

PROPOSTA PARA BOLSA PIBIC – LNBR/CNPEM

Avaliação dos mecanismos promotores de crescimento vegetal induzidos por moléculas sinalizadoras voláteis bacterianas

Orientadora/: Dr^a Juliana Velasco de Castro Oliveira/ **Co-orientador:** Me. Octavio Augusto Costa Almeida

1. INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

Desde 2003, pesquisas que utilizaram bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) relatam que estes microrganismos são capazes de promover o crescimento diversas espécies, incluindo algumas de interesse agrícola, sem haver o contato direto entre eles¹⁻³. Esse efeito ocorre devido às moléculas sinalizadoras voláteis, mais especificamente compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidas pelas bactérias, sendo assim um novo mecanismo de promoção de crescimento vegetal até então não descrito. Os COVs são pequenas moléculas de natureza lipofílica (<300 Dalton), pertencentes a diversas classes químicas e derivadas de uma ampla gama de vias biossintéticas, possuem alta pressão de vapor, e volatilizam facilmente em temperatura ambiente⁴⁻⁷. Tais características permitem a fácil difusão destes compostos pelo solo, água e ar e sua absorção pelas plantas. Assim, bioinoculantes formulados a partir de microrganismos produtores de COVs benéficos às plantas podem apresentar uma vantagem em relação aos demais, pois não há a necessidade de colonização das mesmas. Cada espécie ou cepa bacteriana produz uma gama diferente de COVs (o que é denominado volatiloma) que interagem de forma bastante singular com outros organismos e geram respostas específicas^{2,8}. Além de promover o crescimento em plantas, os COVs microbianos são capazes de induzir resistência a estresses, afetar a produção de metabólitos secundários e inibir patógenos⁸.

Até o momento, já existem diversos estudos com *Arabidopsis thaliana* (principalmente), alface, alfafa, *Nicotiana attenuata*, pepino, repolho, soja, tabaco e tomate, todas espécies de metabolismo fotossintético C3, e alguns poucos estudos com milho e sorgo, espécies C4^{2,3,9,10}. Assim, para aumentar o conhecimento nesta área, nosso grupo vem estudando promoção de crescimento *Setaria viridis*, uma planta modelo de metabolismo C4, por meio de COVs bacterianos. Neste estudo, já fomos capazes de identificar e selecionar isolados bacterianos que promovem crescimento de *S. viridis* em até 4 vezes por meio dos COVs e, também, identificar quais voláteis são produzidos por estas bactérias. Por meio de uma abordagem multi-ômicas, observamos diversas vias metabólicas que estão sendo moduladas por estes compostos. Com a adição de outras análises moleculares e fisiológicas, espera-se obter sólidas evidências de quais processos metabólicos de fato levam à promoção de crescimento. Os resultados deste projeto permitirão um entendimento profundo da ação das moléculas indutoras de crescimento no crescimento vegetal, o que, a longo prazo, pode ajudar no desenvolvimento de novas estratégias agrícolas visando uma agricultura mais sustentável. De forma geral, o projeto envolve estudos de microbiologia aplicada, e o (a) bolsista(a) terá a oportunidade de aprender e ter independência em técnicas de microbiologia (preparo de meio de cultivo, crescimento de bactérias), ensaios de co-cultivo (planta-bactéria) biologia molecular (DNA, purificação de ácidos nucleicos, PCR em tempo real, entre outros), e parcialmente em metabolômica.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto é aprofundar os conhecimentos sobre as vias metabólicas moduladas pelos COVs na promoção de crescimento de *S. viridis*, e identificar os possíveis metabólitos envolvidos. Portanto, têm-se como objetivos específicos:

- i. Realizar uma análise temporal da expressão de genes candidatos relacionados ao crescimento por PCR em tempo real;
- ii. Analisar os resultados do volatiloma das bactérias e realizar a validação funcional utilizando COVs sintéticos (individual e em *mix*);
- iii. Analisar se ocorre mudanças morfológicas na folha e raiz de *S. viridis*, a nível celular, em resposta aos COVs bacterianos.

3. METODOLOGIA RESUMIDA

3.1 Avaliação da expressão temporal de genes que podem estar associados ao crescimento de *S. viridis*

Primeiramente, sementes de *S. viridis* (Acesso A10.1) serão superficialmente esterilizadas e então semeadas em placas de petri de vidro (150x25 mm) contendo meio de cultivo Murashige & Skoog (MS) meia-força (2,25 g.L⁻¹ MS basal; 0,25 g.L⁻¹ MES [ácido 2-(n-morfolino) etanossulfônico]; 10 g.L⁻¹ ágar de planta; pH 5,7 ajustado com solução 0,1 M KOH). As placas serão mantidas em câmara de crescimento em condições de fotoperíodo, temperatura e umidade controladas para germinação das sementes¹¹. Após 5 dias, as plântulas serão utilizadas nos experimentos de co-cultivo onde plantas e bactérias compartilharão apenas a atmosfera interna da placa, havendo uma barreira física para que outros compostos não se difundam através dos meios de cultivo¹¹. Então, serão coletadas plântulas após 1, 2, 3, 5 e 7 dias de co-cultivo para avaliação da promoção de crescimento por peso seco e extração de RNA para análise da expressão de genes selecionados.

