

PROPOSTA PARA BOLSA PIBIC – CTBE/CNPEM

Identificação e uso de voláteis bacterianos para inibir o crescimento de patógenos da cana-de-açúcar

Orientadora/Pesquisadora responsável: Dr^a Juliana Velasco de Castro Oliveira

Co-orientador: Bruno Henrique Silva Dias (Mestrando)

1) INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

Do ponto de vista da biotecnologia aplicada à agricultura, existem diversas estratégias que podem ser utilizadas para maximizar o rendimento de culturas agrícolas e, atualmente, é desejado que a produção seja aumentada adotando práticas sustentáveis. Neste contexto, nosso grupo vem estudando o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal como uma alternativa ao uso de fertilizantes e pesticidas químicos, dado a diversos impactos ambientais que eles ocasionam, como contaminação de águas [1], poluição do ar [2] e diminuição da saúde e fertilidade solo [3, 4].

Diversas bactérias podem aumentar a produtividade agrícola através de uma gama de mecanismos de interação como, por exemplo, produção de fitohormônios e/ou solubilização de fosfato [1, 3, 4]. Além disso, como já descrito na literatura e também validado pelo nosso grupo, bactérias são capazes de produzir compostos orgânicos voláteis (COVs), que também promovem o crescimento vegetal e podem atuar como antagonista de diversos patógenos [5-9].

Os COVs de microrganismos geralmente compõem uma mistura complexa de pequenas moléculas de natureza lipofílica (<300 dalton), derivadas de uma ampla gama de caminhos biossintéticos [10]. Entre as mais de 10.000 espécies microbianas descritas até agora, apenas cerca de 600 são conhecidas como produtoras de COVs [11, 12]. Este pequeno número é uma consequência da quantidade de microrganismos investigados até o momento. A composição qualitativa e quantitativa dos perfis de COVs é variável, dependendo da fonte de carbono, condições de crescimento (disponibilidade de oxigênio, temperatura, pH), entre outros [6, 13]. Recentemente foi desenvolvido um banco de dados destas moléculas denominado mVCO que inclui mais de 1300 voláteis liberados por bactérias ou fungos [11, 12].

O uso de biocontrole baseado em COVs microbianos em cana-de-açúcar é promissor pois, diferente de outras moléculas que são secretadas, como por exemplo, os hormônios de plantas, os COVs podem atuar longe do ponto de produção, tornando-os moléculas ideais para mediar as interações de organismos a curta e longa distância [10]. Entretanto, até hoje, há poucos relatos na literatura que mostram o impacto de COVs

bacterianos na saúde de importantes culturas agrícolas, e não é de nosso conhecimento estudos envolvendo patógenos de cana-de-açúcar.

Dentre algumas doenças que nosso grupo está estudando, este projeto irá focar na estria vermelha, causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* [14]. Até pouco tempo atrás, esta não era considerada uma doença relevante, mas com a expansão dos canaviais para locais mais quentes e com épocas de alta umidade relativa, associada a uma melhoria da fertilidade do solo, ela se tornou mais comum, pois algumas variedades atualmente em uso não possuem resistência satisfatória. A estria vermelha pode causar sérios prejuízos em cana-de-açúcar, mas também em outras culturas de monocotiledôneas, como arroz e milho [15]. Como principais sintomas, pode-se citar a presença de estrias longas nas folhas, que com a evolução da doença ficam com uma cor vermelho-marrom. Com o aumento da severidade, as estrias atingem o meristema apical da planta, que umedece e apodrece, ocasionando um cheiro ruim característico. Por conta de sua relevância como patógeno de importantes culturas agrícolas, 3 genomas de *A. avenae* isoladas de diferentes culturas (arroz, cana e milho) já foram sequenciados [15, 16, JGI Project ID: 400085].

De forma geral, o projeto envolve estudos de microbiologia aplicada, com a identificação de cepas bacterianas capazes de inibir o crescimento deste patógeno de cana-de-açúcar. O(A) aluno(a) terá a oportunidade de aprender e ter independência em técnicas de microbiologia (preparo de meio de cultivo, crescimento de bactérias, etc), biologia molecular (DNA, PCR, purificação de ácidos nucleicos, sequenciamento, entre outros), e parcialmente em metabolômica. Como resultado, além do conhecimento científico, espera-se a longo prazo gerar bioprodutos (biocontroles) como medida sustentável para (i) reduzir a incidência de doenças em cana-de-açúcar, (ii) para substituir, pelo menos em parte, os produtos químicos usualmente utilizados, (iii) aumentar produtividade e reduzir os custos de produção e (iv) aumentar a longevidade de áreas plantadas de cana-de-açúcar no Brasil e demais países produtores.

2) OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto é a identificação e uso de compostos voláteis bacterianos para inibir o crescimento de *A. avenae* subsp. *avenae*. Como objetivos específicos podemos citar:

- (i) Identificar em nossa coleção de bactérias cepas capazes de inibir o crescimento de *A. avenae* (*in vitro*);
- (ii) Identificar os voláteis produzidos por estas bactérias através de HS/GC-MS;
- (iii) Analisar os resultados do objetivo ii e selecionar COVs sintéticos para validação funcional;
- (iv) Caso haja tempo, verificar se a cepa inibe o crescimento de *A. avenae* em cana-de-açúcar (*in vivo*).

3) METODOLOGIA RESUMIDA

3.1 Avaliação de bactérias capazes de inibir o crescimento de *A. avenae*

Serão utilizadas ao menos 20 cepas do banco de microrganismos do CTBE, que foram selecionadas por serem de gêneros distintos (uma vez que a classe de COVs produzidos varia de acordo com a espécie do microrganismo), de modo de vida diferente (vida livre ou endofíticas) e por terem sido isoladas de solo de canaviais proveniente de 5 estados do Brasil. O objetivo é ter cepas diversificadas, para conseguir identificar ao menos uma que iniba o crescimento *A. avenae*.

Primeiramente, o efeito dos voláteis bacterianos será verificado em um sistema *in vitro* que vem sendo utilizado rotineiramente no laboratório. As bactérias da nossa coleção serão crescidas até uma densidade ótica de 0.9, aplicando cerca de 20 µL da cultura (aproximadamente 10^8 bactérias) no centro de um dos lados de uma placa de petri bipartida contendo meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, pH 7,0). A outra metade terá o meio YPGA (extrato de levedura 7 g/L, peptona 7 g/L, glicose 7 g/L, agar 15 g/L, pH 7,0) e será inoculado o patógeno *A. avenae*, na mesma concentração citada acima. Desta forma, nós garantimos que os microrganismos crescem na mesma atmosfera, mas sem contato direto entre eles, ou do meio de cultura que eles crescem. As placas serão vedadas e incubadas na estufa a 26-28°C, e o crescimento de *A. avenae* será avaliado diariamente. Placas bipartidas sem inóculos e inoculadas com *E. coli* DH5α (cepa descrita como incapaz de inibir patógenos) serão utilizadas como controles negativos. Ao final, a quantidade de bactérias *A. avenae* serão quantificadas por contagem, seguindo o protocolo de Raza e colaboradores [17].

Como variáveis para realizar a triagem das melhores cepas, também propomos utilizar o meio de cultura Angle [18] que mimetiza as condições de nutrientes presentes no solo, bem como testar diferentes concentrações bacterianas (por exemplo, 10^7 e 10^9 UFC/mL). Para as cepas que inibirem o crescimento do patógenos, a inibição será testada colocando tanto a bactéria quanto o patógeno em solo, em um sistema de co-cultivo como sugerido por Raza e colaboradores [17]. As melhores cepas serão selecionadas para identificação de seus voláteis através de HS-GC/MS (objetivo *ii*). A sequência completa do gene rDNA 16S e análises filogenéticas serão utilizadas para identificar corretamente os gêneros e/ou espécies de cada cepa de interesse.

3.2 Identificação dos COVs através de HS-GC/MS

Para atingir um dos principais objetivos deste projeto, é preciso identificar os COVs produzidos através da plataforma de metabolômica HS-GC/MS, utilizando as cepas bacterianas promissoras selecionadas no objetivo *i*. Estas cepas serão cultivadas no melhor meio de acordo com os resultados obtidos anteriormente, em frascos de 20 mL (Supelco, Bellefonte) a 26-28°C, por até 5 dias, dependendo da quantidade de voláteis produzidos.

Para identificação dos voláteis, nos basearemos no descrito por Augusto e colaboradores [19]. Os voláteis serão extraídos dos *headspaces* dos *vials* utilizando fibras SPME (stableflex 2 cm, Sigma), seguindo as instruções do fabricante, por tempo a ser determinado de acordo com testes que serão previamente realizados [17, 20, 21]. Em seguida, a mesma será inserida no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (GCTOF-MS, Leco), e o protocolo da separação das moléculas será o descrito previamente em outros trabalhos [22-26], com algumas adaptações. Os parâmetros de aquisição do cromatograma serão os descritos em [27], e eles serão exportados da Leco ChromaTOF (versão 4.51) para o software R 2.12.2. A detecção de picos, os alinhamentos de tempo de retenção e a busca nas bibliotecas serão realizados usando o pacote *TargetSearch* do Bioconductor [28]. Os metabólitos serão quantificados pela intensidade de pico de uma massa selecionada e serão normalizados pela contagem total de íons (TIC). O perfil de COVs obtido em nossa análise será comparado com dados públicos e o mVOCs [11].

