

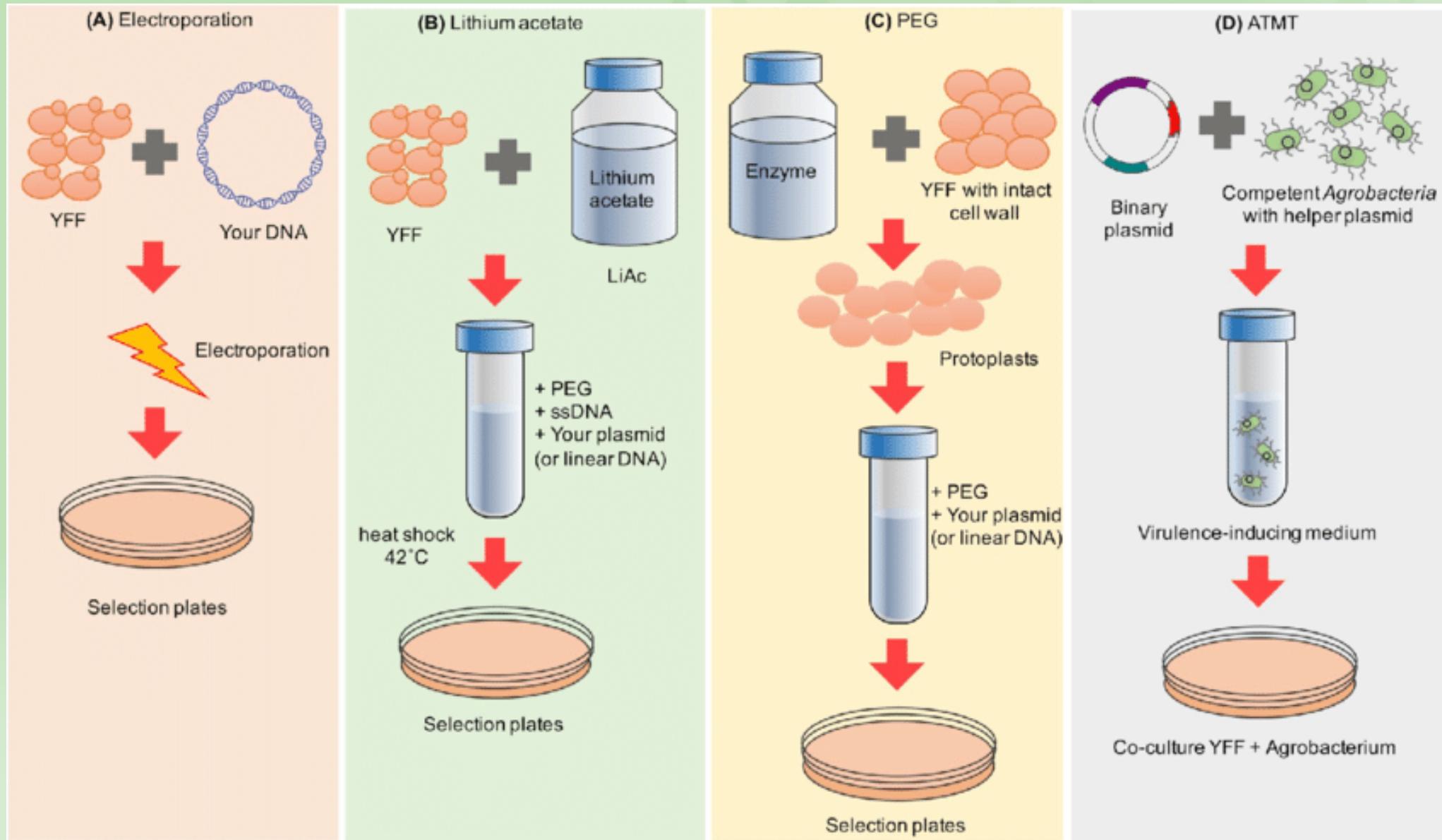
Métodos de Transformação Genética em Fungos

