

## REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DO METABOLISMO DE GLICEROL-3-FOSFATO INDUZ RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFÉ<sup>1</sup>

Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo Gazolla<sup>2</sup>; Dênia Pires Almeida<sup>3</sup>; Isabel Samila Lima Castro<sup>4</sup>; Alex Gazolla de Castro<sup>5</sup>; Luiz Vinícius de Souza Arruda<sup>6</sup>; Nívea Maria Vieira<sup>7</sup>; Hilário Cuquetto Mantovani<sup>8</sup>; Laércio Zambolim<sup>9</sup>; Eveline Teixeira Caixeta<sup>10</sup>; Tiago Antônio de Oliveira Mendes<sup>11</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq, FAPEMIG e CAPES

<sup>2</sup>Mestre em Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Viçosa-UFV, lizandra.figueiredo@ufv.br

<sup>3</sup>Doutora em Genética e Melhoramento, UFV, denia\_pires@hotmail.com

<sup>4</sup>Mestre em Genética e Melhoramento, UFV, samilalcastro@gmail.com

<sup>5</sup>Doutor em Bioquímica Aplicada, UFV, alex.gazolla@live.com

<sup>6</sup>Graduando de Bioquímica, UFV, luizvinicius01@gmail.com

<sup>7</sup>Doutora em Microbiologia Agrícola, UFV, nimvieira@gmail.com

<sup>8</sup>Professor, DSc, Departamento de Microbiologia, UFV, hcmantovani@gmail.com

<sup>9</sup>Professor, PhD, Departamento Fitopatologia, UFV, Viçosa, zambolim@ufv.br.

<sup>10</sup>Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br

<sup>11</sup>Professor, DSc, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV, tiagomgmendes@yahoo.com.br

**RESUMO:** A produção mundial de café tem sido profundamente afetada pela ferrugem do cafeeiro, doença causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. Apesar do Híbrido de Timor 832/2, um híbrido natural de *Coffea arabica* e *C. canephora* resistente à ferrugem, ser uma importante fonte de genes para programas de melhoramento genético, o mecanismo associado à resistência incluindo a regulação do metabolismo durante a infecção é pouco conhecido. Reconstruímos o primeiro modelo metabólico em escala genômica (GEM) para café e a análise do balanço de fluxo (FBA), após a integração de dados de transcriptômica, sugeriu o acúmulo de glicerol-3-fosfato (G3P) na via glicolítica do Híbrido de Timor. A quantificação de G3P nos cultivares em estudo confirmou o acúmulo previsto. O tratamento de plantas suscetíveis com glicerol 3% antes da inoculação do fungo aumentou a concentração de G3P e reduziu os sintomas da doença. Esses resultados destacam o G3P e o metabolismo primário de carboidratos como importante via de resistência à ferrugem do cafeeiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hemileia vastatrix*, modelos metabólicos, glicerol-3-fosfato.

## TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF METABOLISM INDUCES GLYCEROL-3-PHOSPHATE RESISTANCE TO COFFEE RUST

**ABSTRACT:** The worldwide coffee's production has been deeply affected by coffee leaf rust, disease caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix*. Despite the rust resistant Timor Hybrid 832/2, a natural hybrid of *Coffea arabica* and *C. canephora*, be an important source of genes for breeding programs, the mechanism associated to resistance including the regulation of metabolism during infection is little known. Here, we reconstructed the first genome-scale metabolic model (GEM) for coffee and the flux-balance analysis (FBA) after transcriptomic data integration suggested glycerol-3-phosphate (G3P) accumulation in Timor Hybrid's glycolytic pathway. The G3P quantification in cultivars under study confirmed the predicted accumulation. Treatment of susceptible plants with glycerol 3% before fungus inoculation increased G3P concentration and reduced disease symptoms. These results highlight G3P and the primary carbohydrate metabolism as an important pathway of resistance to coffee leaf rust.

