluções contendo 2,0 mg/ml de GPB e de PGM foram adicionadas de 0,14 ml de água destilada e 1 ml de uma solução de borato de sódio 0,95% em H₂SO₄ concentrado. Os sistemas foram agitados e aquecidos a 100°C por 12 min. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, foram adicionados 40 µl de carbazol a 0,2% em etanol absoluto. Os sistemas foram novamente agitados e, após novo aquecimento a

100°C por 10 min, a leitura óptica foi feita em espectrofotômetro (Quimis) a 525 nm. Foi utilizado como padrão uma solução de ácido glucurônico (1 mg/mL) na faixa de concentração de 5 a 30 µg.

5.2. Análise qualitativa da composição monossacarídica da GPB e da PGM

Para identificação da composição de monossacarídeos, a GPB e a PGM foram submetidas à hidrólise ácida total com ácido trifluoracético (TFA) a 3M por 3h à 100°C (ALBERSHEIM et al., 1967). Os monossacarídeos obtidos foram analisados qualitativamente por cromatografia em camada fina (TLC) usando o sistema de solventes composto por n-butanol/acetona/água, 4:5:1 (v/v/v) (OVODOV et al., 1966) e, como padrão, uma mistura de monossacarídeos contendo ramnose, galactose, glicose e manose a 2% em solução aquosa e uma solução de ácido glucurônico a 1 mg/ml. A revelação dos açúcares foi realizada com orcinol/H₂SO₄ a 100°C (KANFER & HAKOMORI, 1983).

6. Avaliação da Resposta de Hipersensibilidade (HR) em plantas de tabaco

6.1. Germinação e crescimento de plantas

As sementes de *N. tabacum* cv. SR1 foram germinadas na Casa de Vegetação, localizada no campus do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com controle de temperatura a 28°C +/-2°C, com fotoperíodo de 12h e no substrato para plantas (Top Garden Green – pH 5,8 +/- 0,5). Após 30 dias as plantas originadas foram transferidas para vasos individuais até atingirem o tamanho ideal (surgimento da terceira folha verdadeira) para realização do experimento de infiltração.

6.2. Interação de folhas de *N. tabacum* cv. SR1 com a PGM de *F. oxysporum* pela técnica de infiltração

Para este experimento foram utilizadas as plantas crescidas na Casa de Vegetação. Após atingirem o tamanho esperado suas folhas foram elicitadas com soluções da PGM de *F. oxysporum* ressuspendidas em água bidestilada estéril nas concentrações de 200 e 400µg/ml utilizando a técnica de infiltração (D'SILVA E HEATH, 1997; WANG *et al.*, 2012).

Esta técnica se fundamenta na infiltração das soluções de PGM na porção ventral da folha. Com o auxílio de uma seringa sem agulha é feita uma leve pressão na folha sem machucá-la, a fim de que o líquido penetre no tecido foliar. Além das soluções da PGM, utilizou-se soro albumina bovina (BSA) 1M como controle positivo e água bidestilada estéril como controle negativo. Os resultados foram avaliados após 24h, 48h e 72h a luz visível e sob a luz UV com auxílio de uma lâmpada UV de alta intensidade. O esquema utilizado na interação da PGM com as folhas de *N. tabacum* está representado na figura 14.

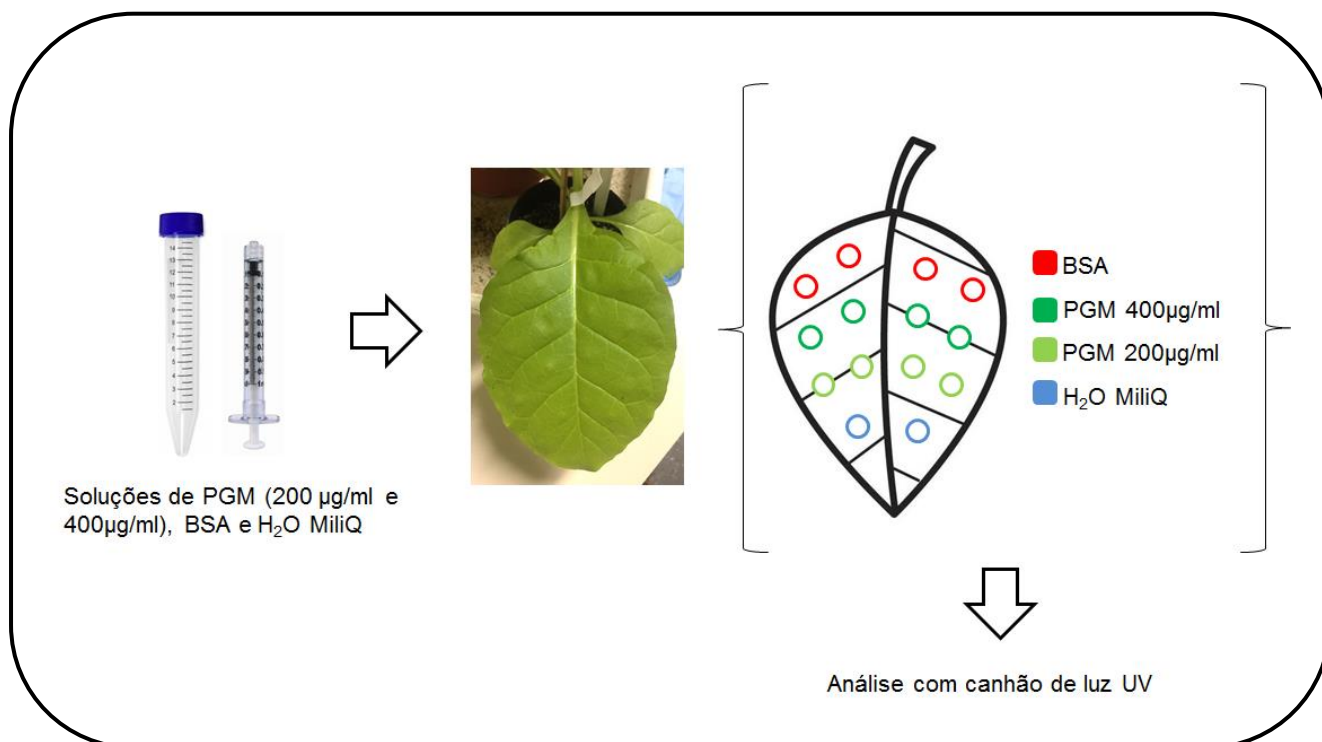


Figura 14: Esquema da infiltração da peptideogalactomanana (PGM) de *F. oxysporum* em folhas de *N. tabacum*.

7. Avaliação da resistência sistêmica adquirida (SAR) em plântulas de tabaco após o tratamento com a PGM

7.1. Germinação das sementes e crescimento de plântulas

Cem mililitros de meio de cultura MS meia força (Murashige & Skoog, 1962) semi-sólido foi preparado contendo sal MS (2,2g), sacarose (15g) e ágar (9g). O meio foi esterilizado por autoclavagem e após resfriamento, dentro do fluxo laminar, foi adicionado de 500 µl de vitamina MS (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, mioinositol e glicina) e vertido em placas de Petri sob condições estéreis. Uma esterilização das sementes de tabaco (armazenadas a -20°C) foi feita por um processo que consistiu em uma lavagem, por agitação manual, com etanol 70%, por 5 min, após o que todo líquido foi aspirado com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida foi feita uma lavagem com hipoclorito de sódio a 2% (50ml) adicionado de TWEEN 20 (2 gotas), seguindo os mesmos parâmetros de agitação e aspiração. Em seguida, seis lavagens consecutivas com água destilada estéril foram realizadas, sendo retirado todo líquido remanescente por aspiração. Após secagem das sementes, estas foram dispostas sobre o meio já solidificado e espalhadas com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril (Figura 15).



Figura 15: Placa contendo meio MS semi-sólido e plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1.

A placa foi fechada e vedada com adesivo *Micropore*®, possibilitando trocas gasosas e o crescimento da planta, sendo a mesma mantida em estufa BOD a 28°C com fotoperíodo de 12h. Após chegarem ao estágio de plântulas (\approx 1 mês) foi realizado o experimento de interação da PGM com suas raízes.

7.2. Avaliação do efeito da PGM de *Fusarium oxysporum* nas raízes de plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1

Em placas de 6 poços contendo meio MS líquido, foram dispostas plântulas elicidadas com diferentes concentrações de PGM de *F. oxysporum*. Duas concentrações distintas de PGM (200 e 400 μ g/ml) foram diluídas em solução isotônica, para avaliar a sua ação nas raízes das plântulas de tabaco, como a seguir: gentilmente, com o auxílio de uma pinça estéril, a plântula foi retirada do meio semi-sólido, suas raízes foram lavadas em água bidestilada estéril e em seguida mergulhadas nas diferentes soluções de PGM por 30 segundos. Um tratamento contendo apenas a solução isotônica foi utilizado como controle negativo. Em seguida, as raízes elicidadas foram colocadas em seus respectivos poços na placa contendo o meio de cultura. Amostras das raízes foram coletadas nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h e 96h. Após cada tempo foram feitas análises com auxílio de microscópio óptico, onde foi observada a mudança de pigmentação da raiz, devido ao acúmulo de H₂O₂. Para a análise foi utilizado o 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma) na concentração de 1mg/ml, diluído em água bidestilada como se segue: as plântulas foram retiradas dos poços, suas raízes separadas e colocadas em microtubos de 1,5 ml. A seguir adicionou-se 1 ml de DAB às raízes das plântulas. Os tubos foram mantidos por 2h na ausência de luz e à temperatura ambiente, após o que as raízes foram transferidas para outro tubo contendo etanol fervente a 70°C, por 10 min. Após a incubação com DAB, as raízes foram observadas ao microscópio óptico com um aumento de 10x (DONG *et al.*, 2008). As raízes não utilizadas neste experimento, tratadas e não tratadas, foram mantidas em freezer -80°C para serem utilizadas nos ensaios de expressão gênica.