Profa. Dra. Chirlei Glienke
BIOGEMM-UFPR

Pré-requisitos para a transformação genética de fungos

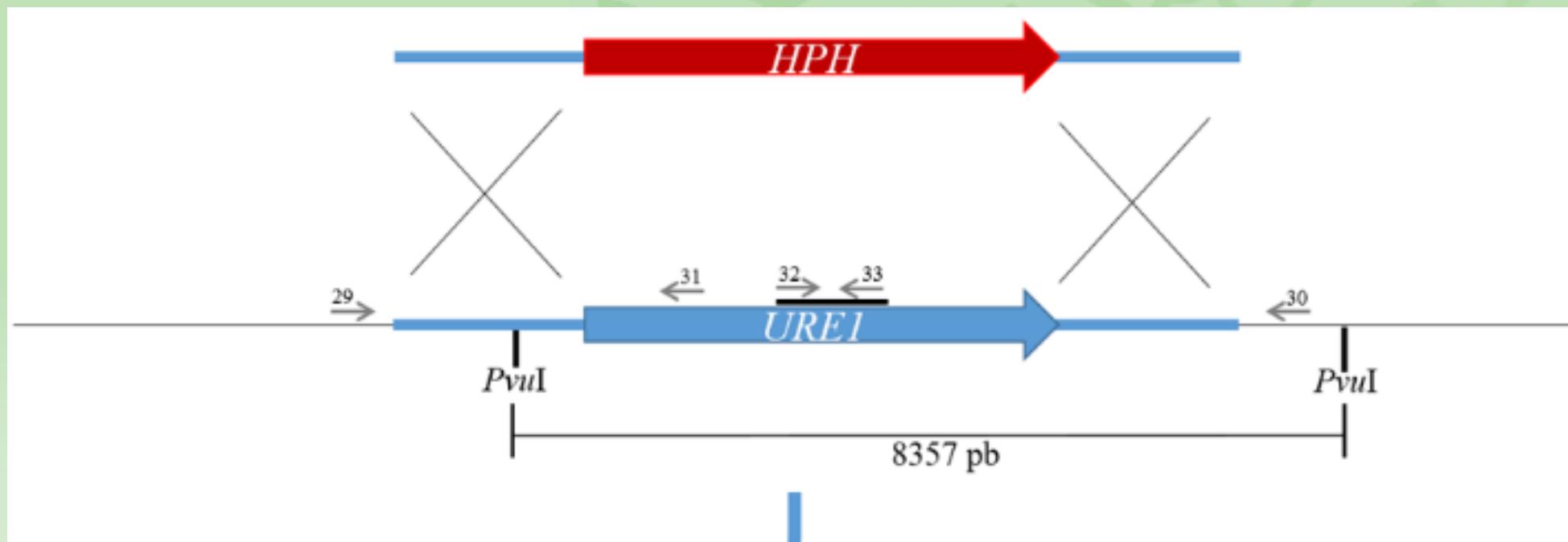
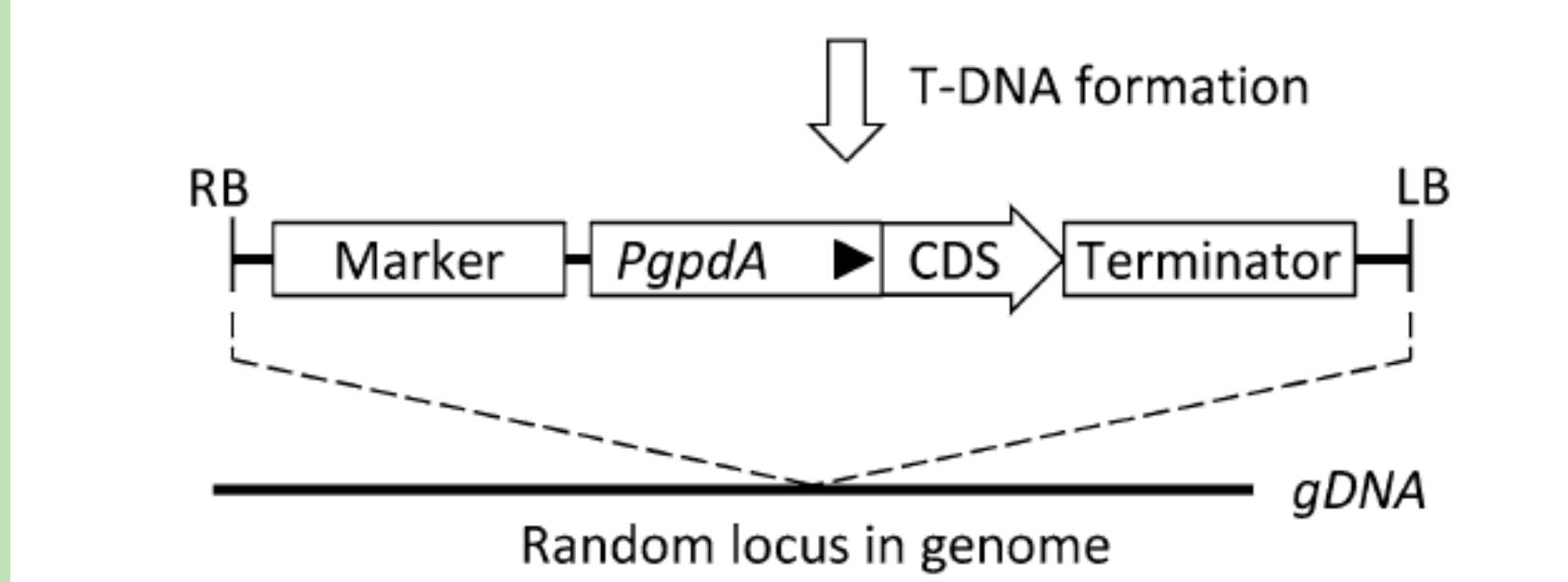
- (1) grandes quantidades de DNA de transformação puro
- (2) células altamente competentes de uma linhagem receptora que permite a passagem de DNA exógeno através da matriz da parede celular
- (3) um mecanismo que permite a entrada do DNA em transformação através da membrana plasmática
- (4) um mecanismo que permite que a entrega do DNA através da membrana nuclear
- (5) um mecanismo que expressa o DNA transformante (tanto integrado ao genoma do fungo ou mantido em um plasmídeo de replicação autônoma)
- (6) uma metodologia de recuperação e seleção que permita o crescimento e isolamento de transformantes positivos e estáveis

Principais métodos de transformação atualmente empregados



Principais métodos de transformação atualmente empregados

Transformation technique	Working Principle	Advantages	Limitations
Protoplast-mediated transformation (PMT)	Uses cell wall hydrolyzing enzymes with a combination of chemicals like PEG or calcium ions for DNA uptake [20, 38].	Effective in a wide number of filamentous fungi, can be used for hyphal tissues, spores, as well as germlings [29, 37].	The transformation rate is highly dependent on the lytic enzymes. Moreover, PEG/Ca sometime causes a toxic effect on the cell [22, 29].