3.3 Validação funcional com o uso de COVs sintéticos

As bactérias são capazes de liberar um conjunto diferente de voláteis; alguns deles são inócuos, alguns podem ser benéficos, e outros podem inibir o crescimento de patógenos. Depois de identificar os perfis de COVs produzidos pelas cepas, queremos verificar qual(quais) destes voláteis possui(em) a capacidade de inibir o crescimento de *A. avenae*, testando-os individualmente ou combinados. Após a conclusão dos objetivos *i* e *ii*, teremos os perfis de COVs obtidos de nossas bactérias selecionadas, bem como quais são as que promovem a maior inibição. Ao relacionar esses dados, especialmente a abundância de COVs e os dados na literatura, escolheremos dez metabólitos sintéticos que serão adquiridos para realizar os testes de inibição *in vitro*. Os voláteis escolhidos serão testados individualmente bem como em misturas.

O sistema de co-cultivo será montado de forma similar ao descrito no item 3.1, mas ao invés de bactéria da nossa coleção na metade da placa de petri, será um dos compostos testados (ou uma mistura) dissolvido em metanol (ou outro solvente recomendado, dependendo do composto) nas concentrações finais de 5, 50 e 500 ng. As placas serão incubadas durante alguns dias semanas (de acordo com a inspeção visual) a 26-28°C. Serão feitas cinco repetições para cada tratamento. As placas que contêm apenas *A. avenae* e apenas metanol/solvente no outro compartimento serão utilizadas como controles negativos. Este passo é muito importante porque será estabelecido quais são os COVs que inibem o crescimento e se o fazem individualmente ou de forma combinatória. Estes dados podem levar à produção de um bioinoculante ou uma formulação química utilizando os compostos mais promissores.

3.4 Avaliar o desempenho das melhores cepas de bactérias *in vivo*

Se houver tempo, nos propomos a testar pela menos uma bactéria capaz de inibir o patógeno *in vitro*, em cana de açúcar infectada (*in vivo*). Para isso, será escolhida uma variedade de cana-de-açúcar susceptível a doença estria vermelha, da qual serão retirados toletes que serão infectados pela gema (Figura 1A). Estes

toletes serão plantados em um vaso com vermiculita que será irrigado com solução nutritiva mensalmente (mg de nutriente/ kg de vermiculita): zinco, 3; cobre, 0.5; magnésio, 4; boro, 1; molibdênio, 0.3; ferro, 5; cálcio, 100; magnésio, 10; fosforo, 120; potássio, 150; nitrogênio, 140), mantendo-os em casa de vegetação (temperatura ~ 28-30°C), com irrigação diária para condição ótima de crescimento da planta.

O sistema de co-cultivo *in vivo* foi inspirado no modelo descrito por Park e colaboradores. [21], mas modificado para um vaso maior que comporte o crescimento da cana-de-açúcar, sendo que a bactéria com potencial de inibir o crescimento ficará em um compartimento independente (sistema desenvolvido junto com o pessoal de protótipos agrícolas do CTBE, Figura 1B). As plantas não inoculadas serão usadas como controles negativos. Serão feitas cinco repetições de cada condição. A avaliação será verificar o aparecimento e a severidade dos sintomas por até 4 meses após a instalação do sistema. Por conta disso, prevê-se que as placas contendo os inóculos bacterianos serão trocadas semanalmente.

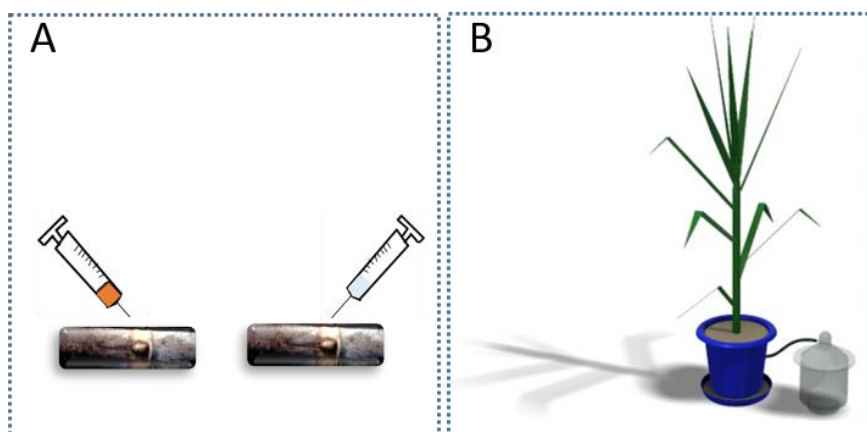


Fig. 1: Sistema para analisar o efeito dos COVs no desenvolvimento da estria vermelha em cana-de-açúcar. A) inóculos dos toletes com solução de bactérias *A. avenae* (em laranja) e controle (só água). A bactéria que inibe o crescimento do patógeno será mantida em um recipiente vedado (aqui representado com um dessecador) e, através de um tubo de mangueira de silicone (11,50 x 8 x 1,75 mm), os COVs serão transferidos diretamente para o solo. O número, tamanho de placa de petri e concentração do inóculo bacteriano irá depender do desenho experimental.

