

INVESTIGANDO A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PELO FUNGO *Geotrichum candidum* DURANTE A INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO CITROS

Palavras-Chave: Interações planta-patógeno, *Geotrichum candidum*, metabolômica, Redes moleculares, metabólitos secundários.

Túlio Ramos Zauza¹, Júlio César Jeronimo Barbosa¹, José Rodrigo Ferreira Maciel¹, Evandro Silva²,
Profa. Dra. Taícia Pacheco Fill^{1*},

¹Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

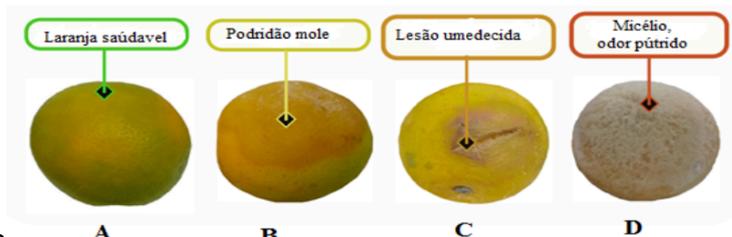
²Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

INTRODUÇÃO:

A citricultura é uma atividade agrícola de grande importância econômica no mundo, sendo amplamente empregada em mais de 140 países com climas tropicais, subtropicais e mediterrâneos (El-Otmani et al., 2011). O Brasil destaca-se como o maior produtor de laranjas do mundo, com uma produção de aproximadamente 12,5 milhões de toneladas no ano de 2023. Dessa forma, o setor de citricultura tem grande impacto na economia do país e arrecada cerca de US\$6,5 bilhões para o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. Além disso, a citricultura tem grande importância social para o país gerando mais de 200 mil empregos diretos e indiretos (Neves et al., 2017). Entretanto, o cultivo de frutas cítricas está sujeito a graves perdas econômicas no período pós-colheita dos frutos, principalmente nas etapas de transporte, armazenamento e comercialização (Hao et al., 2010), devido às doenças causadas por microrganismos (Hao et al., 2010; Costa et al., 2019). Dentre as principais doenças pós-colheita em frutas cítricas, destacam-se os bolores dos frutos cítricos, causados pelos fungos *Penicillium digitatum* e *P. italicum* e a podridão azeda, causada pelo fungo *Geotrichum candidum* (Bazioli et al., 2019).

A infecção de *Geotrichum candidum* ocorre quando as frutas cítricas são expostas a condições de estresse, que combinam diferentes fatores como altas temperaturas, alta umidade, baixa exposição a oxigênio, geralmente necessitando de uma ferida no fruto para que a infecção se estabeleça. Embora a doença podridão azeda tenha grande importância econômica para o país, ainda não existem estudos dedicados ao metabolismo do fungo durante a infecção, e o projeto proposto visa preencher essa lacuna. Os frutos infectados apresentam diversas características, dependendo das condições de armazenamento e do tempo de infecção. Entre os sintomas mais comuns, destacam-se a podridão mole, lesões umedecidas de coloração marrom-clara e um forte odor pútrido (Laranjeira et al., 2005). A **Figura 1** apresenta os principais sintomas da podridão azeda em laranjas.

Figura 1. Principais sintomas da podridão azeda em laranjas *Citrus sinensis*, observados durante os diferentes estágios da infecção. A) Fruto sadio. B) Estágio inicial da infecção (4-7 dias). C) Lesão umedecida (8-10 dias). D) Estágio final (12-15 dias) (Françóis et al., 2022).



Atualmente, as perdas são minimizadas com o uso de fungicidas sintéticos, utilizados como agentes de controle e que muitas vezes são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, a metabolômica é um caminho estratégico para a descoberta de produtos naturais que sejam eficazes no controle de doenças pós colheita.