Electroporation (EP)	An electric current creates permeability in the membrane, making it enable for the uptake of foreign genetic materials (DNA) [19, 41].	Easy to operate and less time-consuming. Highly effective for young mycelia, germinating, and conidia [48].	High voltage may be lethal to some fungal cell, while the precise mechanism for proper optimization is still unknown [49, 50].
<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation (AMT)	Ti plasmid from the <i>A. tumefaciens</i> , act as a binary vector. Transformation is attained by cocultivation with the fungus [38, 64].	Minimum possibility of cell death with no need of protoplast preparation. Applicable for both direct and indirect mutagenesis [23, 61].	The preparation of the binary vector relies on complicated and laborious operation process. Its efficiency is highly dependent on various parameters. [60, 68].
Biochemical transformation/particle bombardment (BT)	Genetic material is absorbed on to a gold or tungsten surface and injected inside the host cell by applying high pressure [52, 53].	Useful for those strains which are difficult to culture, also in which the mechanism of PMT is not fully understood [56, 57].	Robust technology is required. Moreover, it does not apply to targeted and specified mutagenesis [29, 45].
Shock waves-mediated transformation (SWMT)	High-intensity underwater shock waves, induces collapse of a cell with microbubbles containing genetic material [70, 71].	A novel approach claimed to transform any type of conidia, intact spores, and mycelia [68, 70].	Transformation ration is dependent on high cell density [71]. Noneconomical and require adequate amount of plasmid <i>in vitro</i> [38, 50, 72].

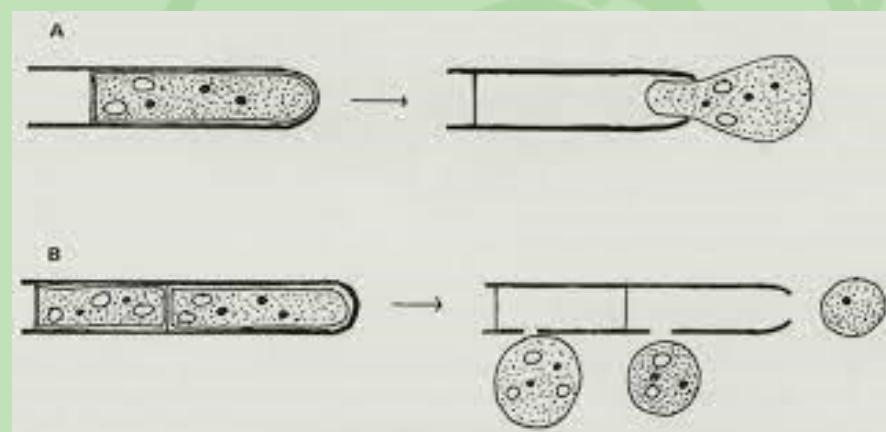
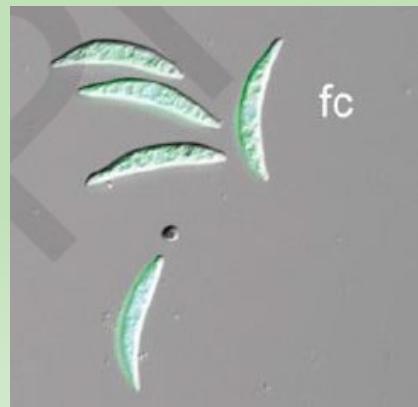


