

PROPOSTA PARA BOLSA PIBIC – CTBE/CNPem

O uso da biotecnologia no biocontrole de fitopatógenos da cana-de-açúcar

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

Co-orientadora: Carla de Sant'Anna Freitas

1) INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

Estima-se que até 2050 a população mundial atingirá aproximadamente 10 bilhões de pessoas, e com isso há a necessidade do aumento da produção de alimento e energia [1]. Nesse sentido, o etanol é um dos biocombustíveis mais promissores, e o Brasil tem um papel importante nesse cenário, podendo contribuir de forma decisiva com a demanda futura necessária. Entretanto, a cana-de-açúcar é constantemente desafiada por estresses abióticos e bióticos, que podem comprometer a produtividade. Mais de 100 fungos, 10 bactérias e 10 vírus causam danos à cana-de-açúcar no mundo todo [2], e cerca de 60 destes microrganismos são encontrados no Brasil (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>). Estima-se que doenças causadas por microrganismos e nematóides respondam por 13% das perdas nesta cultura (www.udop.com.br). Embora alguns produtos químicos (como os fungicidas) possam ser aplicados para tratar a cultura, o controle das doenças é alcançado principalmente pelo uso de variedades resistentes e boas práticas de campo. No entanto, a resistência de novas variedades pode não ser permanente, devido a mudanças nas práticas agrícolas (por exemplo, mecanização), mudanças climáticas ou devido ao surgimento de variantes do patógeno que podem infectar variedades anteriormente consideradas resistentes.

Dentro deste cenário, um dos aspectos cruciais é reduzir o uso de pesticidas na cultura da cana-de-açúcar que, além do alto custo, têm um impacto negativo na saúde humana e no meio ambiente, causando, por exemplo, contaminação de águas [3], poluição do ar [4] e diminuição da saúde e fertilidade solo [5,6]. Diante disso, são necessários investimentos na área de biotecnologia agrícola, visando uma maior produtividade da cana-de-açúcar por hectare, e é desejável que isso seja feito de forma sustentável. Neste contexto, nosso grupo vem estudando o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal como uma alternativa ao uso de fertilizantes e pesticidas químicos.

Diversos microrganismos podem aumentar a produtividade agrícola através de diversos mecanismos de interação como, por exemplo, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios, entre outros [3, 4, 6]. Além disso, nosso grupo vem investigado microrganismos capazes de produzir compostos orgânicos voláteis (COVs) que promovem o crescimento vegetal e também podem atuar como antagonista de diversos patógenos [7-10]. Os COVs são pequenas moléculas de natureza lipofílica (<300 dalton), derivadas de uma ampla gama de caminhos biossintéticos [12-15]. Em 2014 foi desenvolvido um

banco de dados destas moléculas denominado mVOC (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc/>) que inclui mais de 2000 voláteis liberados por cerca de 1000 bactérias e fungos [16].

O uso de biocontrole baseado em COVs microbianos em cana-de-açúcar é promissor pois, diferentemente de outras moléculas que são secretadas, como por exemplo, os hormônios, os COVs podem atuar longe do ponto de produção, tornando-os moléculas ideais para mediar as interações de organismos a curta e longa distância [11, 12], não sendo necessário colonizar a planta. 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, além do que já está sendo realizado pelo nosso grupo.

Dentre as doenças da cana-de-açúcar estudadas pelo nosso grupo, este projeto irá focar na podridão vermelha, causada pelo fungo da classe Sordariomycetes denominado *Colletotrichum falcatum* [17-18]. A podridão pode se manifestar sob diferentes formas, de acordo com os órgãos afetados e estágio vegetativo. Durante a germinação do tolete, provoca o apodrecimento do mesmo, sendo que os tecidos internos apresentam coloração vermelha, marrom e cinza de tonalidades variáveis, causando a morte de gemas e redução na germinação. Nos colmos, o patógeno causa internamente manchas vermelhas separadas por faixas mais claras. Na nervura central das folhas aparecem lesões vermelhas que mais tarde ficam com centro mais claro. O tamanho das lesões é variável, mas em folhas velhas pode atingir toda a extensão da nervura. A parte inferior (abaxial) das folhas fica com a superfície recoberta de pontuações negras, que são as frutificações do fungo. Em geral, os sintomas são mais severos em condições de umidade excessiva, com significativa perda do açúcar do caldo [18].