7.3. Avaliação da expressão de genes de resistência induzidos pelo tratamento das raízes com a PGM por PCR em tempo real

Raízes de plântulas foram coletadas antes e após a interação com a PGM de *F. oxysporum*, ao longo de 5 dias (0h, 24h, 48h, 72h e 96h) e mantidas em freezer a -80°C. As raízes foram maceradas em 1 ml de trizol (Life Technologies) para a extração de RNA total, conforme descrito no protocolo do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi verificada utilizando 1µl da amostra e o equipamento NanoDrop™ ND-1000 (ThermoScientificCo.). A detecção e a qualidade de RNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão tris acetato EDTA (TAE) 0,5x. As bandas de RNA foram visualizadas após coloração do gel com brometo de etídio.

A fim de eliminar resíduos de DNA contaminantes da extração de RNA, 1µg do RNA extraído foi tratado com a enzima RQ1 RNase-FreeDNase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o mesmo 1µg do RNA foi utilizado para a produção do DNA complementar (cDNA- mais estável) utilizando o Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Co.) e 100µM do primer Oligodt (SIGMA), de acordo com as instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica foi realizada por qRT-PCR em tempo real, por ser o método que apresenta maior sensibilidade e especificidade na análise de transcritos. Essa técnica consiste no processo de transcrição reversa (RT) do cDNA seguida da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) com a incorporação de moléculas fluorescentes (SYBR Green) covalentemente ligadas ou não a nucleotídeos. Essas moléculas fluorescentes podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em “tempo real”). Os produtos formados são monitorados a cada ciclo de reação, o que permite uma detecção rápida e específica dos produtos de amplificação (GACHON *et al.*, 2004).

A reação foi realizada no equipamento “Applied Biosystems® 7500 fast Real-Time PCR” usando placa de 96 poços. Todas as reações foram realizadas usando dois *pools* de amostras independentes onde cada um continha a extração do RNA total e tratado, como especificado anteriormente, de dez raízes de plântulas diferentes. Os resultados da expressão gênica

relativa foram obtidos utilizando a média destes dois *pools* que foram constituídos de duas replicatas biológicas das raízes em cada tratamento e que foi analisado em triplicata técnica. Três controles negativos, sem cDNA, foram incluídos na placa para cada combinação de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).

As amostras foram misturadas, com o par de iniciadores específicos para o gene em estudo (10mM) e SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoScientific), de acordo com as instruções do fabricante, para avaliar a expressão dos diferentes genes através da detecção da síntese de fita dupla de cDNA.

Quatro pares de iniciadores específicos (Tabelas 2 e 3) para tabaco foram utilizados, no qual dois pares amplificam genes que foram avaliados quanto à resposta a indução de SAR, PR1 (Proteína relacionada a patogênese 1) e PAL, e os outros dois pares que amplificam os genes *PP2A* (fosfatase 2A) e *Actina*, constitutivos da planta.

A reação de amplificação do cDNA foi realizada em volume final de 25 μ l, de acordo com as orientações do fabricante. Os ciclos das reações de qRT-PCR em tempo real foram: 10 min a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento / extensão a 60°C por 1 min, exceto para os genes *PAL* que foi ajustada para 62°C.

O valor de Ct (*Cycle threshold*) das triplicatas técnicas foi avaliado e os que apresentavam diferença maior que 0,5 foram excluídos. A partir desses valores foram calculados a média e o desvio padrão

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para analisar a expressão de genes constitutivos associados à resistência adquirida sistêmica.

Gene amplificado	Iniciador direito (5'-3')	Iniciador reverso (5'-3')	Pb	Tm calculado
PP2A	GTGAAGCTGTAGGGCCTGAGC	CATAGGCAGGCACCAAATCC	56	60°C
Actina	AGGGTTTGCTGGAGATGATG	CGGGTTAAGAGGTGCTTCAG	56	60°C

(MONTEBIANCO, 2014)

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para analisar a expressão de genes de resistência associados à resistência adquirida sistêmica.

Gene amplificado	Iniciador direito (5'-3')	Iniciador reverso (5'-3')	Pb	Tm calculado
PR1	ATGCGCAAATTATGCTTCC	TTCATCGACCCACATCTCA	138	60°C
PAL	AGTCGTGGACAGGGAATACG	ATTGAGCTGTTCGCGTTCTT	141	62°C

(MONTEBIANCO, 2014)

8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPadPrism* versão 5.00 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego CA). Utilizamos a análise de variância “two-way” ANOVA com o objetivo de comparar diferença entre grupos, enquanto comparações individuais de grupos foram feitas utilizando o teste de Bonferoni (*Bonferoni posttest*) ($p \leq 0,05$).

Resultados

1. Isolamento e purificação parcial da glicoproteína de *Fusarium oxysporum*

Uma quantidade de 700 mg da GPB obtida a partir do micélio de *F. oxysporum* por extração aquosa a quente, foi parcialmente purificada pelo fracionamento com CETAVLON (Lloyd, 1970), originando uma fração majoritária na presença de borato de sódio em pH 8,8, correspondente a fração B (PGM). Esta purificação parcial apresentou um rendimento de 7,5%, uma vez que partindo de 700 mg de GPB foram obtidas, aproximadamente, 55 mg de PGM.

2. Análises colorimétricas

Por meio de métodos analíticos a GPB e a PGM foram analisadas quanto ao teor de açúcares totais (GPB: 82,2% e PGM: 80,6%), proteínas (GPB: 79,4% e PGM: 5,9%) e açúcares acídicos (GPB: 21,2% e PGM: 15,1%) (Tabela 4).

Tabela 4: Conteúdo de açúcares neutros, proteínas e açúcares acídicos da GPB e da PGM obtidas através da precipitação com CETAVLON.

Amostras	Proteínas ^a	Açúcares totais (%) ^b	Açúcares acídicos (%) ^c
GPB	79,4	82,2	21,2
PGM	5,9	80,6	15,1

^a (LOWRY *et al.*, 1951)

^b (DUBOIS *et al.*, 1956)

^c (BLUMENKRANTZ e ASBOC-HANSEN, 1973)

3. Análise qualitativa dos monossacarídeos componentes da GPB e da PGM

Por meio da análise qualitativa por TLC, constatou-se que os monossacarídeos componentes da GPB e da PGM, obtidos após hidrólise

ácida com TFA a 3M, foram manose, glicose e galactose. Na Fr. A também se observou a presença de ácido glucurônico (Figura 16).

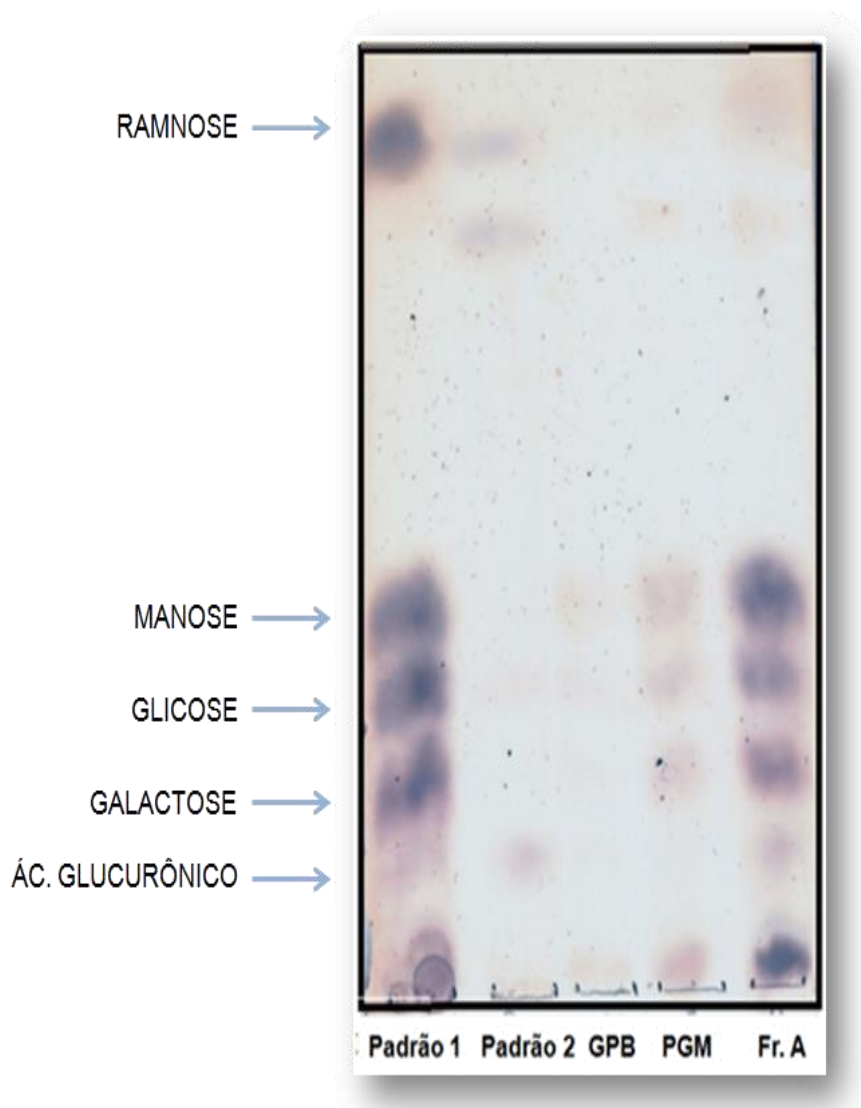


Figura 16: Análise qualitativa da composição de monossacarídeos da GPB e da PGM de *F. oxysporum* por TLC após hidrólise com TFA a 3M, 3h/ 100°C. Sistema de solventes: n-butanol-acetona-água, 4:5:1 (v/v/v). Revelador: orcinol-ácido sulfúrico. Padrão 1: ramnose, manose, glicose e galactose. Padrão 2: ácido glucurônico.

