

Decifrando mecanismos moleculares pelos quais compostos orgânicos voláteis inibem o crescimento de *Xanthomonas albilineans*, causadora da escaaldadura das folhas em cana-de-açúcar

Proposta para Bolsa PIBIC

Orientador: Juliana Velasco de Castro Oliveira (LNBR/CNPq)

1. Introdução e estado da arte

A biotecnologia, entre várias definições, pode ser considerada como uma área de estudo que visa o desenvolvimento de tecnologias que utilize organismos vivos ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para uma dada utilização de interesse. A biotecnologia aplicada à agricultura tem trazido diversos benefícios para o setor e, por consequência, para a sociedade e economia, já que o Brasil é um país que se destaca no cenário agrícola. Atualmente, o Brasil está entre os maiores produtores mundiais de diversas culturas, como a soja, café, milho e cana-de-açúcar. Em relação a cana-de-açúcar, o nosso país é o maior produtor mundial; na safra 2019/2020 foram produzidas mais de 642 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 3,6% em relação a 2018/2019 (<http://www.conab.gov.br>). Sozinho, o setor sucroenergético representa cerca de 2% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (<https://www.novacana.com>). Atualmente, sua importância se estende para além da produção de biocombustível e açúcar, sendo uma biomassa importante para produção de diversos produtos renováveis (bioprodutos), biomateriais, bioquímicos e blocos químicos intermediários [1].

Mesmo sendo uma cultura de relevância mundial, a cana-de-açúcar ainda é constantemente desafiada por estresses bióticos e abióticos que podem comprometer sua produtividade. Mais de 100 doenças (causadas por fungos, bactérias, vírus e fitoplasmas) acometem esta cultura em diferentes partes do mundo [2], representando 13% dos danos totais. No Brasil já foram identificadas cerca de 60 delas (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>), e por ser um país tropical, com condições mais propícias ao crescimento de microrganismos, esses danos podem ser maiores.

Embora existam agroquímicos (bactericidas e fungicidas, por exemplo) que podem ser aplicados na cultura para o controle de algumas doenças, sabemos que eles podem causar alguns impactos negativos no ambiente e na saúde humana [3]. Em adição, o uso de variedades resistentes ainda é a melhor forma de controle, juntamente com as boas práticas agrícolas. Porém, esta resistência das variedades pode ser quebrada, e novas práticas, como a mecanização, além de mudanças climáticas, vêm ocasionado o surgimento de doenças em cultivares anteriormente resistentes [4].

A escaldadura das folhas é uma das doenças mais importantes da cana-de-açúcar. O fitopatógeno causador é a bactéria *Xanthomonas albilineans*, que coloniza os vasos do xilema, movendo-se sistemicamente para os demais tecidos vegetais [5, 6]. Possui um grande poder destrutivo, principalmente em variedades susceptíveis, que podem sofrer até 100% de perdas [5]. A doença pode manifestar-se na forma latente, crônica ou aguda [5, 7]. O sintoma característico é a presença de estrias brancas bem definidas, paralelas a nervura central. Dependendo da forma da doença essas estrias podem aumentar tornando-se grandes áreas brancas. Podem apresentar também folhas anormais com grandes áreas esbranquiçadas, gemas com intensa brotação vindo da base do colmo para a ponta (quebra da dominância apical) com as folhas destes brotos já apresentando estrias ou áreas brancas [8]. O maior prejuízo é o murchamento e morte dos colmos afetados, provocando grandes falhas de brotação nas soqueiras. Seu controle é baseado na utilização de variedades resistentes, desinfecção de ferramentas de colheita e a utilização de mudas sadias [7].

Uma forma ambientalmente amigável de prever e tratar doenças de culturas agrícolas pode ser o biocontrole. Entre diversas formas que este controle biológico pode ser feito, nosso grupo estuda bactérias que produzem pequenas moléculas sinalizadoras denominadas compostos orgânicos voláteis (COVs), que podem inibir o crescimento de fitopatógenos [9]. Já identificamos alguns isolados bacterianos que são capazes de inibir o crescimento da *X. albilineans in vitro*, através dos COVs, e já identificamos quais destes metabólitos são responsáveis pela inibição do crescimento. Assim, este projeto objetiva elucidar alguns possíveis mecanismos pelos quais os COVs inibem este importante fitopatógeno.