Transformação de protoplastos

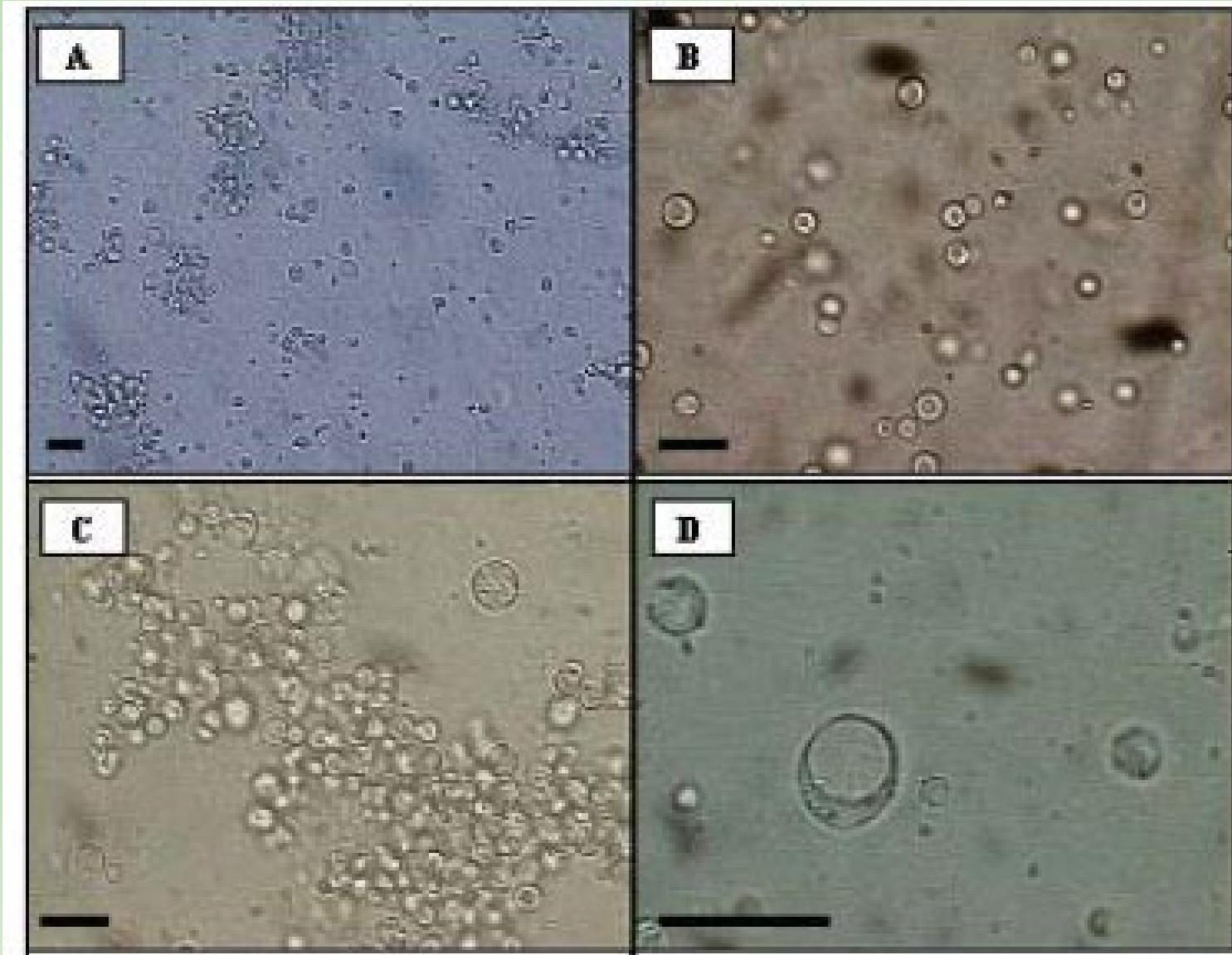
- Primeira transformação em 1978 em *Saccharomyces cerevisiae*
- Necessita do uso de enzimas degradadoras da parede celular (Novozym 234, celulases, glucanases, chitinases,etc) combinando com:
 - Agentes químicos (polietileno glico ou íons de cálcio)
 - Físicos (eletroporação)

Transformação de protoplastos

- Produção a partir de micélio ou esporos (depende da parede celular de cada estrutura e cada espécie)
 - *Colletotrichum abscissum*: Esporos germinados (hifas bem jovens)
 - *Colletotrichum graminicola*: Esporos ovais (menos resistentes do que os falcados)



Protoplastos (esferoplastos) de fungos



Protoplastos

- Protoplastos autênticos:
 - são células esféricas, sem paredes celulares, rodeadas por membrana plasmática,
 - são liberados deixando paredes de células "fantasmas" vazias, e
 - são viáveis, mas osmoticamente sensíveis e, portanto, requerem um estabilizador osmótico.
- Esferoplastos:
 - são também osmoticamente sensíveis e a presença de remanescentes da parede celular podem ser favoráveis para iniciar a regeneração da parede celular
 - 2 a 4 horas de incubação com enzimas líticas
 - Testar a protoplastização acrescentando água em solução de protoplastos em lâmina

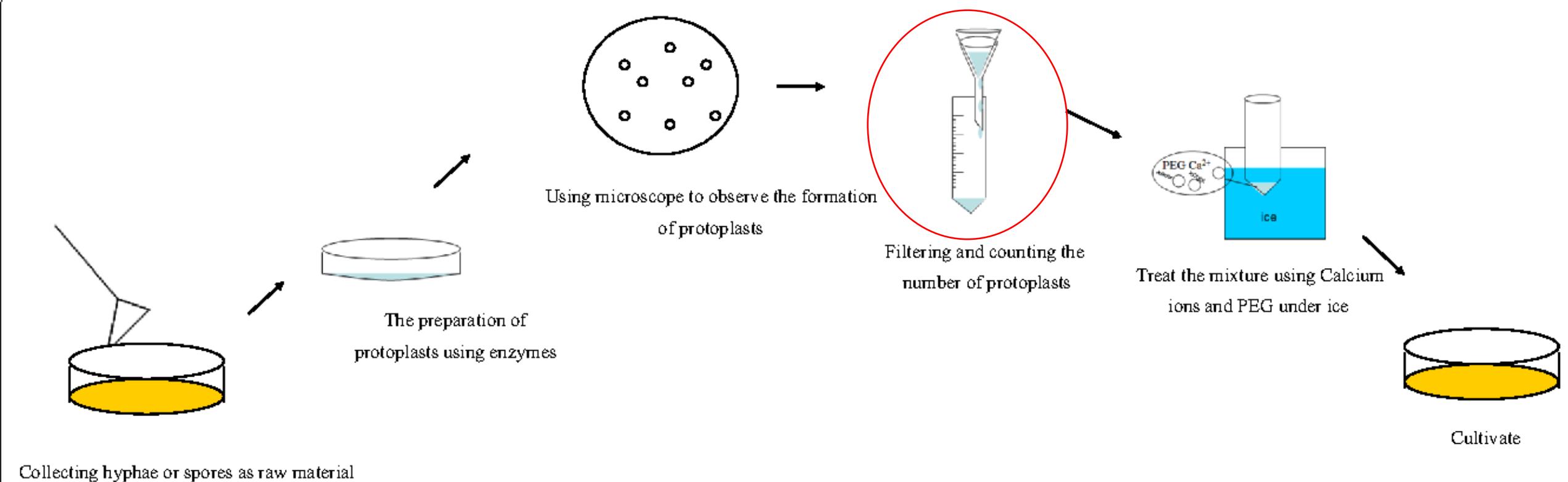
Protoplastos

- Produção e manutenção em tampão estabilizador osmótico:
 - KCl 0,7 M
 - sacarose ou sorbitol de 0,8-1,2 M
- Protoplastos estabilizados em tampão: podem ser congelados e armazenados a -70 a-80 ° C (verificar a viabilidade para cada fungo)
- O tempo de incubação em gelo: 15 e 30 min para a maioria dos fungos - permite a ligação de DNA aos protoplastos

