

**MICHEL LEON CANDIDO DE OLIVEIRA COUTO**

Avaliação da indução de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) em plantas de *Nicotiana tabacum* elicitadas com glicosfingolipídios de *Fusarium oxysporum*.



**Monografia apresentada ao  
Instituto de Microbiologia Paulo de  
Góes, da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para a obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO**

**Dezembro/2019**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Eliana Barreto Bergter e coorientação da Doutoranda Mariana Collodetti Bernardino.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C835a Couto, Michel Leon Candido de Oliveira  
Avaliação da indução de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) em plantas de *Nicotiana tabacum* elicidadas com glicosfingolipídios de *Fusarium oxysporum* / Michel Leon Candido de Oliveira Couto.  
- Rio de Janeiro, 2019.  
63 f.

Orientadora: Eliana Barreto Bergter.  
Coorientadora: Mariana Collodetti Bernardino.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Glucosilceramida. 2. Resistência Sistêmica Adquirida. 3. *Fusarium oxysporum*. 4. Imunidade vegetal. 5. Virus do mosaico do tabaco. I. Bergter, Eliana Barreto, orient. II. Bernardino, Mariana Collodetti, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

**ALUNO: Michel Leon Candido de Oliveira Couto**

**DRE: 116012804**

**BANCA EXAMINADORA:** Profa. Daniela Sales Alviano (Presidente)  
 Profa. Rosa Maria Tavares Haido  
 Dra. Anna Karoline Fausto da Silva  
 Profa. Celuta Sales Alviano (Suplente)

**Título da Monografia: "Avaliação da indução de resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas de *Nicotiana tabacum* elicitadas com glicosíngolipídios de *Fusarium oxysporum*"**

**Local: Sala de reuniões do departamento de Virologia/ IMPPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 05 de dezembro de 2019 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 05 de dezembro de 2019.

**NOTA**

10,0

10,0

10,0

**Banca Examinadora:**

Daniela Sales Alviano

Profa. Daniela Sales Alviano

Rosa Maria Tavares Haido

Profa. Rosa Maria Tavares Haido

Anna Karoline Fausto da Silva

Dra. Anna Karoline Fausto da Silva

Profa. Celuta Sales Alviano

**Aluno:**

Michel Leon Candido de Oliveira Couto

Michel Leon Candido de Oliveira Couto

**Orientador:**

Eliana Barreto Bergter

Profa. Eliana Barreto Bergter

**Coorientador:**

Mariana Collodetti Bernardino

MSc. Mariana Collodetti Bernardino

**Coordenador  
de TCC**

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Existem muitas pessoas que tiveram um papel fundamental para a conclusão dessa etapa muito importante em minha vida. Agradeço principalmente aos meus pais, Eliana e Candido, e a minha avó Bernardina (em memória) por todo o amor que me deram, por estarem sempre cuidando de mim e me apoiando incondicionalmente.

Agradeço imensamente a professora Eliana, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por estar sempre presente no meu dia-a-dia. Muito obrigado por ser essa excelente orientadora e grande amiga.

Agradeço também a todos do laboratório por todas as boas conversas, conselhos e risadas, vocês tornaram uma rotina trabalhosa em divertida. Mariana Xisto, Mariana Collodetti, Victor, Rodrigo, Andressa, Carol, Livia, Evely e Yuri, vocês foram essenciais para o meu crescimento e se tornaram minha segunda família na UFRJ.

Obrigado à minha coorientadora Mariana por todos os ensinamentos, conversas e por estar sempre aberta a novas possibilidades. Agradeço por todo acompanhamento, confiança, apoio e dedicação que você teve durante esses anos.

Gostaria de agradecer aos meus amigos do cafezinho, Adrielle, Ursula e Alex por estarem sempre comigo durante essa jornada e por serem sempre os mais descolados. Agradeço pela sua amizade e por todos os momentos inesquecíveis que vocês proporcionaram, vou para sempre me recordar de nossas aventuras dentro e fora do Fundão. Agradeço também aos meus amigos Dener e Beatriz Caroline, pelas ótimas conversas e por todos os trabalhos e apresentações que fizemos juntos.

Agradeço a todos do laboratório de virologia molecular vegetal, a professora Maite, professora Tatiana, Andréia, Karol, Beatriz, Jonas, Vanessa e José, por serem sempre muito solícitos e ótimos amigos.

Agradeço a todos os integrantes da banca, professora Daniela Alviano, Rosa Haido, Karol Silva e Celuta Alviano, por terem aceitado participar da minha banca de defesa de monografia.

Por fim, agradeço ao CNPq, FAPERJ, CAPES e UFRJ pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Michel Leon Candido de Oliveira Couto

Avaliação da indução de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) em plantas de *Nicotiana tabacum* elicitadas com glicosfingolipídios de *Fusarium oxysporum*.

Orientador: Eliana Barreto-Bergter

Coorientador: Mariana Collodetti Bernardino

Fungos fitopatogênicos são responsáveis por cerca de 20% de todas as perdas em plantas perenes em todo o mundo. O gênero *Fusarium* compreende um grupo de centenas de espécies que, com a exceção de algumas, produzem macroconídeos fusóides. *Fusarium oxysporum* vem emergindo como um importante fungo oportunista causador de infecções disseminadas em imunocomprometidos. Além disso, essa espécie tem sido classificada com uma das mais importantes do gênero *Fusarium*, tendo sido classificada em 5º lugar em uma lista com os 10 fungos fitopatogênicos de importância científica e econômica. *F. oxysporum* é o agente responsável por doenças como a murcha de *Fusarium* e a podridão radicular, que são responsáveis por perdas severas em culturas de milho, tabaco, banana, algodão e maracujá. Monohecosilceramidas (CMH), também conhecidas como cerebrosídeos, são glicosfingolipídios que consistem geralmente de uma glucose ou galactose ligadas por uma ligação  $\beta$ -glicosídica à uma ceramida. Em trabalhos anteriores do grupo, foi demonstrado que o açúcar presente na monohecosilceramida de *F.oxysporum* é a glucose. A atividade elicitora de glucosilceramidas (GlcCer) na síntese de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (PR) já foi demonstrada em algumas espécies vegetais. *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (cultivar resistente à infecção pelo vírus do mosaico do tabaco) é capaz de desenvolver uma resposta de hipersensibilidade (HR) que localiza o patógeno no sítio de infecção a partir da formação de uma lesão necrótica, impedindo o espalhamento da infecção. Neste estudo, a capacidade da GlcCer, isolada e caracterizada de *F.oxysporum*, em induzir a resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas de *N. tabacum* cv Xanthi foi descrita. Para avaliar a indução de SAR, GlcCer foi dissolvida em tampão fosfato de potássio e pulverizada, com o auxílio de um aparelho de alta pressão, em plantas que tinham pelo menos 6 folhas verdadeiras. Amostras foram coletadas em diferentes tempos (1h até 120h) para avaliar a expressão de genes PR. Após 24 horas da pulverização, as primeiras três folhas de cada planta foram inoculadas mecanicamente com uma suspensão de TMV e 72 horas após o inóculo, o número de lesões necróticas foi contado. Foi observado que plantas que foram previamente pulverizadas GlcCer apresentaram um menor número de lesões quando comparada com plantas que foram tratadas com tampão. Experimentos de visualização histoquímica também demonstraram a capacidade da GlcCer em induzir a produção de ROS. Além disso, foi observado por RT-qPCR que os genes envolvidos com a defesa vegetal (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5*, *PR9*, *LOX* e *PAL*) tiveram sua expressão aumentada após o tratamento com a GlcCer. Esses resultados indicam a capacidade da GlcCer de proteger parcialmente plantas de *N. tabacum* cv Xanthi.

Palavras-chave: Glucosilceramida, ROS, Resistência Sistêmica Adquirida, Imunidade vegetal, *Fusarium oxysporum*, Vírus do mosaico do tabaco.

## ABSTRACT

Michel Leon Candido de Oliveira Couto

Evaluation of the induction of Systemic Acquired Resistance in *Nicotiana tabacum* plants elicited with Glycosphingolipids from *Fusarium oxysporum*.

Orientador: Eliana Barreto-Bergter

Coorientador: Mariana Collodetti Bernardino

Crop-destroying fungi are responsible for about 20% of perennial plant losses worldwide. The genus *Fusarium* is a group of several hundred species that, with the exception of a few, produce characteristic fusoid multiseptated macroconidia. *Fusarium oxysporum* is an important opportunistic fungus that causes disseminated infections in immunocompromised human hosts. In addition, this species has been classified as one of the most important plant pathogens of the genus *Fusarium*, ranked 5th in a list of the top 10 plant pathogens of scientific and economic importance. *F. oxysporum* is associated with *Fusarium* wilt and root rot disease in plants, which are responsible for significant losses in crop yields of corn, banana, cotton and passion fruit. Cerebrosides, also known as monohexosylceramides (CMH), are glycosphingolipids that consists generally of one glucose or galactose attached through a  $\beta$ -glycosidic linkage to a ceramide. It has been previously shown by our group that *F. oxysporum* monohexosylceramides are linked to a glucose residue. The elicitor activity of glucosylceramide (GlcCer) in the synthesis of phytoalexins and pathogenesis-related proteins (PR) was already demonstrated in some vegetal species. *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (crop resistant to Tobacco mosaic virus infection) is capable of presenting a hypersensitivity response (HR) that localizes the pathogen by forming a necrotic ring around the infection site which stops the infection from spreading. In this study, the capacity of GlcCer in inducing systemic acquired resistance (SAR) in plants of *N. tabacum* cv Xanthi was reported. GlcCer previously isolated and characterized from the mycelium of *F. oxysporum* was used. To evaluate the induction of SAR in *N. tabacum* cv. Xanthi, GlcCer was dissolved in potassium phosphate buffer, and sprayed by a high-pressure apparatus on plants which had at least six true leaves. Samples were collected at different times after plant elicitation (1h to 120h) to measure the expression pathogenesis-related proteins. After 24 h of being sprayed, the first three leaves of each plant were mechanically inoculated with a TMV suspension and 72 h after the viral inoculum the necrotic lesions were counted. It was observed that plants that had been previously sprayed with the solution containing GlcCer showed a decreased number of lesions when compared to those that had been sprayed with potassium phosphate buffer. Histochemical localization experiments also revealed that GlcCer was capable of inducing the generation of ROS. In addition, we observed by RT-qPCR that the genes involved in plant defense (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5*, *PR9*, *LOX* and *PAL*) had their expression increased when the *N. tabacum* plants were elicited with GlcCer. We can conclude by these results that GlcCer is capable of partially protecting *N. tabacum* cv Xanthi plants.

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Key-words: Glucosylceramide, ROS- generation, Systemic-Acquired-Resistance, Plant-immunity, *Fusarium oxysporum*, Tobacco mosaic virus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação dos diferentes tipos de esporo produzidos por <i>Fusarium spp</i> .....	12
<b>Figura 2:</b> Diagrama representativo da filogenia do gênero <i>Fusarium</i> .....	14
<b>Figura 3:</b> Plantas de bananeira dois meses após inóculo com diferentes raças de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> .....	18
<b>Figura 4:</b> Distribuição global das diferentes raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>cubense</i> ..	20
<b>Figura 5:</b> Microscopia confocal do processo de infecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> em plantas de banana .....	21
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da parede celular fúngica .....	23
<b>Figura 7:</b> Esquema representativo indicando as diferentes composições da parede celular de <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	24
<b>Figura 8:</b> Esquema representativo da estrutura básica de glicosfingolipídeos.....	26
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática da estrutura da cutícula vegetal e microscopia eletrônica de transmissão da cutícula foliar .....	28
<b>Figura 10:</b> Sintomas da infecção pelo Vírus do mosaico do tabaco (TMV) em folhas de <i>N. tabacum</i> . .....	31
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática do desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida (SAR). .....	33
<b>Figura 12:</b> Esquema representativo da disposição das folhas que foram inoculadas com o vírus do mosaico do tabaco (TMV). .....	40
<b>Figura 13:</b> Esquema de extração e purificação do extrato lipídico bruto para a obtenção da glucosilceramida de <i>F. oxysporum</i> purificada. ....	44
<b>Figura 14:</b> Análise por espectrometria de massas com ionização eletrospray positiva (ESI-MS) [M+Li] das GlcCers de <i>F.oxysporum</i> . ....	45
<b>Figura 15:</b> Dosagem de polifenóis totais dos extratos aquosos de <i>N. tabacum</i> cv Xanthi..	46
<b>Figura 16:</b> Esquema de folhas demonstrando o aspecto visual dos diferentes tratamentos	47
<b>Figura 17:</b> Contagem de lesões necróticas em plantas de <i>N. tabacum</i> cv. Xanthi .....	48
<b>Figura 18:</b> Visualização histoquímica do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	49
<b>Figura 19:</b> Expressão dos genes relacionados à defesa de plantas de <i>N. tabacum</i> cv Xanthi .....	50



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Diferentes <i>formae speciales</i> de <i>F. oxysporum</i> encontrados no Brasil, seus hospedeiros e regiões onde foram relatados. ....	16
<b>Tabela 2:</b> Ranqueamento dos 10 fungos fitopatogênicos de maior importância científica e econômica .....	18
<b>Tabela 3:</b> Classificação e propriedades de proteínas PR isoladas de diferentes sistemas vegetais .....	34
<b>Tabela 4:</b> Lista de primers utilizados .....	43

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO:</b>	12
1.1 Taxonomia e distribuição geográfica de <i>Fusarium oxysporum</i>	12
1.2 Importância do gênero <i>Fusarium</i>	14
1.3 Fitopatogênese	20
1.4 Parede celular fúngica	22
1.5 Glicosfingolipídios	25
1.6 Sistema imune de plantas	27
1.6.1 Resistência a patógenos	27
1.6.2 Barreiras físicas e químicas	28
1.6.3 Imunidade induzida por padrões moleculares associados à patógenos (PTI) e imunidade induzida por efector (ETI)	29
1.6.4 Resposta de hipersensibilidade (HR)	31
1.6.5 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)	32
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>3. OBJETIVO</b>	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos:	37
<b>4. METODOLOGIA:</b>	38
4.1 Microrganismo utilizado	38
4.2. Extração e purificação dos glicosfingolipídeos	38
4.2.1 Condições de cultivo e obtenção de massa celular	38
4.2.2 Obtenção do extrato lipídico bruto	38
4.2.3 Fracionamento dos lipídios neutros	38
4.2.4 Purificação dos glicosfingolipídios	39
4.3. Obtenção do material vegetal	39
4.4. Determinação do conteúdo fenólico	49
4.5 Avaliação da severidade da doença em <i>N. tabacum</i> cv Xanthi tratadas com GlcCer	40
4.5.1 Vírus do mosaico do tabaco (TMV) - obtenção da suspensão viral	40
4.5.2 Pulverização da GlcCer e inóculo mecânico viral	40
4.5.3 Avaliação da severidade da doença	40
4.6. Visualização histoquímica do acúmulo de espécies reativas de oxigênio em plantas de <i>N. tabacum</i> cv Xanthi	41
4.6.1 Visualização histoquímica de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	41
4.6.2 Visualização histoquímica de radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	41

4.7. Análise da expressão gênica de genes relacionados à defesa vegetal por qRT-PCR .....	42
4.7.1 Obtenção e armazenamento das amostras vegetais .....	42
4.7.2 Extração e purificação do RNA total .....	42
4.7.3 Reação de Transcriptase reversa .....	42
4.7.4 PCR quantitativo em tempo real .....	42
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 Extração e purificação dos glicosfingolipídeos.....	44
5.2 Determinação do conteúdo fenólico .....	46
5.3 Avaliação da severidade da doença .....	47
5.4 Visualização histoquímica do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). 48	
5.5 Análise da expressão gênica de genes relacionados à defesa vegetal.....	49
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1 Taxonomia e distribuição geográfica de *Fusarium oxysporum*

Os fungos do gênero *Fusarium* pertencem ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes da ordem Hypocreales (Michielse e Rep, 2009). O gênero é composto de fungos filamentosos, apresentando hifas hialinas e septadas onde algumas espécies são capazes de produzir até três tipos de esporos assexuados como macroconídios, microconídios e esporos de resistência chamados de clamidosporos (**Figura 1**) (Ohara *et al.*, 2004). Os macroconídios de *Fusarium* apresentam forma fusóide e são levemente curvados, com pontas em suas extremidades e multisseptados. Os microconídios apresentam por sua vez uma forma elipsoidal ou cilíndrica, que pode ser reta ou curva e geralmente não apresentam septos. Os clamidosporos são hialinos e de parede lisa ou rugosa e estão dispostos de forma terminal ou de forma intercalada ao longo das hifas. Algumas espécies também são capazes de produzir ascósporos (esporos sexuais), que ficam dispostos dentro de estruturas formadas durante a reprodução sexual, chamada de peritécios, contendo os ascos que comportam os ascósporos (**Figura 1**). Apenas cerca de 20% de todas as espécies do gênero apresentarem um ciclo sexual conhecido (Ma *et al.*, 2013).



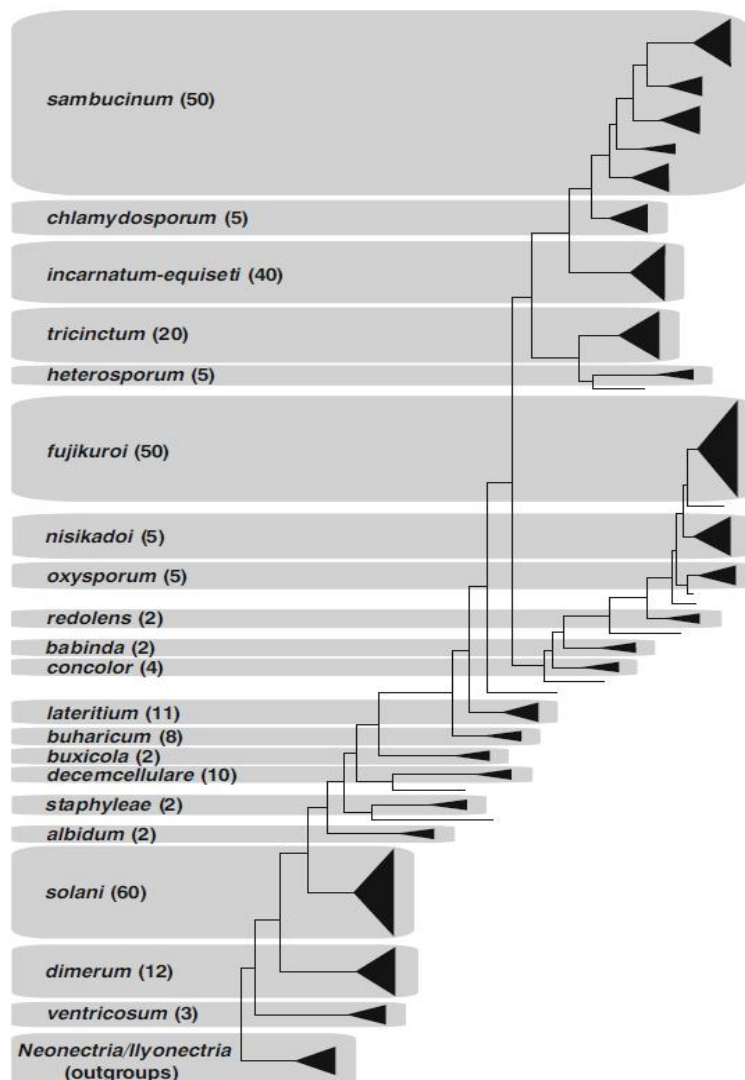
**Figura 1:** Representação dos diferentes tipos de esporo produzidos por *Fusarium spp* com esporos assexuados à esquerda e sexuais à direita. (Adaptado de Ma *et al.*, 2013)

O gênero *Fusarium* apresenta uma ampla distribuição global e é encontrado tanto em regiões de clima temperado quanto de clima tropical, sendo encontrados macroconídios de *Fusarium* desde os solos congelados do pergelissolo ártico até as areias do deserto do Saara. Esses fungos são encontrados em solos (especialmente em solos cultivados) e estão geralmente associados a degradação de matéria orgânica. Entretanto, uma grande quantidade de espécies é também conhecida por serem patógenos de planta de elevada importância econômica. (Di Pietro *et al.*, 2003).