4. Avaliação da resposta de hipersensibilidade de *Nicotiana tabacum* cv. SR1 após tratamento das folhas com a PGM de *Fusarium oxysporum*

No ensaio de infiltração, folhas de *N. tabacum* cv. SR1 foram elicitadas pela PGM de *F. oxysporum*, como visto no esquema da figura 14. Após a infiltração das soluções de PGM na folha não foram vistas alterações a luz

visível em nenhum dos tempos avaliados (24h, 48h e 72h). Porém, na observação sob luz UV, foram observados halos fluorescentes nos locais de infiltração do controle positivo e de todas as soluções de PGM. Esses halos fluorescentes aumentavam de intensidade proporcionalmente ao aumento da concentração da solução de PGM e ao aumento do tempo de avaliação. Não foram observadas resposta de necrose proeminente em nenhum dos pontos (Figura 17).

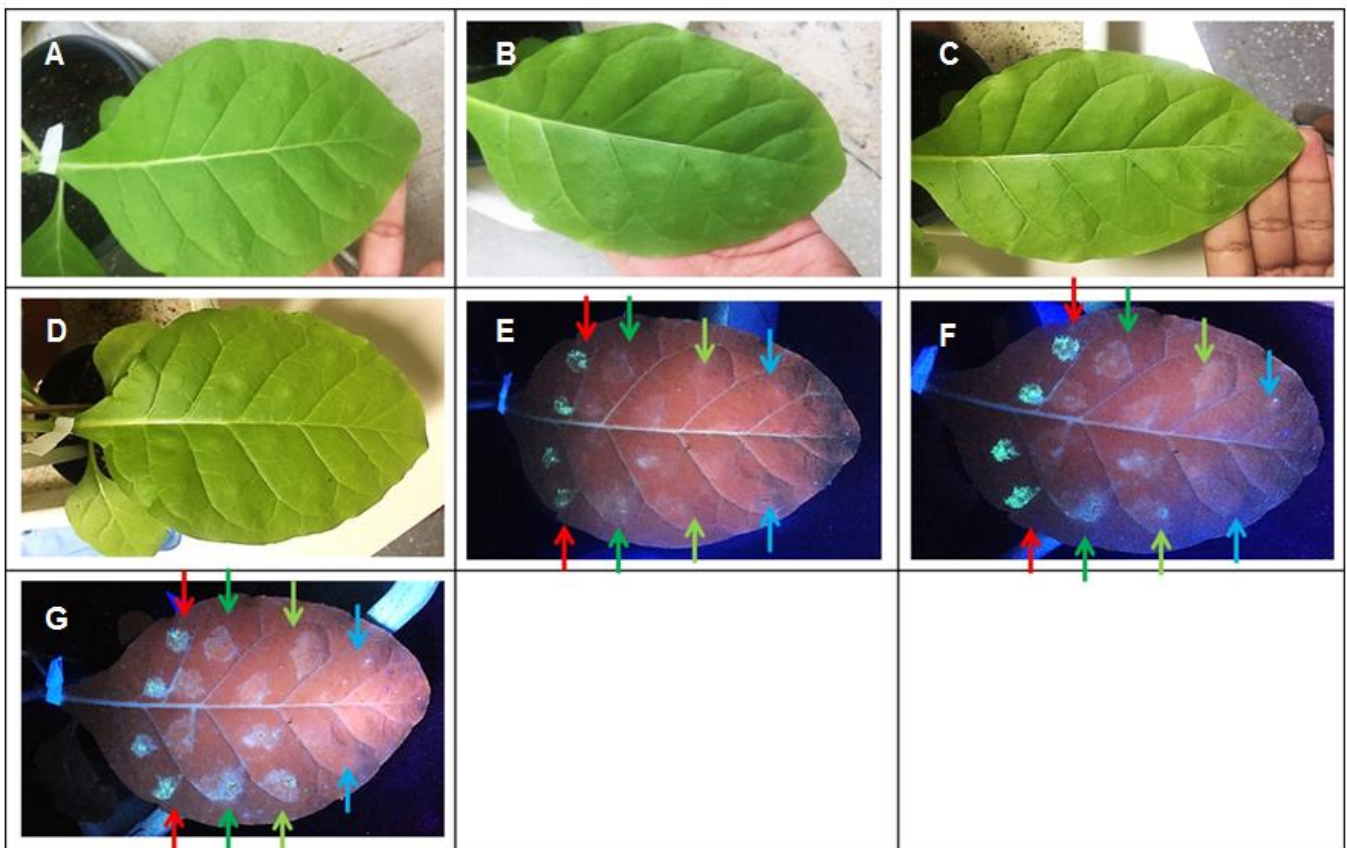


Figura 17: Análise de folha de *Nicotiana tabacum* cv. SR1 infiltrada com diferentes concentrações de peptideogalactomanana (PGM). Folha observada a luz visível nos tempos de 0h (A), 24h (B), 48h (C) e 72h (D). Folha observada a luz UV nos tempos 24h (E), 48h (F) e 72h (G). Marcações: BSA (vermelho), PGM 400µg/ml (verde escuro), PGM 200 µg/ml (verde claro) e água bidestilada (azul).

5. Avaliação da resposta oxidativa em plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1 após tratamento com a PGM de *Fusarium oxysporum* (in vitro)

As raízes das plântulas de *N. tabacum* crescidas em meio semi-sólido foram avaliadas quanto à resposta oxidativa após tratamento com a PGM de *F. oxysporum*. A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi observada após elicitação de raízes com diferentes concentrações da PGM de *F. oxysporum*. Observamos a precipitação do DAB nas raízes das plântulas tratadas com a PGM nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h, indicando a produção e deposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no tecido das raízes. O mesmo resultado não foi observado nos controles e no tempo 0h de tratamento (Figura 18).

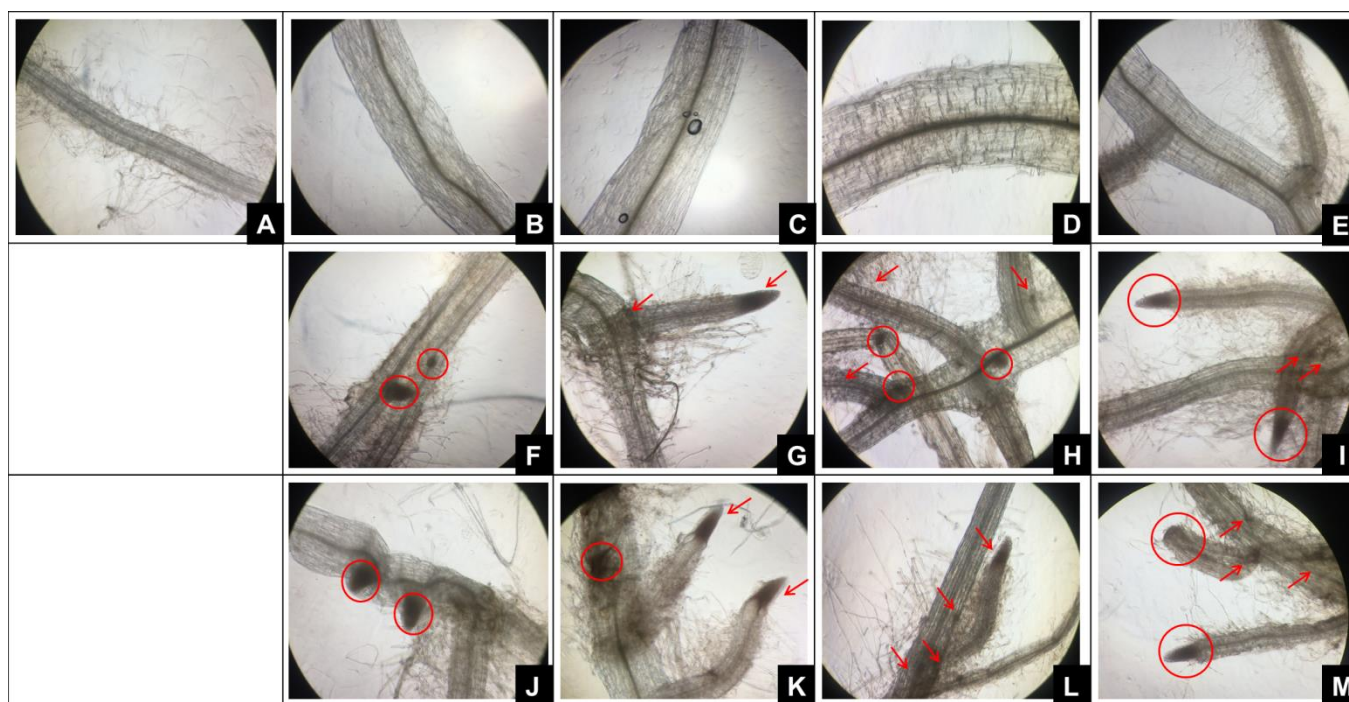


Figura 18: Observação da resposta oxidativa, pela deposição de 3,3-diaminobenzidina (DAB), em raízes de plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1. Raízes tratadas apenas com solução isotônica nos tempos: 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) e 96h (E). Raízes tratadas com solução de PGM 200µg/ml nos tempos: 24h (F), 48h (G), 72h (H) e 96h (I). Raízes tratadas com solução de PGM 400µg/ml nos tempos: 24h (J), 48h (K), 72h (L) e 96h (M). As marcações em vermelho indicam os locais onde ocorreu acúmulo de H_2O_2 . PGM: peptidogalactomanana