De forma geral, o projeto envolve estudos de microbiologia aplicada, com a identificação de microrganismos capazes de inibir o crescimento do fungo *C. falcatum*. O(A) aluno(a) terá a oportunidade de aprender e ter independência em técnicas de microbiologia (preparo de meio de cultivo, crescimento de bactérias, fungos, leveduras, etc), biologia molecular (DNA, PCR, purificação de ácidos nucléicos, sequenciamento, entre outros), e parcialmente em metabolômica. Como resultado a longo prazo do projeto, além do conhecimento científico, espera-se gerar bioprodutos como medida sustentável para reduzir a incidência de doenças em cana-de-açúcar, e substituir, pelo menos em parte, os produtos químicos usualmente utilizados, que possuem uma baixa eficiência.

2) OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto é obter ao menos um microrganismo que iniba o crescimento de *C. falcatum* por COVs, e identificar os possíveis metabólitos envolvidos. Como objetivos específicos podemos citar:

- (i) Identificar em nossa coleção de microrganismos cepas capazes de inibir o crescimento de *C. falcatum* (*in vitro*);
- (ii) Identificar os voláteis produzidos por estes microrganismos através de HS/GC-MS;
- (iii) Analisar os resultados do objetivo *ii* e selecionar COVs sintéticos para validação funcional.

3) METODOLOGIA RESUMIDA

3.1 Avaliação de bactérias capazes de inibir o crescimento de *C. falcatum*

Serão utilizados ao menos 50 microrganismos do banco do CTBE (aqui denominados “cepas testes”, entre eles fungos, leveduras e bactérias). Estes microrganismos foram selecionados 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 diferentes procedências. O objetivo é ter cepas diversificadas, para conseguir identificar ao menos uma que iniba o crescimento *C. falcatum*.

Primeiramente, o efeito dos voláteis microbianos contra o fitopatógeno será verificado em um sistema *in vitro* que vem sendo utilizado rotineiramente no laboratório. As cepas testes e o fungo patogênico crescerão em placas bipartidas, compartilhando da mesma atmosfera (por onde os COVs vão permear), mas sem contato direto entre eles, ou do meio de cultura em que eles crescem. Uma metade da placa bipartida terá o meio de crescimento do *C. falcatum* (40 g de aveia, 20 g de sacarose, 20 g de ágar), e no outro o meio mais apropriado para cada cepa teste, que irá variar com o tipo de microrganismo (por exemplo, LB para bactéria; PDA para fungo; e YPG para levedura). Após inóculo do patógeno e da cepa teste nos seus respectivos meios, as placas serão vedadas e incubadas na estufa a 26-28°C, e o crescimento de *C. falcatum* será avaliado diariamente de acordo com o tamanho de seu diâmetro. Placas bipartidas sem inóculos e inoculadas com *E. coli* DH5α (cepa descrita como incapaz de inibir patógenos) serão utilizadas como controles negativos.

Primeiramente o *screening* será feito em unicatas, dado o número de cepas testes, e os que apresentarem possível resultado inibitório serão refeitos em triplicatas. Como variáveis para realizar a triagem das melhores cepas, também propomos utilizar o meio de cultura Angle [19] que mimetiza as condições de nutrientes presentes no solo, bem como testar diferentes concentrações bacterianas (por exemplo, 10^7 e 10^9 UFC/mL). As melhores cepas serão selecionadas para identificação de seus voláteis através de HS-GC/MS (objetivo *ii*). A sequência completa do gene rDNA 16S (bactéria) ou ITS (fungo) 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 testes 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 método descrito por Augusto e colaboradores [20]. 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 [21, 22]. 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 [23-27], com algumas adaptações. Os parâmetros de aquisição do cromatograma serão os descritos em [28], 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 [29]. 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 [16].

3.3 Validação funcional com o uso de COVs sintéticos

Depois de identificar os perfis de COVs produzidos pelas melhores cepas, queremos verificar qual(quais) destes voláteis possui(em) a capacidade de inibir o crescimento de *C. falcatum*, testando-os individualmente ou combinados. Após a conclusão dos objetivos *i* e *ii*, teremos as cepas que promovem inibição e os perfis de COVs obtidos de nossos microrganismos selecionados. 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*.

O sistema de co-cultivo será montado de forma similar ao descrito no item 3.1, mas ao invés da cepa teste em uma 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 o fungo fitopatogênico e 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.