**KEY WORDS:** *Hemileia vastatrix*, metabolic model, glycerol-3-phosphate.

## INTRODUÇÃO

O café é uma importante commodity internacional e o Brasil é o seu maior produtor seguido por Vietnã e Colômbia (Kovalcik *et al.*, 2018). As espécies mais cultivadas são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo a primeira responsável por cerca de 70% da produção mundial (Davis *et al.*, 2011). Em algumas culturas, a produção de café sofre grandes perdas (Talhinhas *et al.*, 2017) e um fator importante é a ocorrência de pragas e doenças. A principal doença que afeta a produção de café no mundo é a ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. Em condições ambientais favoráveis à infecção, a doença pode promover perdas de até 50% na produção (Zambolim, 2016). O Híbrido de Timor 832/2, um híbrido natural de *C. arabica* e *C. canephora*, é uma variedade resistente a *H. vastatrix* e tem sido uma importante fonte de genes para programas de melhoramento. No entanto, o alto potencial adaptativo do fungo e a pressão seletiva causada pelo uso de cultivares resistentes culminaram no surgimento de várias raças fisiológicas capazes de superar a resistência obtida por meio de métodos clássicos de melhoramento (Bettencourt, 1981; Capucho *et al.*, 2012; Barka *et al.*, 2017, Silva *et al.*, 2006). No presente trabalho, utilizamos uma nova abordagem para estudar a relação patógeno-hospedeiro, por meio da integração de dados genômicos e transcriptômicos para a construção do primeiro modelo metabólico para o café. A análise do balanço de fluxo (FBA) indicou acúmulo de

glicerol-3-fosfato (G3P) no cultivar resistente e este resultado foi validado por quantificação por LC-MS. Este metabólito foi descrito como indutor de resposta sistêmica adquirida (SAR) em plantas e é possível que tenha um papel semelhante na resistência do cafeeiro contra *H. vastatrix*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção de dados genômicos e transcriptômicos

O genoma de *Coffea canephora* (Denoeud *et al.*, 2014) foi obtido do Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>) e Florez e equipe (Florez *et al.*, 2017) forneceram os dados brutos do transcriptoma do cultivar suscetível *C.canephora* Caturra CIFC 19/1 e resistente a Timor Híbrido CIFC-832/2 durante a infecção experimental com *H. vastatrix* raça XXXIII.

### Construção do modelo

A reconstrução metabólica em escala genômica foi construída no servidor Modelo SEED (<http://modelseed.org/>), utilizando os parâmetros padrão do servidor. O modelo gerado foi manipulado com o software COBRAtoolbox (Schellenberger *et al.*, 2011) no MATLAB 2015a (The Mathworks, 2015), onde foi realizada a Análise de Balanço de Fluxo (FBA).

### Análise do transcriptoma e integração ao modelo

A qualidade dos dados brutos obtida da plataforma Miseq (Illumina) foi avaliada usando o software FastQC versão 0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Em seguida, os dados foram refinados com o software Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), onde foram retiradas as sequências de adaptadores, leituras e leituras muito pequenas com uma pontuação phred <15. As leituras restantes foram submetidas a uma nova análise de qualidade pelo FastQC. O genoma de referência de *C. canephora* foi indexado com o programa Bowtie2-build (Langmead *et al.*, 2009) e as leituras foram alinhadas no genoma com o software Tophat (Trapnell *et al.*, 2009). Os resultados foram usados para quantificar as transcrições e estimar a expressão diferencial de genes com o programa Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2010). Os genes e dados de fold-change foram integrados ao modelo baseado no genoma por meio do pacote GIMME (Becker & Palsson, 2008), disponível no software COBRAtoolbox do Matlab versão 2015a.