Protoplastos

- A transformação é mediada por polietilenoglicol (PEG) na presença de 50 mM CaCl₂ e tampão MOPS 10 mM
- O PEG líquido (peso molecular 1.000-8.000, normalmente 4.000 ou 6.000) é misturado com o DNA plasmídial
- PEG na presença de íons Ca²⁺, o DNA é preso e introduzido nos protoplastos, provavelmente por endocitose induzida por PEG
- Regeneração das paredes celulares em meio complexo com ou sem pressão de seleção:
 - Regeneração direta na presença do agente seletivo
 - Regeneração inicialmente na ausência do agente de seleção

Transformação de protoplastos

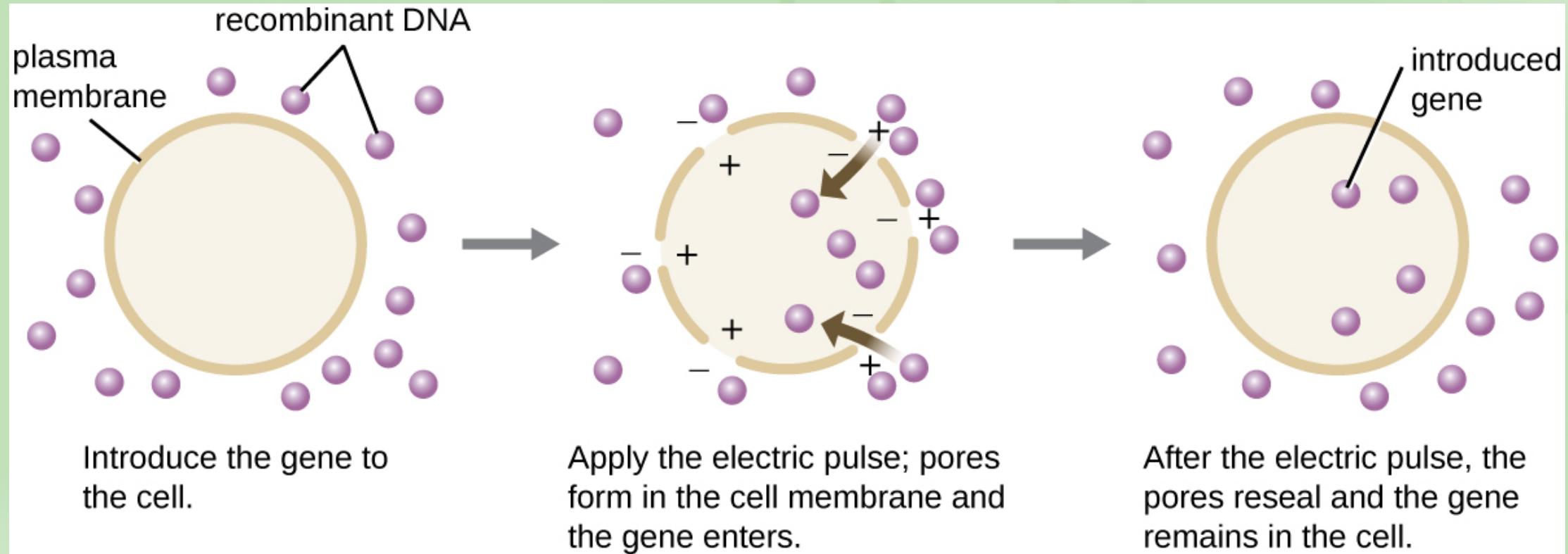


Organism	Pre-growth			Lysis of cell wall					References
	Medium	Time	T	Enzymes	Time	T	Osmotic stabilizer		
<i>N. crassa</i>	CM+1.5 %S	4–6 h	25–30 °C	Glusulase/Novozyme 234	1 h	30 °C	Sorbitol	Case et al. (1979), Vollmer and Yanofsky (1986), Mautino et al. (1996)	
<i>A. niger</i>	MM+Y+C+G+U	12–20 h	30 °C	Glucanex	1–2.5 h	30–37 °C	Sorbitol/NaCl/MgSO ₄	De Bekker et al. (2009), Mania et al. (2010), Azizi et al. (2013)	
<i>A. nidulans</i>	MM+Y+C+G+U	10 h	30 °C	Glucanex	2 h	30 °C	Sorbitol/NaCl/MgSO ₄	Mania et al. (2010)	
<i>P. chrysogenum</i>	PDB	24 h	30 °C	Novozyme 234	2 h	RT	NaCl	Hamlyn et al. (1981), Flanagan et al. (1990), Sukumar et al. (2010)	
<i>T. harzianum</i>	PDB	16 h	28 °C	Novozyme 234	3 h	28 °C	Sorbitol/KCl	Balasubramanian and Lalithakumari (2008), Savitha et al. (2010)	
<i>T. atroviride</i>	PDB	15–16 h	28 °C	Lysing enzymes for <i>T. harzianum</i>	2 h	30 °C	Sorbitol	Cardoza et al. (2006)	
<i>T. reesei</i>	M	16 h	28 °C	Lysing enzymes for <i>T. harzianum</i>	2 h	28–30 °C	Sorbitol	Gruber et al. (1990)	
<i>C. cinereus</i>	Y+M+G	48 h	37 °C	Defined mixture cellulases+chitinases	2 h	30–37 °C	Sucrose/KCl/Mannitol	Binninger et al. (1987)	
<i>U. maydis</i>	Y+P+S	18 h	30 °C	Novozyme 234	^a	30 °C	Sorbitol	Waard (1976), Eppendorf (2002)	
<i>F. graminearum</i>	Y+P+D	12–16 h	RT	Driselase and lysing enzymes	^a	30 °C	Sorbitol	Goswami (2012)	
<i>F. pallidoroseum</i>	PDB	18 h	25 °C	Lysing enzymes for <i>T. harzianum</i>	3 h	30 °C	KCl	Naseema et al. (2008)	
<i>S. cerevisiae</i>	Y+P+D	4 h	30 °C	Zymolase	20–90 min	30 °C	Sorbitol	Ezeronye and Okerentugba (2001), Tomo et al. (2013)	
<i>Ozonium</i> sp.	Y+P+salts (CaCl ₂ +MgSO ₄)	36 h	28 °C	1.5 % lywallzyme + 0.5 % snailase + 1.5 % cellulose + 0.5 %lysozyme	3 h	30 °C	NaCl	Zhou et al. (2008)	