A identificação do fungo é feita a partir de critérios morfológicos como a forma de seus microconídios e macroconídios, a estrutura dos conidióforos, que são prolongamentos de hifa de onde “brotam” os conídios, assim como a disposição e formação dos clamidósporos. Quando crescido em meio sólido *Fusarium oxysporum* apresenta aspecto algodinoso de coloração branca que com o tempo pode se tornar rosácea (Moss e Smith, 1984)

Entretanto, através do sequenciamento de diversos *loci* como o do fator de elongação 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), B-tubulina (B-TUB), calmodulina (CAM) e para a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2), de fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* e *Aspergillus*, somado à análises filogenéticas revelaram que muitas das espécies que foram previamente identificadas a partir da sua morfologia são, na verdade, um complexo de espécies morfológicamente indistinguíveis (Balajee *et al.*, 2009; Van Diepeningen, Brankovics e Iltes, J., 2015).

Em 2015, O'Donnell e colaboradores, a partir de análises filogenéticas baseadas na sequência dos genes *RPB1* e *RPB2*, que codificam para subunidades RNA polimerase II de fungos do gênero, sugeriram a existência de pelo menos 300 espécies filogeneticamente distintas pertencentes ao gênero *Fusarium*, 20 complexos de espécies e 9 linhagens monotípicas (**Figura 2**). (O'Donnell *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Diagrama representativo da filogenia do gênero *Fusarium* inferida da combinação do conjunto de dados *RPB1* + *RPB2* (3383 bp) enraizados em sequências de *Neonectria* e *Ilyonectria*. Análise baseada em “Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition” (GCPSR) indica a existência de pelo menos 300 espécies filogeneticamente distintas, 20 complexos de espécies (destacado em cinza) e 9 linhagens monotípicas. O número estimado de espécies filogeneticamente distintas em cada complexo de espécie este indicado entre parênteses (O’Donnel et al., 2015).

## 1.2 Importância do gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é encontrado em solos de forma ubíqua e pode sobreviver um grande período de tempo na forma de resistência, clamidosporo, sem a necessidade de um hospedeiro sendo que, uma vez no solo, esses esporos permanecem de forma indefinida. (Di Pietro, 2003, Ploetz, 2015). Os fungos pertencentes a esse gênero são conhecidos fitopatógenos e tem sido associados à casos de infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos. (Di Pietro, 2003; Lopez-Dias *et al.*, 2018)

Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* vem emergindo como um importante agente de hialohifomicose e a apresentação clínica irá depender de diversos fatores como o estado imunológico do paciente e o sítio de entrada do patógeno. Infecções disseminadas e fungemia por *Fusarium* geralmente são encontradas em pacientes imunocomprometidos, enquanto que quadros de sinusite alérgica ou de infecções superficiais como onicomicoses ou queratites, podem estar associadas tanto à pacientes imunocompetentes quanto imunocomprometidos. As manifestações clínicas da doença como sinusite ou pneumonia muitas vezes se confundem com outras hialohifomicoses de alta ocorrência como a aspergilose, o que pode causar confusão no diagnóstico. Uma característica marcante da fusariose é a alta taxa de detecção de fungemia em casos de infecção disseminada, o que é um contraste com a aspergilose. (Nucci e Anaissie, 2007)

Além de seu papel como fitopatógeno e patógeno oportunista, o gênero *Fusarium* também é um importante produtor de micotoxinas. Essas são moléculas provenientes do metabolismo secundário fúngico e são importantes contaminantes de ração animal e de alimentos. Em *Fusarium*, as principais toxinas produzidas são os tricotecenos, a zearalenona e a fumonisina B1. Os sintomas causados pela ingestão dessas micotoxinas irá variar de acordo uma série de fatores como a espécie do animal, a dose ingerida e por quanto tempo o animal ou indivíduo esteve em contato com a toxina. (Mello, Placinta e Macdonald, 1999; Chilaka *et al.*, 2017)

O complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC) compreende fungos que são patógenos de planta e também compreende fungos que não apresentam fitopatogenicidade e vivem como sapróbios do solo. Entretanto, diferentes isolados de por exemplo, *F. oxysporum*, podem apresentar um alto nível de especificidade quanto ao hospedeiro que são capazes de acometer. Em busca de melhor classificar esses diferentes isolados de acordo com sua capacidade de infectar determinada espécie vegetal, foi criado um agrupamento taxonômico artificial. Esse grupamento é feito a partir da atribuição de uma *formae speciales* (f. sp.) ao fungo. Diferentes isolados de *F. oxysporum* que tenham a capacidade de infectar e causar doença em tomateiro são incluídos no grupo de *formae speciales* definida como *Lycopersici* (*F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*). Até 2009, mais de 120 f.spp. de *F. oxysporum* foram descritas. (Michielse e Rep, 2009; Taylor *et al.*, 2016). No Brasil, pelo menos 25 diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* já foram relatadas acometendo plantas em diversas regiões do país (Tabela 1).

**Tabela 1: Diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* encontrados no Brasil, seus hospedeiros e regiões onde foram relatados.**

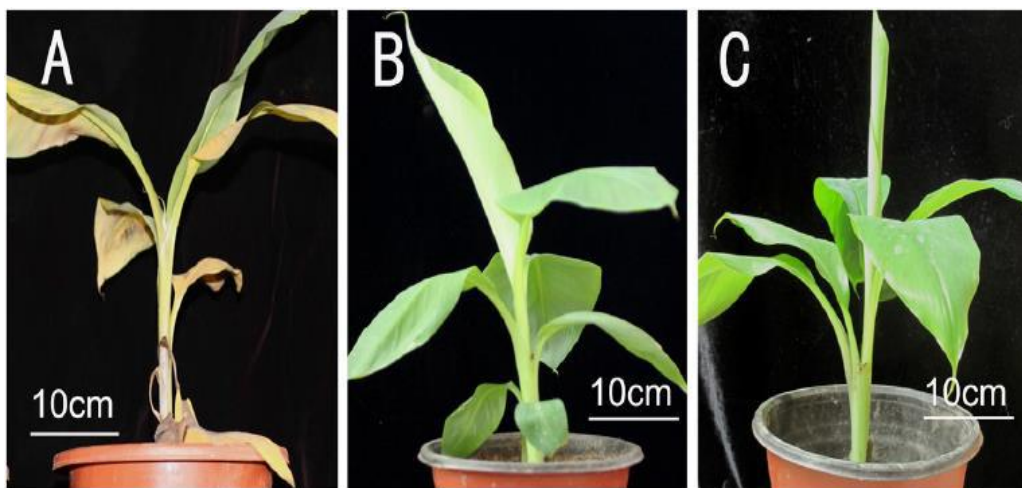
<i>Formae speciales</i>	Hospedeiros	Região
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	<i>Abelmoschus esculentus</i> [QUIABO]	SP, GO,
	<i>Capsicum annuum</i> [PIMENTÃO]	BA, RJ, PR,
	<i>Dolichos lablab</i> [LABE-LABE]	MT, MG,
	<i>Gossypium hirsutum</i> [ALGODÃO]	ES, RN, PE, CE
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tracheiphilum</i>	<i>Vigna unguiculata</i> [FEIJÃO-FRADINHO]	Não relatado
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>sesami</i>	<i>Sesamum indicum</i> [GERGELIM]	PB, PE
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ricini</i>	<i>Ricinus communis</i> [MAMONA]	AL, BA, N, MG, PB, PE, PR, RN, SP, NE
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Raphani</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> [COUVE-DE-FOLHA]	Não relatado
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> [COUVE-FLOR]	
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> [BRÓCOLIS]	
	<i>Brassica oleracea</i> [COUVE]	
	<i>Brassica</i> sp.	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i>	<i>Pisum sativum</i> [ERVILHA]	RS, SP, MG
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>passiflorae</i>	<i>Passiflorae assiflora edulis</i> [MARACUJÁ-AMARELO]	PA, ES, SP, CE, TO, RJ
	<i>Passiflora edulis flavicarpa</i> [MARACUJÁ-AMARELO]	
	<i>Passiflora</i> sp.	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>	<i>Citrullus lanatus</i> [MELANCIA]	SP, PE, NE
	<i>Cucumis melo</i> [MELÃO]	
	<i>Cucurbita</i> sp. [ABÓBORA]	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>nicotianae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> [FUMO]	Não relatado
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	<i>Cucumis melo</i> [MELÃO]	Não relatado
	<i>Cucurbita</i> sp. [ABÓBORA]	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>	<i>Medicago sativa</i> [ALFAFA]	Não relatado



<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	<i>Capsicum annuum</i> [PIMENTÃO] <i>Lycopersicon esculentum</i> [TOMATEIRO] <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> <i>Lycopersicon</i> sp.	CE, PE, MG, SP, PB, DF, AM, BR, NE, ES, RJ
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lupini</i>	<i>Lupinus</i> sp.	Não relatado
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>herbemontis</i>	<i>Vitis vinifera</i> [UVA] <i>Vitis</i> sp.	RS, SP, SC
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>elaeidis</i>	<i>Elaeis guineensis</i> [DENDÊ]	AM, PA
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i> [CRAVO]	Não relatado
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cyclaminis</i>	<i>Cyclamen persicum</i> [CICLAME]	SP
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	<i>Cucurbita</i> sp. [ABÓBORA] <i>Cucumis sativus</i> [PEPINO]	MG
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	<i>Musa paradisiaca</i> [BANANEIRA] <i>Musa sapientum</i> [BANANA-DA-TERRA] <i>Musa</i> sp. [BANANEIRA] <i>Heliconia</i> sp.	AL, MA, MG, CE, TO, BA, PE, AM, SP, ES, NE, DF
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> [COUVE-FLOR] <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> [REPOLHO] <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> [BRÓCOLIS] <i>Brassica oleracea</i> [COUVE] <i>Ricinus communis</i> [MAMONA] <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>rapa</i>	SP, RS, PE
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>coffeeae</i>	<i>Coffea arabica</i> [CAFEEIRO]	PR
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>citri</i>	<i>Citrus</i> sp.	Não relatado
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	<i>Allium cepa</i> [CEBOLA] <i>Allium fistulosum</i> [CEBOLINHA] <i>Allium sativum</i> [ALHO]	MG
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Batatas</i>	<i>Ipomoea batatas</i> [BATATA DOCE]	RJ
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>basilici</i>	<i>Ocimum basilicum</i> [MANJERICÃO]	Não relatado
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Não relatado

Fonte: Base de dados “Fungos Relatados em Plantas no Brasil” disponibilizado pela Embrapa.

Cada diferente grupo de *formae speciales* pode ser subsequentemente dividida em diferentes “raças” de acordo com seu padrão de virulência, predisposição climática ou especialização ao nível de cultivar (Edel-Hermann e Lecomte, 2019). Na **Figura 3** é possível observar a comparação entre os fenótipos de plantas de bananas 2 meses após o inóculo com duas raças diferentes *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, a raça tropical 4 (RT4) que apresenta uma maior virulência, e a raça 1 (R1).



**Figura 3:** Plantas de bananeira dois meses após inóculo com diferentes raças de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Em (A) planta infectada com a raça tropical 4 (RT4), em (B) raça 1 e em (C) planta controle tratada apenas com água. (Li *et al.*, 2017)

Dentre os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*, *Fusarium oxysporum* se destaca como importante patógeno de plantas. O complexo foi classificado em 2012 em 5º lugar em uma lista dos 10 patógenos mais importantes economicamente e cientificamente (**Tabela 2**) (Dean *et al.*, 2010). A sua importância se deve não só aos grandes prejuízos causados na lavoura como também a diversa gama de hospedeiros que *F. oxysporum*, pertencente a diferentes f.sp. e suas diferentes raças pode acometer. Um total de mais de 100 diferentes espécies agronomicamente importantes podem ser afetadas (Ma *et al.*, 2013), como por exemplo, tomate, maracujá, banana, melão, pepino, entre outros. (Taylor *et al.*, 2016)

**Tabela 2: Ranqueamento dos 10 fungos fitopatogênicos de maior importância científica e econômica (Dean *et al.*, 2012).**

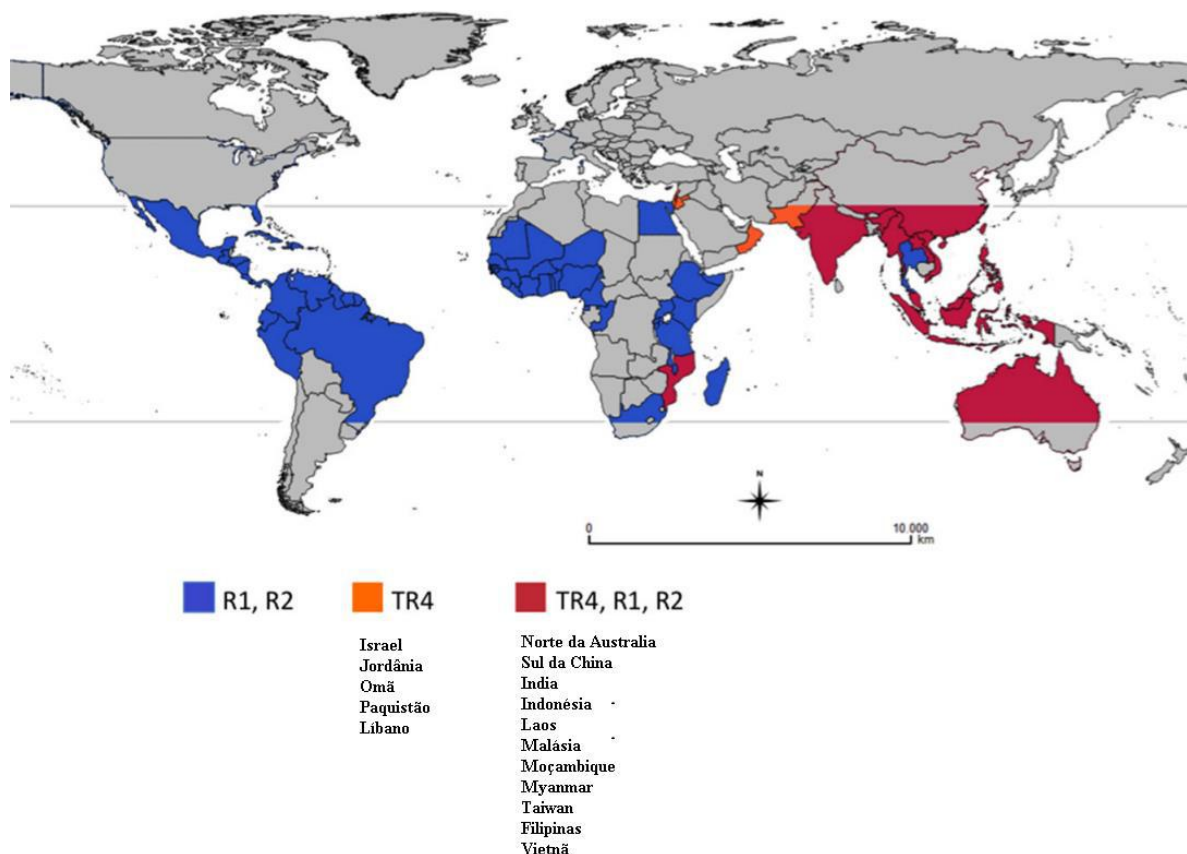
Posição no ranking	Fitopatógeno
1	<i>Magnaporthe oryzae</i>
2	<i>Botrytis cinerea</i>
3	<i>Puccinia spp.</i>
4	<i>Fusarium graminearum</i>
5	<i>Fusarium oxysporum</i>
6	<i>Blumeria graminis</i>
7	<i>Mycosphaerella graminicola</i>

8	<i>Colletotrichum spp</i>
9	<i>Ustilago maydis</i>
10	<i>Melampsora lini</i>

---

A doença causada por *Fusarium oxysporum* está relacionado com uma das maiores e mais importantes epidemias fúngicas da história. A banana é uma das frutas mais populares do mundo e está entre um dos principais “commodities” da América Latina e no início do século XX, a maior parte da produção era proveniente da cultivar Gross Michel, que se mostrou suscetível à infecção por *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Devido a produção ser majoritariamente proveniente de um cultivar suscetível, a doença causada pelo *F. oxysporum* se alastrou pelas plantações até a década 1960, quando a epidemia levou ao colapso completo do cultivar Gross Michel. A doença ficou popularmente conhecida como Mal do Panamá ou Doença do Panamá, e é até hoje considerada uma das mais devastadoras da história. A solução encontrada pelos agricultores foi a troca do cultivar Gross Michel pelo cultivar resistente Cavendish, que, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, representa, atualmente, cerca de 47% da produção global e corresponde a maior parte das bananas exportadas. Entretanto, já existem diferentes raças de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* capazes de infectar esse cultivar resistente (Ordóñez, 2015; Dita, 2018).

No sudeste asiático, a raça tropical 4 (RT4) de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* vem se alastrando e causando sérios prejuízos para a indústria produtora de banana. No Brasil, ainda não foi detectado a presença de TR4 (**Figura 4**). Em busca de prevenir a chegada de TR4 no país, no dia 22 de Agosto de 2018 foi publicado no Diário Oficial da União a instrução normativa de número 43, intitulada “Plano Nacional de Contingência para a praga *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raça 4 tropical - Foc R4T, Grupo de Compatibilidade Vegetativa VCG01213/16, agente causal da murcha de *Fusarium* em bananeira”. Esse plano tem como objetivo o estabelecimento de ações preventivas e emergenciais para a contenção, supressão e erradicação de focos da praga no Brasil. O plano tem diversas propostas, como: proibir a importação de material propagativo de bananeira proveniente de países que têm ocorrência/presença de RT4 (**Figura 4**), a implementação de levantamentos fitossanitários em áreas comerciais de banana e diversas outras medidas (Diário Oficial da União, 2018).