Neste contexto, a metabolômica é uma técnica ômica poderosa no entendimento das interações patógeno-hospedeiro, através das análises direcionadas (*target*) e não direcionadas (*untarget*) dos

metabólitos que desempenham papéis críticos no crescimento, desenvolvimento e no sistema de defesa tanto do hospedeiro quanto do patógeno (Silva et al., 2022;). Ao ser combinada com técnicas de criação de redes moleculares, como o FBMN (*Feature Based Molecular Networking*), a metabolômica oferece uma abordagem robusta para a análise detalhada dos metabólitos envolvidos na virulência de fitopatógenos, como o *G. candidum* em citros. Assim, a descoberta destes metabólitos pode ser usada para entender a base molecular da patogenicidade de *G. candidum*, o que poderia implicar em um primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de controle específicas e ambientalmente amigáveis para a doença, além de significar um avanço no desenvolvimento de fungicidas naturais, podendo ter, portanto, grande significado econômico para o Brasil.

Neste sentido, o projeto tem como principal objetivo compreender os aspectos químicos e bioquímicos da doença podridão azeda, assim como as estratégias utilizadas pelo patógeno *G. candidum* para infectar o seu respectivo hospedeiro *C. sinensis* e também as estratégias de defesa da planta. O estudo será conduzido através do emprego da abordagem metabolômica não direcionada via a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas aliado a softwares metabolômicos (XCalibur, Sirius, Cytoscape) e a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), para investigar os metabólitos relacionados à resistência da fruta e à virulência do patógeno.

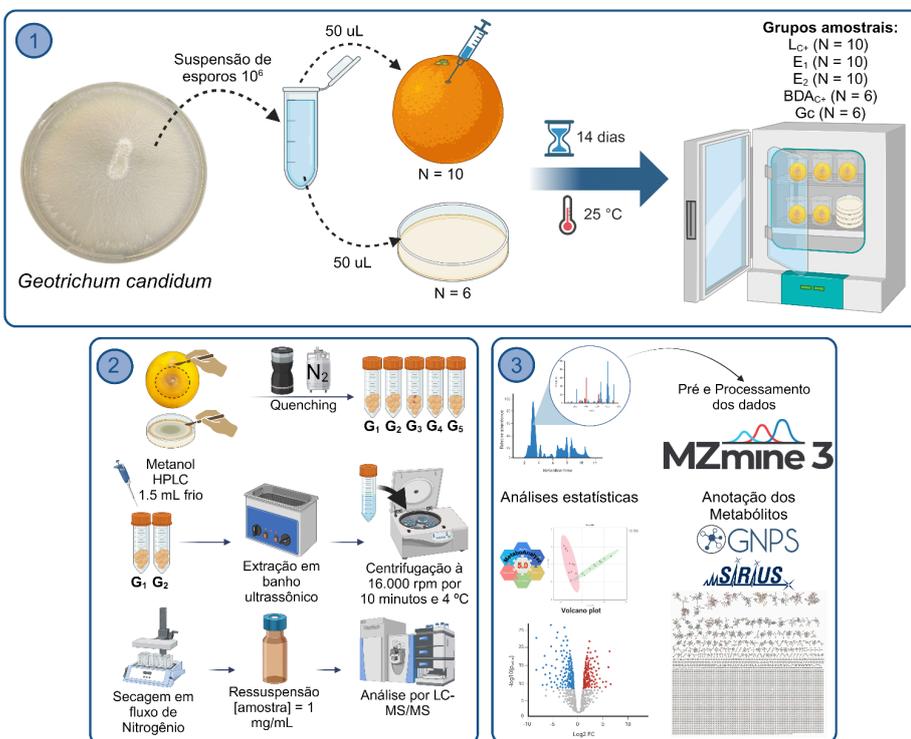
METODOLOGIA:

O fluxo de trabalho abaixo (**figura 2**) foi montado com o intuito de representar a metodologia realizada durante a prática dos experimentos envolvendo o fungo *G. candidum* e o hospedeiro *C. sinensis*.

Etapa 1: Preparo de uma suspensão de esporos do fungo *G. candidum* a qual foi utilizada para a realização do inóculo em vinte laranjas, sendo dez para o estágio inicial e dez para o estágio final (N amostral de cada grupo = 10). O fungo foi também cultivado *in vitro* em seis placas de Petri contendo meio BDA (N amostral = 6). O fungo foi incubado em uma câmara BOD por 7 e 14 dias dependendo do grupo amostral.