CM complete medium, MM minimal medium, Y yeast extract, C casaminoacids, S sucrose, G glucose, RT room temperature, U uridine, M malt extract, P bactopeptone, D dextrose, PDB potato dextrose broth

^aProtoplast formation is checked in the microscope, determining the time needed for digestion of cell wall

Eletroporação (protoplastos ou esporos)



Eletroporação - condições para *Neurospora crassa*

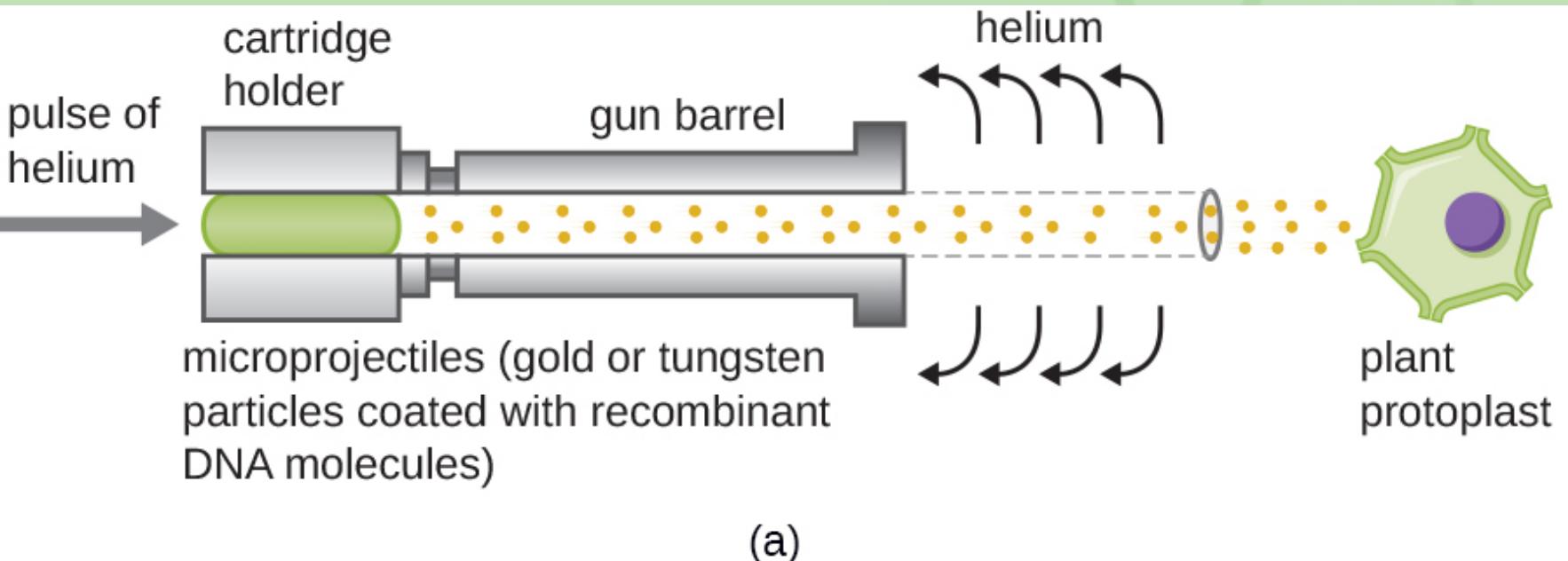
Conditions	Untreated	Pretreated germinated conidia with β -glucuronidase (1 mg/ml)
Capacitance (μ F)	25.0	25.0
Field strength (KV/cm) ^a	12.5	12.5
Time constant (msec)	5.0	5.0
Number of conidia	5.8×10^6	6.3×10^6
Cell viability (%) ^b	57.0	54.0
Transformation efficiency	5.5	41.0

^aField strength of 12.5 KV/cm was generated by directing 2.5 KV of electric discharge from 25 μ F capacitor through a pulse controller (set at 200 Ω in parallel with the sample) and then through the cuvette with 0.2 cm electrode gap

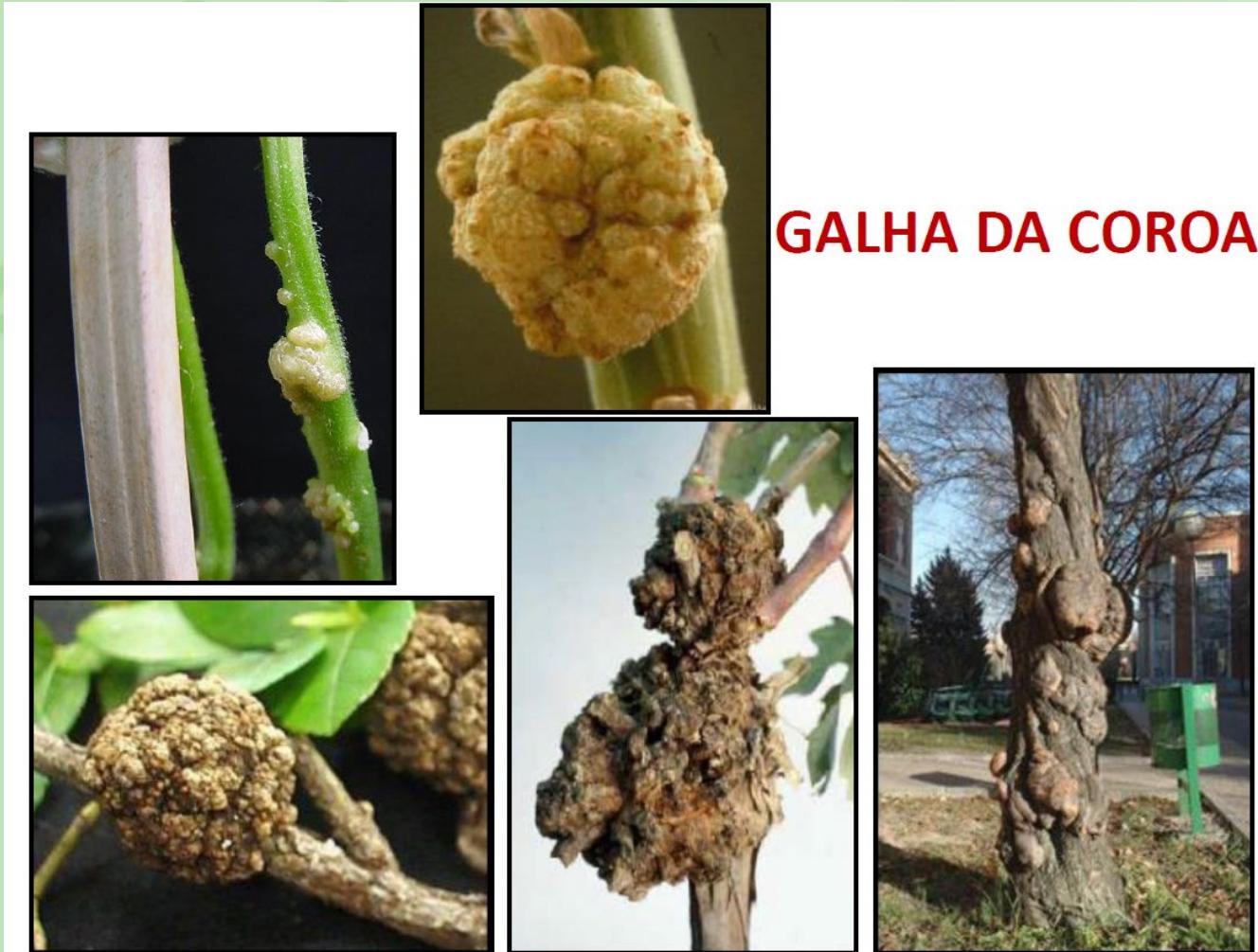
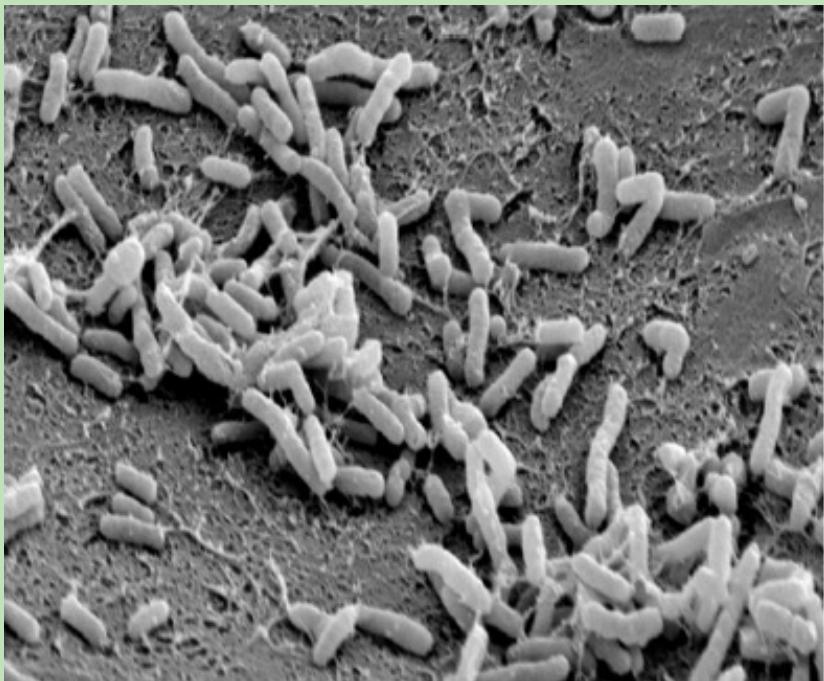
^bPercentage of conidia surviving electroporation treatment