Para tal, a parte aérea das plântulas serão maceradas com em nitrogênio líquido com o auxílio de cadinhos e pistões para se obter 100 mg de macerado por amostra. As amostras permanecerão congeladas a -80 °C até o início da extração de RNA, que será realizada utilizando o *kit* SV Total RNA Isolation System (Promega) seguindo o protocolo do fornecedor, com algumas modificações. A qualidade e integridade dos RNAs será determinada utilizando o *kit* Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies) em um equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), seguindo protocolo do fornecedor. A quantificação será realizada utilizando o *kit* Invitrogen Qubit™ RNA BR Assay (ThermoFisher Scientific) em aparelho Qubit (ThermoFisher Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. Será feito tratamento com DNase (*kit* Turbo DNA-free, Invitrogen) para eliminar qualquer vestígio de DNA, seguido de síntese de cDNA utilizando entre 100 a 500 ng de RNA tratado (*kit* Revertaid First Strand cDNA Synthesis, ThermoFisher). Os oligonucleotídeos serão desenhados baseados nas sequências nucleotídicas dos genes selecionados dos dados de multi-ômicas. A análise de expressão gênica por RT-qPCR será realizada seguindo metodologia já padronizada no grupo, descrita por Neto *et al.* (2016)¹².

3.2 Validação funcional com o uso de COVs sintéticos na promoção de crescimento de *S. viridis*

Depois de identificar os perfis de COVs produzidos pelas melhores cepas, queremos verificar qual (quais) destes voláteis possui(em) a capacidade de promover o crescimento de *S. viridis*, testando-os individualmente ou combinados. Os dados de volatiloma serão analisados e escolheremos dez metabólitos sintéticos que serão comercialmente adquiridos para realizar os testes promoção *in vitro*. O sistema de co-cultivo será montado

de forma similar ao descrito no item 3.1, mas ao invés da cepa teste na placa de petri menor, 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 um período de dias (de acordo com a inspeção visual) nas condições citadas anteriormente e a promoção de crescimento será avaliada pelo peso seco. Este passo é muito importante porque será estabelecido quais são os COVs que de fato promovem 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.

3.3 Análises morfológicas de folha e de raiz de *S. viridis* em resposta aos COVs bacterianos

Em um estudo realizado por Zhang *et al.* (2008), foi constatada a capacidade de COVs bacterianos induzirem o aumento celular vegetal por meio da produção de enzimas que reduzem a rigidez da parede celular e promovem a expansão celular¹³. Assim, queremos avaliar se as folhas e raízes de *S. viridis* exposta a COVs apresentarão mudanças morfológicas. Amostras de folhas e raízes serão coletadas em alguns dos tempos analisados no item 3.2, e mensuração do tamanho celular será feita através de técnica de microscopia, como descrito por Zhang *et al.* (2008).

4. REFERÊNCIAS

1. Ryu, C. M. *et al.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4927–4932 (2003).
2. Sharifi, R. & Ryu, C. M. Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany* vol. 122 349–358 (2018).
3. Fincheira, P., Quiroz, A., Tortella, G., Diez, M. C. & Rubilar, O. Current advances in plant-microbe communication via volatile organic compounds as an innovative strategy to improve plant growth. *Microbiol. Res.* **247**, 126726 (2021).
4. Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M. & Maffei, M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science* vol. 6 151 (2015).
5. Lemfack, M. C. *et al.* MVOC 2.0: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1261–D1265 (2018).
6. Piechulla, B., Lemfack, M. C. & Kai, M. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant. Cell Environ.* **40**, 2042–2067 (2017).
7. Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R. & Dott, W. Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere* **39**, 795–810 (1999).
8. Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L. & Garbeva, P. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology* vol. 8 (2017).
9. Yasmin, H. *et al.* Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* alleviated drought stress by modulating defense system in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.* **172**, 896–911 (2021).
10. Castulo-Rubio, D. Y. *et al.* Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (Strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. *J. Plant Growth Regul.* **34**, 611–623 (2015).
11. Dias, B. H. S. Análise de voláteis bacterianos promotores do crescimento vegetal. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (2021).
12. Neto, A. A. K., Borin, G. P., Goldman, G. H., de Lima Damásio, A. R. & de Castro Oliveira, J. V. Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*. *FEMS Yeast Res.* **16**, (2016).
13. Zhang, H. *et al.* Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *Plant J.* **56**, 264–273 (2008).