6. Avaliação da resistência adquirida sistêmica em raízes de plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. SR1 tratadas com PGM de *Fusarium oxysporum*

Para avaliar a resposta de defesa induzida pela elicitação das raízes de plântulas de *N. tabacum* cv. SR1 com a PGM de *F. oxysporum*, os níveis de transcritos de dois genes (*PR1* e *PAL*) foram avaliados.

Primeiramente foi feita a extração do RNA total, e sua qualidade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando tampão tris acetato EDTA (TAE) 0,5x. As bandas de RNA foram visualizadas após coloração do gel com brometo de etídio. Em seguida foi feito um tratamento com DNase para a posterior síntese do cDNA. A avaliação da expressão dos genes relacionados à defesa (*PR1* e *PAL*) foi realizada utilizando qRT-PCR em tempo real.

Inicialmente foi possível observar que a PGM de *F. oxysporum* foi capaz de induzir a expressão dos dois genes de defesa analisados. O padrão de expressão desses genes, no entanto, foi inesperado.

A elicitação do tecido radicular das plântulas de *N. tabacum* cv. SR1 com a concentração de 400µg/ml da PGM levou a uma alta expressão do gene *PR1* em 72h – aproximadamente 45 vezes mais expresso que o controle – ocorrendo uma queda acentuada em 96h. A concentração de 200µg/ml apresentou um padrão distinto, pois seu pico de expressão ocorreu em 24h e foi decaindo ao longo do tempo (Figura 19).

O gene *PAL*, assim como o gene *PR1*, quando elicitado com 400µg/ml de PGM de *F. oxysporum* apresentou expressão máxima em 72h – aproximadamente 9 vezes mais expresso que o controle. Já a concentração de 200µg/ml de PGM foi capaz de induzir a expressão máxima do gene em 48h, diminuindo gradualmente ao longo do tempo (Figura 20).

Comparando o perfil de expressão dos dois genes avaliados é possível observar que ambos apresentam um pico máximo de expressão em 72h quando elicitados com a maior concentração de PGM (400µg/ml). Apenas a

expressão do gene *PR1* foi dose dependente até 72h, declinando bruscamente em 96h.

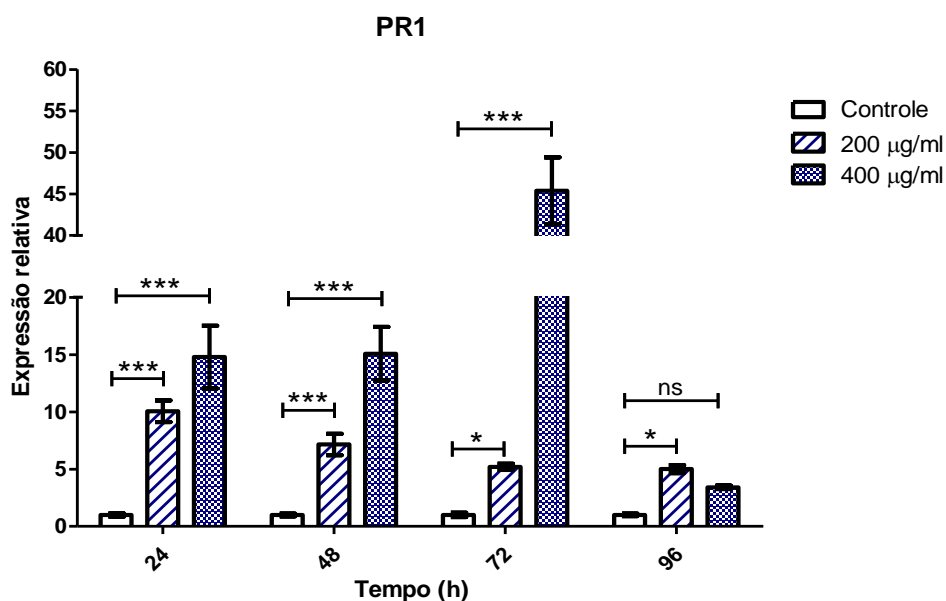


Figura 19: Expressão do gene relacionado à patogênese 1 (*PR1*) em raízes de plântulas de *Nicotiana tabacum* tratadas com diferentes concentrações de peptideogalactomanana. Todos os resultados foram obtidos em experimentos feitos em duplicata biológica e triplicata técnica (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ e ns = não significativo).

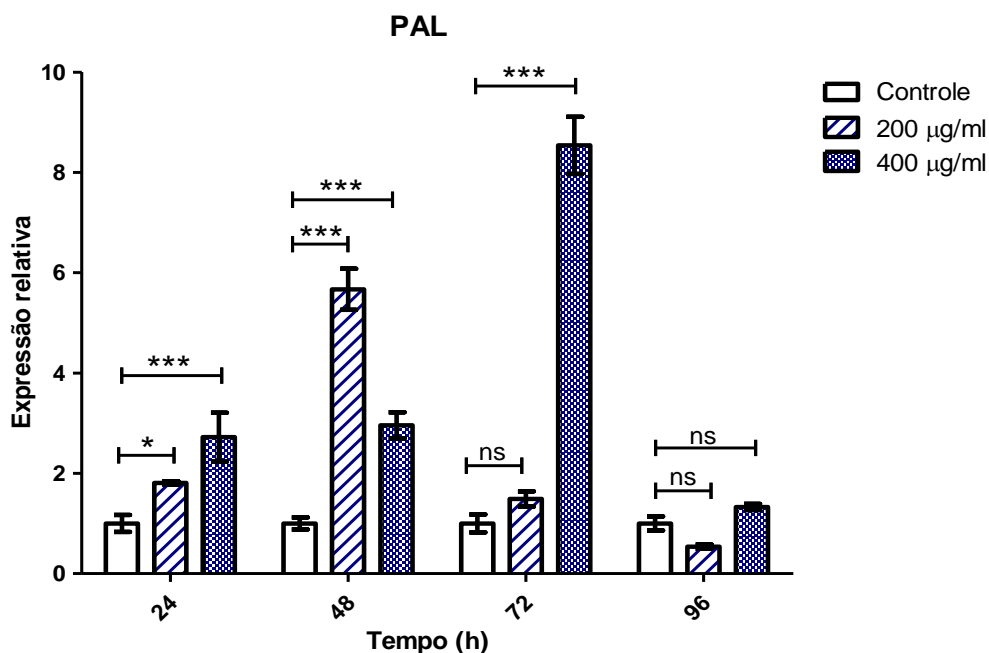


Figura 20: Expressão do gene Fenilalanina amônia liase (*PAL*) em raízes de plântulas de *Nicotiana tabacum* tratadas com diferentes concentrações de peptideogalactomanana. Todos os resultados foram obtidos em experimentos feitos em duplicata biológica e triplicata técnica (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ e ns = não significativo).

Discussão

F. oxysporum é um fungo que tem sido estudado devido à sua capacidade fitopatogênica (BURGESS, NELSON E SUMMERELL, 1989) e por estar emergindo como um importante fungo oportunista causador de doenças em hospedeiros imunocomprometidos (WALSH *et al.*, 2004; HAFIZI *et al.*, 2013; SCHÄFER *et al.*, 2014).

A parede celular fúngica é uma estrutura altamente relevante na célula, uma vez que controla sua forma e a protege contra danos mecânicos. Essa estrutura celular está envolvida na interação fungo/célula hospedeira, proporcionando adesão e posterior invasão do fungo no tecido do hospedeiro (REISS *et al.*, 1992; LATGÉ, 2010).

Os glicoconjugados são moléculas envolvidas no processo de colonização de tecidos, como adesão e diferenciação celular (CRUCHO *et al.*, 2015), sendo considerados fatores de virulência em fungos como: *Aspergillus fumigatus*, *Candida glabrata*, *Scedosporium apiospermum* e *Pseudallescheria boydii* (LÓPEZ-RIBOT *et al.* 2004; PINTO *et al.*, 2004; SCHMALHORST *et al.*, 2008; SEIDER *et al.*, 2011; ROLLIN-PINHEIRO *et al.*, 2014). Essas moléculas são de grande importância para a interação do fungo com o hospedeiro e seu estudo fornece informações relevantes sobre mecanismos de colonização, interações patógeno/hospedeiro e patogênese, assim como novos alvos para agentes antifúngicos (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006; ROILIDES *et al.*, 2009; LATGÉ, 2010).