Etapa 2: Foi realizada a extração da região infectada pelo fungo nas laranjas utilizando uma lâmina esterilizada, seguido de uma imersão em nitrogênio líquido, maceração do material e sonicando por 30 minutos em banho ultrassom. Em seguida, os extratos gerados foram analisados via LC-HRMS (Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry). O mesmo procedimento foi realizado para o cultivo *in vitro*.

Etapa 3: Pré-processamento e processamento dos dados obtidos após a análise realizada pelo equipamento utilizando a plataforma MZmine 3.0.9. Nessa etapa foram feitas análises estatísticas e anotações dos metabólitos identificados utilizando o MetaboAnalyst 6.0, o GNPS, XCalibur, Sirius, Cytoscape.



L_C - Controle Positivo de Laranja; E₁ - Extração Laranja em Estágio 1 de infecção (7dpi); BDA_C - Controle Positivo Meio de Cultura; E₂ - Extração Laranja em Estágio 2 de infecção (14dpi);

Figura 2: Fluxograma utilizado para a investigação do papel dos metabólitos secundários durante a interação entre o fungo *G. candidum* em seu hospedeiro citros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Visando compreender a diversidade metabólica envolvida na interação entre o fungo *G. candidum* e seu hospedeiro citros, foi realizado um estudo avaliando e comparando o metabolismo de amostras de laranjas saudáveis e amostras de laranjas infectadas com *G. candidum* através de análises metabômicas via LC-HRMS (*Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry*), equipamento capaz de detectar e identificar moléculas com base na medição da sua razão massa/carga.

Neste contexto, o primeiro passo do experimento foi monitorar a progressão da infecção ao longo dos 14 dias, registrando por meio de fotografias o aumento radial da doença a partir do ponto de aplicação da suspensão de *G. candidum*.

Observou-se mudanças significativas na cor e na morfologia da laranja devido à disseminação da doença (Figura 3). Após sete dias de infecção, realizou-se a primeira extração em um grupo de dez laranjas infectadas (Estágio 1). No 14º dia da infecção, foram extraídas amostras das regiões infectadas de dez laranjas no estágio final (Estágio 2). Dez laranjas saudáveis também foram extraídas e utilizadas como grupo controle. O monitoramento em diferentes estágios permitiu observar o

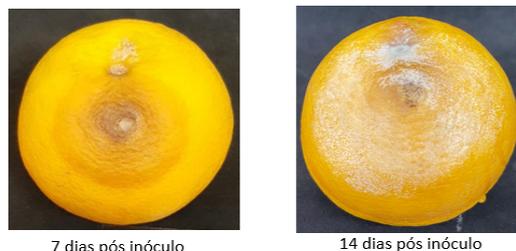


Figura 3: Registros da laranja nos diferentes estágios da infecção.

comportamento dos metabólitos produzidos em cada fase, visando identificar quimicamente as diferenças significativas de cada grupo, auxiliando assim na compreensão do metabolismo do fungo ao longo dos diferentes tempos de infecção e dos mecanismos de defesa da planta hospedeira. Os extratos obtidos foram analisados por LC-HRMS e em seguida, submetidos à análises de redes moleculares e análises multivariadas.

A análise dos componentes principais (PCA) foi o método estatístico utilizado nesse experimento. Esse método é utilizado quando há mais de uma variável no sistema, tendo como objetivo reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados, agrupando os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características.

