

Análise Metabolômica De Raízes De *Citrus Sinensis* Na Compreensão Do Mecanismo De Infecção De *Huanglongbing*

Palavras-Chave: Huanglongbing, Metabolômica, Interação patógeno-hospedeiro

Autoras:

Mariana Melo Silva Oliveira, IQ – UNICAMP

Hellen Bertoletti Barbieri, IQ - UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Taicia Pacheco Fill (orientadora), IQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é uma doença sem cura que afeta a citricultura, causando perdas econômicas em pomares do mundo todo, incluindo no Brasil, o país com maior produção de laranjas (BASSANEZI, 2010; FAO, 2021). A doença é causada por três espécies de bactérias limitadas ao floema, porém a mais comum é a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), cujo vetor é o psíldeo *Diaphorina citri* (POLEK, 2007). A detecção da infecção é dificultada devido a um período de latência e, quando ocorre, a solução biológica é a remoção de exemplares do pomar, reduzindo a produção de citros, e o uso extensivo de defensivos agrícolas (BOVÈ, 2006; ZAPAROLLI, 2018). Os mecanismos de infecção da CLAs não são totalmente conhecidos, uma vez que seu cultivo *in vitro* ainda não foi bem-sucedido em laboratório (WANG, 2013). Por isso, a busca por formas menos agressivas para o controle da doença se baseia em estudos da interação patógeno-hospedeiro.

Estudos mostraram diferenças metabólicas entre diferentes partes da planta afetada pela HLB e de plantas sadias (PADHI, 2019; CHEN, 2022). As raízes são uma das principais regiões de desenvolvimento e multiplicação da CLAs durante o período assintomático, entretanto, não existem estudos extensivos dedicados à essa região do hospedeiro e sua função no desenvolvimento da doença (JOHNSON, 2014). Portanto, o presente projeto tem como objetivo realizar o estudo metabolômico de raízes de plantas infectadas com HLB a fim de estudar a interação patógeno-hospedeiro como meio para o desenvolvimento de tratamentos menos agressivos da doença.

METODOLOGIA

Material biológico e extração de metabólitos secundários

A espécie de laranja doce valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), enxertada em citrumelo swingle (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*) infectado por enxertia com brotos transportando CLAs, foi mantida em estufa sob condições fitossanitárias e nutricionais padrão em colaboração com o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), em Araraquara, SP. O PCR foi realizado para confirmar a infecção das plantas. Em 100 mg de raízes maceradas, 1 mL de metanol foi adicionado para extração dos metabólitos secundários. As amostras foram sonicadas por 40 min e, em seguida, centrifugadas por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e, posteriormente, ressuspenso em 1 mL de metanol para as análises metabolômicas via cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Aquisição dos dados por UHPLC-MS/MS para metabolômica

As análises foram realizadas em um UHPLC-MS/MS – Thermo Q Exactive Orbitrap– Dionex UltiMate 3000 RSLCnano System, operados em modos positivo e negativo de ionização. As análises de UHPLC-HRMS foram feitas através de uma coluna C18 (100 mm x 2.1 mm x 2,6 mm; Thermo). As análises de espectrometria de massas foram realizadas em modo *full scan*, com uma faixa de *scan* entre *m/z* 100 a 1500 Da. O espectro de fragmentação MS/MS foi adquirido dos cinco íons mais intensos por *scan*. As análises foram realizadas com o extrato metanólico de todas as amostras de raízes, com injeções de amostras branco (metanol) e amostras de controle de qualidade (QC). As amostras de controle de qualidade foram obtidas pela mistura de alíquotas de todas as amostras e foram injetadas a cada 5 amostras no começo e no fim das análises.

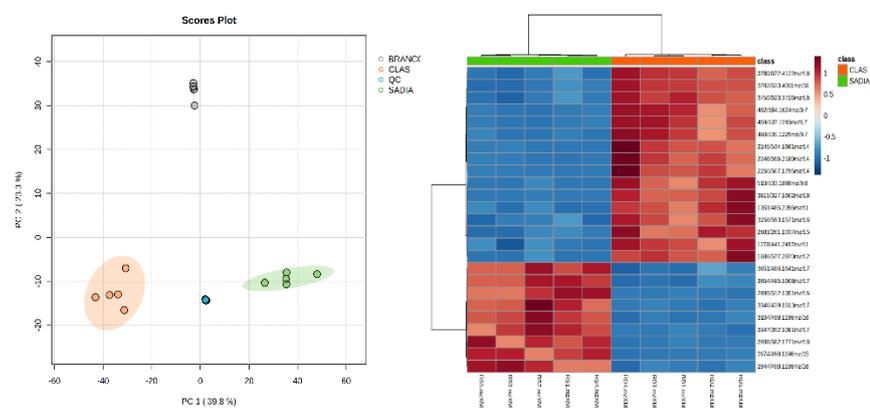
Processamento e análise dos dados UHPLC-MS/MS