4) REFERÊNCIAS

1. Tilman, D., C. Balzer, J. Hill, and B.L. Befort, 2011. *Global food demand and the sustainable intensification of agriculture*. PNAS, **13**: p.20260-20264.
2. Esh, A.M.H. Etiology, epidemiology and management of fungal diseases of sugarcane. In: Arya A, Perelló AE, editors. *Management of Fungal Plant Pathogens*. 2010. UK: CABI Head Office. pp. 217-230.
3. Francis, I., M. Holsters, and D. Vereecke, 2010. *The Gram-positive side of plant-microbe interactions*. Environ Microbiol, **12**(1): p. 1-12.
4. Bhattacharyya, P.N. and D.K. Jha, 2012. *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture*. World J Microbiol Biotechnol, **28**(4): p. 1327-50.
5. Santoyo, G., et al., 2016. *Plant growth-promoting bacterial endophytes*. Microbiol Res, **183**: p. 92-9.
6. Souza, R., A. Ambrosini, and L.M. Passaglia, 2015. *Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils*. Genet Mol Biol, **38**(4): p. 401-19.
7. Ryu, C.M., et al., 2003. *Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **100**(8): p. 4927-32.
8. Schulz, S. and J.S. Dickschat, 2007. *Bacterial volatiles: the smell of small organisms*. Nat Prod Rep, **24**(4): p. 814-42.
9. Fiddaman, P.J. and S. Rossall, 1994. *Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from Bacillus subtilis*. J Appl Bacteriol, **76**(4): p. 395-405.
10. Kai, M., et al., 2007. *Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen Rhizoctonia solani*. Arch Microbiol, **187**: p. 351-360.
11. Zou, C., et al., 2007. *Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis*. Soil Biol Biochem, **39**: p. 2371-2379.
12. Kanchiswamy, C.N., M. Malnoy, and M.E. Maffei, 2015. *Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity*. Front Plant Sci, **6**: p. 151.
13. Lemfack, M.C., et al., 2014. *mVOC: a database of microbial volatiles*. Nucleic Acids Res, **42**: p. D744-8.
14. Piechulla, B., M.C. Lemfack, and M. Kai, 2017. *Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi*. Plant Cell Environ, **40**: p. 2042-2067.
15. Fischer, G., et al., 1999. *Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility*. Chemosphere, **39**(5): p. 795-810.
16. Lemfack M.C., B. O. Gohlke BO, S.M.T. Toguem, S. Preissner, B. Piechulla, R. Preissner, 2018. *mVOC 2.0: a database of microbial volatiles*. Nucleic Acids Res, **46**: p. D1261-D1265.
17. Sanguino, A. As principais doenças da cana-de-açúcar. Curso tópico da cultura da Cana IAC. 23 pags. Disponível em http://www.infobibos.com/cursocana/alunos/aulas/aula9/aula_9.pdf.
18. Viswanathan, R., et al., 2009. *Interaction between sugarcane and Colletotrichum falcatum causing red rot: Understanding disease resistance at transcription level*. Sugar Tech, **11**: p44-50.
19. Angle, J.S., S.P. McGrath, and R.L. Chaney, 1991. *New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution*. Appl environ microbiol, **57**(12): p. 3674-6.
20. Augusto, F. and A.L.P. Valente, 2002. *Applications of solid-phase microextraction to chemicals analysis of live biological samples*. Anal Chem. **21**: p. 428-438.
21. Peñuelas, J., et al., 2014. *Biogenic volatile emissions from the soil*. Plant Cell Environ, **37**: p. 1866-1891.
22. Park, Y.S., et al., 2015. *Promotion of plant growth by Pseudomonas fluorescens strain SS101 via novel volatile organic compounds*. Biochem Biophys Res Commun, **461**(2): p. 361-365.
23. Snow, N.H. and G.C. Slack, 2002. *Head-space analysis in modern gas chromatography*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, **21**(9-10): p. 608-617.
24. da Silva, G.C., et al., 2015. *Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis*. Food Chem, **167**: p. 71-7.

25. Junior, S.B., et al., 2011. *Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction*. J Chromatogr A, **1218**(21): p. 3345-50.
26. Rees, C.A., et al., 2018. *Comprehensive volatile metabolic fingerprinting of bacterial and fungal pathogen groups*. J Breath Res, **12**(2): p. 026001.
27. Hough, R., D. Archer, and C. Probert, 2018. *A comparison of sample preparation methods for extracting volatile organic compounds (VOCs) from equine faeces using HS-SPME*. Metabolomics, **14**(2): p. 19.
28. Weckwerth, W., K. Wenzel, and O. Fiehn, 2004. *Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks*. Proteomics, **4**(1): p. 78-83.
29. Cuadros-Inostroza, A., et al., 2009. *TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data*. BMC Bioinformatics, **10**: p. 428.