### Infecção experimental e quantificação de metabólitos

O cultivar resistente Híbrido de Timor CIFC-832/2 e o suscetível *C. arabica* cv. Caturra CIFC 19/1 foram transferidos para uma sala de aclimação, onde foram infectados com esporos da raça *Hemileia vastatrix* XXXIII. O controle foi realizado com folhas de ambas as cultivares sem infecção. Em cada planta, três folhas foram infectadas para a extração de metabólitos. Além do tempo zero imediatamente antes da infecção, as folhas foram coletadas às 12, 24 e 96 horas após a inoculação (hai). A extração foi feita conforme descrito por Lisec e grupo (Lisec *et al.*, 2006) com adaptações. Glicose, gliceraldeído-3-fosfato, glicerol-3-fosfato, citrato, fumarato e malato foram quantificados por LC-MS (Lu *et al.*, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a geração do modelo metabólito para *Coffea canephora*, utilizando o ModelSEED, foram encontrados 1140 genes, além de 1084 reações metabólicas e 1162 metabólitos, distribuídos em onze compartimentos subcelulares e espaço extracelular. Dentre estes, foram identificadas 19 vias do metabolismo primário (carboidratos, lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos), totalizando 214 reações únicas, cerca de 500 genes e 300 metabólitos únicos. Ao avaliar os gráficos de PCA e *heatmap* (Figura 1), é possível observar que as cultivares possuem perfil de expressão similar nas diferentes rotas em estudo para o tempo inicial (0 h). Em intervalos subsequentes, é comum observar diferenças principalmente às 12 e 24 horas após a inoculação (hai), onde a expressão genética de c24 (Caturra 24 hai) é mais semelhante a h12 (Timor Híbrido 12 hai) do que h24 (Timor Híbrido 24 hai). Para a maioria das vias metabólicas, o perfil h24 é distante de todas as outras amostras. Depois de 96 hai, os perfis de expressão ficam mais semelhantes novamente. A maioria das mudanças na expressão gênica associadas à via de carboidratos e ao ciclo de Krebs foram observadas após 12 e 24, indicando a existência de potenciais mecanismos de resistência induzidos pelo patógeno e associados ao metabolismo.

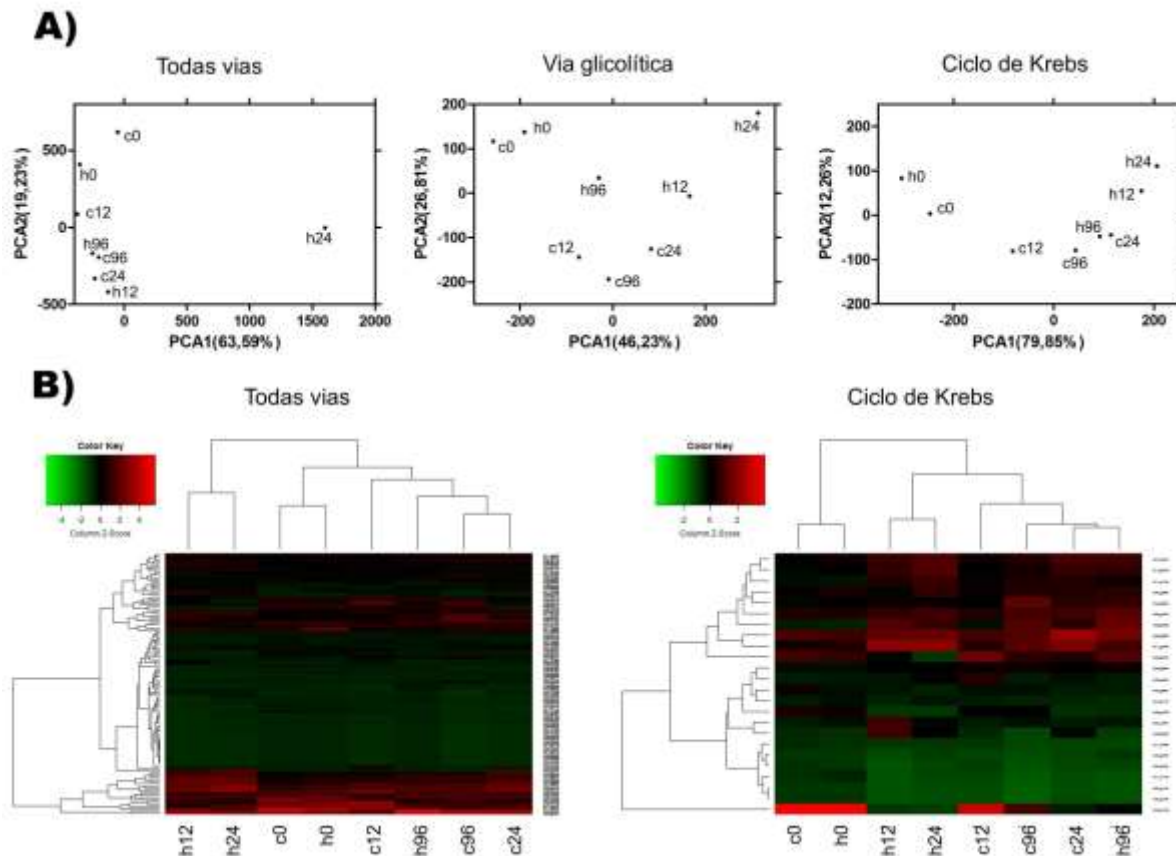


Figura 1: Análise comparativa do transcriptoma de cafeeiros suscetíveis (Caturra, c) e resistentes (Híbrido de Timor, h) infectados por *Hemileia vastatrix* após 12, 24 e 96 horas. A) PCA de todas as vias metabólicas primárias identificadas, via glicolítica e ciclo de Krebs. B) *Heatmaps* da via glicolítica e do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA).