^cStable transformants per μ g of DNA

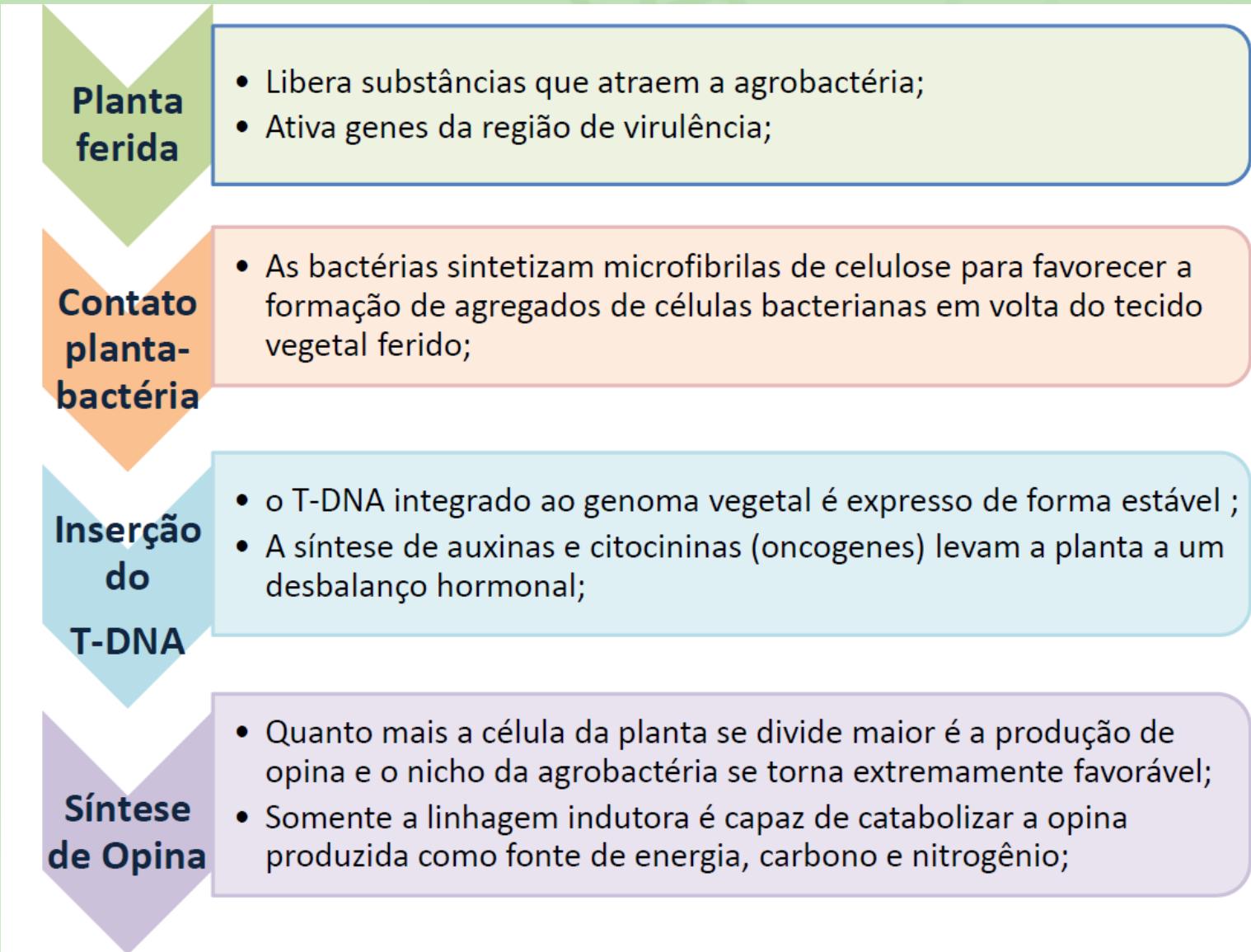
Bombardeamento de partículas



Agrobacterium tumefaciens

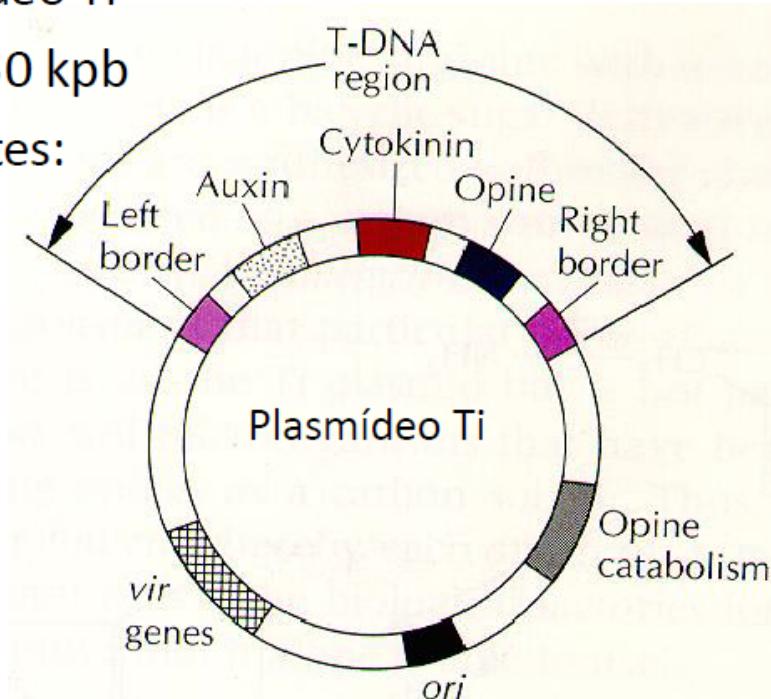


Agrotransformação em plantas

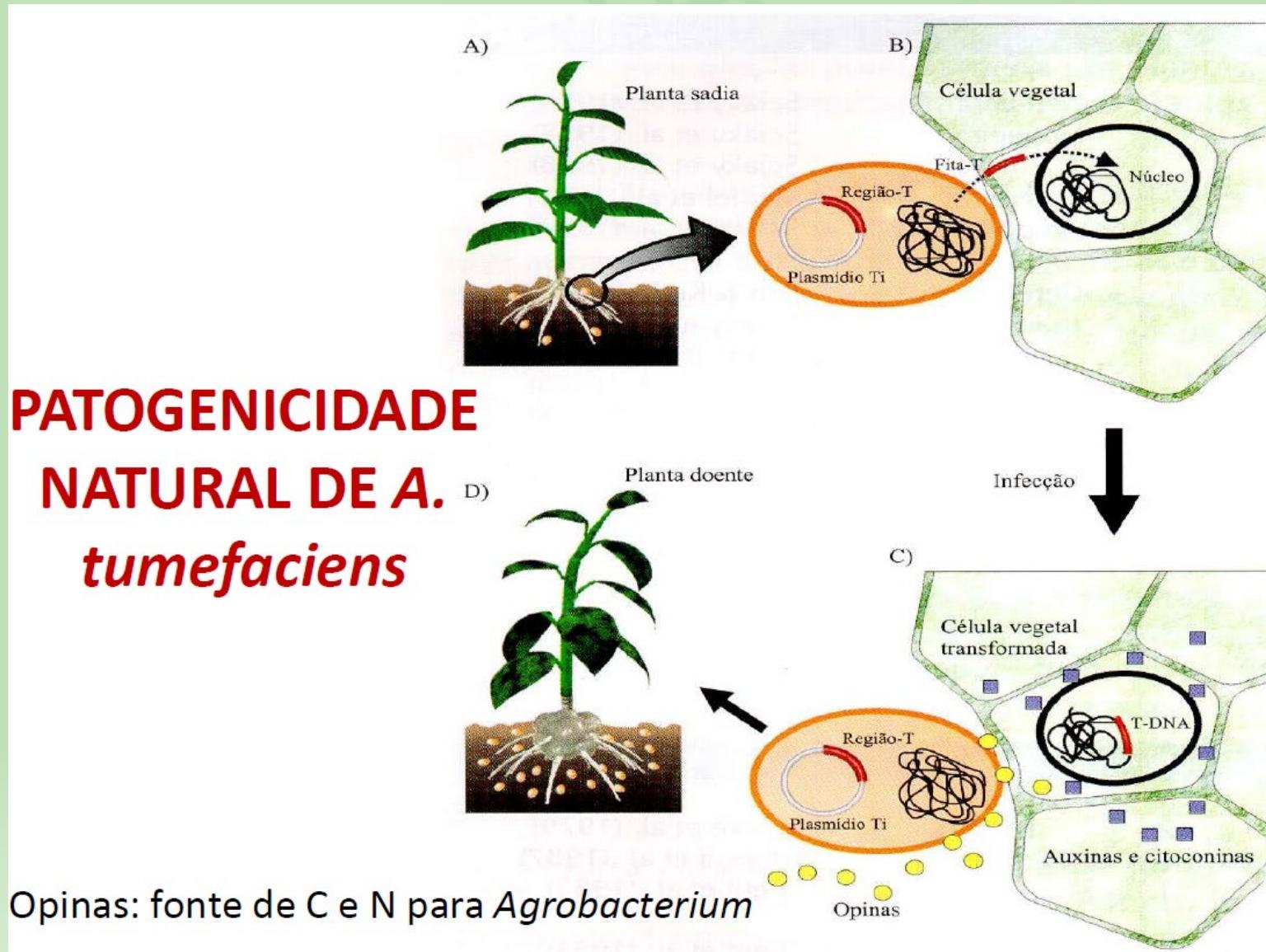


Agrobacterium tumefaciens

- Infecção natural – fermentos;
- Quimiotactismo - fenóis, açúcares, amino ácidos;
- Expressão de genes da bactéria transferidos e integrados de forma estável ao genoma vegetal
- Formação de tumores;
- Capacidade tumorogênica - plasmídeo Ti =
 - **Ti = Tumor Inducing** - 150 a 250 kpb
- Regiões do plasmídeo Ti importantes:
 - **região T-DNA - Transfer DNA**
 - **região vir - genes de virulência**