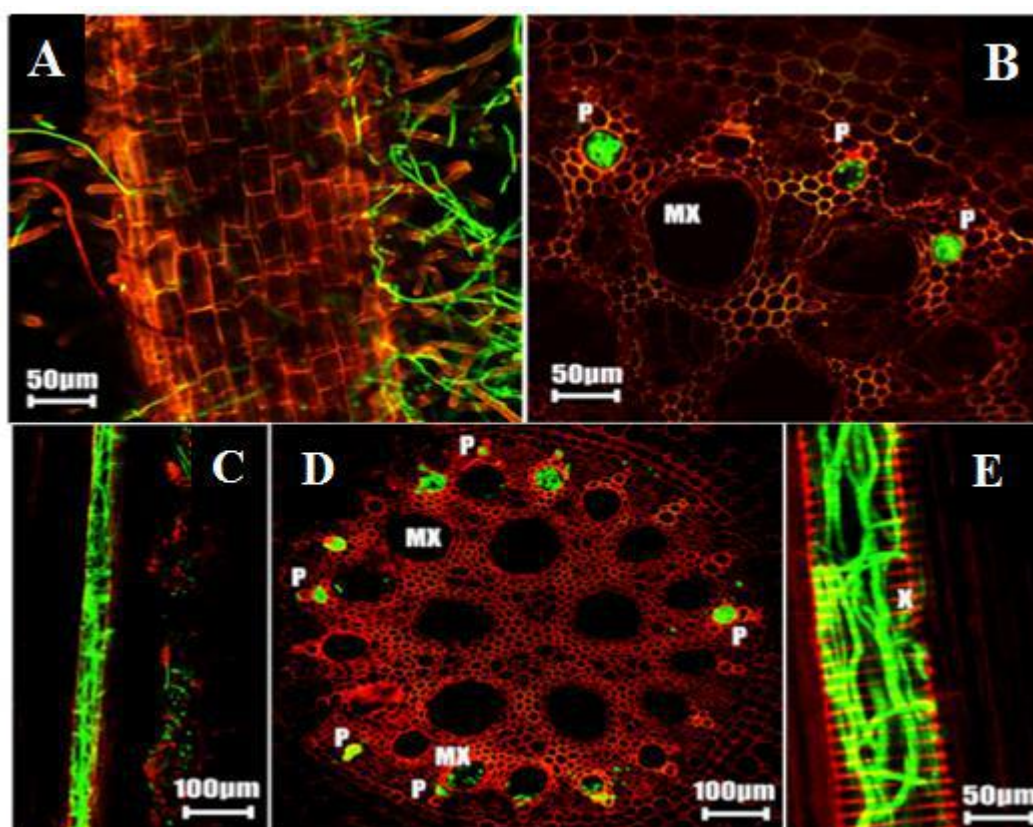
**Figura 4:** Distribuição global das diferentes raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Onde R1: Raça 1, R2: Raça 2, TR4: raça tropical 4. As raças 1 e 2 estão amplamente distribuídas nos países produtores de banana e afetam variedades locais (Adaptado de Dita *et al.*, 2018).

### 1.3 Fitopatogênese

O FOSC apresenta um perfil hemibiotrófico de fitopatogênese. Fungos com esse perfil de comportamento colonizam inicialmente o tecido da planta de forma biotrófica, suprimindo o sistema imune do hospedeiro através de proteínas secretadas (efetores) e prevenindo a morte celular das células vegetais, permitindo que as hifas invasivas se espalhem pelo tecido infectado. Após a fase biotrófica o fungo assume um perfil necrotrófico, liberando moléculas tóxicas para a célula do hospedeiro e induzindo a morte celular (Koeck e Hardham 2011).

Popularmente conhecida como murcha por *Fusarium*, a fusariose é a principal doença causada por *F. oxysporum* e está presente em diversas regiões do mundo e acomete diversas monoculturas. O nome da doença provém do efeito característico causado pelos sintomas, onde plantas doentes demonstram um efeito de murcha. Os sintomas da doença inicialmente são epinastia foliar (curvatura anormal das folhas para baixo), desnutrição, clorose das partes aéreas, murcha progressiva das folhas e caule e perda das folhas. (Di Pietro, 2003; Ma, 2013).

O processo de infecção do hospedeiro se dá a partir do crescimento das raízes em solo contaminado com conídios, geralmente clamidósporos, de *F. oxysporum*. A aproximação da raiz é capaz de induzir a germinação dos conídios. Após a germinação, as hifas invasivas se aderem às raízes e penetram entre as células do córtex da planta até alcançar o xilema, tecido vascular responsável pelo transporte da seiva bruta. Uma vez no xilema o fungo irá produzir microconídios que irão ser carreados pela seiva e irão germinar, consequentemente acometendo um vaso superior. Esse ciclo de germinação e espalhamento continua até o comprometimento do xilema pelo bloqueio da passagem da seiva bruta (**Figura 5**), o que leva ao característico sintoma de murcha que dá nome à doença. A combinação do crescimento fúngico no tecido, a secreção de toxinas e a resposta de defesa da planta contribuem para o processo de murcha (Rodriguez-Gálvez e Mendgen, 1995; Di Pietro, 2003).



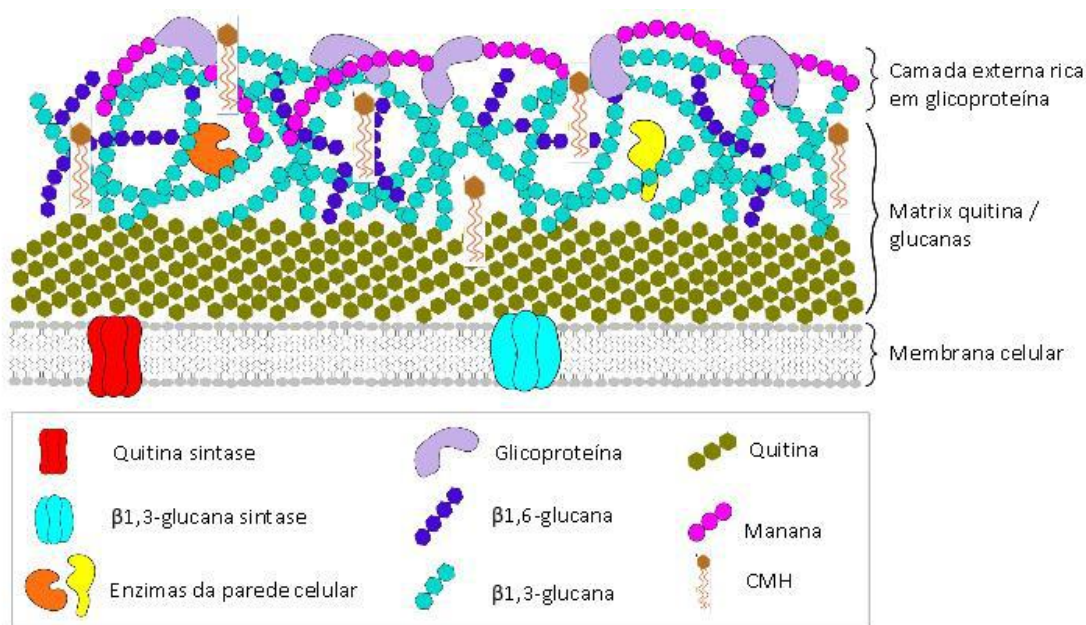
**Figura 5:** Imagens de microscopia confocal evidenciando o processo de infecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em plantas de banana, esporos e hifas estão evidenciados em verde e tecido vegetal em vermelho. Em (A), aderência às raízes e epiderme da bananeira 2 dias após a inoculação do fungo. Em (B), corte transversal e em (C), corte longitudinal evidenciando a presença de hifas no floema (P) 3 dias após o inóculo. Em (D), corte transversal demonstrando a presença de hifas em diversos floemas e alguns xilemas (MX) e em (E) seções longitudinais demonstrando o crescimento de hifas em xilemas, 7 dias após a inoculação. (Adaptada de Li *et al.*, 2017)

#### 1.4 Parede celular fúngica

A parede celular fúngica é uma estrutura complexa e dinâmica capaz de conferir proteção contra diversos estresses ambientais como mudanças em temperatura, osmolaridade, temperatura e pH (Yoshimi, Miyazawa e Abe, 2017; Sherrington *et al.*, 2017). Essa estrutura também é responsável pela manutenção da forma celular e também tem papel de interface com o meio ou com o hospedeiro (Ruis-Herrera *et al.*, 2005). Diversos componentes fazem parte da constituição da parede celular fúngica. A sua composição compreende majoritariamente diversos polissacarídeos que se encontram distribuídos em diferentes camadas da parede.

A parede celular pode ser dividida em uma camada mais interna estrutural, que é geralmente mais conservada entre os fungos (Hopke, 2018), e é composta por  $\beta$ -(1,3)-glucanas ligadas covalentemente à  $\beta$ -(1,6)-glucanas ramificadas e quitina (**Figura 6**) (Netea 2008). Esses polímeros formam ligações de hidrogênio com as cadeias de polissacarídeos próximas, criando uma rede tridimensional que contribui de forma significativa para resistência da parede (Camacho *et al.*, 2017). Os componentes da parede celular e a sua disposição apresenta variações entre as diferentes espécies de fungos, estágios de crescimento e condições ambientais (Latge, 2010). Na maioria dos fungos, a camada mais externa da parede apresenta uma maior variação de seus componentes, mas geralmente são encontradas  $\alpha$ -glucanas (majoritariamente  $\alpha$ -(1,3)-glucanas com baixas proporções de  $\alpha$ -(1,4)-glucanas) e galactomananas, que podem cobrir polissacarídeos mais internos à parede, dificultando o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. A camada mais externa da parede celular é composta, principalmente, de glicoproteínas frouxamente ancoradas. (Yoshimi, Miyazawa e Abe, 2017; Hopke 2018).



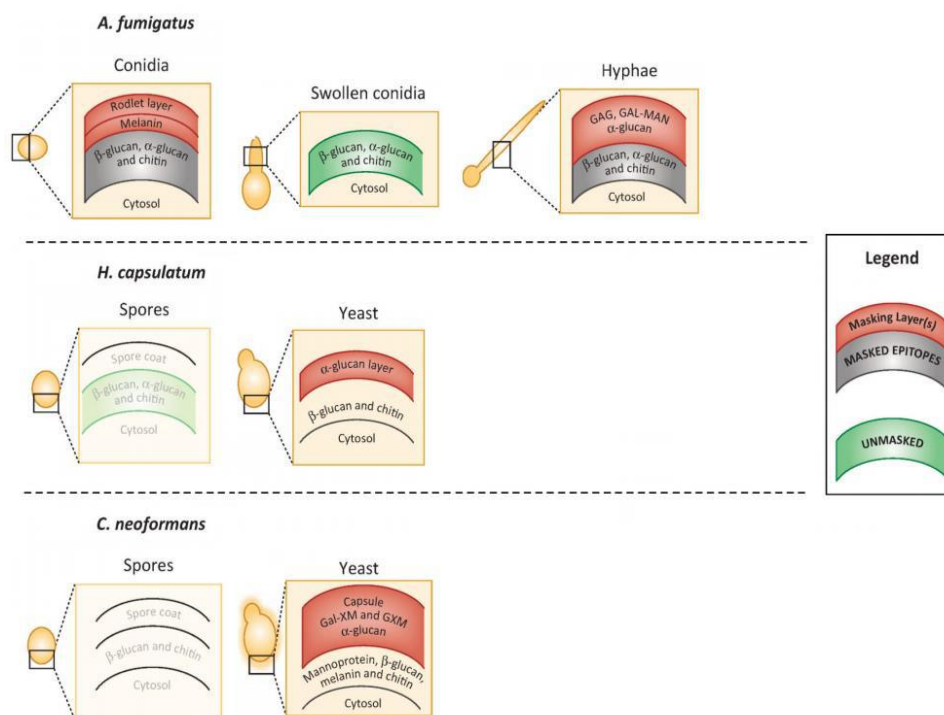


**Figura 6:** Representação esquemática da parede celular fúngica (Adaptada de Geoghegan, Steinberg e Gurr, 2017)

A presença de moléculas altamente conservadas na camada interior da parede celular fúngica faz de seus componentes, do ponto de vista evolutivo, ótimos alvos para reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. O reconhecimento dos polissacarídeos da parede celular é capaz de iniciar uma resposta do sistema imune no hospedeiro. Em mamíferos, receptores de reconhecimento de padrão (PRR) específicos para  $\beta$ -glucanas e para manana foram descritos em células fagocíticas que irão, a partir do reconhecimento dessas moléculas, montar um processo inflamatório através da liberação de citocinas e recrutamento de células de defesa do hospedeiro para o sítio da infecção. Em plantas,  $\beta$ -glucanas e oligossacarídeos de quitina são reconhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e são capazes de induzir uma resposta de defesa (Pinto, Barreto-Bergter e Taborda, 2008; Fujikawa *et al.*, 2009 Shinya *et al.*, 2015;).

Visando evitar a resposta imune do hospedeiro, fungos muitas vezes mascaram suas moléculas de superfície. Fujikawa e colaboradores em 2009 mostraram que a hifa infecciosa de *Magnaporthe grisea* durante a infecção do tomateiro, mascara suas moléculas de superfície com  $\alpha$ -(1,3)-glucanas, impedindo o reconhecimento do fungo pelo hospedeiro e também impedindo a ação de enzimas hidrolíticas (Fujikawa *et al.*, 2009). Em geral, esse mecanismo de camuflagem parece estar bem distribuído nos fungos. Em *Histoplasma capsulatum*, o mesmo mascaramento com  $\alpha$ -glucanas ocorre, impedindo o reconhecimento mediado por dectina-1 das  $\beta$ -(1,3)-glucanas, impossibilitando o reconhecimento por células do sistema imune. Já em *Paracoccidioides brasiliensis*, ocorre a conversão das  $\beta$ -(1,6)-glucanas da parede celular para

$\alpha$ -(1,3)-glucanas. Na **Figura 7**, está esquematizado as diferentes formas que *Aspergillus fumigatus*, *H. capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* usam para camuflar sua camada interna da parede celular (Hopke, 2018).



**Figura 7:** Esquema representativo indicando as diferentes composições da parede celular de acordo com o estágio celular fúngico de *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans*. Legenda: Camadas marcadas em vermelho indicam mascaramento, camadas em cinza indicam que estão sendo mascaradas e camadas em verde indicam camadas não mascaradas. (Adaptada de Hopke, 2018)

Quase todas moléculas que compõem a parede celular dos fungos são importantes ou essenciais para o crescimento fúngico ou para a sua virulência. Esse fato, somado a ausência da maioria dessas moléculas no hospedeiro humano, torna os componentes da parede celular excelentes alvos para drogas antifúngicas (Gow, Latge e Munro, 2017).

Melanina é um pigmento negativamente carregado de alto peso molecular que é produzido por organismos pertencentes a todos os reinos. Esses pigmentos são formados por polímeros de compostos fenólicos e/ou indólicos, entretanto, pouco se sabe sobre estrutura detalhada do composto devido a sua alta resistência aos diversos tratamentos químicos. (Camacho *et al.*, 2017)

Fungos melanizados além de apresentarem uma alta resistência à temperatura e à radiação UV e ionizante, também são capazes de resistir melhor à presença de metais pesados e drogas antifúngicas, devido a capacidade da melanina de se ligar a esses compostos, impedindo

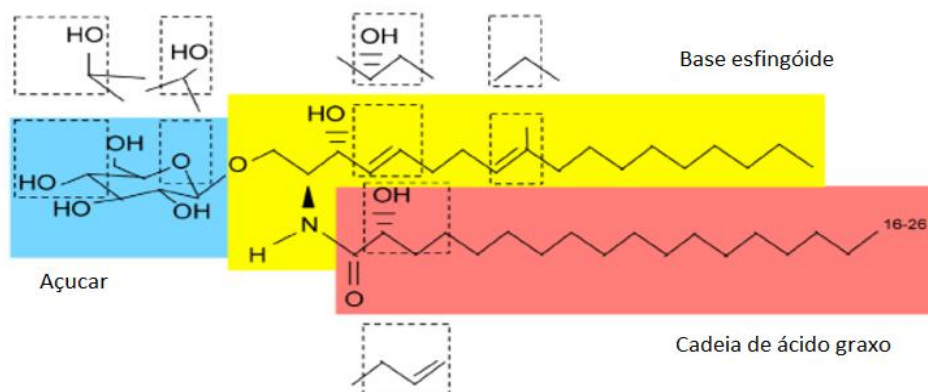


a sua ação. Em 1999, Doering e colaboradores demonstraram a capacidade da melanina produzida por *C. neoformans* de se ligar à peptídeos antimicrobianos produzidos por células imunes, conferindo uma resistência à esses compostos (Doering *et al.*, 1999; Gow, Lagte e Munro, 2017; Camacho *et al.*, 2017).

### 1.5 Glicosfingolipídios

Glicosfingolipídios, são moléculas anfipáticas encontrados nos mais diversos sistemas biológicos. A sua característica anfipática se deve a presença de uma região hidrofóbica formada por uma ceramida e uma região hidrofílica formada por uma cadeia de açúcar de tamanho variável. A ceramida é formada por uma cadeia de ácido graxo variável ligado à uma base esfingóide longa, geralmente uma esfingosina, esfinganina ou uma fitoesfingosina por uma ligação amídica ao carbono 2 da base esfingóide. A região hidrofílica é formada por um ou mais monossacarídeos ligados por ligação  $\beta$ -glicosídica à porção ceramida da estrutura (Barreto-Bergter, Pinto e Rodrigues, 2004; Futerman e Hannun, 2004). Em células fúngicas, os principais glicosfingolipídios descritos são inositolfosforilceramidas e hexosilceramidas. (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016)

Glucosilceramidas (GlcCer), também conhecidas como cerebrosídeos, são os principais glicosfingolipídios neutros expressos em fungos patogênicos e estão ausentes na maioria das células de mamíferos, sendo assim um possível alvo para novas terapias antifúngicas (Rollin-Pinheiro e Meirelles, 2014). Sua composição contém uma ceramida (9-metil-4,8-esfingodienina) ligada ao ácido 2-hidroxi-octadecanóico ou ao ácido 2-hidroxi hexadecanóico e uma glicose ou uma galactose (**Figura 8**). Essas moléculas apresentam um alto grau de conservação, principalmente na cadeia de esfingosina, mas algumas variações são encontradas no tamanho da cadeia de ácido graxo e em seu grau de insaturação (Barreto-Bergter, Sasaki e Souza; 2004; Barreto-Bergter, 2011). Além disso, existem algumas diferenças estruturais entre a GlcCer de animais e de fungos, onde fungos além de apresentarem uma metilação no carbono 9 da base esfingóide, também apresentam uma insaturação no carbono 8, características ausentes em GlcCer de mamíferos. (Warnecke e Heinz, 2003; Ramamoorthy *et al.*, 2007; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016).



**Figura 8:** Esquema representativo da estrutura básica de glicosfingolipídios. Em azul: açúcar, geralmente uma galactose ou glucose; em amarelo: base conservada 9-metil-4,8-esfingodienina; em vermelho: ácido graxo de cadeia longa. (Del Poeta, 2014).

Além de componentes estruturais da membrana e da parede celular, GlcCers também estão envolvidas na diferenciação, crescimento e sinalização celular fúngica. Esse fato faz da GlcCer um bom alvo para o desenvolvimento de drogas que inibam a diferenciação e crescimento fúngico (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014). Em 2000, Rodrigues e colaboradores demonstraram que GlcCers de *Cryptococcus neoformans* estão envolvidas na biossíntese da parede celular, no brotamento leveduras e que o tratamento com anticorpos específicos para GlcCer teve um efeito fungistático contra esses organismos (Rodrigues *et al.*, 2000; Pinto, Barreto-Bergter e Taborda, 2008). A eficiência da utilização de anticorpos contra GlcCers de *C. neoformans* já foi previamente evidenciado em camundongos por Rodrigues e colaboradores em 2007, sendo necessários estudos subsequentes para uma possível utilização como tratamento (Rodrigues *et al.*, 2007). Entretanto, a expressão de GlcCer varia entre as diferentes espécies fúngicas e seu estado morfológico. Em *Pseudallescheria boydii*, os conídios não apresentam GlcCer expostos em sua superfície, em claro contraste com as hifas e os tubos germinativos onde ambas as formas apresentam essa molécula em sua superfície. (Pinto *et al.*, 2002). Em *Lomentospora prolificans*, a GlcCer não está acessível na superfície de conídios jovens, mas está presente em conídios jovens que foram tratados com NaOH, indicando um possível papel da melanina como mascarador de GlcCer. (Xisto *et al.*, 2019)

Glicoconjugados como cerebrosídeos são conhecidos elicitores de defesa vegetal. *Magnaporthe cinerea* é um importante patógeno de arroz que vem apresentando um perfil de resistência contra os tratamentos antifúngicos empregados na lavoura (Hahn, 2014). No início do século XXI, Umemura e colaboradores demonstraram a atividade dos cerebrosídeos A e C de *Magnaporthe grisea* como elicitador da produção de fitoalexinas (metabólitos secundários vegetais envolvidos na defesa) e na expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR) em

plantas de arroz. A elicitação por essas moléculas foi capaz de proteger a planta não só contra a doença causada por *M. grisea* como também foi capaz de proteger contra diversas outras doenças, sugerindo que cerebrosídeos tem um papel mediando as interações entre a planta de arroz e diferentes patógeno (Umemura *et al.*, 2000).