Após a integração do transcriptoma, foram gerados quatro modelos contexto-específicos (0, 12, 24 e 96h). Na análise dos fluxos previstos para cada modelo, a via glicolítica se destacou por ter as maiores diferenças entre os tempos avaliados e o modelo original. Na reconstrução da via glicolítica, os fluxos previstos indicaram um desvio no metabolismo para a produção de glicerol-3-fosfato, principalmente em 12 e 24 hai. A quantificação dos metabólitos confirmou a tendência indicada pelas predições (Figura 2). A concentração de glicose foi significativamente reduzida no cultivar resistente em relação ao cultivar suscetível durante a infecção. A concentração de gliceraldeído-3-fosfato e glicerol-3-fosfato em plantas resistentes em 12 e 24 hai foi significativamente maior quando comparada ao cultivar suscetível. Para validar a importância do glicerol-3P no mecanismo de resistência do cafeeiro, plantas suscetíveis a *H. vastatrix* foram submetidas ao tratamento com duas concentrações de glicerol. Na quantificação de glicerol-3P, não houve diferença estatística entre controle e tratamento com glicerol 1% (v/v). No entanto, a concentração de glicerol-3P no tratamento com glicerol 3% (v/v) foi semelhante à observada no Híbrido de Timor (Figura 3A). Na infecção experimental realizada após os tratamentos com glicerol, observou-se que o glicerol 1% não foi capaz de retardar ou reduzir a infecção, enquanto as plantas que receberam tratamento com glicerol 3% apresentaram menor porcentagem de lesões (Figura 3B). Juntos, esses resultados sugerem que o glicerol-3P pode ser um mecanismo importante para a resistência do café à ferrugem. Atualmente, o glicerol-3P é apontado como um sinal móvel importante da resistência sistêmica adquirida em plantas (SAR) (Chanda et al, 2011; Yang et al, 2013). A SAR é caracterizada por uma resposta que ocorre em toda a planta, não apenas no local da infecção, e pelo aumento da expressão de genes regulados pela patogênese (genes PR) (Mandal et al, 2011; Durrant & Dong, 2004). A aplicação de glicerol em folhas de cacau foi capaz de estimular a resistência contra o patógeno *Phytophthora capsici* (Zhang et al, 2014). Um estudo sobre a ferrugem do trigo mostrou que a aplicação de glicerol em folhas de trigo alguns dias antes da inoculação do fungo foi capaz de reduzir os sintomas da doença. Em contraste, a aplicação de glicerol no dia da inoculação ou após a inoculação não contribuiu para aumentar a resistência contra o patógeno (Li et al., 2016). Juntos, nossos resultados sugerem que as diferenças transcricionais entre plantas de café resistentes e suscetíveis durante a infecção por *H. vastatrix* resultam em uma remodelação metabólica que induz um mecanismo de resistência dependente de glicerol-3P.