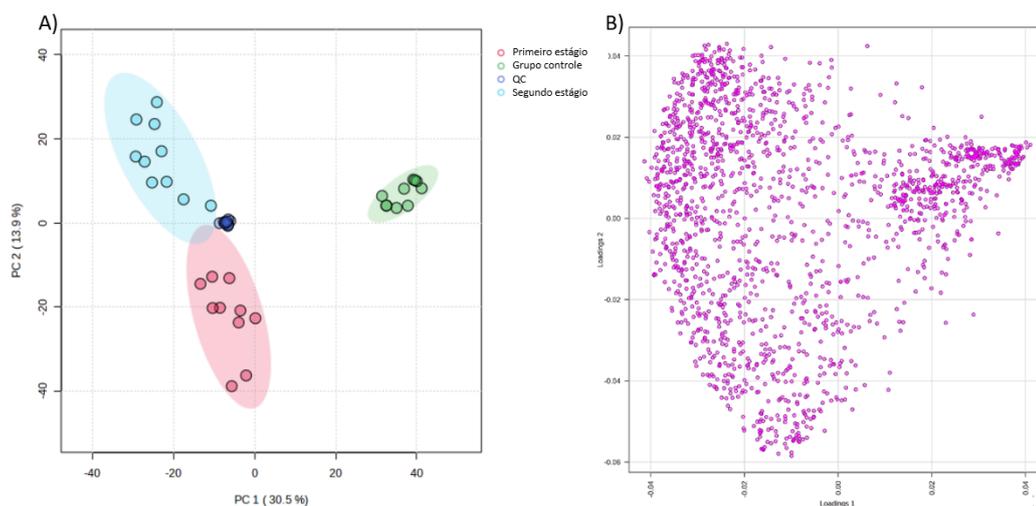


Figura 4. Análise de componentes principais (PCA) com scores (A) e loadings(B) realizados com 1290 features significantes detectados nos dados de LC-HRMS dos extratos de frutos de *C. sinensis* infectados com *G. candidum*.

Com isso, foi possível plotar dois gráficos: Gráfico de scores - Separação das amostras por grupos dadas suas semelhanças; gráfico de loadings - Identificação de íons diferenciais (aqueles que estatisticamente foram identificados em maior quantidade em um dos grupos). Pelo gráfico de scores (Figura 4-A), observa-se uma clara separação entre grupos, com a PC 1 discriminando as laranjas controles (em verde), contribuindo com 30,5% da variação total. A PC 2 também é importante, separando as laranjas do estágio inicial (marrom claro) e final (laranja escuro) da infecção, com uma contribuição de 13,9%. O gráfico de Loadings (Figura 4-B) confirma a presença de íons diferenciais em cada um dos grupos. O grupo QC (controle de qualidade) confirma a reprodutibilidade das análises, apresentando uma variação próxima de zero.

Assim, com o auxílio do FBMN (Feature based molecular network), um banco de dados que permite visualizar e anotar dados de espectrometria de massa (MS) acoplados a equipamentos

Figura 6: Rede de moléculas onde estão representados o ácido indolacético e a fitoesfingosina, produzidos somente pelo patógeno.

(Chung et. al.,2003). Nota-se que ao longo do período de infecção há um aumento na área de pico desse íon, sugerindo que houve um aumento em sua produção ao longo do tempo. Outro exemplo é a Fitoesfingosina acetamida (*m/z* 360.3104), um esfingolípido. Tal classe de moléculas são identificadas como componentes da estrutura celular de seres vivos, como animais, fungos e plantas, sendo capazes de controlar o metabolismo celular (Singh et. al., 2010). Além disso, os esfingolípídios podem desempenhar um papel importante na regulação da virulência em uma variedade de fungos (Beccaccioli et. al., 2019; Heung et. al., 2006).

Dessa forma, com os dados obtidos nesse projeto, temos uma base para a compreensão das estratégias químicas de infecção do fungo e um potencial enorme para explorar ainda mais essa doença, visando compreender os mecanismos de defesa da planta e os fatores de virulência do fungo durante a interação patógeno-hospedeiro. Com isso, já estão em andamento novos experimentos buscando isolar os metabólitos diferenciais produzidos pelo fungo durante a interação para que sejam avaliados com relação a sua funcionalidade na interação patógeno-hospedeiro.

CONCLUSÕES:

O estudo aqui realizado destaca a importância da metabolômica como área de pesquisa dentro da ciência e ressalta o potencial das análises via LC-HRMS/MS, bem como o uso do FBMN para examinar os perfis de diversos metabólitos de uma amostra biológica.