Os dados obtidos foram processados pelo software MZmine 3.9 (SCHMID, 2023). A anotação dos metabólitos foi realizada através da associação dos bancos de dados disponíveis na plataforma GNPS e da ferramenta para propagação de anotação *in silico* SIRIUS (DUHRKOP, 2019). A plataforma GNPS também foi utilizada para a construção de redes moleculares por meio da ferramenta *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) (NOTHIAS, 2020). As análises estatísticas uni e multivariadas foram realizadas por meio da plataforma MetaboAnalyst 6.0 (PANG, 2024) e do *software* GraphPad Prism com o objetivo de selecionar os *features* importantes para a diferenciação dos grupos (controle/infectado). Gráficos de quantificação relativa foram obtidos para os *features* diferenciais utilizando as áreas dos picos cromatográficos integradas manualmente através do *software* Xcalibur (Thermo Scientific).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) e a planta *C. sinensis* foi estudada por meio da análise metabolômica de raízes infectadas em comparação com raízes sadias (5 amostras por grupo). As análises estatísticas dos dados obtidos nos modos positivo e negativo de ionização apontaram robustez, reprodutibilidade e ausência de interferências instrumentais por meio da sobreposição das amostras de controle de qualidade nos gráficos de Análise de Componentes Principais (PCA) em ambos os casos. O mesmo gráfico também indicou a separação dos grupos de raízes controle e infectadas com CLAs. Aliado ao PCA, os resultados de *Volcano plot* e *VIP scores*, obtido a partir da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), apontaram os *features* diferenciais (p-valor < 0,05) entre as amostras controle e infectada.

Figura 1. Gráficos obtidos pelas análises estatísticas dos resultados do estudo em modo negativo de ionização, com gráfico de *scores* do PCA dos grupos controle, infectado, QC e branco (metanol) à esquerda e mapa de calor gerado pela plataforma MetaboAnalyst 6.0 a partir dos 25 *features* com maiores diferenças estatisticamente significativas, isto é, menores números de p-valor, entre as raízes sadias (verde) e com CLAs (laranja) da análise em modo negativo de ionização.



Nas análises em modo positivo de ionização, foram anotados *features* diferenciais das classes de cumarinas, limonoides e sesquiterpenos, todos em maior quantidade nas raízes infectadas. A alteração na via das cumarinas condiz com estudos transcriptômicos que indicaram modificações na biossíntese de fenilpropanoides em raízes de *C. sinensis* infectadas com CLAs, visto que fenilpropanoides são precursores de cumarinas (XIE, 2023; STRINGLIS, 2019). Alterações na composição de cumarinas podem interferir na defesa química da planta, visto que podem apresentar atividades antioxidantes, por exemplo, como é o caso da clausarina, metabólito anotado pela presente análise (JANTAMAT, 2019). Outro metabólito anotado com atividades antioxidantes e antibacterianas reportadas é o alfa-bisabolol, um álcool de sesquiterpeno que foi isolado de *Zanthoxylum tingoassuiba*, outra espécie da família Rutaceae (FORRER, 2013; SIMIONATTO, 2007; DA SILVA, 2008).

Os limonoides são uma classe de compostos químicos que possuem atividade biológica de defesa de plantas da família Rutaceae e foram identificados no nosso estudo veprisona e desacetilnomilina em maior quantidade em raízes infectadas com CLAs (GONZÁLEZ-COLOMA, 2011). Outros limonoides importantes são a limonina e a nomilina, pois apresentam atividade contra o ataque de insetos (RUBERTO, 2002). Esses metabólitos foram estudados e apresentaram uma queda na concentração nas raízes doentes no caso da nomilina e não apresentaram mudanças estatisticamente significativas no caso da limonina. A nomilina, um precursor biossintético de outros limonoides é produzida, primariamente, no tecido do caule na região do floema e, também, nas raízes (OU, 1988). Assim, os resultados indicam uma possível interferência no metabolismo de triterpenoides devido à presença da bactéria no floema.

As análises feitas em modo negativo de ionização geraram anotações nas classes de alcaloides, flavonoides prenilados e flavanonas. O feature diferencial de alcaloide derivado de ácido antranílico corresponde a buxifoliadine H, o qual apresentou atividade citotóxica quando isolado de *Severinia buxifolia* (Rutaceae) (da SILVA, 2013). No caso dos flavonoides prenilados, apesar de participarem da defesa da planta contra patógenos, foram encontrados 6,8-diprenilnaringenina e 8-isopentenilnaringenina em maior quantidade nas raízes de *C. sinensis* saudáveis (CHEN, 2014). Os resultados são consistentes com uma regulação negativa dos genes de biossíntese de flavonoides em raízes infectadas reportado por Xie *et al.* (2023). As flavanonas anotadas foram licoflavanona, hesperidina e naringenina. Dentre elas, foi observada maior concentração de naringenina em raízes saudáveis e maior quantidade de licoflavanona e de hesperidina nas raízes infectadas com CLAs. Tanto a licoflavanona quanto a hesperidina apresentaram atividade antioxidante em outros estudos (FRATTARUOLO, 2019; PARHIZ, 2015).