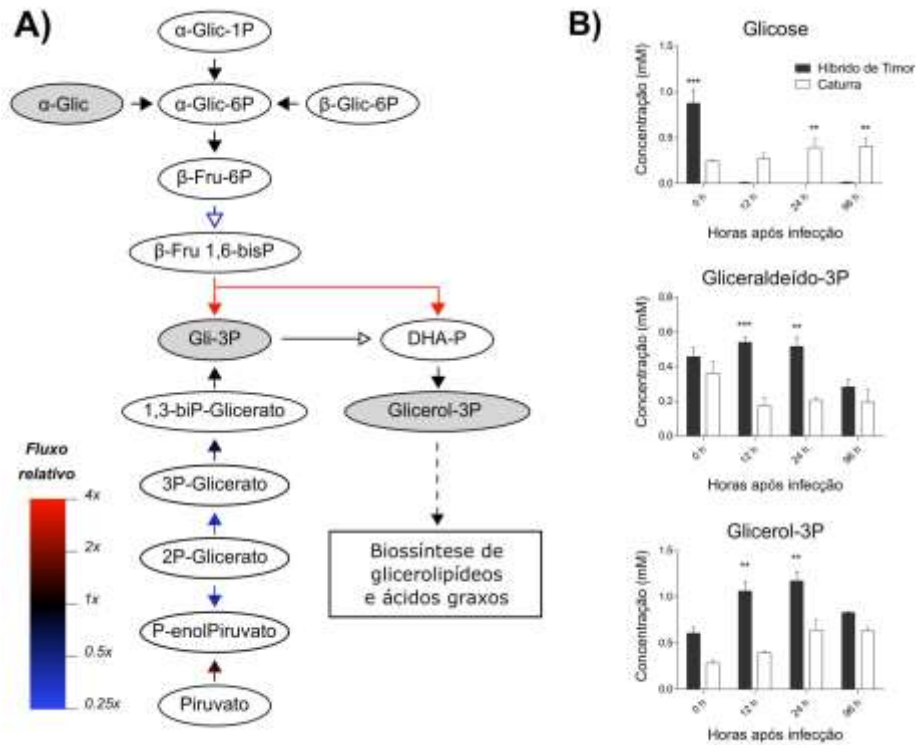


Figure 2: Análise de fluxo metabólico e quantificação de intermediários da via glicolítica em cafeeiros infectados por *H. vastatrix*. A) Reconstrução da via glicolítica baseada nos fluxos preditos após a integração do transcriptoma em 12 hai. Setas vazias representam reações que mudaram em relação ao modelo original. Os metabolitos de cor cinza foram quantificados. B) Quantificação de glicose, gliceraldeído-3P e glicerol-3P em 0, 12, 24 e 96 hai em cultivares de café resistentes (Timor Híbrido) e suscetíveis (Caturra). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA de dois fatores e teste de Bonferroni.

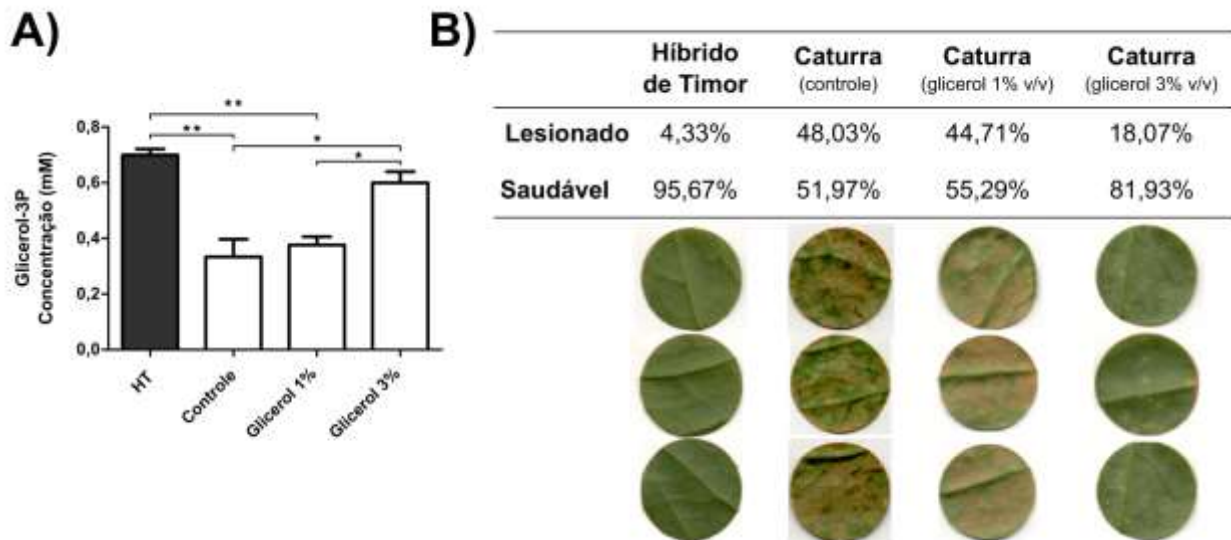


Figura 3: Análise do efeito do tratamento com glicerol em cafeeiros suscetíveis (Caturra) antes da infecção por *H. vastatrix*. A) Quantificação de glicerol-3P intracelular em cultivares resistentes (HT, Híbrido de Timor) e suscetíveis (Controle, Glicerol 1 e 3%, Caturra) tratadas com glicerol 12 hai. Os controles (HT e Controle) foram pulverizados com água. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA de dois fatores e teste de Bonferroni. B) Porcentagem de área saudável 30 dias após a infecção.