Durante a iniciação científica, espera-se que o aluno desenvolva algumas habilidades e aprenda algumas técnicas e metodologias, tais como:

- (i) Busca de sequência em banco de dados, como no NCBI;
- (ii) Desenho de oligonucleotídeos;
- (iii) PCR e PCR em tempo real (qPCR);
- (iv) Extração e purificação de RNA;
- (v) Síntese de cDNA;
- (vi) Cultivo de microrganismos;
- (vii) Ensaio enzimáticos;
- (viii) Cultivo de cana-de-açúcar *in vitro*.

Este projeto, além de permitir um aprofundamento científico e contribuir para, no futuro, o desenvolvimento de um bioproduto, é fundamental quando falamos de *X. albilineans*. Isso porque o sequenciamento de seu genoma mostrou que ele é bem menor do a maioria das outras bactérias do mesmo gênero (3,7 Mb sendo a média das demais 5,0 Mb), e que esta bactéria possui um conjunto de genes relacionados a patogenicidade distinto, o que a torna única entre as *Xanthomonas* [10].

2. Objetivos

- (i) Investigar se a expressão de alguns genes chave relacionados à patogenicidade de *X. albilineans* é alterada pelos COVs;
- (ii) Avaliar se a atividade de algumas enzimas relacionadas a degradação da parede vegetal é alterada pelos COVs;
- (iii) Realizar experimentos “pilotos” para verificar se a inibição também ocorre *in planta*.

3. Metodologia resumida

Análise da expressão de genes relacionados a patogenicidade

X. albilineans será cultivada em meio de cultivo líquido, com e sem os COVs sintéticos de interesse. Primeiramente, iremos determinar qual concentração de dois COVs sintéticos ocasiona uma inibição de crescimento de cerca de 50% (avaliado por densidade ótica, a 600 nm). Após, as culturas inibidas e os controles sem inibição serão centrifugados e o *pellets* celulares serão preservados a -80 °C. Os respectivos RNAs serão extraídos utilizando o kit Quick-RNA Fungal/Bacterial (Zymo research), seguindo as recomendações do fabricante. Será feito tratamento com DNase (kit Turbo DNA-free, Invitrogen) para eliminar qualquer vestígio de DNA, síntese de cDNA (kit Revertaid First Strand cDNA Synthesis, ThermoFisher), e análise de expressão gênica por RT-qPCR seguindo metodologia descrita em [11]. Ao todo, esperamos avaliar a expressão de 10 genes importantes para a patogenicidade de *X. albilineans* [10, 12, 13]. Os experimentos serão realizados em quadruplicata e, como normalizador, será utilizado genes endógenos [14].

Avaliação da atividade enzimática

X. albilineans será cultivada como mencionado no item acima. As culturas serão centrifugadas e o sobrenadante será armazenado a -20 °C para posterior análise da atividade enzimática. *X. albilineans* possui 19 genes que codificam as enzimas degradadoras de parede vegetal, que são essenciais para a infecção de *Xanthomonas* em seus hospedeiros [15]. Neste trabalho avaliaremos a atividade celulolítica e xilanolítica, conforme [16]. Os resultados serão normalizados pela quantidade de proteína presente no sobrenadante e/ou crescimento.

Ensaio *in planta*

Plântulas de cana-de-açúcar já são rotineiramente cultivadas *in vitro* em nosso laboratório [17]. Assim, iremos infectar com *X. albilineans* 30 plântulas seguindo o protocolo descrito em [18]. Para verificar o efeito dos COVs bacterianos, ensaios de co-cultivo com as canas infectadas serão feitas em frascos contendo a bactéria antagonista previamente identificada pelo grupo (10 plântulas), bem como um COV sintético testado nos itens anteriores (10 plântulas). Como controle, as demais plântulas serão cultivadas sem o antagonista/COV sintético. As plântulas serão cultivadas em câmaras de crescimento, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas escuro/claro. Diariamente as canas-de-açúcar serão avaliadas para ver o surgimento de sintomas da doença, como as estrias

clorótidas nas folhas.

Como a variedade de cana que cultivamos *in vitro* pode ser resistente à *X. albilineans* (pelo menos nas condições em que os ensaios serão feitos), como alternativa, é proposto a realização de um ensaio adaptado com folhas de cana-de-açúcar destacadas provenientes de 3 variedades susceptíveis e uma resistente, como proposto por Garcia e colaboradores [19].