Os glicoconjugados presentes na parede celular de microrganismos foram descritos como moléculas importantes no estímulo e na supressão da resposta imune em plantas (ERBS & NEWMAN, 2009). Notadamente, os glicoconjugados de origem fúngica já foram apontados como fatores de virulência na patogênese de plantas. Ensaios feitos com *F. oxysporum* sp. *Nicotianae* determinaram que o aumento da expressão de glicoproteínas da parede celular do fungo resultaram no aumento da severidade de lesões apresentadas após a infecção em folhas de tabaco (NARASIMHAN *et al.*, 2003). Em 2011, PENG e colaboradores demonstraram que o glicoconjugado *PemG1*, extraído de *Magnaporthe grisea*, apresentou efeitos patogênicos em *Arabidopsis* e em plantas de arroz. Em 2015, ZHANG e colaboradores observaram efeitos semelhantes em plantas de tabaco e tomate com a molécula *BcGs1*, extraída do fungo *Botrytis cinerea*.

Contemplando os prévios argumentos, neste trabalho foi isolada uma glicoproteína a partir do micélio de *F. oxysporum*, a qual foi purificada pelo fracionamento com CETAVLON, segundo a metodologia de LLOYD (1970), originando uma fração B. Essa fração foi caracterizada como uma PGM em estudos prévios do nosso grupo. DE OLIVEIRA (2016) demonstrou, por análises colorimétricas, que esta molécula era composta por açúcares neutros (80,6%) e proteínas (5,9%) e, por cromatografia de camada fina (TLC), que os monossacarídeos presentes eram manose, glicose e galactose. A reatividade imunológica de PGM de fungos já foi descrita em *A. fumigatus* (HAIDO *et al.*, 1998) e *A. flavus* (SILVA BAHIA *et al.*, 2003; FILIZZOLA, 2010).

Em seu ambiente natural, as plantas encontram uma grande variedade de agentes patogênicos, incluindo fungos, oomicetos, vírus e bactérias. As defesas das plantas dependem da interação entre padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) e receptores de reconhecimento de padrão (PRR) presentes no hospedeiro. A indução desse tipo de resposta envolve vias de sinalização de MAPquinase, expressão de genes que codificam proteínas PR, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), produção de fitoalexinas e deposição de calose para limitar a infecção e crescimento de patógenos (SUN *et al.*, 2015).

O uso de estratégias capazes de estimular respostas de defesa (constitutivas e induzidas) em plantas é muito empregado com o intuito de impedir a colonização da planta por patógenos (VOGEL-ADGHOUGH *et al.*, 2013). Elictores são compostos que ativam as respostas de defesa em plantas, tornando-as menos suscetíveis ao ataque por uma ampla gama de agentes patogênicos (COOPER & HORTON, 2017). Os elicitores derivados de patógenos são mais comumente associados à indução de defesas do hospedeiro e estes, quando reconhecidos pelos PRRs codificados pelo hospedeiro, resultam no estímulo da imunidade ativada por PAMPs. Esta forma de resistência pode minimizar ou prevenir a colonização microbiana, tornando o uso de elicitores mais adequado para controle de patógenos em sistemas agrícolas (SINGH *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2015).

A resposta de HR em folhas foi previamente observada na literatura. Em 2012, WANG e colaboradores infiltraram em folhas de tabaco a molécula *PevD1*

isolada do fungo patogênico *Verticillium dahliae*, observando que esta molécula induziu HR nas plantas de tabaco.

Na presença da PGM de *F. oxysporum* as plantas de *N. tabacum* cv. SR1 não apresentaram uma resposta de necrose proeminente em nenhum dos pontos infiltrados, como era esperado. A observação sob luz UV mostrou que a molécula induziu uma resposta do tipo HR de forma dose e tempo dependente, uma vez que a intensidade dos halos fluorescentes, observados nos pontos de infiltração, aumentava proporcionalmente a concentração de PGM infiltrada e aos tempos de observação. Isso indica que pode ter havido formação de compostos fenólicos associados à morte celular, induzidos e liberados nestes tecidos (WANG *et al.*, 2012).

Quando em contato com um patógeno a planta é capaz de produzir um conjunto de respostas de defesa, dentre as quais podemos destacar a rápida formação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esses compostos parecem desempenhar papéis fundamentais nos estágios iniciais e tardios da resposta das plantas contra patógenos (ZHAO *et al.*, 2007). Segundo DONG e colaboradores (2008), a produção de H₂O₂ contribui de forma relevante para o reforço da resistência de plantas transgênicas contra patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta resposta tem o intuito de reforçar a parede celular e evitar a propagação do agente patogênico para outros locais da planta, essencialmente, formando uma rede em volta do patógeno e dessa forma restringindo sua reprodução e propagação. Em concentrações tóxicas, o H₂O₂ pode causar danos ao DNA, oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e oxidação de aminoácidos (GERBER *et. al*, 2004; TUDZYNSKI *et. al*, 2012; MUTHAMILARASAN & PRASAD, 2013 STAEL *et. al*, 2015).

A PGM de *F. oxysporum* foi capaz de induzir a produção de H₂O₂ nas raízes das plântulas de *N. tabacum* cv. SR1. A produção de H₂O₂ foi detectada através da reação de precipitação com DAB e sua concentração aumentou progressivamente ao longo do tempo avaliado. A deposição de DAB observada nas raízes tratadas com PGM está relacionada a uma resposta da planta contra o patógeno e as suas moléculas de superfície. O uso da PGM de *F. oxysporum*

pode propiciar uma defesa posterior a outros patógenos como foi observado por PENG e colaboradores (2011) e ZHANG e colaboradores (2015).

A SAR é um mecanismo de defesa ativado através da via de sinalização mediada pelo SA após uma HR. Devido à sua importância econômica, os mecanismos reguladores de SAR têm sido extensivamente estudados usando plantas modelo como *Arabidopsis*, tabaco e arroz (KUSAJIMA *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos (metabólitos da via fenilpropanóide) desempenham um papel relevante no crescimento e na adaptação ambiental de muitas plantas. PAL é a primeira enzima chave da via fenilpropanóide, sendo um agente regulatório das respostas de crescimento de plantas (MA, 2016; CHEN, 2017).

PAL é uma das enzimas que ligam o metabolismo primário ao metabolismo secundário, por isso é bastante estudada no que diz respeito às respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos. Análises de expressão gênica demonstraram que PAL poderia ser estimulada por elicitores ambientais, como baixa temperatura, desidratação e irradiação UV. As moléculas de sinalização de plantas, como SA e JA também estimularam a expressão de PAL (MA, 2016).

Em *Arabidopsis*, isocorismato sintase 1 (ICS1) é uma enzima chave na biossíntese de SA para a indução de SAR, sendo o seu equivalente, em tabaco, a via biossintética mediada por PAL (KUSAJIMA *et al.*, 2017).

CASS e colaboradores (2015) apontaram que a supressão do gene *PAL* aumenta a suscetibilidade da planta *Brachypodium* contra patógenos biotróficos. A super expressão desse gene, porém, tem um efeito oposto: ela promove o acúmulo de compostos fenilpropanóides, como a lignina, auxiliando na formação de uma barreira mecânica contra agentes patogênicos.

Neste trabalho foi observado que duas concentrações distintas de PGM foram capazes de expressar diferentemente o gene *PAL*. As duas concentrações (400 µg/ml e 200 µg/ml) se mostraram eficientes em aumentar a expressão do gene, porém esta expressão só é significativa ($p \leq 0,05$) até 72h após o tratamento. Este dado está de acordo com o que já foi descrito previamente na

literatura, onde pesquisas mostraram que a sinalização de defesa mediada por genes *PAL* parece ser rapidamente ativada, mas posteriormente suprimida. (CASS *et al.* 2015; CHEN, 2017)

Proteínas PR são componentes da imunidade ativada por PAMPs e podem agir como marcadores de SAR em plantas, impedindo a invasão por patógenos. (MIRANDA *et al.*, 2017)

PR1 é uma das proteínas mais produzidas após o ataque de patógenos e embora tenha sido amplamente estudada, sua função exata ainda permanece desconhecida. PECĚENKOVÁ e colaboradores (2017) sugeriu que esta proteína tenha atividade antifúngica, estando envolvida na sinalização de defesa mediada por SA e na morte celular relacionada à HR.

Estudos mostraram que quando o gene *PR1* foi super expresso no tabaco, essas plantas se tornaram ligeiramente mais resistentes a certos agentes patogênicos, como os oomicetos *Phytophthora parasitica* e *Peronospora tabacina*. No entanto, quando PR1 foi silenciado essas plantas apresentaram maior suscetibilidade a infecções por estes oomicetos (KIBA *et al.*, 2007; GAMIR 2016; PECĚENKOVÁ *et al.*, 2017).

Quando tratada com a PGM de *F. oxysporum*, *N. tabacum* expressou o gene de defesa *PR1* a partir de 24h. A concentração de PGM de 400µg/ml apresentou um perfil de expressão genica tempo e dose dependente até 72h após o tratamento com a PGM. Esses dados encontrados são semelhantes àqueles apresentados por GAMIR (2016).