Com o auxílio da rede de moléculas, foi possível anotar 189 compostos identificados durante a interação do hospedeiro *C. sinensis* com o patógeno *G. candidum*, como cumarinas, terpenoides, alcaloides, policetideos, aminoácidos e peptídeos. Isso possibilitou que fossem feitas melhores investigações sobre a doença podridão azeda, causada por esse fungo durante a interação.

Conhecer os metabólitos secundários do fungo, assim como aqueles produzidos pela laranja como forma de defesa, é o primeiro passo para compreender os fatores de virulência que causam a infecção. Com poucos registros na literatura, a investigação dos metabólitos secundários do fungo produzidos na infecção se faz essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle da doença mais seguras e ambientalmente amigáveis, o qual pode apresentar potenciais interesses econômicos.

BIBLIOGRAFIA

- Bazioli, J. M., Belinato, J. R., Costa, J. H., Akiyama, D. Y., Pontes, J. G. M., Kupper, K. C., Augusto, F., de Carvalho, J. E., Fill, T. P. **Biological control of citrus postharvest phytopathogens**. *Toxins* 2019, 11(8), 460.
- Costa, J. H., Bazioli, J. M., Pontes, J. G. M., Fill, T. P. **Penicillium digitatum infection mechanisms in citrus: What do we know so far?** *Fungal Biol.* 2019, 123, 584-593.
- El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., Zacarias, L. **Citrus spp.: Orange mandarin tangerin clementine grapefruit pomelo lemon and lime**. In: Yahia, E.M. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. 2011, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 437-514.
- François, Guerline Amorim et al. **Exploring the Citrus Sour Rot pathogen: biochemical aspects, virulence factors, and strategies for disease management-a review**. *Fungal Biology Reviews*, 2022.
- Laranjeira, F. F., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Aguilar-Vildoso, C. I., Della Colleta Filho, H. **Fungos, procaríotos e doenças abióticas**. In: Mattos Junior, D., De Negri, J. D., Pio, R. M., Pompeu Junior, J. (Eds.) *Citros*. Campinas-SP. Instituto Agrônomo de Campinas e Fundag. 2005.
- Silva, E.; Belinato, J. R.; Porto, C.; Nunes, E.; Guimarães, F.; Meyer, M. C.; Pilau, E. J. **Soybean Metabolomics Based in Mass Spectrometry: Decoding the Plant's Signaling and Defense Responses under Biotic Stress**. *J Agric Food Chem* 2021, 69 (26), 7257–7267.
- A. Ortuño, L. Díaz, N. Alvarez, I. Porras, A. García-Lidón, J.A. Del Río. **Comparative study of flavonoid and scopolamine accumulation in different Citrus species and their susceptibility to Penicillium digitatum**, *Food Chemistry*, Volume 125, Issue 1, 2011, Pages 232-239.
- Costa, J. H.; Fernandes, L. S.; Akiyama, D. Y.; Fill, T. P.; **Exploring the interaction between citrus flavonoids and phytopathogenic fungi through enzymatic activities**, *Bioorganic Chemistry*, Volume 102, 2020.
- Kuang-Ren Chung, Turksen Shilts, Ümran Ertürk, LW Timmer, Peter P. Ueng, **Derivados de indol produzidos pelo fungo Colletotrichum acutatum causando antracnose da cal e queda de frutos pós-floração de cítricos**, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 226, Edição 1, setembro de 2003, Páginas 23–30
- Márcia Beccaccioli, Massimo Reverberi, Valéria Scala. **Lipídios fúngicos: biossíntese e sinalização durante a interação planta-patógeno**. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 2019, 24(1), 168–181.
- Singh, A. and Del Poeta, M. (2011), **Lipid signalling in pathogenic fungi**. *Cellular Microbiology*, 13: 177-185.
- Heung LJ, Luberto C, Del Poeta M2006.**Role of Sphingolipids in Microbial Pathogenesis**. *Infect Immun*74: .<https://doi.org/10.1128/iai.74.1.28-39.2006>