Além de seu efeito envolvendo a defesa vegetal, GlcCers também são importantes elicitores de resposta imune em mamíferos. Recentemente, Xisto e colaboradores demonstraram a capacidade de GlcCers isoladas de *L. proliferans* de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, estímulo da migração de leucócitos e a ativação de macrófagos peritoneais associado a um aumento da capacidade microbicida desses macrófagos quando desafiados com conídios de *L. proliferans*. (Xisto *et al.*, 2019)

## 1.6 Sistema imune de plantas

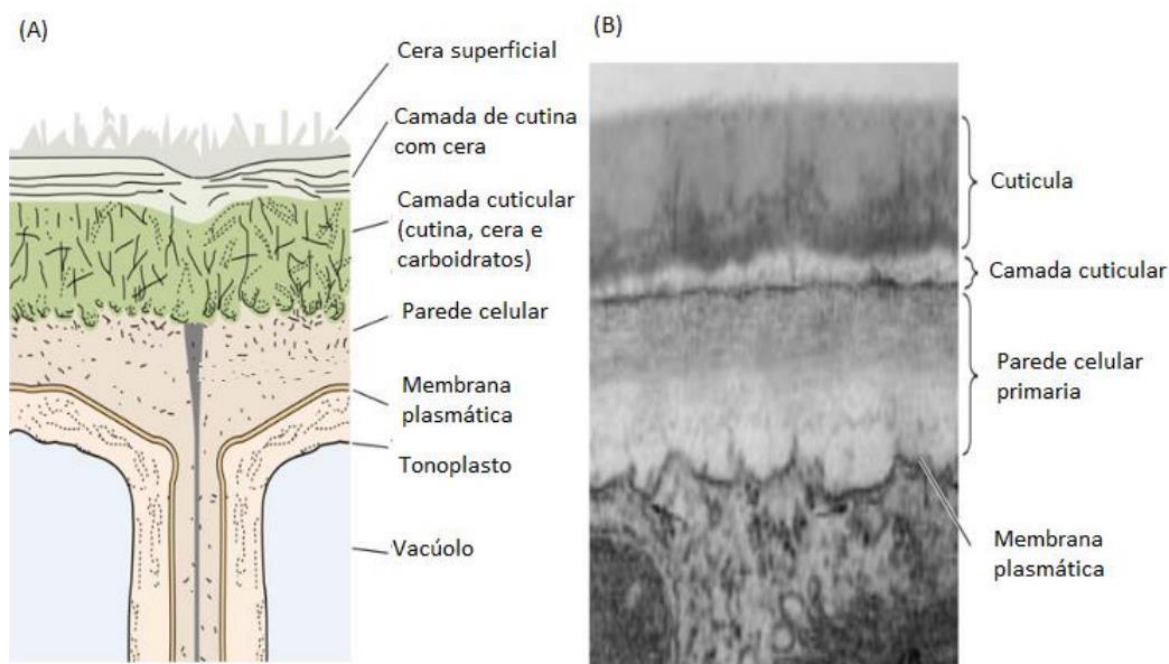
### 1.6.1 Resistência a patógenos

Plantas são organismos sésseis que são constantemente desafiados por diferentes tipos de estresse sendo de origem abiótica como: excesso/falta de água, radiação proveniente do Sol, ventos muito forte ou de origem biótica como herbivoria, relações de parasitismo com plantas parasitas (Kaiser *et al.*, 2015) ou infecções pelos mais diversos tipos de patógenos fúngicos, bacterianos e nematóides. A pressão seletiva proporcionada por esses e outros fatores levou ao desenvolvimento de diversas estratégias por parte da planta para lidar com esses diferentes estresses e se proteger contra danos.

Dentre os mecanismos utilizados pela planta para se proteger se destacam inicialmente as defesas pré-formadas de origem química e física. Esses mecanismos pré-formados irão agir como primeira camada de defesa, repelindo a maioria das infecções. As barreiras físicas são proporcionadas pela cutícula, cera e pela parede celular, e como barreiras químicas temos a presença de diferentes metabólitos de secundários envolvidos com a defesa, chamados coletivamente de fitoanticipinas. Caso um patógeno consiga superar essas defesas pré-formadas ele será desafiado por uma diversa gama de mecanismos pós-formados que são desencadeados a partir da resposta imune vegetal, como por exemplo a lignificação da parede celular, a geração de espécies reativas de oxigênio, a produção de fitoalexinas, produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR) entre outros. Todos esses mecanismos serão melhor explicados posteriormente.

### 1.6.2 Barreiras físicas e químicas

Um dos primeiros mecanismos de defesa vegetal que patógenos capazes de causar infecção devem vencer é a barreira física formada pela cera, cutícula e parede celular vegetal. **(Figura 9)**. A cutícula é formada por cutina, ceras e carboidratos e sua estrutura tende a variar entre as diferentes espécies vegetais. Para que ocorra uma infecção, o patógeno deve ser capaz de enfraquecer essa estrutura, através da utilização de enzimas como por exemplo a cutinase. Auyong e colaboradores demonstraram em 2015 como o silenciamento do gene codificante para cutinase em *Colletotrichum truncatum* impactou negativamente na capacidade do fungo de infectar plantas de pimenta e soja (Auyong *et al.*, 2015).



**Figura 9:** Representação esquemática da estrutura da cutícula vegetal **(A)** e em, **(B)** Microscopia eletrônica de transmissão de uma cutícula de jovem folha, evidenciando as camadas de cutícula indicadas em **(A)**, ceras não são visíveis, mas estão presentes (Figura **(A)** por Jeffree, 1996; Figura **(B)** por Gunning e Steer, 1996).

A parede celular vegetal é uma estrutura extremamente complexa e é composta de diversos polímeros que variam em proporção entre as diferentes espécies de plantas e tecidos vegetais. A presença de moléculas como celulose, hemicelulose, pectina e lignina fazem da parede celular uma barreira complexa para ser superada. Patógenos que conseguem estabelecer uma infecção dispõem mecanismos pelos quais eles conseguem desestabilizar essa parede, como a produção de enzimas degradadoras de parede (CWDE) que mudam ou hidrolisam a ligação entre as glucanas que constituem os componentes da parede (Bacete *et al.*, 2018)

Plantas são organismos capazes de produzir diversos compostos moleculares de baixo peso molecular e com uma grande variedade de grupos funcionais e esqueletos de carbono que não tem atividade no seu metabolismo primário (Maag *et al.*, 2014). Esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários. As plantas podem ter três grandes grupos de metabólitos secundários, como: compostos fenólicos, terpenos e compostos que contêm nitrogênio (Taiz e Zeiger, 2017). Além disso, estes metabólitos podem ser constitutivamente expressos ou podem ter sua expressão modulada em caso de uma infecção (Piasecka, Jedrzejczak-rey Bednarek, 2015). Metabólitos secundários que possuem efeito antimicrobiano são convencionalmente divididos em pré-formados (fitoantecipinas), sendo constitutivamente expressos ou pós-formados (fitoalexinas), que tem sua expressão induzida por algum estresse (Vanetten *et al.*, 1994).

Fitoantecipinas apresentam uma grande variedade de mecanismos de ação e são fundamentais para a resistência intrínseca de determinadas plantas contra diversos tipos de patógenos, apesar da maioria dos mecanismos de ação desses compostos não estar elucidada (Ahuja, Kissen e Bones, 2012). Em 1995, Bowyer e colaboradores demonstraram como mutantes do fungo *Gaeumannomyces graminis* que tiveram a habilidade de produzir uma enzima responsável pela hidrólise de saponina, perdiam a virulência contra plantas produtoras de saponina, mas ainda apresentava virulência contra plantas não produtoras de saponinas, demonstrando assim a importância da presença de uma fitoantecipina para evitar a patogênese contra esse fungo. (Bowyer *et al.*, 1995)

Fitoalexinas são compostos de baixo peso molecular que apresentam uma grande variedade estrutural. Algumas fitoalexinas apresentam diversos efeitos sobre determinados microrganismos. A camalexina é uma fitoalexina produzida em *Arabidopsis thaliana* que é capaz de causar danos à membrana celular, reduzir a permeabilidade de membrana e induzir a morte celular programada de fungos sensíveis (Ahuja, Kissen e Bones, 2012).

### 1.6.3 Imunidade induzida por padrões moleculares associados à patógenos (PTI) e imunidade induzida por efector (ETI)

A imunidade vegetal geralmente é resumida em dois grandes tipos de imunidade que tem como princípio o reconhecimento de diferentes tipos de moléculas. O primeiro nível de imunidade após as defesas pré-formadas citadas anteriormente, é baseado no reconhecimento de padrões moleculares associadas à patógenos (PAMP) ou associados ao dano (DAMP) por

receptores reconhecedores de padrão (PRRs). Os PAMPs são moléculas essenciais e altamente conservadas entre os patógenos, o que faz com que sejam alvos ideais para reconhecimento. Diversas moléculas podem ser reconhecidas como PAMPs pelas células vegetais, como quitina, ergosterol e  $\beta$ -glucanas de origem fúngica (Khoza, Dubery e Piater, 2019) ou o lipopolissacarídeo ou flagelina bacteriana (Silipo, 2009). Os DAMPs por sua vez são moléculas provenientes da própria célula vegetal e podem ser liberados a partir de, por exemplo, a quebra de polímeros da parede celular devido à ação de enzimas degradadoras de parede celular secretadas por algum patógeno (Choi e Klessig, 2016). Essas moléculas ao serem reconhecidas pelos PRRs irão desencadear uma resposta conhecida como imunidade induzida por PAMP (PTI). A PTI é marcada inicialmente pelo grande influxo de íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) no citoplasma da célula vegetal. Esse influxo é iniciado a partir da abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes na membrana do tilacóide após a fosforilação de PRRs que ligaram à PAMPs/DAMPs (Muthamilarasan e Prasad, 2013). A PTI dará início a diversos fatores como burst oxidativo, deposição de calose e a expressão de genes relacionados à defesa (Altenbach and Robatzek, 2007; Schwessinger and Zipfel, 2008).

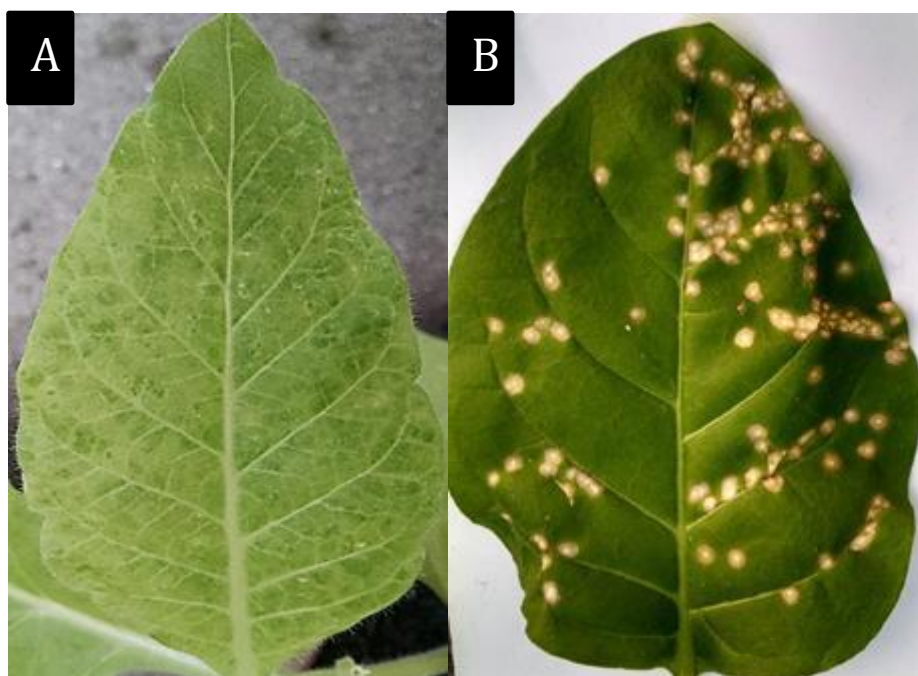
Para subverter a resposta inicial de PTI e conseguir infectar um determinado hospedeiro, diversos patógenos desenvolveram uma série de moléculas altamente variáveis chamadas de efetores. Essas moléculas efetoras podem possuir diversas funções e agem como fatores de virulência. Esses efetores são codificados por genes de avirulência (*Avr*) do patógeno e podem agir no espaço intercelular inibindo a atividade de enzimas líticas produzidas pelas células do hospedeiro ou mascarando a presença de PAMPs que por sua vez diminui os efeitos da PTI. Os efetores também podem agir no espaço intracelular, interferindo por exemplo em cascatas de sinalização e na expressão de determinados genes (Silva *et al.*, 2018).

Em busca de se defender contra a patógenos que conseguem resistir a resposta de PTI, as plantas desenvolveram o que se chama imunidade induzida por efetores (ETI). A ETI se baseia no reconhecimento de moléculas efetoras por receptores codificados por genes de resistência (*R*). Os genes *R* codificam para proteínas intracelulares chamadas de “nucleotide-binding leucine rich repeat receptors” (NLR) que irão reconhecer os efetores de forma direta, onde NLRs interagem especificamente com as moléculas efetoras, ou indireta onde o receptor interage como proteínas do hospedeiro que são alvos dos efetores provenientes do patógeno. A resistência proveniente de uma resposta ETI é uma relação gene-a-gene, ou seja, cada proteína *R* será responsável pela interação com uma proteína *Avr*. Além disso o reconhecimento dos efetores induz a expressão de genes de defesa como proteínas relacionadas à patogênese (PR),

geração de espécies reativas de oxigênio, deposição de calose, síntese de fitohormônios como ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico. A ETI está geralmente associada com o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade (HR) e com a indução de respostas de resistência distais como a resistência sistema adquirida (SAR). (Liu *et al.*, 2013; Li, Kapos e Zhang, 2015)

#### 1.6.4 Resposta de hipersensibilidade (HR)

A resposta de hipersensibilidade é um tipo de morte celular programada que tem como um dos primeiros fatores a rápida produção e acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de radical superóxido ( $O_2^-$ ), que é induzida a partir de uma resposta de ETI (Lamb e Dixon, 1997; Coll, Epple e Dangl, 2011). Durante a HR, a célula infectada comete apoptose e induz a morte celular das células ao redor do sítio de infecção, inibindo assim o crescimento e a disseminação de patógenos biotróficos e hemibiotróficos a partir da formação de lesões necróticas (**Figura 10**). As células vegetais que estão envolvidas no processo de HR aumentam a produção de fitoalexinas, proteínas PR e de componentes para fortalecimento da parede celular (Dangl, Dietrich e Richber, 1996).



**Figura 10:** Sintomas da infecção pelo vírus do Mosaico do Tabaco (TMV) em folhas de *N. tabacum*. Em (A), sintoma típico de mosaico causado pela infecção por TMV em cultivar suscetível SR1 e em (B) a formação de lesões necróticas em cultivar Xanthi, resistente à infecção por TMV. (fotos por Montebianco, 2017)

Plantas de *Nicotiana tabacum* pertencentes ao cultivar (cv) Xanthi são intrinsecamente resistentes à infecção pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV). A resistência é evidenciada pela

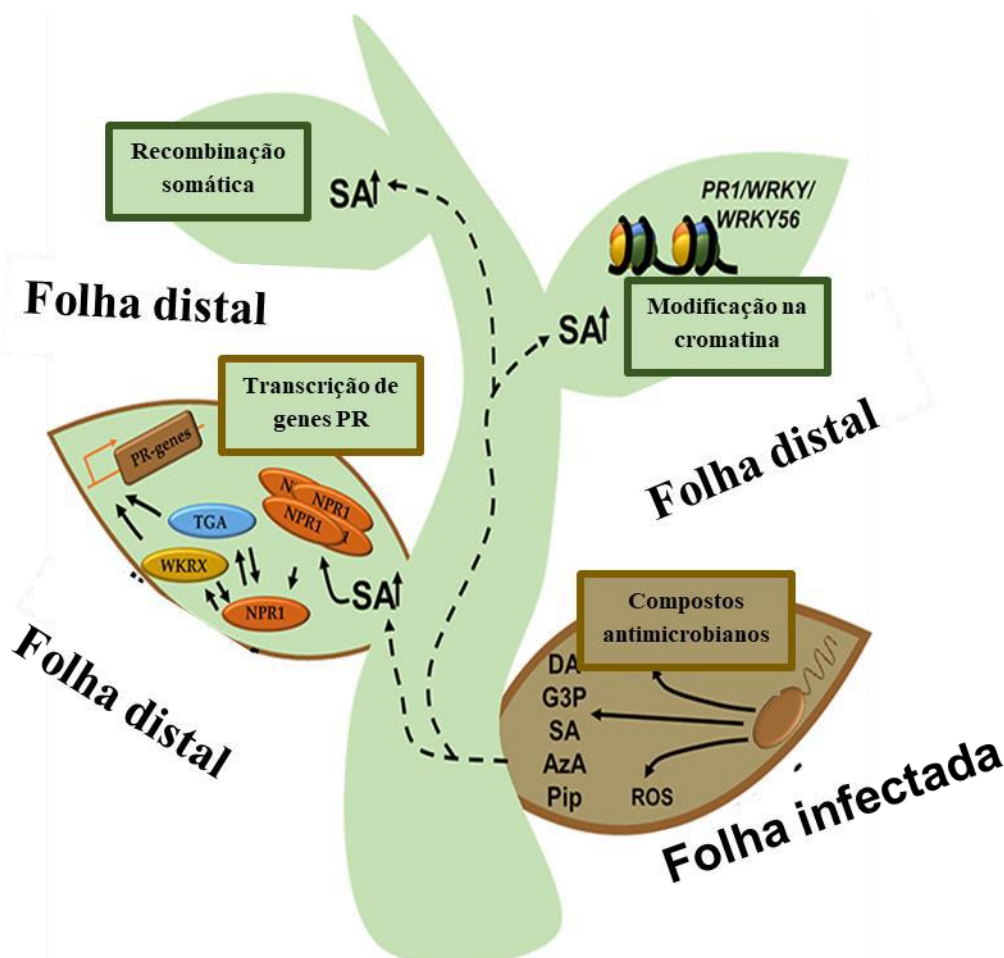
formação de lesões necróticas após a infecção por TMV em contraste com os sintomas característicos da doença causada pelo vírus em um cultivar suscetível (**Figura 10**). Essa resistência é mediada pelo gene de resistência *N* (Yang e Klessing, 1996). Análise sequencial demonstrou que a proteína putativa *N* possui um domínio amino terminal com similaridades aos domínios de uma proteína tipo Toll em *Drosophila* e ao receptor de interleucina 1 humano (IL-1R), o está de acordo com a atividade proposta da proteína *N* na via de transdução de sinal envolvida na HR. (Whitham *et al.*, 1994)

#### 1.6.5 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)

Como visto previamente, plantas possuem diversos mecanismos que visam a proteção dos tecidos vegetais contra o dano causado por patógenos. Um outro mecanismo conhecido e de extrema importância é resistência sistêmica adquirida (SAR) que é capaz de, como o nome sugere, desenvolver uma proteção na planta como um todo contra infecções. O desenvolvimento de SAR permite que a planta, após uma infecção localizada, seja capaz de montar uma resistência duradoura de forma sistêmica contra infecções posteriores (**Figura 11**) (Shoresh, Harman e Mastouri, 2010; Banday e Nandi, 2015). Além disso, SAR desenvolve uma mudança no perfil transcricional de diversos genes que codificam para proteínas relacionadas à



patogênese (PR) (**Tabela 3**), o que por sua vez implica em uma resistência de amplo espectro (Durrant e Dong, 2004).