O perfil de expressão desses genes de defesa, *PR1* e *PAL*, sugere que a PGM de *F. oxysporum* pode ser utilizada como um elicitor de defesa em plantas. Esses elicitores tem a capacidade de controlar a infecção por patógenos pois ativam o sistema de defesa da planta antes desta entrar em contato com um microrganismo patogênico, auxiliando no controle de infecções (COOPER e HORTON, 2017).

Conclusões

- O processo de extração e purificação pelo qual a PGM de *F. oxysporum* é obtida possui um rendimento muito baixo, fazendo com que sucessivas extrações e purificações sejam necessárias, com o intuito de obter uma quantidade de PGM suficiente para realização dos experimentos.
- A caracterização química da PGM mostrou que esta se tratava de uma glicoproteína contendo manose, glicose e galactose, sendo portanto definida como uma peptidogalactomanana (PGM).
- A PGM de *F. oxysporum* foi capaz de induzir uma resposta de HR tempo e dose dependentes em folhas de *N. tabacum* cv. SR1, levando a crer que esta molécula seja capaz de ativar uma resposta de defesa local na planta.
- Raízes de plântulas de *N. tabacum* cv. SR1 quando tratadas com a PGM de *F. oxysporum* exibiram uma produção de H₂O₂. A produção desse composto é característica do *burst* oxidativo, tendo como função isolar e eliminar o patógeno.
- A PGM de *F. oxysporum* foi capaz de aumentar a expressão dos genes de defesa *PR1* e *PAL* em raízes de plântulas de tabaco. Essa expressão aumentada pode conferir um perfil de resistência sistêmica à planta e uma possível proteção contra futuros ataques por patógenos.
- Os resultados apresentados comprovam a ação fitopatogênica da PGM presente na parede celular de *F. oxysporum* em plantas de tabaco.

Referências Bibliográficas

ALAGARASAN, G.; ASWATHY, K. S. Shoot the Message, Not the Messenger-Combating Pathogenic Virulence in Plants by Inhibiting Quorum Sensing Mediated Signaling Molecules. *Front Plant Sci*, v. 8, p. 556, 2017.

ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P. D.; KARR, A. A method for the analysis of sugar in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate*, n.5, p.340-345, 1967.

BAILLIEUL, F.; GENETET, I.; KOPP, M.; SAINDRENAN, P.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S.. A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *Plant J*, v. 8, n. 4, p. 551-60, 1995.

BANDAY, Z. Z.; NANDI, A. K. Interconnection between flowering time control and activation of systemic acquired resistance. *Front Plant Sci*, v. 6, p. 174, 2015.

BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Research*, v.95, p.205-218, 1981.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. Ed. CRC Press, Florida, 1ªed., p. 27-41, 1989.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOC-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, v.54, p.481-489, 1973.

BURGESS, L. W.; NELSON, P. E.; SUMMERELL, B. A. Variability and Stability of Morphological Characters of *Fusarium oxysporum* Isolated from Soils in Australia. *Mycologia*, v. 81, n. 5, p. 818-822, 1989.

BURKETOVA, L.; TRDA, L.; OTT, P. G.; VALENTOVA, O. BIO-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnol Adv*, v. 33, n. 6 Pt 2, p. 994-1004, 2015.

CABIB, E.; DRGON, T.; DRGONOVÁ, J.; FORD, R. A.; KOLLÁR, R. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochemical Society Transactions*, v. 25, n. 1, 1997.

CALIXTO, R.; MATTOS, B.; BITTENCOURT, V.; LOPES, L.; SOUZA, L.; SASSAKI, G.; CIPRIANI, T.; SILVA, M.; BARRETO-BERGTER, E. β -Galactofuranose-containing structures present in the cell wall of the saprophytic fungus *Cladosporium (Hormoconis) resinae*. *Res Microbiol*, v. 161, n. 8, p. 720-8, 2010.

CANEPPA, A. S. Polissacarídeos ácidos de *Fusarium oxysporum*: evidencição, antigenicidade e participação na interação com macrófagos peritoneais de camundongo. Monografia (Biomedicina) – Instituto de Biomedicina, UNIRIO. Rio de Janeiro, 2010.

CASS, C. L.; PERALDI, A.; DOWD, P. F.; MOTTIAR, Y.; SANTORO, N.; KARLEN, S. D.; BUKHMAN, Y. V.; FOSTER, C. E.; THROWER, N.; BRUNO, L. C.; MOSKVIN, O. V.; JOHNSON, E. T.; WILLHOIT, M. E.; PHUTANE, M.; RALPH, J.; MANSFIELD, S. D.; NICHOLSON, P.; SEDBROOK, J. C. Effects of PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*. *J Exp Bot*, v. 66, n. 14, p. 4317-35, 2015.

CHEN, Y.; LI, F.; TIAN, L.; HUANG, M.; DENG, R.; LI, X.; CHEN, W.; WU, P.; LI, M.; JIANG, H.; WU, G. The Phenylalanine Ammonia Lyase Gene *LjPAL1* Is Involved in Plant Defense Responses to Pathogens and Plays Diverse Roles in *Lotus japonicus*-*Rhizobium* Symbioses. *Mol Plant Microbe Interact*, p. MPMIO4170080R, 2017.

CHEOL SONG, G.; SIM, H. J.; KIM, S. G.; RYU, C. M. Root-mediated signal transmission of systemic acquired resistance against above-ground and below-ground pathogens. *Ann Bot*, 2016.

CONRATH, U. Systemic Acquired Resistance. *Plant Signaling and Behavior*, v. 1, n. 4, p. 179-184, 2006.

COOPER, W. R.; HORTON, D. R. Elicitors of Host Plant Defenses Partially Suppress *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) Populations Under Field Conditions. *J Insect Sci*, v. 17, n. 2, 2017.

CORDELIER, S.; DE RUFFRAY, P.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Mol Biol*, v. 51, n. 1, p. 109-18, 2003.

CRUCHO, C. I.; CORREIA-DA-SILVA, P.; PETROVA, K. T.; BARROS, M. T. Recent progress in the field of glycoconjugates. *Carbohydr Res*, v. 402, p. 124-32, 2015.

DE OLIVEIRA, N. F. Caracterização química e imunológica da peptidogalactomanana de *Fusarium oxysporum*. Dissertação de Mestrado (Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ. Rio de Janeiro, 2016.

DA SILVA, M. I. D. Peptidoramnomana de *Scedosporium prolificans*: Caracterização estrutural, imunológica e interação com macrófagos de camundongos. Dissertação de Mestrado (Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ. Rio de Janeiro, 2009.

D'SILVA, I.; HEATH, M. C. Purification and characterization of two novel hypersensitive response-inducing specific elicitors produced by the cowpea rust fungus. *J Biol Chem*, v. 272, n. 7, p. 3924-7, 1997.

DA SILVA BAHIA, M. C.; HAIDO, R. M.; FIGUEIREDO, M. H.; LIMA DOS SANTOS, G. P.; LOPES BEZERRA, L. M.; HEARN, V. M.; BARRETO-BERGTER, E. Humoral immune response in aspergillosis: an immunodominant glycoprotein of 35 kDa from *Aspergillus flavus*. *Curr Microbiol*, v. 47, n. 2, p. 163-8, 2003.

DE PAUW, B. E. What are fungal infections? *Mediterr J Hematol Infect Dis*, v. 3, n. 1, p. e2011001, 2011.

DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. Human Fusariosis. *Clin Microbiol Infect*, v. 10, n. 1, p. 67-75, 2004.

DONG, X.; JI, R.; GUO, X.; FOSTER, S. J.; CHEN, H.; DONG, C.; LIU, Y.; HU, Q.; LIU, S. Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Planta*, v. 228, n. 2, p. 331-40, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBES, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.

ESCARIÃO, A. C. S. L.; RIBEIRO, S. E.; JORGE, P. A.; LEITE, E. C. S.; BRANDT, C. T. Efeito terapêutico do *cross-linking* corneal na ceratite infecciosa. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v.72, n.6, 2013.

FILIZZOLA, P. I. Peptideogalactomanana de *Aspergillus flavus*: Caracterização imunológica e envolvimento na interação com células Raw. Monografia (Biomedicina) – Instituto de Biomédico, UNIRIO. Rio de Janeiro, 2010.

FISHER, F.; COOK, N. B. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. 1ª ed. Revinter Brasil, 2001. 337 p.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JR., A. A.; COELHO, M. A. N.; COSTA, A. F.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. G.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M.; ZAPPI, D.C. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. *BioScience*, Minas Gerais, v. 62, n. 1. 2012.

FUNK, V.; HOLLOWELL, T.; BERRY, P.; KELLOFF, C.; ALEXANDER, S.N. Checklist of the Plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro; Guyana, Suriname, French Guiana). *Contributions from the United States National Herbarium*, v 55:1-584. 2007.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot*, v. 55, n. 402, p. 1445-54, 2004.

GAMIR, J.; DARWICHE, R.; VAN'T HOF, P.; CHOUDHARY, V.; STUMPE, M.; SCHNEITER, R.; MAUCH, F. The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J*, v. 89, n. 3, p. 502-509, 2017.

GERBER, I. B.; ZEIDLER, D.; DURNER, J.; DUBERY, I. A. Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta*, v. 218, n. 4, p. 647-57, 2004.

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, p. 301-308, 2001.

GOHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*, v. 46, p. 189-215, 2008.