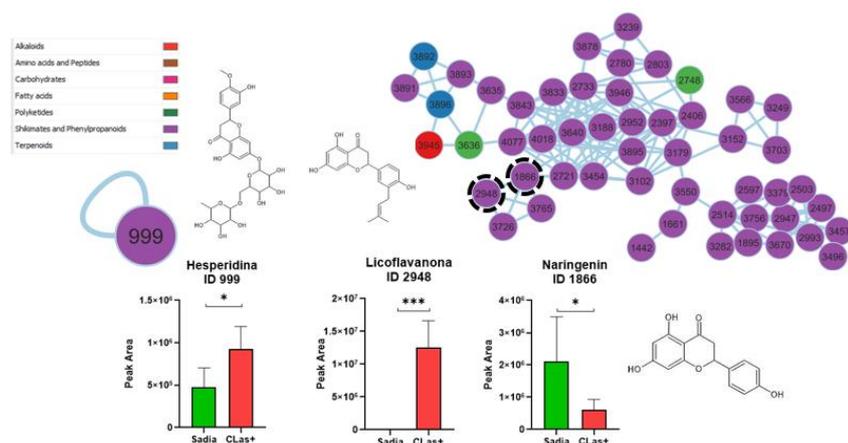


Figura 2. Redes moleculares construídas a partir dos dados metabolômicos via modo de ionização positiva. As cores indicam as vias bioquímicas associadas aos features detectados pelo processamento, conforme indicado no canto superior esquerdo. Hesperidina, licoflavanona e naringenina foram metabólitos anotados através da análise metabolômica realizada, os dois primeiros encontrados regulados positivamente nas raízes doentes e o último encontrado em maior quantidade em raízes doentes, conforme indicado pelos gráficos de barra. Teste de Tukey foi realizado para cada grupo relativo ao

metabólito anotado. Os níveis de significância são indicados da seguinte maneira: ns – p-valor > 0,05; * p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,001; **** p-valor < 0,0001.

A presença de diversos agentes antioxidantes em maior quantidade nas raízes infectadas pela CLas é corroborada por estudos que indicam que a HLB é uma doença imune, em que os sintomas são causados por espécies reativas de oxigênio que desencadeiam a morte de células do floema (MA, 2022). Além disso, foi observado por Pandey et al. (2023) um aumento da expressão de genes relacionados a enzimas com função antioxidante em folhas de novos ramos de *C. sinensis* infectada com HLB.

CONCLUSÕES

A análise metabolômica utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas das raízes de *Citrus sinensis* infectadas com CLas em comparação com raízes sadias demonstrou uma possível forma de defesa da planta à presença do patógeno por meio do aumento na quantidade de metabólitos com atividades antioxidantes reportadas anteriormente.