**Figura 11:** Representação esquemática da resistência sistêmica adquirida (SAR). Uma infecção desenvolvida por um patógeno em uma folha distal é percebida e desencadeia uma cascata de sinalização que induz a produção local de espécies reativas de oxigênio e outros compostos antimicrobianos. A infecção também irá induzir a produção de diversos fitohormônios, principalmente o ácido salicílico, que será transportado pelo floema para as partes distais da planta. Com isso, desencadeará uma mudança no perfil transcricional vegetal aumentando a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e modificação na cromatina. (Adaptado de Naranjo-Arcos e Bauer, 2017).

O desenvolvimento de SAR é dado a partir de uma infecção primária. Essa infecção primária irá levar à disseminação de um sinal sistêmico ainda não elucidado que irá se espalhar pela planta utilizando o sistema vascular vegetal. Essa molécula irá induzir o acúmulo de fitohormônio conhecido como ácido salicílico (SA), que é fundamental para o desenvolvimento de SAR (Shah e Zeier, 2013). Estudos realizados em plantas de tabaco e *Arabidopsis* transgênicas que codificam para uma enzima capaz de hidrolisar SA tiveram um aumento na susceptibilidade e redução na expressão da proteína relacionada à patogênese PR1, que é geralmente induzida por SA. O aumento da expressão de PR1 está estreitamente associado com

a ativação da resistência sistêmica adquirida após uma infecção por um patógeno ou plantas tratadas com elicitores (Chalfoun *et al.*, 2013)

As superfamílias de proteínas PR têm diversas funções (**Tabela 3**). A superfamília das PR2 é composta de  $\beta$ -1,3-glucanases e, assim como proteínas pertencentes a PR3 que tem função de quitinase, podem ter ação antifúngica direta a partir da quebra de componentes pertencentes à camada mais interna da parede celular fúngica. (Ali *et al.*, 2018).

**Tabela 3: Classificação e propriedades de proteínas PR isoladas de diferentes sistemas vegetais. (Ali *et al.*, 2018)**

Proteínas PR	Função/propriedade
PR1	Atividade antifúngica
PR2	$\beta$ -1,3-glucanase
PR3	Quitinase (classes I, II, IV, V, VI, VII)
PR4	Quitinases (classes I e II)
PR5	Osmotina/thaumatina
PR6	Inibidor de proteinase
PR7	Endoproteinase
PR8	Quitinase (classe III)
PR9	Peroxidase
PR10	Proteínas tipo ribonuclease
PR11	Quitinase (classe I)
PR12	Defensina
PR13	Tionina
PR14	Proteína transferidora de lipídios
PR15	Oxalato oxidase
PR16	Enzima tipo oxidase
PR17	Antifúngica e antiviral

As proteínas PR5 são classificadas como osmotinas ou proteínas tipo taumatina, e estão associadas com a indução de morte celular programada de patógenos de origem fúngica através da danificação do DNA e ruptura da membrana plasmática, apesar disso e o mecanismo ainda não está completamente elucidado (Hakim *et al.*, 2018; Chaliha *et al.*, 2018).

Além dos genes PR, as defesas pós-formadas das plantas também são influenciadas por moléculas da via fenilpropanóide. Essa via tem como enzima primária a fenilalanina amônia-liase, que está envolvida com diversos compostos fenólicos como, por exemplo, os isoflavonóides, metabólitos secundários de importante ação como fitoalexinas (Taiz e Zeiger, 2017).

Outros genes como o da lipoxigenase (LOX) podem influenciar na defesa, pois os produtos primários da atividade de LOX, leva a formação de moléculas de alta reatividade, que

podem formar radicais livres e causar danos à membrana celular e morte celular (HR). (Boava *et al.*, 2011). O gene para peroxidase (*POX*) por sua vez, pode ter diversas funções na resposta de defesa vegetal. *POX* pode agir como mediador da resposta de hipersensibilidade, e como um protetor contra os danos causados por ozônio e radical superóxido (Orozco-Cardenas, Narvaez-Vasquez e Ryan, 2001). Em *Arabidopsis*, a mutação nos genes que codificam para a peroxidase impedem o desenvolvimento de SAR (Shah e Zeier, 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

Um fator limitante para o alto rendimento de monoculturas são as doenças causadas por fitopatógenos. Para lidar com esse problema, agricultores utilizam diversos tipos de estratégias para tentar evitar o acometimento da plantação, como a rotação de culturas (Dita, 2018), a utilização de fungicidas ou a utilização de cultivares resistentes. Entretanto, tem sido cada vez mais frequente o surgimento de fungos patogênicos que apresentam resistência aos limitados antifúngicos disponíveis. A rápida emergência de fungos e bactérias multirresistentes são uma séria ameaça para o controle das doenças nas plantações. Atualmente, as doenças fúngicas são responsáveis pela perda de aproximadamente 20% na produção mundial de plantas perenes, sendo a perda aumentada em 10% após a colheita (Fisher, *et al.* 2018). Por esses motivos, o desenvolvimento de um biopesticida capaz de agir de uma forma diferente dos atuais tem se tornado extremamente interessante.

Como já foi visto anteriormente, *F. oxysporum* é um fungo capaz de persistir por muito tempo no solo e está associado com o desenvolvimento de doença em mais de 100 diferentes espécies vegetais de importância econômica (Ma *et al.*, 2013). O surgimento e a disseminação de novas raças de *F. oxysporum*, como a raça tropical 4 (RT4), tem chamado atenção para a fragilidade das estratégias até então empregadas para o controle de doenças fúngicas.

A partir da elucidação de alguns dos mecanismos empregados pelo sistema imune vegetal para proteger a planta, novas estratégias para lidar com as infecções vem surgindo. Alguns estudos já demonstraram a capacidade de algumas moléculas provenientes de fungos em induzir uma resposta de defesa vegetal como: cerebrosídeos extraídos de *Colletotrichum capsici* (Naveen *et al.*, 2012), uma glicoproteína de *Phytophthora megasperma* (Cordelier *et al.*, 2003), cerebrosídeos de *Magnaporthe grisea* (Umemura *et al.*, 2000). O estudo das interações entre essas moléculas e o sistema imune vegetal é importante para o desenvolvimento de estratégias alternativas aos pesticidas.

A SAR é uma defesa de amplo espectro e de longa duração vegetal onde a infecção por um patógeno em um sítio primário é capaz de induzir a defesa em tecidos distais contra diversos tipos de patógenos. Em contraste com a estratégia empregada nas lavouras para combater a infecção através do emprego de compostos com atividade antifúngica, a utilização de um glicoconjugado de um fungo patogênico como elicitadora do sistema imune vegetal se mostra como uma interessante alternativa.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade da indução de SAR em plantas de *N. tabacum* cv Xanthi, resistente à infecção pelo TMV, pelas moléculas de glucosilceramidas (GlcCer) extraídas e purificadas da parede celular de *Fusarium oxysporum*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Obter a GlcCer de *Fusarium oxysporum*.
- Avaliar a capacidade da GlcCer como protetor contra a infecção pelo vírus do Mosaico do Tabaco (TMV);
- Avaliar a produção de metabólitos secundários;
- Avaliar a expressão de espécies reativas de oxigênio nas folhas tratadas em diferentes tempos;
- Analisar a expressão de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida em plantas de tabaco após a pulverização com a GlcCer ao longo do tempo;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismo utilizado

Durante esse trabalho, foi utilizado cepa 4247 de *Fusarium oxysporum* proveniente de uma infecção em raízes de tomateiro. Esta cepa foi cedida pela Dr<sup>a</sup> Maria Inês Sarquis da Coleção de Cultura de Fungos da FIOCRUZ.

### 4.2. Extração e purificação dos glicosfingolipídeos

#### 4.2.1 Condições de cultivo e obtenção de massa celular

A massa celular foi obtida a partir do crescimento do fungo em meio Sabouraud modificado líquido sob agitação à temperatura ambiente. Após uma semana de crescimento, a massa celular foi filtrada em funil de Buchner com filtro de papel, lavada com água destilada e armazenada a -20°C até ser processada.

#### 4.2.2 Obtenção do extrato lipídico bruto

A massa de células, de aproximadamente 500 gramas, de *F. oxysporum* foi tratada inicialmente com clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) e em seguida foi triturada com o auxílio de um liquidificador e deixada em agitação por 2 horas em temperatura ambiente, obtendo-se o extrato lipídico inicial após a filtração. O mesmo procedimento foi repetido utilizando clorofórmio/metanol na proporção 1:2 (v/v). Os extratos provenientes das duas filtrações foram combinados e secos em rotaevaporador. O extrato lipídico bruto foi então fracionado em uma partição de Folch (clorofórmio/ metanol/ KCl 0,75%; 8:4:3 v/v) durante a noite (Folch *et al.*,1957).

#### 4.2.3 Fracionamento dos lipídios neutros

A fração inferior da partição de Folch foi coletada e seca em rotoevaporador até a secura. A fase inferior foi então dissolvida em clorofórmio e aplicada em uma coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck, 5 x 100cm). A coluna foi eluída com volumes iguais de clorofórmio, acetona e metanol, respectivamente. As diferentes frações foram coletadas, concentradas e

posteriormente analisadas em cromatografia de camada fina (TLC) em placa de sílica gel. Como solvente de corrida foi utilizado clorofórmio/ metanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$  (2M) na proporção 40:10:1 (v/v). As bandas foram visualizadas utilizando vapor de iodo (Marinetti, 1986) e orcinol/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Kanfer e Hakomori, 1983) e a identificação dos glicosfingolipídios foi feita a partir da comparação com o fator de retenção de um padrão de cerebrosídeo bovino (Calixto *et al.*, 2016)

#### 4.2.4 Purificação dos glicosfingolipídios

A fração eluída com acetona, rica em glicosfingolipídios, foi purificada por mais uma cromatografia em coluna de sílica gel. Esta coluna foi eluída sequencialmente com proporções decrescentes de clorofórmio/metanol (95:5, 9:1, 8:2, 7:3 e 1:1, e 0:1 v/v). Frações de 5mL foram então coletadas e analisadas por cromatografia em camada fina (TLC), utilizando a mesma solução de corrida descrita no item anterior. As bandas foram então visualizadas, como previamente citado, a partir da exposição à vapor de iodo e com orcinol/  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Collodetti, 2016)

#### 4.3. Obtenção do material vegetal

Para obtenção do material vegetal, sementes de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi foram germinadas em substrato Top Garden Floreira® acrescido de vermiculita e mantidas em casa de vegetação com controle de temperatura ( $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 25 dias. Após a germinação as plântulas foram transferidas para potes individuais contendo o mesmo substrato anterior.

#### 4.4. Determinação do conteúdo fenólico

O conteúdo fenólico total dos extratos aquosos foi avaliado utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu (Holland *et al.*, 2011). Folhas de *N. tabacum* foram coletadas 48 horas após o tratamento com diferentes concentrações de GlcCer resuspendido em tampão fosfato 20mM (50, 100, 200 ou 400  $\mu\text{g/mL}$ ), tampão fosfato e não tratadas. O extrato aquoso foi obtido a partir da maceração das folhas em água destilada com o auxílio de gral e pistilo, os extratos foram então filtrados, congelados e posteriormente liofilizados. Amostras do extrato foram adicionados a uma solução do reagente Folin-Ciocalteu a 10%. Após 5 minutos, foi adicionado  $\text{NaCO}_3$  (2%) e a reação foi incubada em temperatura ambiente por 2 h na ausência de luz. A leitura dos resultados foi feita em espectrofotômetro a 660 nm.

Os resultados obtidos foram comparados com a curva de calibração utilizando ácido gálico e elaborada nas concentrações entre 20 e 160 mg/l. O conteúdo fenólico total dos extratos foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG), em mg/g de extrato seco.

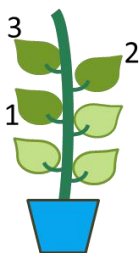
#### 4.5 Avaliação da severidade da doença em *N. tabacum* cv Xanthi tratadas com GlcCer

##### 4.5.1 Vírus do mosaico do tabaco (TMV) - obtenção da suspensão viral

Para obter a suspensão viral foram utilizadas folhas de *N. tabacum* cv SR1 (cultivar suscetível à infecção por TMV) que foram previamente inoculadas com TMV estocadas em freezer -80°C. Cerca de 1g de folhas congeladas foram adicionadas a 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,01M pH 7,0 e maceradas com o auxílio de um gral e pistilo autoclavados. Em seguida, o inóculo viral foi diluído 25 vezes em tampão fosfato de potássio 0,01M pH 7,0.

##### 4.5.2 Pulverização da GlcCer e inóculo mecânico viral

Para a realização do experimento, GlcCer purificada foi ressuspensa em tampão fosfato de potássio 20mM na concentração de 100 µg/mL. Essa mistura foi então pulverizada na planta como um todo, utilizando um aparelho de alta pressão (W550, WAGNER), em plantas com cerca de seis folhas verdadeiras e o mesmo foi feito com o tampão fosfato 20mM pH 7,0 (controle). Após 24 horas, a suspensão viral foi inoculada mecanicamente nas três primeiras folhas mais jovens e plenamente expandidas (**Figura 12**).



**Figura 12:** Esquema representativo da disposição das folhas de *N. tabacum* que foram inoculadas com vírus do mosaico do tabaco (TMV).

##### 4.5.3 Avaliação da severidade da doença

Como dito previamente, a infecção por TMV em *N. tabacum* cv. Xanthi é capaz de induzir a formação de lesões necróticas provenientes de uma resposta de HR. A avaliação da severidade da doença foi feita observando-se a formação ou não destas lesões 72h após o



inóculo. As lesões foram contadas nas três primeiras folhas mais jovens e plenamente expandidas que receberam o inóculo viral previamente (Wang *et al.*, 2016)

#### 4.6. Visualização histoquímica do acúmulo de espécies reativas de oxigênio em plantas de *N. tabacum* cv Xanthi

##### 4.6.1 Visualização histoquímica de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

Para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio após o tratamento com GlcCer de *F. oxysporum*, plantas de *N. tabacum* cv Xanthi que foram pulverizadas com GlcCer como descrito anteriormente, tiveram suas duas folhas mais jovens e plenamente expandidas foram coletadas após 30 min, 1h, 3h e 6h após a pulverização. Para cada diferente tempo e para cada tratamento, três plantas foram utilizadas totalizando

Em seguida, foi preparado uma solução contendo diaminobenzidina (DAB) dissolvido em tampão fosfato de potássio 10mM pH 3.8 na concentração de 1 mg/mL. As folhas coletadas foram submergidas em placas de Petri contendo a solução e deixadas em uma câmara de vácuo por 1 hora no escuro. As folhas foram então submetidas a um tratamento com etanol absoluto fervente para a retirada da clorofila, proporcionando uma melhor visualização dos precipitados formados pelo DAB e o peróxido de hidrogênio. As folhas foram fotografadas após a retirada da clorofila (Wang *et al.*, 2016)

##### 4.6.2 Visualização histoquímica de radical superóxido ( $O_2^-$ )

Plantas de *N. tabacum* cv Xanthi que foram pulverizadas com GlcCer solubilizado em tampão fosfato de potássio na concentração de 100µg/mL por um aparelho de alta pressão e tiveram, assim como no experimento anterior, suas duas folhas mais jovens e plenamente expandidas coletadas após 30 min, 1h, 3h, 6h, ou 24h após a pulverização. Para a visualização histoquímica de radical superóxido, foi preparado uma solução contendo o reagente nitroazul de tetrazólio (NBT) dissolvido em tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,8 na concentração de 0.5mg/mL. As folhas foram então submergidas em placas de Petri contendo a solução e deixadas em uma câmara de vácuo por 1 hora no escuro (Wang *et al.*, 2016)

Após o tratamento à vácuo, as folhas foram tratadas com etanol absoluto fervente para a retirada da clorofila, proporcionando uma melhor visualização dos precipitados formados pelo NBT e o radical superóxido. Após a retirada da clorofila as folhas foram fotografadas.

4.7. Análise da expressão gênica de genes relacionados à defesa vegetal por PCR em tempo real.

#### 4.7.1 Obtenção e armazenamento das amostras vegetais

Folhas de *N. Tabacum* cv. Xanthi foram coletadas em 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h após pulverização com GlcCer (100 µg/mL) ou com tampão fosfato 20mM e foram armazenadas a -80°C até a etapa de maceração. Em seguida, as folhas foram trituradas em nitrogênio líquido com o auxílio de gral e pistilo até a formação de um pó que foi transferido para um tubo eppendorf e congelado em freezer -80°C para posterior extração do RNA total.

#### 4.7.2 Extração e purificação do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a pureza foram determinadas a partir de 1,5µl utilizando um espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific). A integridade do RNA foi verificada a partir de eletroforese em gel de agarose (0,8%) utilizando tampão de corrida Tris Acetato (0,5x) e foi visualizada por marcação com brometo de etídio. As amostras foram então tratadas com RQ1 RNase-Free Dnase (Promega Corporation).

#### 4.7.3 Reação de Transcriptase reversa

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita utilizando 1µg de RNA total como molde para transcriptase reversa e 100 µM de primer OligodT. Após a síntese do cDNA, as amostras foram diluídas 25 vezes em água MilliQ autoclavada (Matos *et al.*, 2018).

#### 4.7.4 PCR quantitativo em tempo real

Para a análise da reação de RT-qPCR, foram adicionados à uma placa de 96 poços, 2.5µL de cDNA, 6µL de SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,6µl de primers forward e reverse (10mM) (**Tabela 4**) para os genes a serem analisados e água MilliQ autoclavada para completar o volume de 25µl. A reação foi feita em uma máquina de pcr em tempo real (Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System). As análises foram feitas a partir da média de uma triplicata técnica, sendo a expressão relativa calculada pelo do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Todos os genes avaliados tem a temperatura de anelamento de 60°C, exceto *PAL* e *PR5*, cujas temperaturas foram ajustadas para 62°C.

Os genes avaliados foram: *PR-1* (proteína relacionada à patogênese com ação antifúngica sugerida), *PR-2* (proteína relacionada à patogênese 2, com ação de  $\beta$ -1,3-glucanase), *PR-3* (proteína relacionada à patogênese 3, ação de quitinase), *PR-5* (proteína relacionada à patogênese 5 com função de osmotina/taumatina), *PAL* (Fenilalanina amônia-liase), *LOX* (Lipoxigenase) e *POX* (Peroxidase). Como genes constitutivos foram avaliados: *PP2A* (Fosfatase 2A) e *Ntbuc* (Ubiquitina) (Matos *et al.*, 2018).