4) REFERÊNCIAS

1. Francis, I., M. Holsters, and D. Vereecke, *The Gram-positive side of plant-microbe interactions*. Environ Microbiol, 2010. **12**(1): p. 1-12.
2. Bhattacharyya, P.N. and D.K. Jha, *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture*. World J Microbiol Biotechnol, 2012. **28**(4): p. 1327-50.
3. Santoyo, G., et al., *Plant growth-promoting bacterial endophytes*. Microbiol Res, 2016. **183**: p. 92-9.
4. Souza, R., A. Ambrosini, and L.M. Passaglia, *Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils*. Genet Mol Biol, 2015. **38**(4): p. 401-19.
5. Ryu, C.M., et al., *Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4927-32.
6. Schulz, S. and J.S. Dickschat, *Bacterial volatiles: the smell of small organisms*. Nat Prod Rep, 2007. **24**(4): p. 814-42.
7. Fiddaman, P.J. and S. Rossall, *Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from Bacillus subtilis*. J Appl Bacteriol, 1994. **76**(4): p. 395-405.
8. Kai, M., et al., *Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen Rhizoctonia solani*. Arch Microbiol, 2007. **187**: p. 351-360.

9. Zou, C., et al., *Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis*. *Soil Biol Biochem*, 2007. **39**: p. 2371-2379.
10. Kanchiswamy, C.N., M. Malnoy, and M.E. Maffei, *Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity*. *Front Plant Sci*, 2015. **6**: p. 151.
11. Lemfack, M.C., et al., *mVOC: a database of microbial volatiles*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**: p. D744-8.
12. Piechulla, B., M.C. Lemfack, and M. Kai, *Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi*. *Plant Cell Environ*, 2017. **40**: p. 2042-2067.
13. Fischer, G., et al., *Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility*. *Chemosphere*, 1999. **39**(5): p. 795-810.
14. Santa Brigida, A.B., et al., *Sugarcane transcriptome analysis in response to infection caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae**. *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0166473.
15. Xie, G.L., et al., *Genome sequence of the rice-pathogenic bacterium *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* RS-1*. *J Bacteriol*, 2011. **193**(18): p. 5013-4.
16. Fontana, P.D., et al., *Genome sequence of *Acidovorax avenae* Strain T10_61 associated with sugarcane red stripe in Argentina*. *Genome Announc*, 2016. **4**(1).
17. Raza, W., et al., *Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum**. *Microbiol Res*, 2016. **192**: p. 103-13.
18. Angle, J.S., S.P. McGrath, and R.L. Chaney, *New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution*. *Appl environ microbiol*, 1991. **57**(12): p. 3674-6.
19. Augusto, F. and A.L.P. Valente, *Applications of solid-phase microextraction to chemicals analysis of live biological samples*. *Anal Chem*, 2002. **21**: p. 428-438.
20. Peñuelas, J., et al., *Biogenic volatile emissions from the soil*. *Plant Cell Environ*, 2014. **37**: p. 1866-1891.
21. Park, Y.S., et al., *Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **461**(2): p. 361-365.
22. Snow, N.H. and G.C. Slack, *Head-space analysis in modern gas chromatography*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002. **21**(9-10): p. 608-617.
23. da Silva, G.C., et al., *Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis*. *Food Chem*, 2015. **167**: p. 71-7.
24. Junior, S.B., et al., *Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction*. *J Chromatogr A*, 2011. **1218**(21): p. 3345-50.
25. Rees, C.A., et al., *Comprehensive volatile metabolic fingerprinting of bacterial and fungal pathogen groups*. *J Breath Res*, 2018. **12**(2): p. 026001.
26. Hough, R., D. Archer, and C. Probert, *A comparison of sample preparation methods for extracting volatile organic compounds (VOCs) from equine faeces using HS-SPME*. *Metabolomics*, 2018. **14**(2): p. 19.
27. Weckwerth, W., K. Wenzel, and O. Fiehn, *Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks*. *Proteomics*, 2004. **4**(1): p. 78-83.
28. Cuadros-Inostroza, A., et al., *TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data*. *BMC Bioinformatics*, 2009. **10**: p. 428.