BIBLIOGRAFIA

- BASSANEZI, R. B.; Lopes, S. A.; Júnior, J. B.; Spósito, M. B.; Yamamoto, P. T.; Miranda, M. P.; Teixeira, D. C.; Wulff, N. A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology*, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- CHEN, Q.; Min, A.; Luo, S.; He, J.; Wu, R.; Lin, X.; Wang, Y.; He, W.; Zhang, Y.; Lin, Y.; et al. Metabolomic Analysis Revealed Distinct Physiological Responses of Leaves and Roots to Huanglongbing in a Citrus Rootstock. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, n. 16, p. 9242, 2022.
- CHEN, X.; Mukwaya, E.; Wong, M.S.; Zhang, Y. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharm Biol*, v. 52, n. 5, p. 655–660, 2014.
- DA SILVA, C.V.; Detoni, C.B.; Velozo, E.S.; Guedes, M.L.S. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. st. Hil. *Quim. Nova*, v. 31, n. 8, p. 2052-2055, 2008.
- DA SILVA, M.F.G.F.; Fernandes, J.B.; Forim, M.R.; Vieira, P.C.; de Sá, I.C.G. Alkaloids Derived from Anthranilic Acid: Quinoline, Acridone, and Quinazoline. In: RAMAWAT, K.G.; Mérillon, J.M. Natural Products. Springer, 2013. p.715-859.
- DÜHRKOP, K.; Fleischauer, M.; Ludwig, M.; Aksenov, A.A.; Melnik, A.V.; Meusel, M.; Dorrestein, P.C.; Rousu, J.; Böcker, S. SIRIUS 4: Turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*, v. 16, p. 299–302, 2019.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Countries by commodities rankings of FAOSTAT, 2021. Disponível em <https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country>. Acesso em: 01/08/2023.
- FORRER, M.; Kulik, E.M.; Filippi, A.; Waltimo, T. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated halitosis. *Archives of Oral Biology*, v. 58, p. 10-16, 2013.
- FRATTARUOLO, L.; Carullo, G.; Brindisi, M.; Mazzotta, S.; Bellissimo, L.; Rago, V.; Curcio, R.; Dolce, V.; Aiello, F.; Cappello, A.R. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of 17 Flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) Leaf Phytocomplexes: Identification of Licoflavone as a Modulator of NF- κ B/MAPK Pathway. *Antioxidants*, v. 8, n. 186, 2019.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A.; López-Balboa, C.; Santana, O.; Reina, M.; Fraga, B.M. Triterpene based plant defenses. *Phytochem Ver*, v. 10, p. 245–260, 2011.
- JANTAMAT, P.; Weerapreeyakul, N.; Puthongking, P. Cytotoxicity and Apoptosis Induction of Coumarins and Carbazole Alkaloids from *Clausena harmandiana*. *Molecules*, v. 24, n. 3385, 2019.

- JOHNSON, E.G; Wu, J; Bright, D.B and Graham, J.H. Association of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ root infection, but not phloem plugging with root loss on Huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology*, v. 63, p. 290–298, 2014.
- MA, W.; Pang, Z.; Huang, X. et al. Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. *Nat Commun*, v. 13, n. 529, 2022.
- NOTHIAS, L.F.; Petras, D.; Schmid, R.; et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat Methods*, v. 17, n. 9, p. 905-908, 2020.
- OU, P.; Hasegawa, S.; Herman, Z.; Fong, C.H. LIMONOID BIOSYNTHESIS IN THE STEM OF CITRUS LIMON, *Phytochemistry*, v. 27, n.1, p. 115-118, 1988.
- PADHI, E.M.T.; Maharaj, N.; Lin, S.Y.; Mishchuk, D.O.; Chin, E.; Godfrey, K.; Foster, E.; Polek, M.; Leveau, J.H.J. and Slupsky, C.M. Metabolome and Microbiome Signatures in the Roots of Citrus Affected by Huanglongbing. *Phytopathology*, v. 109, n. 12, 2019.
- PANDEY, S.S.; Xu, J.; Achor, D.S.; Li, J.; Wang, N. Microscopic And Transcriptomic Analyses Of Early Events Triggered By ‘Candidatus Liberibacter Asiaticus’ In Young Flushes Of Huanglongbing-Positive Citrus Trees. *Phytopathology*, v. 113, n. 6, p. 985-997, 2023.
- PANG, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; Lima Morais, D. A. de; Chang, L.; Barrette, M.; Gauthier, C.; Jacques, P.-É.; LI, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 2024.
- PARHIZ, 2015 Parhiz, H.; Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother. Res.*, v. 29:, p. 323 331, 2015.
- POLEK, M.; Vidalakis, G.; Godfrey, K. Citrus bacterial canker disease and Huanglongbing (Citrus Greening). *ANR Catalog*, v. 8218, p. 1–12, 2007.
- RUBERTO, G. Citrus Limonoids and Their Semisynthetic Derivatives as Antifeedant Agents Against Spodoptera frugiperda Larvae. A Structure–Activity Relationship Study. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6766–6774, 2002.
- SCHMID, R.; Heuckeroth, S.; Korf, A. et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat Biotechnol.*, v. 41, p. 447–449, 2023.
- SIMIONATTO, E.; Bonani, V.F.L.; Morel, A.F. et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 18, n. 5, p.879-885, 2007.
- STRINGLIS, I.A.; Jonge, R.d. and Pieterse, C.M.J. The Age of Coumarins in Plant–Microbe Interactions. *Plant Cell Physiol.*, v. 60, n. 7, p. 1405–1419, 2019. doi:10.1093/pcp/pcz076
- WANG, N. and Trivedi, P. Citrus Huanglongbing: A Newly Relevant Disease Presents Unprecedented Challenges. *Phytopathology*, v. 103, n. 7, 2013.
- XIE, Z.; Wang, S.; Ma, J. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of midrib and root of Wanjincheng orange (*Citrus sinensis* Osbeck) in response to the early invasion of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae*, v. 318, n. 112018, 2023.
- ZAPAROLLI, D. Biological control against citrus greening. *Revista Pesquisa FAPESP*, v. 254, p. 60–63, 2018.