## CONCLUSÕES

1. No presente trabalho foi possível observar diferenças no metabolismo primário do Híbrido de Timor 832/2 e de *C. arabica* cv. Caturra CIFC 19/1 ao longo da infecção por *Hemileia vastatrix*.
2. As maiores alterações na expressão gênica ocorreram entre 12 e 24 horas após a inoculação sugerindo que a resposta apresentada pela planta neste período é determinante para o prosseguimento ou não da doença.
3. Além disso, a aplicação de glicerol 3% (v/v) antes da inoculação do fungo foi capaz de reduzir as lesões provocadas pela doença sendo um forte indício de que esse metabólito tem importante papel na resistência do cafeeiro contra a ferrugem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKA GD, CAIXETA ET, DE ALMEIDA RF, ALVARENGA SM, ZAMBOLIM L (2017) Differential expression of molecular rust resistance components have distinctive profiles in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. *European Journal of Plant Pathology* 149: 543–561.
- BETTENCOURT AJ (1981) Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de factores de resistência à *H. vastatrix* BERK & BR. para as principais cultivares de *Coffea arabica*. L. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/IICT): 93.
- CAPUCHO AS, ZAMBOLIM EM, FREITAS RL, HADDAD F, CAIXETA ET, ZAMBOLIM L (2012) Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 7: 189–191.
- CHANDA B, XIA Y, MANDAL MK, YU K, SEKINE K, GAO Q, SELOTE D, HU Y, STROMBERG A, NAVARRE D, KACHROO A, KACHROO P (2011) Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat Genet* 43:421–427.
- DAVIS AP, TOSH J, RUCH N, FAY MF (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 167, 357–377.
- DENOEUDE, F., *et al.* (2014) The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, v 5 p. 1181-1185.
- DURRANT WE, DONG X (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185–209.
- FLOREZ JC, MOFATTO LS, DO LIVRAMENTO FREITAS-LOPES R, FERREIRA SS, ZAMBOLIM EM, CARAZZOLLE MF, ZAMBOLIM L, CAIXETA ET (2017) High throughput transcriptome analysis of coffee reveals prehaustorial resistance in response to *Hemileia vastatrix* infection. *Plant Mol Biol* 95:607–623.
- KOVALCIK A, OBRUCA S, MAROVA I (2018) Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing* 110:104–119.
- LI Y, SONG N, ZHAO C, LI F, GENG M, WANG Y, LIU W, XIE C, SUN Q (2016) Application of Glycerol for Induced Powdery Mildew Resistance in *Triticum aestivum* L. *Frontiers in Physiology* 7: 413.
- MANDAL MK, CHANDA B, XIA Y, YU K, SEKINE K, GAO Q, SELOTE D, KACHROO A, KACHROO P (2011) Glycerol-3-phosphate and systemic immunity. *Plant Signaling & Behavior* 6:1871–1874.
- SILVA M DO C, VÁRZEA V, GUERRA-GUIMARÃES L, AZINHEIRA HG, FERNANDEZ D, PETITOT A-S, BERTRAND B, LASHERMES P, NICOLE M (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 119–147.
- TALHINHAS P, BATISTA D, DINIZ I, VIEIRA A, SILVA DN, LOUREIRO A, TAVARES S, PEREIRA AP, AZINHEIRA HG, GUERRA-GUIMARÃES L, VÁRZEA V, SILVA M DO C (2017) The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 18:1039–1051.
- YANG Y, ZHAO J, LIU P, XING H, LI C, WEI G, KANG Z (2013) Glycerol-3-Phosphate Metabolism in Wheat Contributes to Systemic Acquired Resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *PLoS ONE* 8:e81756.
- ZAMBOLIM L, (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop. Plant pathol.* 41: 1-8.
- ZHANG Y, SMITH P, MAXIMOVA SN, GUILTINAN MJ (2014) Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. *Molecular Plant Pathology* 16:27–37.