**Tabela 4: Lista de primers utilizados**

Nome do primer	Sequencia do primer (5'-3')	Tamanho (pb)
OligoDT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	-
PP2A F	GTGAAGCTGTAGGGCCTGAGC	121
PP2A R	CATAGGCAGGCACCAAATCC	
PR1a F	ATGCGCAAAATTATGCTTCC	138
PR1a R	TCTCATCGACCCACATCTCA	
PR2 F	ATTAGCAGCATCAGGGTTGC	89
PR2 R	TAGCTTTGGGTGGGTAGGTG	
PR3 F	GGTTTTGCTGCATTCCAAAT	91
PR3 R	TGCCGCTTTGATCTTCTTCT	
PR5 F	TCAGGAATGCTGCAAGAATG	123
PR5 R	GCTTGTTCTGGCTCTCATCC	
PAL F	AGTCGTGGACAGGGAATACG	141
PAL R	ATTGAGCTGTTCGCGTTCTT	
LOX F	GGATGTTGGTGCTTCTTTCC	135
LOX R	TCCAAGAATGCTGGTTTTCC	
NtPRxN1 (POX) F	CGTAGAGATGGGCGAGTTTC	142
NtPRxN1 (POX) R	TAGTGTGCGCACCAAGTAAGG	
NtbucR	CTGGACAGCAGACTGACATC	119
NtbucF	CAGGATAATTTGCTGTAAACAGAT	

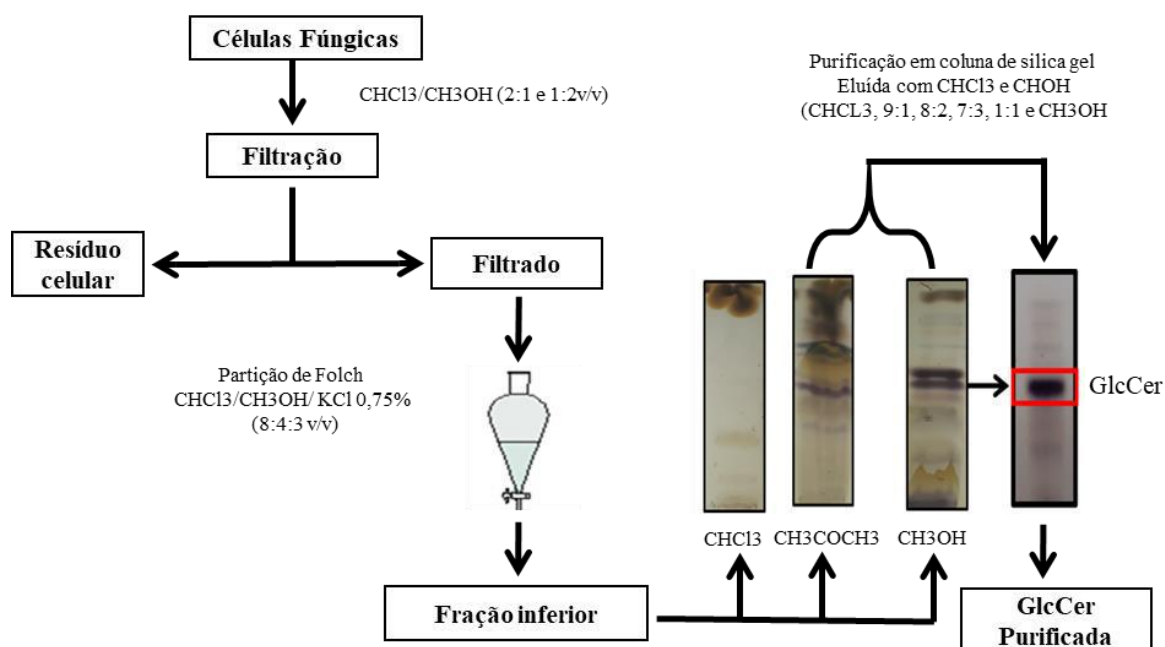
*PP2A* - Fosfatase 2A; *PR1a* - Proteína relacionada a patogênese 1a; *PR2* - Proteína relacionada a patogênese 2; *PR3* - Proteína relacionada a patogênese 3; *PR5* - Proteína relacionada a patogênese 5; *PAL* - Fenilalanina amônia-liase; *LOX* - Lipoxigenase e *NtPRxN1 (POX)* - Peroxidase, *Ntbuc* - Ubiquitina.

## 5. RESULTADOS

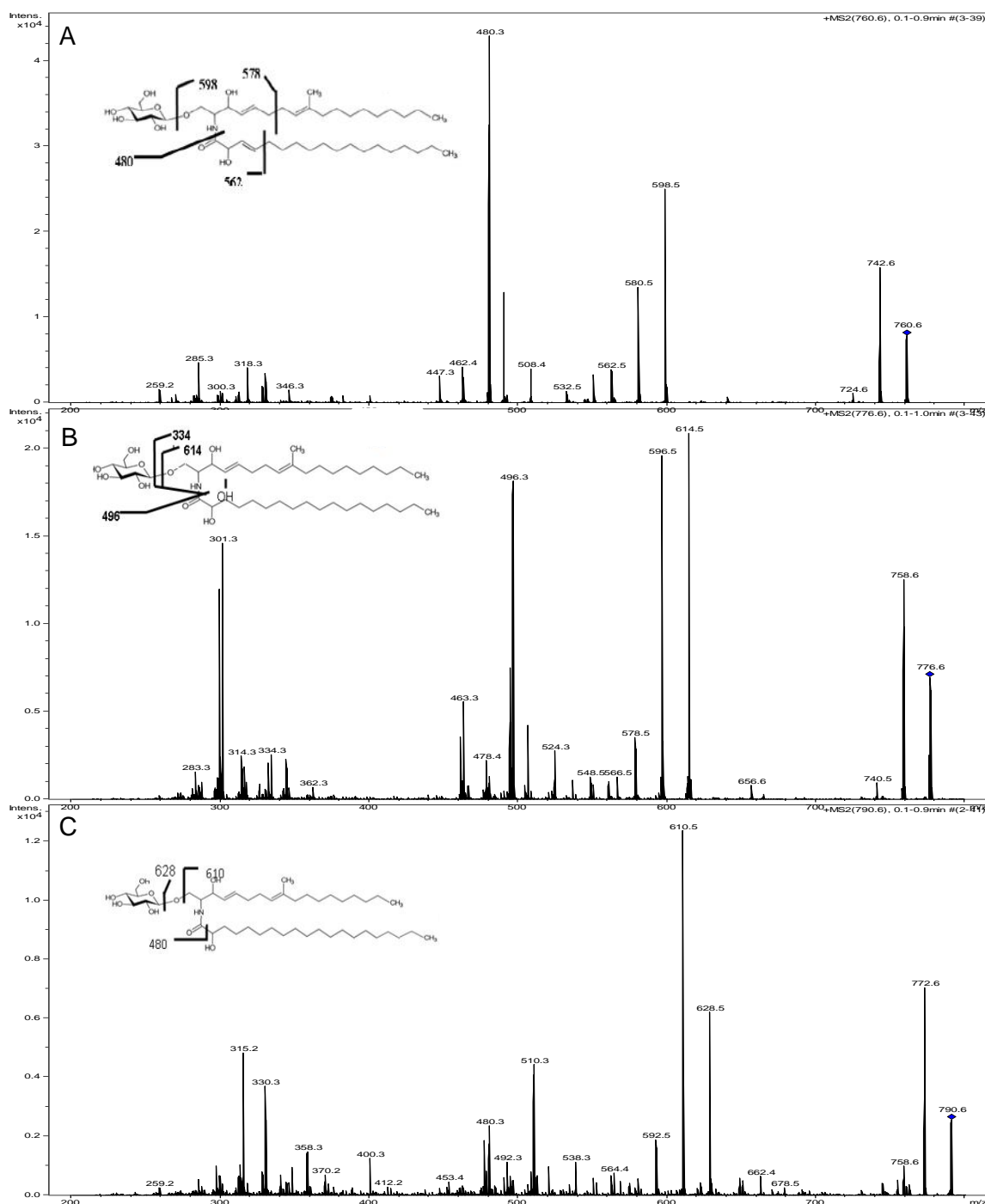
### 5.1 Extração e purificação dos glicoesfingolipídeos

O extrato lipídico bruto foi obtido através do tratamento de aproximadamente 500g de massa celular de *F. oxysporum* com clorofórmio e metanol nas proporções de 2:1 e em seguida 1:2 (v/v). O extrato bruto foi fracionado de acordo com Folch e colaboradores e a fase inferior, rica em lipídeos neutros foi reservada. A fase inferior foi então fracionada em coluna de sílica-gel eluída com clorofórmio, acetona e metanol. A GlcCer se mostrou presente nas frações acetona e metanol e foi purificada por sucessivas cromatografias em

sílica-gel. A presença da molécula foi verificada por cromatografia em camada fina ao longo do processo, como mostrado na **Figura 13**. Em trabalho anterior do grupo, a análise por espectrometria de massas com ionização eletrospray, as GlcCers de *F. Oxysporum* foram identificadas como *N*-2'-hidroxioctadecenóico-1- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingodienina, *N*-2'-hidroxioctadecanóico-1- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-9-metil-4-hidroxi-4,8-esfingodienina e *N*-2'-hidroxieicosanoil-1- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingodienina (**Figura 14**).



**Figura 13:** Esquema de extração e purificação do extrato lipídico bruto para a obtenção da glucosilceramida de *F. oxysporum* purificada.

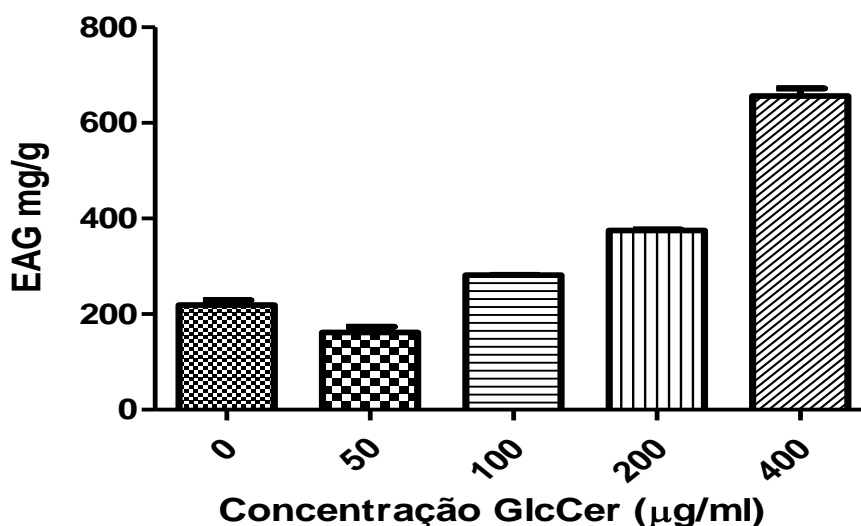


**Figura 14:** Análise por espectrometria de massas com ionização eletrospray positiva (ESI-MS)  $[M+Li]$  das GlcCers de *F.oxysporum*. Em (A) m/z 760 (*N*-2'-hidroxiocetadecénico-1-β-*D*-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingodienina), (B) m/z 776 (*N*-2'-hidroxiocetadecanóico-1-β-*D*-glucopiranosil-9-metil-4-hidroxi-4,8-esfingodienina) e (C) m/z 790 (*N*-2'-hidroxiicetanosil-1-β-*D*-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingodienina). (Bernardino, 2016)

## 5.2 Determinação do conteúdo fenólico

O conteúdo de fenóis totais nos extratos de *N. tabacum* cv Xanthi tratadas com diferentes concentrações de GlcCer (48h) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama (**Figura 15**). A partir

da concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , foi observado um aumento na produção de polifenóis totais. O tratamento com a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  teve um aumento de 28% na concentração de polifenóis, enquanto que as concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$  e 400  $\mu\text{g/mL}$  tiveram um aumento de 71% e 200%, respectivamente. Esses resultados demonstram que a GlcCer é capaz de induzir a produção de polifenóis dose dependente.

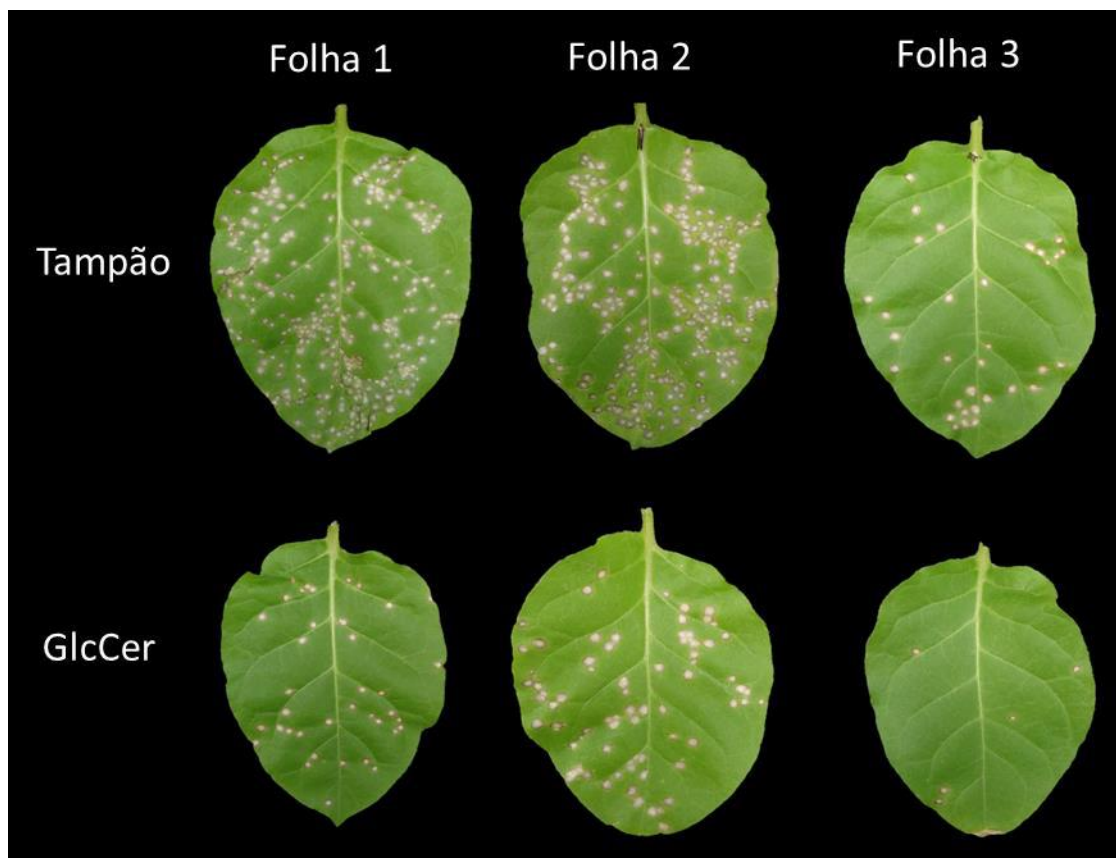


**Figura 15:** Dosagem de polifenóis totais dos extratos aquosos de *N. tabacum* cv Xanthi 48 h após tratamento com GlcCer de *F. oxysporum* em diferentes concentrações.

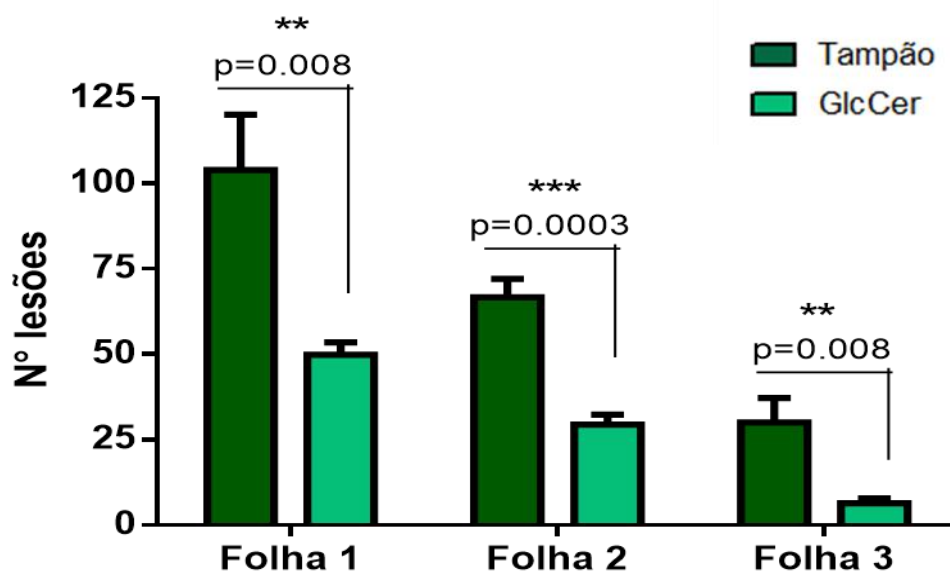
### 5.3 Avaliação da severidade da doença

Em busca de avaliar o efeito protetor da GlcCer contra o TMV, pelo menos dez plantas de *N. tabacum* cv Xanthi foram utilizadas para cada tratamento. Após 24 horas de tratamento com a GlcCer ou com tampão fosfato, foi feito o inóculo mecânico viral nas três primeiras folhas verdadeiras e plenamente expandidas e, 72 horas após o inóculo viral, foi feita a contagem do número de lesões necróticas. Foi possível observar que as folhas que foram tratadas com GlcCer tiveram uma drástica redução no número de lesões (**Figura 16**). Através da quantificação do número de lesões, foi observado uma redução de 52,2% para a

folha 1, de 56% para a folha 2 e de 78,7% para folha mais jovem (**Figura 17**), demonstrando assim a capacidade da GlcCer de proteger parcialmente plantas de *N. tabacum* cv Xanthi.



**Figura 16:** Esquema de folhas das três primeiras folhas plenamente expandidas de *N. tabacum* cv Xanthi 72 h após o inóculo de TMV. As folhas da sessão inferior foram tratadas com GlcCer 100 µg/mL, enquanto que as folhas da sessão superior foram tratadas apenas com tampão fosfato.



**Figura 17:** Contagem de lesões necróticas em plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi elicidadas com GlcCer (CMH) ou tampão, 3 dias após o inóculo com Tobacco mosaic virus (TMV). \*\* $P < 0,008$ , \*\*\* $P < 0,0003$ .