GORDON, T. R.; OKAMOTO, D.; MILGROOM, M. G. The structure and interrelationship of fungal populations in native and cultivated soils. *Molecular Ecology*, v. 1, p. 241-249, 1992.

HADWIGER, L. A. Anatomy of a nonhost disease resistance response of pea to *Fusarium solani*: PR gene elicitation via DNase, chitosan and chromatin alterations. *Front Plant Sci*, v. 6, p. 373, 2015.

HAFIZI, R.; SALLEH, B.; LATIFFAH, Z. Morfological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 959-968, 2013.

HAIDO, R. M.; SILVA, M. H.; EJZEMBERG, R.; LEITAO, E. A.; HEARN, V. M.; EVANS, E. G.; BARRETO BERGTER, E. Analysis of peptidogalactomannans from the mycelial surface of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, v. 36, n. 5, p. 313-21, 1998.

HAMILTON, S. R.; GERNGROSS, T. U. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol*, v. 18, n. 5, p. 387-92, 2007.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M. Micotoxinas e Matabólitos Bioativos de *Fusarium*: Perspectiva de sua Importância para o Brasil. *Semina: Ci. Agr.*, v. 15, n. 1, p. 74-79, 1994.

JIAO, J.; ZHOU, B.; ZHU, X.; GAO, Z.; LIANG, Y. Fusaric acid induction of programmed cell death modulated through nitric oxide signalling in tobacco suspension cells. *Planta*, v. 238, n. 4, p. 727-37, 2013.

KANFER, J. N.; HAKOMORI, S. Chemistry of glycosphingolipids. In: *Handbook of lipids Research*. Ed. Donald J. Hanahan, v.3, New York and London, Plenum Press, p. 1-165, 1983.

KAVANAGH, K. *Fungi: Biology and Applications*. 2^a ed. John Wiley & Sons Irlanda, 2011. 376 p.

KIBA, T.; HENRIQUES, R.; SAKAKIBARA, H.; CHUA, N. H. Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, v. 19, n. 8, p. 2516-30, 2007.

KINKEMA, M.; FAN, W.; DONG, X. Nuclear Localization of NPR1 is Required for Activation of PR Gene Expression. *The Plant Cell*, v. 12, p. 2339-2350, 2000.

KUSAJIMA, M.; OKUMURA, Y.; FUJITA, M.; NAKASHITA, H. Abscisic acid modulates salicylic acid biosynthesis for systemic acquired resistance in tomato. *Biosci Biotechnol Biochem*, p. 1-4, 2017.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, v.66, n.2, p.279-290, 2007.

LATGE, J. P. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*, v. 12, n. 7, p. 863-72, 2010.

LEHMANN, S.; SERRANO, M.; L'HARIDON, F.; TJAMOS, S. E.; METRAUX, J. P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*, v. 112, p. 54-62, 2015.

LEITAO, E. A.; BITTENCOURT, V. C.; HAIDO, R. M.; VALENTE, A. P.; PETER-KATALINIC, J.; LETZEL, M.; DE SOUZA, L. M.; BARRETO-BERGTER, E. Beta-galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology*, v. 13, n. 10, p. 681-92, 2003.

LEONETTI, P.; ZONNO, M. C.; MOLINARI, S.; ALTOMARE, C. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Rep*, v. 36, n. 4, p. 621-631, 2017.

LI, Y.; MAO, L.; YAN, D.; MA, T.; SHEN, J.; GUO, M.; WANG, Q.; OUYANG, C.; CAO, A. Quantification of *Fusarium oxysporum* in fumigated soils by a newly developed real-time PCR assay to assess the efficacy of fumigants for *Fusarium* wilt disease in strawberry plants. *Pest Manag Sci*, v. 70, n. 11, p. 1669-75, 2014.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot*, v. 60, n. 12, p. 3311-36, 2009.

LINCOLN, T.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 5^a ed. Sinauer Associates. Estados Unidos. 2012.

LLOYD, K. O. Isolation, characterization, and partial structure of peptidogalactomannans from the yeast form of *Cladosporium werneckii*. *Biochemistry*, v. 9, n. 17, p. 3446-53, 1970.

LOPES, L. C.; DA SILVA, M. I.; BITTENCOURT, V. C.; FIGUEIREDO, R. T.; ROLLIN-PINHEIRO, R.; SASSAKI, G. L.; BOZZA, M. T.; GORIN, P. A.; BARRETO-BERGTER, E. Glycoconjugates and polysaccharides from the *Scedosporium/Pseudallescheria boydii* complex: structural characterisation, involvement in cell differentiation, cell recognition and virulence. *Mycoses*, v. 54 Suppl 3, p. 28-36, 2011.

LOPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; MURGUI, A.; MARTINEZ, J. P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 41, n. 3, p. 187-96, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAN, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, n.1, p. 265-275, 1951.

MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*, v. 67, p. 399-416, 2013.

MA, L. J.; VAN DER DOES, H. C.; BORKOVICH, K. A.; COLEMAN, J. J.; DABOUSSI, M. J.; DI PIETRO, A.; DUFRESNE, M.; FREITAG, M.; GRABHERR, M.; HENRISSAT, B.; HOUTERMAN, P. M.; KANG, S.; SHIM, W. B.; WOLOSHUK, C.; XIE, X.; XU, J. R.; ANTONIW, J.; BAKER, S. E.; BLUHM, B. H.; BREAKSPEAR, A.; BROWN, D. W.; BUTCHKO, R. A.; CHAPMAN, S.; COULSON, R.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G.; DIENER, A.; GALE, L. R.; GARDINER, D. M.; GOFF, S.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; HILBURN, K.; HUA-VAN, A.; JONKERS, W.; KAZAN, K.; KODIRA, C. D.; KOEHRSEN, M.; KUMAR, L.; LEE, Y. H.; LI, L.; MANNERS, J. M.; MIRANDA-SAAVEDRA, D.; MUKHERJEE, M.; PARK, G.; PARK, J.; PARK, S. Y.; PROCTOR, R. H.; REGEV, A.; RUIZ-ROLDAN, M. C.; SAIN, D.; SAKTHIKUMAR, S.; SYKES, S.; SCHWARTZ, D. C.; TURGEON, B. G.; WAPINSKI, I.; YODER, O.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZHOU, S.; GALAGAN, J.; CUOMO, C. A.; KISTLER, H. C.; REP, M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, v. 464, n. 7287, p. 367-73, 2010.

MA, R.-F.; LIU, Q.-Z.; XIAO, Y.; ZHANG, L.; LI, Q.; YIN, J.; CHEN, W.-S. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Isatis indigotica* Fort.: molecular cloning, characterization, and expression analysis. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 14, n. 11, p. 801-812, 2016.

MANDAL, S.; MITRA, A. Accumulation of cell wall-bound phenolic metabolites and their upliftment in hairy root cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Biotechnol Lett*, v. 30, n. 7, p. 1253-8, 2008.

MICHIELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol*, v. 10, n. 3, p. 311-24, May 2009.

MIRANDA, V. J.; PORTO, W. F.; FERNANDES, G. D. R.; POGUE, R.; NOLASCO, D. O.; ARAUJO, A. C. G.; COTA, L. V.; FREITAS, C. G.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Comparative transcriptomic analysis indicates genes associated with local and systemic resistance to *Colletotrichum graminicola* in maize. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 2483, 2017.

MOLLA, K. A.; KARMAKAR, S.; CHANDA, P. K.; SARKAR, S. N.; DATTA, S. K.; DATTA, K. Tissue-specific expression of Arabidopsis NPR1 gene in rice for sheath blight resistance without compromising phenotypic cost. *Plant Sci*, v. 250, p. 105-114, 2016.

MUHAMMED, M.; CARNEIRO, H.; COLEMAN, J.; MYLONAKIS, E. The challenge of managing fusariosis. *Virulence*, v. 2, n. 2, p. 91-96, 2014.

MUR, L. A. J.; NAYLOR, G.; WARNER, S. A. J.; SUGARS, J. M.; WHITE, R. F.; DRAPER, J. Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal*, v. 9, n. 4, p. 559-571, 1996.

MURRAY, P. *Microbiologia Médica*. 5^a ed. Elsevier. Brasil, 2006.

MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J Biosci*, v. 38, n. 2, p. 433-49, 2013.

NARASIMHAN, M. L.; LEE, H.; DAMSZ, B.; SINGH, N. K.; IBEAS, J. I.; MATSUMOTO, T. K.; WOLOSHUK, C. P.; BRESSAN, R. A. Overexpression of a cell wall glycoprotein in *Fusarium oxysporum* increases virulence and resistance to a plant PR-5 protein. *The Plant Journal*, v. 36, n. 3, p. 390-400, 2003.

NAZ, R.; BANO, A.; WILSON, N. L.; GUEST, D.; ROBERTS, T. H. Pathogenesis-related protein expression in the apoplast of wheat leaves protected against leaf rust following application of plant extracts. *Phytopathology*, v. 104, n. 9, p. 933-44, 2014.

NEWMAN, M. A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J. T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci*, v. 4, p. 139, 2013.

NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect*, v. 7, n. 4, p. 789-98, 2005.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, v. 20, n. 4, p. 695-704, 2007.

NUCCI, M.; VARON, A. G.; GARNICA, M.; AKITI, T.; BARREIROS, G.; TROPE, B. M.; NOUER, S. A. Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 19, n. 10, p. 1567-72, 2013.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, v. 198, p. 249-266, 2004.