4. Referências

- [1] M. Villela Filho, C. Araujo, A. Bonfá, W. Porto, Chemistry based on renewable raw materials: perspectives for a sugar cane-based biorefinery, *Enzyme Res.* (2011) 654596.
- [2] A.S. Rott, P; Bailey, R.A.; Comstock, J. C.; Croft, B.J.; Saumtally, ed., A guide to sugarcane diseases, La Librairie du Cirad, Montpellier, 399p., 2000.
- [3] P. Nicolopoulou-Stamati, S. Maipas, C. Kotampasi, P. Stamatis, L. Hens, Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture, *Front. Public Heal.* 4 (2016) 148.
- [4] D. Tilman, K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor, S. Polasky, Agricultural sustainability and intensive production practices, *Nature.* 418 (2002) 671–677.
- [5] P. Rott, I.S. Mohamed, P. Klett, D. Soupa, A. Saint-Albin, P. Feldmann, P. Letourmy, Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*, *Phytopathology.* 87 (1997) 1202–1213.
- [6] R.G. Birch, *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control, *Mol. Plant Pathol.* 2 (2001) 1–11.
- [7] P. Rott, M.J. Davis, Leaf scald, in: R. P., B.R. A., C.J. C., C.B. J., Saumtally A. S. (Eds.), Guide to Sugarcane Disease, 2000: pp. 38–44.
- [8] J.-H. Daugrois, bullet Boisse-Noc, bullet Champoiseau, P. bullet, Rott, The revisited infection cycle of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane, *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 6 (2011) 91–97.
- [9] L. Weisskopf, The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi , in: A. Méndez-Vilas (Ed.), Microb. Pathog. Strateg. Combat. Them Sci. Technol. Educ. ., Badajoz: Formatex Research Center, 2013: pp. 1352–1363.
- [10] I. Pieretti, A. Pesic, D. Petras, M. Royer, R. Süßmuth, S. Cociancich, What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads?, *Front. Plant Sci.* 6 (2015).
- [11] A.A. Kaupert Neto, G.P. Borin, G.H. Goldman, A.R. Damasio, J. V Oliveira, Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*, *FEMS Yeast Res.* 16 (2016) fov117.
- [12] I. Pieretti, M. Royer, V. Barbe, S. Carrere, R. Koebnik, A. Couloux, A. Darrasse, J. Gouzy, M.-A. Jacques, E. Lauber, C. Manceau, S. Mangenot, S. Poussier, B. Segurens, B. Szurek, V. Verdier, M. Arlat, D.W. Gabriel, P. Rott, S. Cociancich, Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels, *BMC Genomics.* 13 (2012) 658.
- [13] G. Astua-Monge, J. Freitas-Astua, G. Bacocina, J. Roncoletta, S.A. Carvalho, M.A. Machado, Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 1201–1205.

- [14] X. Yan, Q. Zhang, J. Zou, C. He, J. Tao, Selection of optimized reference genes for qRT-PCR normalization in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cultured in different media, *Curr. Microbiol.* 76 (2019) 613–619.
- [15] M.-A. Jacques, M. Arlat, A. Boulanger, T. Boureau, S. Carrère, S. Cesbron, N.W.G. Chen, S. Cociancich, A. Darrasse, N. Denancé, M. Fischer-Le Saux, L. Gagnevin, R. Koebnik, E. Lauber, L.D. Noël, I. Pieretti, P. Portier, O. Pruvost, A. Rieux, I. Robène, M. Royer, B. Szurek, V. Verdier, C. Vernière, Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*, *Annu. Rev. Phytopathol.* 54 (2016) 163–187.
- [16] G.P. Borin, C.C. Sanchez, A.P. de Souza, E.S. de Santana, A.T. de Souza, A.F. Paes Leme, F.M. Squina, M. Buckeridge, G.H. Goldman, J. V. Oliveira, Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass, *PLoS One.* 10 (2015) e0129275.
- [17] J.J. Bello-Bello, In Vitro Propagation of Sugarcane for Certified Seed Production, in: M. Mendoza-Mexicano (Ed.), IntechOpen, Rijeka, 2018: p. Ch. 6.
- [18] L.-H. Lin, M.S. Ntambo, P.C. Rott, Q.-N. Wang, Y.-H. Lin, H.-Y. Fu, S.-J. Gao, Molecular detection and prevalence of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, in China, *Crop Prot.* 109 (2018) 17–23.
- [19] E. Garcia, M. Casagrande, A. Rago, N. Massola, Método para inoculação de ferrugem da cana-de-açúcar em segmentos de folhas, *Fitopatol. Bras.* 32 (2007).