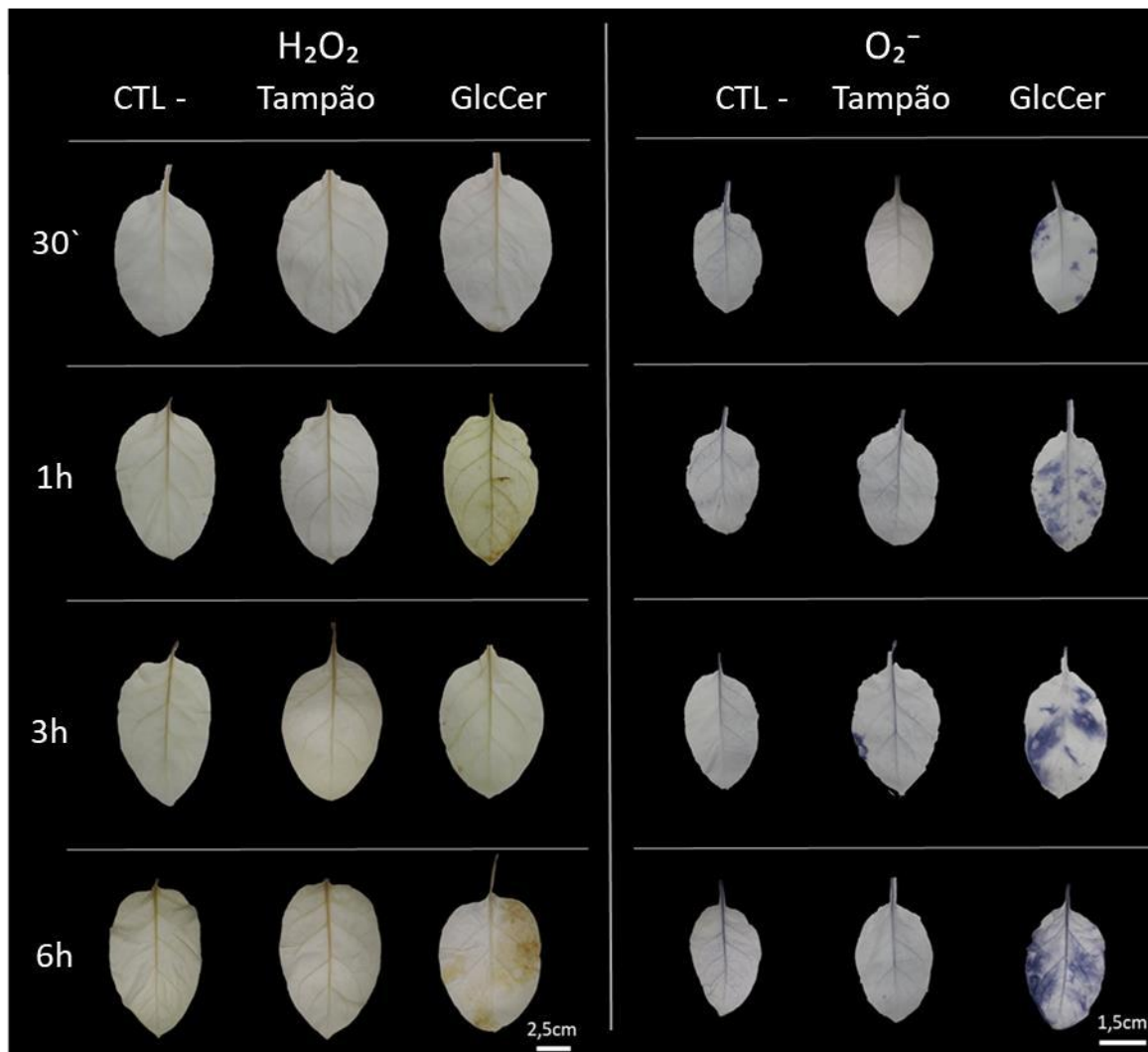
#### 5.4 Visualização histoquímica do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Visando avaliar a capacidade da GlcCer em induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, plantas de *N. tabacum* cv Xanthi foram pulverizadas com GlcCer e tiveram suas três primeiras folhas mais jovens e plenamente expandidas coletadas, em diferentes tempos após a pulverizadas, para visualização histoquímica de peróxido de hidrogênio ou de radical superóxido. Após o tratamento em câmara de vácuo com diaminobenzidina (DAB) para avaliar a presença  $H_2O_2$  ou com nitroblue tetrazolium (NBT) para avaliar a presença de  $O_2^-$ , as folhas tiveram sua clorofila removida e a deposição dos precipitados foi observada (**Figura 18**).

Na **Figura 18**, é possível observar a presença de marcação marrom em todos os tempos testados, demonstrando o acúmulo de  $H_2O_2$ . O tempo de 6 horas apresentou a maior marcação. Também foi possível observar que o acúmulo de  $O_2^-$  acontece em todos os tempos testados, com os tempos de 3h e 6h após o tratamento apresentando as maiores marcações.



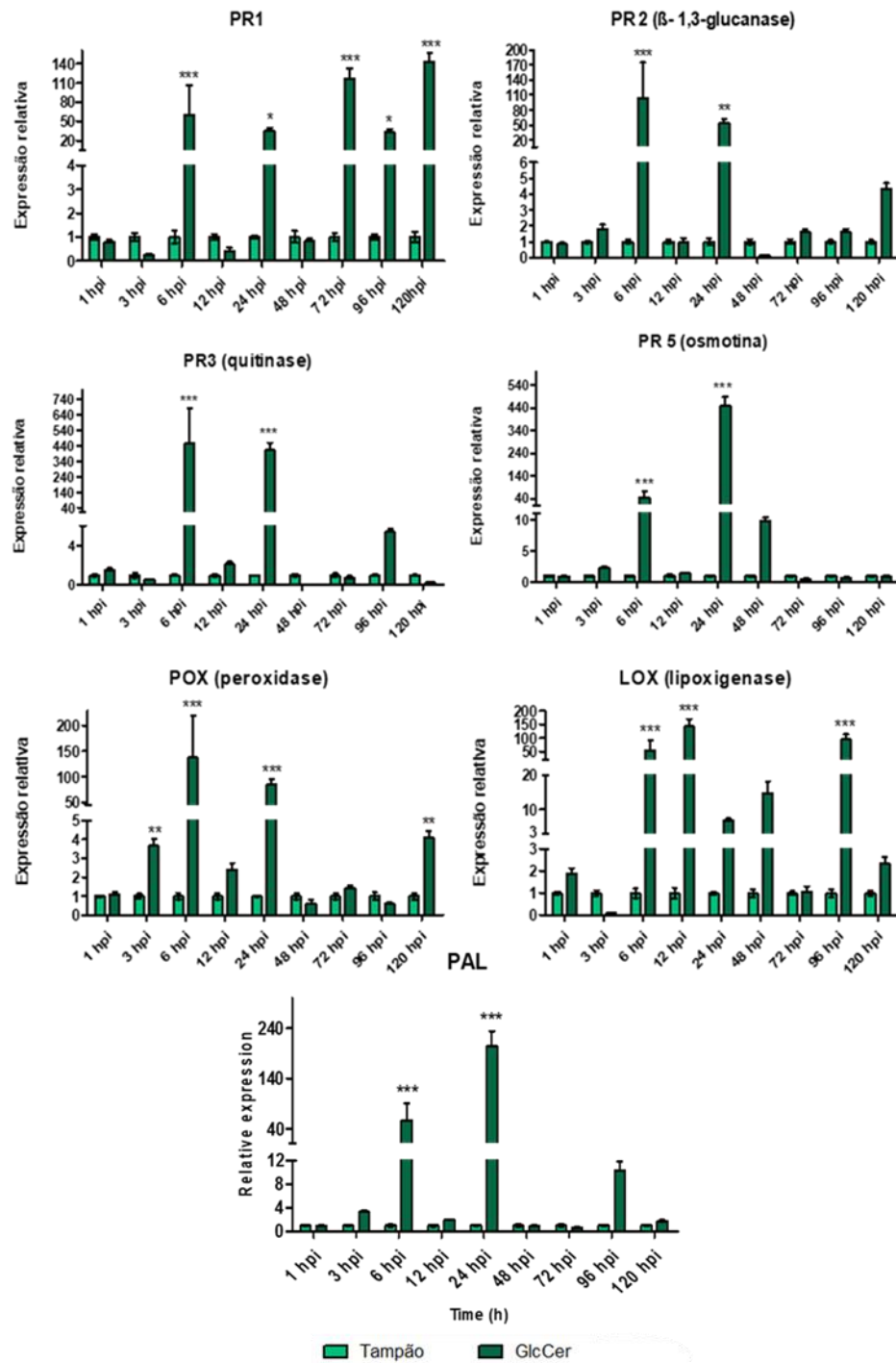
Esses resultados indicam que o a GlcCer é capaz de induzir a produção de ROS em plantas de tabaco.



**Figura 18:** Visualização histoquímica do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em folhas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi coletadas em diferentes tempos após o tratamento com GlcCer de *F. oxysporum*. No quadro à esquerda está representado o acúmulo de  $H_2O_2$ , que é evidenciado pela coloração marrom. No quadro à direita está disposto o acúmulo de  $O_2^-$ , evidenciado pela cor azul.

### 5.5 Análise da expressão gênica de genes relacionados à defesa vegetal

A fim de avaliar o efeito do tratamento GlcCer na indução SAR em plantas de *N. tabacum* cv Xanthi, diversos genes relacionados à defesa foram avaliados por PCR em tempo real (**Figura 19**).



**Figura 19:** Expressão dos genes relacionados à defesa de plantas de *N. tabacum* cv Xanthi tratadas com GlcCer de *F. oxysporum* em diferentes tempos. *PR1*: função antifúngica sugerida, *PR2*:  $\beta$ -(1,3) glucanase; *PR3*: Quitinase; *PR5*: osmotina-like; *POX*: Peroxidase; *LOX*: Lipoxigenase e *PAL*: Fenilalanina amônia liase. Genes constitutivos utilizados para a normalização: *PP2A* e *Actina*. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

O gene *PR1* teve seu primeiro aumento de expressão em 6h, e manteve sua expressão relativamente alta durante quase todos os tempos, atingindo seu pico de expressão em 120 h, estando 147,7x mais expresso que o controle.

A avaliação do gene *PAL* mostrou que esse gene teve seu primeiro aumento de expressão em 6 horas, atingindo seu pico de expressão 24 horas após o tratamento, estando 219x mais expresso do que o controle.

O gene *PR2*, que codifica para uma  $\beta$ -(1,3) glucanase, atingiu seu maior aumento em 6 horas, com 104,5x e teve uma expressão 54,6x maior que o controle em 24 horas. Assim como o gene *PR2*, o gene *PR3*, que codifica para uma quitinase, também teve o seu maior nível de expressão em 6 horas, de 454,8x e se manteve alto em 24 horas com um aumento de 409,6x.

Para o gene *PR5* teve seu maior pico de expressão em 24 horas, sendo 448,2x mais expresso. O gene *LOX* teve seu pico de expressão em 12 horas, sendo 143,7 vezes mais expresso, e permaneceu com níveis relativamente altos de expressão.

Foi observado que o gene *POX*, teve seu primeiro aumento de expressão em 3 horas, estando 3,6x mais expresso e logo em seguida atingiu seu pico de expressão em 6 horas, com um aumento na expressão relativa de 137,6x.

Esses resultados mostram que o tratamento com a GlcCer de *F. oxysporum* foi capaz de induzir um aumento na expressão dos genes nos tempos testados, principalmente, no tempo de 6 horas mostrando que todos são precocemente ativados após o tratamento.

## 6. DISCUSSÃO

O gênero *Fusarium* compreende diversos fungos fitopatogênicos de grande importância econômica. O complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC) compreende fungos encontrados em solos cultivados e não cultivados ao redor do mundo, estando presente em diversos climas diferentes. FOSC se destaca em sua grande gama de possíveis hospedeiros vegetais, incluindo plantas cotiledôneas ou monocotiledôneas, anuais ou perenes (Ma *et al.*, 2013; Edel-Hermann e Lecomte, 2019).

Como dito anteriormente, a parede celular fúngica é uma estrutura essencial para a sua sobrevivência. A parede celular é composta de diversas moléculas que são altamente conservadas e não são encontradas no tecido vegetal, sendo ótimos candidatos para serem reconhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMP). Moléculas da parede celular fúngica que são altamente preservadas como  $\beta$ -glucanas e oligosacarídeos de quitina são conhecidos PAMPs e são capazes de induzir o sistema imune vegetal. (Fujikawa *et al.*, 2009 Shinya *et al.*, 2015; Hopke, 2018).

A utilização de mecanismos que visam ativar uma resposta de defesa induzida ou constitutiva em busca de impedir a colonização da planta por fitopatógenos é algo muito empregado (Vogel-adghough *et al.*, 2013). Moléculas elicitoras são aquelas que tem a capacidade de induzir uma resposta defesa em plantas, diminuindo a sua susceptibilidade a doenças causadas por fitopatógenos (Cooper e Horton, 2017). Essas moléculas podem ser extraídas diretamente de microrganismos ou sintetizadas (Tripathi, Raikhy e Kumar, 2019).

Em 2003, Narasimhan e colaboradores demonstraram como o aumento na expressão de glicoproteínas da parede celular de *F. oxysporum* f.sp. *nicotianae* correspondia a uma maior severidade nas lesões apresentadas em folhas tabaco. (Narasimhan *et al.*, 2003).

Umemura e colaboradores em 1998, isolaram e identificaram os compostos com maior ação elicitora no fungo fitopatógeno de arroz *Magnaporthe grisea*. Os compostos tiveram suas estruturas analisadas e foram identificados como esfingolipídios. O tratamento de folhas de arroz com esses cerebrosídeos foi capaz de induzir a produção e o acúmulo de fitoalexinas, morte celular e aumento de resistência contra patógenos compatíveis.

Neste trabalho propomos a utilização de uma maneira alternativa de combater doenças que afetam plantas através da utilização da glucosilceramida (GlcCer) extraída de micélio de *F. oxysporum* como um elicitor da imunidade vegetal. A resistência sistêmica adquirida tem sido cada vez mais estudada não só como uma alternativa à utilização de

agrotóxicos, mas também como um possível tratamento preventivo contra infecções de patógenos de origem fúngica, viral ou bacteriano de forma prolongada.

Polifenóis são metabólitos secundários que são sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides. Esses compostos, como os taninos, são geralmente encontrados em alimentos como maçãs e vinho tinto e estão associados com benefícios à saúde. Além disso, a classe dos flavonóides e isoflavonoides podem atuar também como fitoalexinas devido ao seu papel antifúngico e antibacteriano (Taiz e Zeiger, 2017).

A análise dos polifenóis totais realizada nesse trabalho foi feito baseado em trabalhos anteriores do grupo, onde foi visto que a GlcCer de *F. oxysporum* era capaz de induzir a produção de diversos flavonoides em plantas de maracujá (*Passiflora alata*), principalmente vitexina-2''-O-ramnosideo. A melhor indução dessa substância ocorreu com a concentração de 100µg/mL de GlcCer (Bernardino, 2016).

Neste contexto, buscamos avaliar como a pulverização com a GlcCer afetaria a produção de compostos fenólicos em plantas de *N. tabacum* cv Xanthi. A análise dos resultados indicou que a GlcCer é capaz de induzir a produção de compostos fenólicos em plantas de tabaco e que esse aumento ocorre de uma forma dose dependente. É interessante observar que o período em que foi feita a coleta para avaliação da produção de compostos fenólicos é justamente onde ocorre os menores níveis de expressão do gene *PAL*, e sua expressão é fundamental para a via dos fenilpropanois e conseqüentemente para a síntese de compostos fenólicos (Hemm *et al.*, 2004). Para experimentos futuros seria interessante comparar a produção desses compostos em diferentes tempos.

Segundo Heller e Tudzynski (2011), espécies reativas de oxigênio tem um papel fundamental nas interações entre patógenos e plantas e é um dos primeiros eventos que ocorrem a partir do reconhecimento de um patógeno pela planta. Além de seu papel antimicrobiano direto, a geração de ROS também está envolvida com a sinalização celular associada à expressão de genes relacionados à patogênese (PR), à resposta de hipersensibilidade (HR) e também ao desenvolvimento de SAR (Torres, Jones e Dangl, 2006; Heller e Tudzynski, 2011).

Em 2010, Kim e colaboradores relataram que plantas de *A. thaliana* que super expressavam o gene *RCI3*, que codifica para uma peroxidase, tinham um aumento de produção de ROS nas raízes quando essas plantas estavam em situação de baixa disponibilidade de potássio (Kim, Ciani e Schachtman, 2010). Além disso, Choi e colaboradores também demonstraram que a superexpressão de *A. thaliana* do gene *CapO2*,

que codifica para uma peroxidase extracelular de pimenteira, aumentou as concentrações de  $H_2O_2$  em resposta à infecção pela bactéria *Pseudomonas syringae*. (Choi et al., 2007)

Para investigar a capacidade elicitora de GlcCer durante a síntese de ROS, foram avaliados a geração de superóxido e de peróxido de hidrogênio em plantas de tabaco. Foi observado que a pulverização da GlcCer de *F. oxysporum* foi capaz de induzir a produção tanto de  $O_2^-$  quanto  $H_2O_2$  e o acúmulo de ROS foi detectado por técnica histoquímica em todos os tempos testados. O maior acúmulo ocorreu durante o período de 6 horas, coincidindo com os picos de expressão de *POX* por RT-qPCR.

Umemura e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento com um cerebrosídeo presente em fungos era capaz de induzir a produção de ROS, a expressão de genes *PR*, além de proteger plantas de alface, tomate, melão e batata doce contra a infecção por *F. oxysporum*. Estes resultados demonstraram a capacidade de cerebrosídeos de agir como protetores contra infecções fúngicas. Além disso, em 2016, Wang e colaboradores demonstraram que a proteína PeBA1 extraído de *Bacillus amyloliquefaciens* era capaz de proteger plantas de *N. tabacum* contra a infecção pelo TMV, demonstrando a atividade de uma molécula de origem bacteriana contra uma doença de origem viral.

Nosso trabalho é o primeiro a investigar a ação da GlcCer como um possível agente antiviral em plantas. Nesse trabalho foi observado a capacidade da GlcCer de proteger plantas de *N. tabacum* cv Xanthi contra a infecção pelo TMV. O cultivar Xanthi foi utilizado devido a sua característica de possuir um gene *N* que confere resistência ao TMV. Ao ser desafiada com o vírus, o produto do gene *N* interage com o domínio helicase da replicase viral do TMV, desencadeando uma resposta de hipersensibilidade no local da infecção e resultando na morte da célula infectada e das células próximas, o que impede o espalhamento do patógeno (Gao et al., 2014). Foi observado que o tratamento com GlcCer foi capaz proteger parcialmente as plantas de *N. tabacum* cv Xanthi da infecção pelo TMV, onde folhas tratadas apresentaram um mínimo de 52% de redução no número de lesões necróticas quando comparadas com o controle, podendo esse número chegar à 78% em folhas mais jovens, indicando o potencial anti-viral da GlcCer.

Uma das principais características da SAR é a mudança no perfil de expressão de genes *PR* de maneira prolongada. Dentre os genes geralmente investigados, o aumento da expressão de *PR1* é reconhecida como um dos principais marcadores do desenvolvimento de SAR (Narasimhan et al., 2003; Van Loon, Rep e Pieterse, 2006). O silenciamento de *PR1* em *Arabidopsis thaliana* levou a uma maior susceptibilidade a infecção pelo oomiceto *Phytophthora parasitica* enquanto que plantas de *N. tabacum* que tiveram o gene

superexpresso aumentaram maior resistência contra *Phytophthora parasitica* e *Peronospora tabacina* (Gamir *et al.*, 2016; Pečenková, Pleskot e Žárský, 2017).

Neste estudo, foi investigado por PCR em tempo real os níveis de expressão de diversos genes *PR*, além de genes relacionados à defesa como o gene que codifica para enzima lipoxigenase (*LOX*) e para enzima fenilalanina-amônio-liase (*PAL*). Os genes foram avaliados em diferentes tempos até o tempo máximo de 120 horas.

Foi possível observar que o gene *PR1* teve um grande aumento em sua expressão nos diversos tempos testados e essa expressão se manteve alta, indicando o desenvolvimento de SAR. Os dois genes que codificam para enzimas com ação antifúngica, *PR3* (quitinase) e *PR2* ( $\beta$ -(1,3) glucanase), apresentaram um perfil parecido de expressão, tendo seus maiores picos de expressão nos tempos de 6 e 24 horas.

Como foi citado anteriormente, o estabelecimento de SAR é mediado pelo acúmulo de ácido salicílico (SA) em tecidos distais do local da infecção, e esse acúmulo é responsável pelo desencadeamento da resposta. Em tabaco, a principal via de síntese de ácido salicílico é através da via de fenilpropanóides, que é mediada pela ação da enzima PAL (Singh, Lim e Kachroo, 2017). O aumento da expressão desse gene está associado com o rápido acúmulo de SA (Tripathi, Raikhy e Kumar, 2019).

Todos os genes relacionados à defesa vegetal estudados apresentaram um grande aumento em sua expressão no período de 6 horas, com exceção do gene que codifica a enzima peroxidase (*POX*), que teve um aumento significativo em 3 horas. Esses dados sugerem não só o estabelecimento de SAR como também indicam que o desenvolvimento rápido desta resposta quando comparada aos outros genes testados.

Para quase todos os genes testados, foi observado um período de alta expressão seguido por um período de expressão basal ou até de repressão. Esse comportamento pode estar associado ao ciclo circadiano. A proteína NPR1 tem um papel essencial na transcrição de genes relacionados ao ciclo circadiano e também está envolvida no desenvolvimento de respostas de defesa vegetal e no estabelecimento de SAR (Dong, 2004; Zhou *et al.*, 2015). Essa dinâmica entre a expressão de genes de defesa e a relação com o ciclo circadiano pode estar relacionada com o comportamento observado.