OHARA, T.; TSUGE, T. FoSTUA, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell*, v. 3, n. 6, p. 1412-22, 2004.

- PECENKOVA, T.; PLESKOT, R.; ZARSKY, V. Subcellular Localization of Arabidopsis Pathogenesis-Related 1 (PR1) Protein. *Int J Mol Sci*, v. 18, n. 4, 2017.
- PENG, D. H.; QIU, D. W.; RUAN, L. F.; ZHOU, C. F.; SUN, M. Protein elicitor PemG1 from *Magnaporthe grisea* induces systemic acquired resistance (SAR) in plants. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 24, n. 10, p. 1239-46, 2011.
- PEREZ-NADALES, E.; NOGUEIRA, M. F.; BALDIN, C.; CASTANHEIRA, S.; EL GHALID, M.; GRUND, E.; LENGELER, K.; MARCHEGIANI, E.; MEHROTRA, P. V.; MORETTI, M.; NAIK, V.; OSES-RUIZ, M.; OSKARSSON, T.; SCHAFER, K.; WASSERSTROM, L.; BRAKHAGE, A. A.; GOW, N. A.; KAHMANN, R.; LEBRUN, M. H.; PEREZ-MARTIN, J.; DI PIETRO, A.; TALBOT, N. J.; TOQUIN, V.; WALTHER, A.; WENDLAND, J. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet Biol*, v. 70, p. 42-67, 2014.
- PIETRO, A. D.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M. I. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol*, v. 4, n. 5, p. 315-25, 2003.
- PINTO, M. R.; BARRETO-BERGTER, E.; TABORDA, C. P. Glycoconjugates and Polysaccharides of Fungal Cell Wall and Activation of Immune System. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 195-208, 2008.
- PINTO, M. R.; DE SA, A. C.; LIMONGI, C. L.; ROZENTAL, S.; SANTOS, A. L.; BARRETO-BERGTER, E. Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. *Microbes Infect*, v. 6, n. 14, p. 1259-67, 2004.
- PONTIER, D.; BALAGUÉ, C.; ROBY, D. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Molecular Biology and Genetics*, v. 321, p. 721-734, 1998.
- PRADOS-ROSALES, R. C.; ROLDAN-RODRIGUEZ, R.; SERENA, C.; LOPEZ-BERGES, M. S.; GUARRO, J.; MARTINEZ-DEL-POZO, A.; DI PIETRO, A. A PR-1-like protein of *Fusarium oxysporum* functions in virulence on mammalian hosts. *J Biol Chem*, v. 287, n. 26, p. 21970-9, 2012.
- PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; POCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front Plant Sci*, v. 6, p. 573, 2015.
- REISS, E.; HEARN, V. M.; POULAIN, D.; SHEPHERD, M. G. Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol*, v. 30 Suppl 1, p. 143-56, 1992.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 123-130, 2003.
- RIZZARDI, M. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; BALBINOT JR, A. A. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, p. 957-965, 2003.

ROILIDES, E.; SIMITSOPOULOU, M.; KATRAGKOU, A.; WALSH, T. J. Host immune response against *Scedosporium* species. *Med Mycol*, v. 47, n. 4, p. 433-40, 2009.

ROLLIN-PINHEIRO, R.; LIPORAGI-LOPES, L. C.; DE MEIRELLES, J. V.; SOUZA, L. M.; BARRETO-BERGTER, E. Characterization of *Scedosporium apiospermum* glucosylceramides and their involvement in fungal development and macrophage functions. *PLoS One*, v. 9, n. 5, p. e98149, 2014.

ROMANO, C.; CAPOSCIUTTI, P.; GHILARDI, A.; MIRACCO, C.; FIMIANI, M. A case of primary localized cutaneous infection due to *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia*, v. 170, n. 1, p. 39-46, 2010.

SCHAFER, K.; DI PIETRO, A.; GOW, N. A.; MACCALLUM, D.; Murine model for *Fusarium oxysporum* invasive fusariosis reveals organ-specific structures for dissemination and long-term persistence. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e89920, 2014.

SCHMALHORST, P. S.; KRAPPMANN, S.; VERVECKEN, W.; ROHDE, M.; MULLER, M.; BRAUS, G. H.; CONTRERAS, R.; BRAUN, A.; BAKKER, H.; ROUTIER, F. H. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, v. 7, n. 8, p. 1268-77, 2008.

SCHOFFELMEER, E. A. M.; KLIS, F.M.; SIETSMA, J.H.; CORNELISSEN, B.J.C. The Cell Wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*, v. 27, p. 275-282, 1999.

SEIDER, K.; BRUNKE, S.; SCHILD, L.; JABLONOWSKI, N.; WILSON, D.; MAJER, O.; BARZ, D.; HAAS, A.; KUCHLER, K.; SCHALLER, M.; HUBE, B. The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *J Immunol*, v. 187, n. 6, p. 3072-86, 2011.

SERRANO-GOMEZ, D.; DOMINGUEZ-SOTO, A.; ANCOCHEA, J.; JIMENEZ-HEFFERNAN, J. A.; LEAL, J. A.; CORBI, A. L. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol*, v. 173, n. 9, p. 5635-43, 2004.

SEVER, Z.; IVIC, D.; KOS, T.; MILICEVIC, T. Identification of *Fusarium* species isolated from stored apple fruit in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol*, v. 63, n. 4, p. 463-70, 2012.

SILIPO, A.; ERBS, G.; SHINYA, T.; DOW, J. M.; PARRILLI, M.; LANZETTA, R.; SHIBUYA, N.; NEWMAN, M. A.; MOLINARO, A. Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*, v. 20, n. 4, p. 406-19, 2010.

SINGH, A.; LIM, G. H.; KACHROO, P. Transport of chemical signals in systemic acquired resistance. *J Integr Plant Biol*, v. 59, n. 5, p. 336-344, 2017.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol*, v. 12, n. 2, p. 89-100, 2012.

STAEL, S.; KMIĘCIK, P.; WILLEMS, P.; VAN DER KELEN, K.; COLL, N. S.; TEIGE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Plant innate immunity--sunny side up? *Trends Plant Sci*, v. 20, n. 1, p. 3-11, 2015.

SUN, T. J.; LU, Y.; NARUSAKA, M.; SHI, C.; YANG, Y. B.; WU, J. X.; ZENG, H. Y.; NARUSAKA, Y.; YAO, N. A novel pyrimidin-like plant activator stimulates plant disease resistance and promotes growth. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. e0123227, 2015.

TUDZYNSKI, P.; HELLER, J.; SIEGMUND, U. Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, v. 15, n. 6, p. 653-9, 2012.

TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell*, p. 153-164, 2002.

UMEMURA, K.; OGAWA, N.; YAMAUCHI, T.; IAWATA, M.; SHIMURA, M.; KOGA, J. Cerebroside Elicitors Found in Diverse Phytopathogens Activate Defense Responses in Rice Plants. *Plant Cell Physiol*, v. 41, n. 6, p. 676-683, 2000.

VAN KOOYK, Y.; RABINOVICH, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, v. 9, n. 6, p. 593-601, 2008.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, v. 44, p. 135-62, 2006.

VOGEL-ADGHOUGH, D.; STAHL, E.; NAVAROVA, H.; ZEIER, J. Pipecolic acid enhances resistance to bacterial infection and primes salicylic acid and nicotine accumulation in tobacco. *Plant Signal Behav*, v. 8, n. 11, p. e26366, 2013.

WALSH, T. J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect*, v. 10 Suppl 1, p. 48-66, 2004.

WANG, B.; YANG, X.; ZENG, H.; LIU, H.; ZHOU, T.; TAN, B.; YUAN, J.; GUO, L.; QIU, D. The purification and characterization of a novel hypersensitive-like response-inducing elicitor from *Verticillium dahliae* that induces resistance responses in tobacco. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 93, n. 1, p. 191-201, 2012.

WEN, F.; WHITE, G. J.; VANETTEN, H. D.; XIONG, Z.; HAWES, M. C. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol*, v. 151, n. 2, p. 820-9, 2009.

XISTO, M. I.; BITTENCOURT, V. C.; LIPORAGI-LOPES, L. C.; HAIDO, R. M.; MENDONÇA, M. S.; SASSAKI, G.; FIGUEIREDO, R. T.; ROMANOS, M. T.; BARRETO-BERGTER, E. O-glycosylation in cell wall proteins in *Scedosporium prolificans* is critical for phagocytosis and inflammatory cytokines production by macrophages. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. e0123189, 2015.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 863-873, 2000.

ZHANG, J.; DU, X.; WANG, Q.; CHEN, X.; LV, D.; XU, K.; QU, S.; ZHANG, Z. Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. *BMC Res Notes*, v. 3, p. 208, 2010.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; QIU, D.; ZENG, H.; GUO, L.; YANG, X. BcGs1, a glycoprotein from *Botrytis cinerea*, elicits defence response and improves disease resistance in host plants. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 457, n. 4, p. 627-34, 2015.

ZHAO, B.; YAN, J.; ZHANG, S.; LIU, X.; GAO, Z. Phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from greenhouse melon soil in Liaoning Province. *Saudi J Biol Sci*, v. 21, n. 4, p. 374-9, 2014.

ZULOAGA, F. O.; BELGRANO, M. J. The Catalogue of Vascular Plants of the Southern Cone and the Flora of Argentina: their contribution to the World Flora. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4. 2015.