Os resultados encontrados nesse trabalho corroboram com o que foi descrito por Naveen e colaboradores (2012), onde os mecanismos de defesa vegetal de plantas de pimenta (*Capsicum annum*) são elicitados através da pulverização com cerebrosídeos extraídos de *Colletotrichum capsici*, um conhecido fitopatógeno de pimenteira. A molécula se mostrou capaz de induzir o acúmulo inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aumentar a produção das enzimas PAL, POX

e LOX e, além disso, foi capaz de proteger a planta contra a infecção por *C. capsici*. O estudo de Umemura e colaboradores (2000) também demonstrou que cerebrosídeos extraídos de *Magnaporthe grisea* eram as principais moléculas envolvidas na elicitação da produção de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (Umemura *et al.*, 2000; Naveen *et al.*, 2012).



## 7. CONCLUSÕES

- Glucosilceramidas (GlcCer) foram isoladas de micélio de *F.oxysporum* e purificadas através de fracionamento em colunas de sílica gel.
- A GlcCer de *F. oxysporum* foi capaz de proteger parcialmente as plantas de *N. tabacum* cv Xanthi contra a infecção pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV).
- A análise por PCR em tempo real mostrou a capacidade da GlcCer em aumentar a expressão de todos os genes relacionados a defesa vegetal testados (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5*, *PR9*, *LOX* e *PAL*). Foi possível também observar que a alta expressão de vários genes no período de 5 dias.
- O aumento da expressão de genes *PR* apontam a importancia da GlcCer de *F.oxysporum* como uma molécula elicitadora de SAR em *N. tabacum* cv Xanthi.
- A GlcCer foi capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente de radical superóxido.
- O tratamento com GlcCer foi capaz de induzir a produção de polifenóis de maneira dose dependente.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, I., Kissen, R. e Bones, A. M. (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17, 73-90.
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam, S. T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S. e Grover, A. (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* 212-213, 29-37
- Altenbach, D. e Robatzek, S. (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular plant-microbe interactions* 20, 1031-1039
- Auyong, A. S. M., Ford, R. e Taylor, P. W. J. (2015). The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 6, 259 -270.
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E. e Molina, A. (2018) Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* 93: 614-636
- Balajee, S. A., Borman, A. M., Brandt, M. E., Cano, J., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., Guarro, J., Haase, G., Kibbler, C., Meyers, W., O'Donnel, K., Petti, C. A., Rodriguez-Tudela, J. L., Sutton, D., Velegriaki, A. e Wickes, B. L. (2009) Sequence-Based Identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* Species in the Clinical Mycology Laboratory: Where Are We and Where Should We Go from Here? *Journal of Clinical Microbiology* 47, 877-884
- Banday, Z. Z. e Nandi, A. K. (2015) Interconnection between flowering time control and activation of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 6, art 174
- Barreto-Bergter, E., Pinto, M. R. e Rodrigues, M. L. (2004). Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 76,67 -84.
- Barreto-Bergter, E., Sasaki, G. L., Souza, L. M., (2011) Structural analysis of fungal cerebrosides. *Frontiers in Microbiology* 2, art 239.
- Barreto-Bergter, E. e Figueiredo, R. T. (2014) Fungal glycans and the innate immune recognition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Vol. 4 artigo 17, 1-17
- Bernardino, M. C. (2016). Glicosfingolípídios de *Fusarium oxysporum*: Caracterização Estrutural e Avaliação do seu Efeito na Produção de Flavonóides em *Passiflora alata* Curtis.. Dissertação (Mestrado em microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 98f
- Boava, L. P., Cristofani-Yaly, M., Stuart, R. M. e Machado, M. A. (2011). Expression of defense-related genes in response to mechanical wounding and *Phytophthora parasitica* infection in poncirus trifoliata and citrus sunki. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76, 119-125.
- Bowyer, P., Clarke, B. R., Lunness, P., Daniels, M.J. e Osbourn, A. E. (1995). Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267, 371-374.
- Calixto, R. O. R., Rollin-Pinheiro, R., Silva, M. I. D., Liporagi-Lpoes, L., Vieira, J. M., Sasaki G. L., e Barreto-Bergter, E. (2016) Structural analysis of glucosylceramides (GlcCer) from species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex. *Fungal Biology* 120: 166-172
- Camacho, E., Chrissian, C., Cordero, R. J. B., Liporagi-Lopes, L., Stark, R. E. e Casadevall, A. (2017) “N-Acetylglucosamine Affects *Cryptococcus neoformans* Cell-Wall Composition and Melanin Architecture.” *Microbiology* 163 ,1540–1556.

- Chalfoun, N. R., Grellet-Bournonville, C. F., Martínez-Zamora, M. G., Díaz-Prelase, A., Castagnaro, A. P. e Díaz-Ricci, J. C. (2013) . Purification and characterization of AsES Protein: a subtilisin secreted by *Acremonium strictum* is a novel plant defense elicitor. *Journal of Biological Chemistry* 288, 14098-14113.
- Chaliha, C., Rugen, M. D., Field, R. A. e Kalita, E. (2018) Glycans as Modulators of Plant Defense Against Filamentous Pathogens. *Frontiers in Plant Science* 9, artigo 928, 1-16.
- Chilaka, C. A., Boevre, M. D., Atanda, O. O. e Saeger, S. D. (2017). “The Status of *Fusarium* Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: A Review of Emerging Trends and Post-Harvest Mitigation Strategies towards Food Control.” *Toxins* 9, 19.
- Choi, H.W., Kim, Y.J., Lee, S.C., Hong, J.K. e Hwang, B.K. (2007). Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular per-oxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology*. 145, 890–904
- Choi, H. W. e Klessig, D. F. (2016) DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology* 16, 232 -242.
- Coll, N. S., Eppe, P. e Dangl, J. L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and differentiation* 18, 1247-1256.
- Cordelier, S., Ruffray, D.P., Fritigand, B. e Kauffmann, S. (2003). Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* Glycoprotein elicitor. *Plant Molecular Biology* 51, 109–118.
- D'Mello, J. P. F., Placinta, C. M. e Macdonald, A. M. C. (1999). *Fusarium* Mycotoxins: a Review of Global Implications for Animal Health, Welfare and Productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80, 183–205.
- Dangl, F. L., Dietrich, R. A. e Richber, M. H. (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe interactions. *The Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Dean, R., Van, J. A. K., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., e Foster, G. D. (2012). “The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology.” *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.
- Del Poeta, M., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L. e Luberto, C. (2014). Synthesis and Biological Properties of Fungal Glucosylceramide. *PLoS Pathogens* 10(1): e1003832.
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. e Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology* 4, 315-325.
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G. e Staver, C. P. (2018). “*Fusarium* Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management.” *Frontiers in Plant Science* 9, artigo 1468, 1-21.
- Doke, N. (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato-tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora-infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology* 23:345–357
- Dong, X. (2004). NPR1, all this considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 547-552.
- Diário Oficial da União (2018). Imprensa Nacional. Instrução Normativa nº43, de 22 de agosto de 2018. Disponível em: <[http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/37784948/do1-2018-08-22-instrucao-normativa-n-43-de-](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/37784948/do1-2018-08-22-instrucao-normativa-n-43-de-)>
- Durrant, W.E. e Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185-209.

- Edel-Hermann, V. e Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* 109: 512-530
- Fisher, C. M., Hawkins, N. J., Sanglard, D. e Gurr, S. J. (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360, 739-742.
- EMBRAPA (2019). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Recursos Genéticos e Biotecnologia. Banco de Dados - Fungos Relatados em Plantas no Brasil. Disponível em: <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/micbanco01a.asp>>
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry* 226, 497-509.
- Fujikawa, T., Kuga, Y., Yano, S., Yoshimi, A., Tachiki, T., Abe, K. e Nishimura, M. (2009) Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Molecular microbiology* 73, 553-570
- Futerman, A. H. e Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*, 5, 777–782.
- Gamir, J., Darwiche, R., Hof, P. V., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneider, R. e Mauch, F. (2017) The sterol-binding activity of pathogenesis-related protein 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant Journal* 89, 502-509.
- Gao, J. S, Hu, L., Xie, P., Meng, Y., Cai, Y. Y., Lin, Y. (2014) Isolation and molecular characterization of an ethylene response factor NtERF1-1 in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Journal of Biosciences* 5, 887 -897.
- Gow, N. A. R., Latge, J. P., Munro, C. A. (2017) The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology spectrum*, 5.
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* Volume 7, 133- 141
- Hakim, Ullah, A., Hussain, A., Shaban, M., Khan, A. H., Alariqi, M., Gul, S., Jun, Z., Lin, S., Li, J., Jin, S. e Munis, M. F. H. (2018) Osmotin: A plant defense tool against biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 123, 149-159.
- Heller, J. e Tudzynski, P. (2011) Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *The Annual Review of Phytopathology* 49, 369-390
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C. (2004) Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 38:765–778.
- Hopke, A., Brown, A. J. P., Hall, R. A. e Wheeler, R. T. (2018). Dynamic Fungal Cell Wall Architecture in Stress Adaptation and Immune Evasion. *Trends in Microbiology* 26, 284–295.
- Kaiser, B., Vogg, G., Furst, U. B. e Albert, M. (2015) Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. *Frontiers in Plant Science* 6, art 45.
- Kanfer, J.N. e Hakomori, S. 1983. Chemistry of glycosphingolipids. In: *Handbook of Lipids Research*, Donald J Hanahan (eds), vol3, New York and London, Plenum Press, p. 1-165
- Khoza, T. G., Dubery, I. A. e Piater, L. A. (2019). Identification of Candidate Ergosterol-Responsive Proteins Associated with the Plasma Membrane of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1302.
- Kim, M. J., Ciani, S. e Schachtman, D. P. (2010). A Peroxidase Contributes to ROS Production during *Arabidopsis* Root Response to Potassium Deficiency. *Molecular Plant* 3:420-427

- Koeck, M., Hardham, A. R. e Dodds, P. N. (2011). The Role of Effectors of Biotrophic and Hemibiotrophic Fungi in Infection. *Cellular Microbiology* 13, 1849–1857.
- Lamb, C. e Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Reviews in Plant Physiology* 48, 251–275
- Latgé, J. P. (2010) Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology* Vol. 12, 863-872
- Li, C., Yang, J., Li, W., Sun, J. e Peng, M. (2017) Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Plant Disease* 100: 2073-2078
- Li, X., Kapos, P. e Zhang, Y. (2015) NLRs in plants. *Current Opinion in Immunology* 2, 114–121.
- Liu, W., Liu, J., Ning, Y., Ding, B., Wang, X., Wang, X. e Wang, G.L. (2013). Recent progress in understanding PAMP - and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant* 6, 605-620.
- Lopez-Dias, C., Rahjoo, V., Sulyok, M., Ghionna, V., Martin-Vicente, A., Capilla, J., Di Pietro, A. e Lopez-Berges, M. S. (2018). Fusaric acid contributes to virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Plant Pathology* 19, 440-453.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M. e Kazan Kemal. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology* 67, 399–416
- Maag, D., Erb, M., Kollner, T. G. e Gershenzon, J. (2014) Defensive weapons and defense signals in plants: Some metabolites serve both roles. *Bioessays* 37, 167-174
- Marinetti, G.V. 1986. Detection and characterization of lipids. *Techniques of Lipidology*. 226p.
- Mattos, B. B., Montebianco, C., Romanel, E., Silva, T. F. S., Bernabé, R. B., Simas-Tosin, F., Souza, L. M., Sassaki, G. L., Vaslin, M. F. S. e Barreto-Bergter, E. (2018). A peptidogalactomannan isolated from *Cladosporium herbarum* induces defense related genes in BY-2 tobacco cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 126, 206-216.
- Michielse, C. B. e Martijn, R. (2009) Pathogen Profile Update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10, 311–324.
- Moss, M. O. e Smith, J. E. (1984). The applied mycology of *Fusarium*. The ultrastructure and physiology of sporulation in *Fusarium*. Cambridge University Press pp 129–140.
- Muthamilarasan, M., Prasad, M. (2013) Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of biosciences* 38, 433-449.
- Naranjos-Arcos, M. A., Bauer, P. (2016) Iron Nutrition, Oxidative Stress, and Pathogen Defense. *Nutritional deficiency* 64-98.
- Narasimhan, M. L., Le, H., Damsz, B., Singh, N.K., Ibeas, J.I., Matsumoto, T.K., Woloshuk, C.P. e Bressan, R.A. (2003) 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.
- Naveen, J. e Hariprasad, P. (2012) Cerebroside mediated elicitation of defense response in chilli (*Capsicum annum* L.) against *Colletotrichum capsici* infection. *Plant-Microorganism Interactions* 8, 65-73
- Netea, M. G, Brown, G. D., Kullberg, B. J. e Gow, N. A. (2008). An Integrated Model of the Recognition of *Candida albicans* by the Innate Immune System. *Nature Reviews Microbiology* 6, 67–78.
- Nucci, M., Anaissie, E. (2007) *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 695-704.

- O'Donnel K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous P. R., Geiser, D. M. e Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica* 43:583–595
- O'Donnel K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N. C., Colyer, P., Waalwijk, C., Lee, T. V. D., Moretti, A., Kang, S., Kim, H-S., Geiser, D. M, Juba, J. H., Baayen, R. P., Cromey, M. G., Bithell, S. Sutton, D. A., Skovgaard, K., Ploetz, R., Kistler, H. C., Elliot, M., Davis, M. e Sarver, B. A J. (2009) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within *the Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 46, 936-948.
- Ohara, T., Inoue, I., Namiki, F., Kunoh, H. e Tsuge, T. (2004) “REN1 Is Required for Development of Microconidia and Macroconidia, but Not of Chlamydoconidia, in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*.” *Genetics* 166, 113–124.
- Ordóñez, N., Seidl, F. M., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B. P. H. J., Ploetz, C. R., Kena, G. H. J. (2015) Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet. *PLoS Pathogens*. 11(11): e1005197
- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J. e Ryan, C. A. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13, 179-91.
- Pečenková, T., Pleskot, R. e Žárský, V. (2017). Subcellular Localization of Arabidopsis Pathogenesis-Related 1 (PR1) Protein. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 825 -838
- Peng, D.H., Qiu, D. W., Ruan, L. F., Zhou, C. F. e Sun, M. (2011) Protein elicitor PemG1 from *Magnaporthe grisea* induces systemic acquired resistance (SAR) in plants. *Molecular plant-microbe interactions* 24, 1239-1246.
- Piasecka, A., Jedrzejczak-rey, N. e Bednarek, P. (2015) Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *The New phytologist* 206, 948-964.
- Pinto, M. R., Barreto-Bergter, E. e Taborda, C. P. (2008) Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. *Brazilian journal of microbiology* 39, 195-208.
- Pinto, M.R.; Barreto-Bergter, E. and Taborda, C.P. (2008) Glycoconjugates and Polysaccharides of Fungal Cell Wall and Activation of Immune System. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 195–208.
- Ploetz, R. C. (2015) “Management of *Fusarium* Wilt of Banana: A Review with Special Reference to Tropical Race 4.” *Crop Protection* 73, 7–15.
- Ploetz, Randy C. (2015) *Fusarium* Wilt of Banana. *Phytopathology* 105, 1512–1521.
- Rodríguez-Gálvez, E. e Mendgen, K. (1995). The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189, 61-72.
- Rollin-Pinheiro, R., Singh, A., Barreto-Bergter, E., Del Poeta, M. (2017) Sphingolipids as Targets for Treatment of Fungal Infections. *Future Medicinal Chemistry* 8, 1469–1484.
- Rollin-Pinheiro, R. Liporagi-Lopes, L. C., Meirelles, J. V. D., Souza, L. M., Barreto-Bergter, E. (2014) Characterization of *Scedosporium apiospermum* glucosylceramides and their involvement in fungal development and macrophage functions. *PLoS One* 30;9(5):e98149
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentín, E. e Sentandreu R. (2005). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *Yeast Research* 6:14-29
- Schwessinger, B. e Zipfel, C. (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current opinion in plant biology* 11, 389-395.

- Shah, J. e Zeier, J. (2013). Long distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 4. art. 30
- Sherrington, Sarah L., *et al.*. "Adaptation of *Candida albicans* to Environmental PH Induces Cell Wall Remodelling and Enhances Innate Immune Recognition." *PLOS Pathogens* 13.
- Shores, M., Harman, G. E. e Mastouri, F. (2010) Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents Annual Review of Phytopathology. 48, 21-43.
- Silipo, A., Erbs, G., Shnya, T., Dow, J. M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shinuya, N., Newman, M. A. e Molinaro, A. (2010) Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* 20, 406-419.
- Silva, M.S., Arraes, F.B.M., Campos, M.A., Grossi-de-Sa, M., Fernandez, D., Cândido, E.S., Cardoso, M. H., Franco, O. L., Grossi-de-Sa, M. F. (2018). Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Science* 270, 72-84.
- Taiz, L. e Zeiger E. (2017). Secondary Metabolites and Plant Defense, *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, pp. 283-308.
- Taylor, A., Vágány, V., Jackson, A. C., Harrison, R. J., Rainoni, A. e Clarkson, J. P. (2015) Identification of Pathogenicity-Related Genes In *Fusarium Oxysporum* f. Sp.cepae. *Molecular Plant Pathology* 17, 1032–1047.
- Tripathi, D., Raikhy, G. e Kumar (2019) Chemical elicitors of systemic acquired resistance - Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology* 17:48-59
- Torres, M. A., Jones, J. D. G. e Dangl, J. L. (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* 141 373-378
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11:1187–1194
- Umemura, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., Iwata, M., Shimura, M. e Koga, J. (2000). Cerebroside Elicitors Found in Diverse Phytopathogens Activate Defense Responses in Rice Plants. *Plant Cell Physiology* 41, 676-683.
- Vanetten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. e Farmer, E. E. (1994) Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins" *Plant Cell* 6, 1191-1192.
- Van Diepeningen, A. D., Brankovcs, B. e Iltes, J. (2015) Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Current Fungal Infection Reports* 9: 135-143
- Van Loon L. C., Rep M. e Pieterse C. M. J. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants Annual Review in Phytopathology 44: 135-162.
- Wang, N., Liu, M., Guo, L., Yang, X. e Qiu, D. (2016) A Novel Protein Elicitor (PeBA1) from *Bacillus amyloliquefaciens* NC6 Induces Systemic Resistance in Tobacco. *International Journal of Biological Sciences* 12: 757-767
- Warnecke, D. e Heinz, D. (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 919-941.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 79, 1101-1115.
- Xisto, M. I. D. S., Henao, J. E. M., Dias, L. D. S., Santos, G. M. P., Calixto, R. D. O. R., Bernardino, M. C., Taborda, C. P. e Barreto-Bergter, E. (2019). Glucosylceramides From *Lomentospora prolificans* Induce a Differential Production of Cytokines and Increases the Microbicidal Activity of Macrophages. *Frontiers in*

Microbiology 10, art 554.

Yang, Y. e Klessing, D. (1996) Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Plant biology* 93, 14972–14977.

Yoshimi, A., Miyazawa, K. e Abe, K. (2017) Function and Biosynthesis of Cell Wall  $\alpha$ -1,3-Glucan in Fungi. *Journal of Fungi* 3, 63.

Zhou, M., Wang, W., Karapetyan, S., Mwimba, M., Marqués, J., Buchler, N. E. e Dong, X. (2015) Redox rhythm reinforces the circadian clock to gate immune response. *Nature* 523 (7561): 472-476