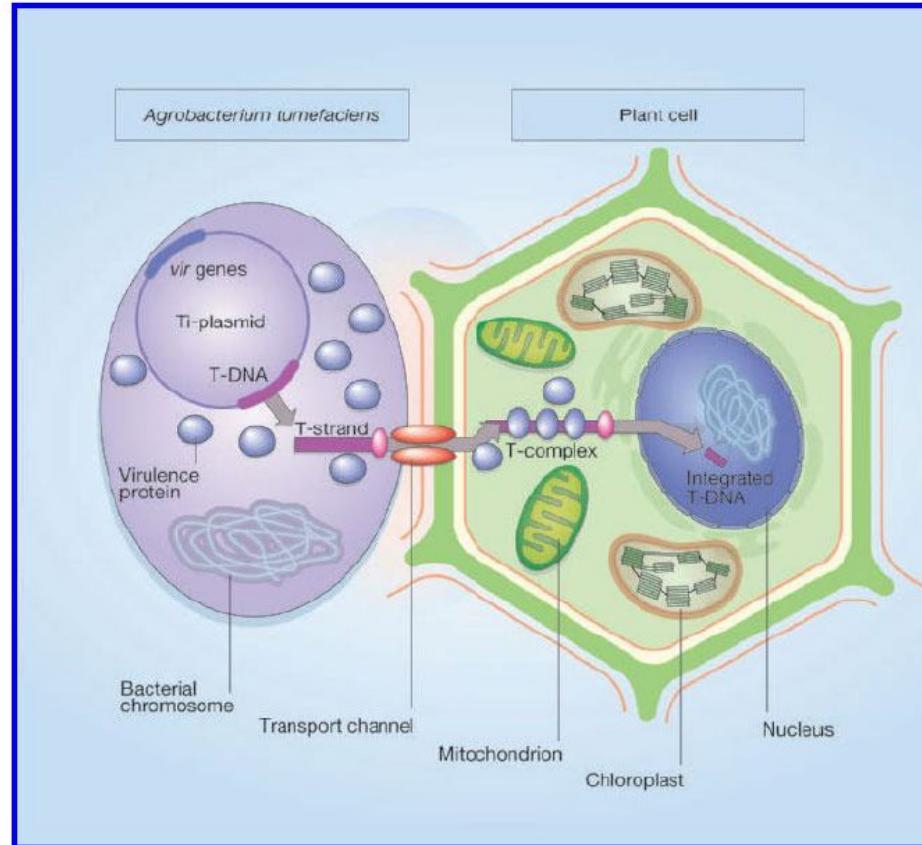


Agrotransformação em plantas



Agrotransformação em plantas

PATOGENICIDADE NATURAL DE A. *tumefaciens*



Agricultural biotechnology: Gene exchange by design (*Nature* 433, 583-584 (10 February 2005)

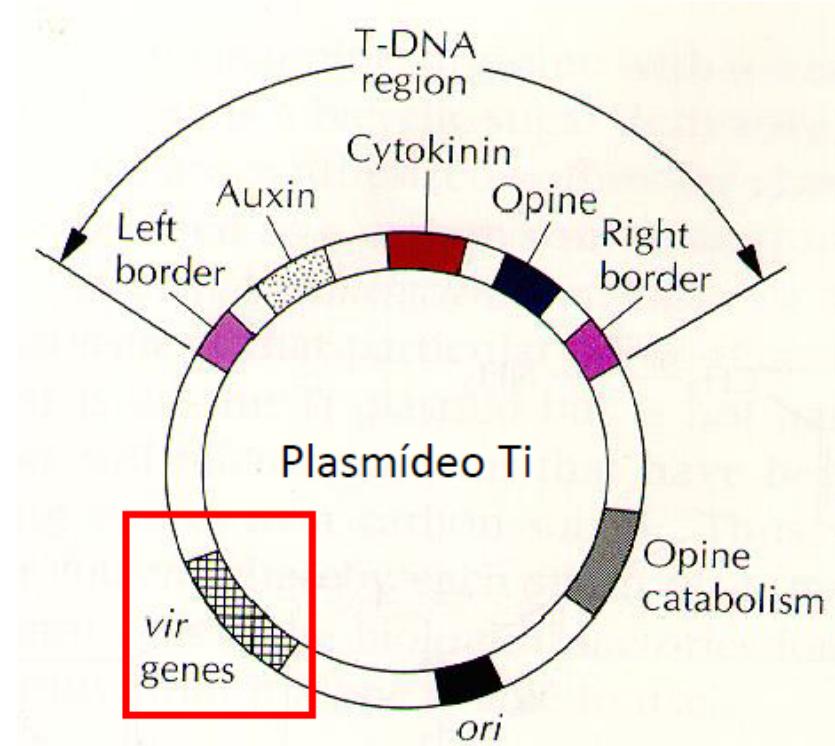
Agrotransformação

Região *vir*

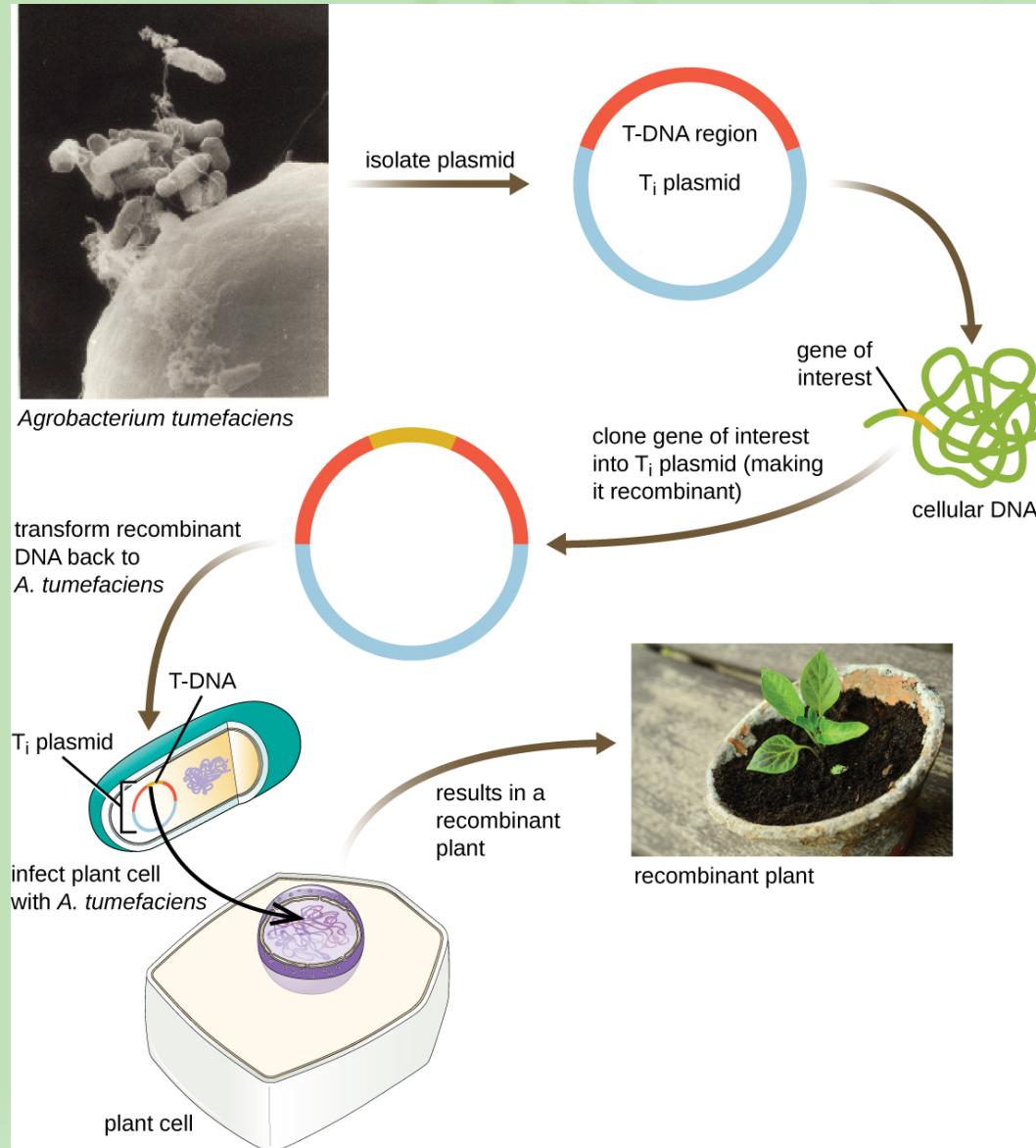
- genes responsáveis pela síntese de enzimas da transferência e integração do T-DNA

Região *vir* é suficiente para transferir qualquer T-DNA - reconhece bordas

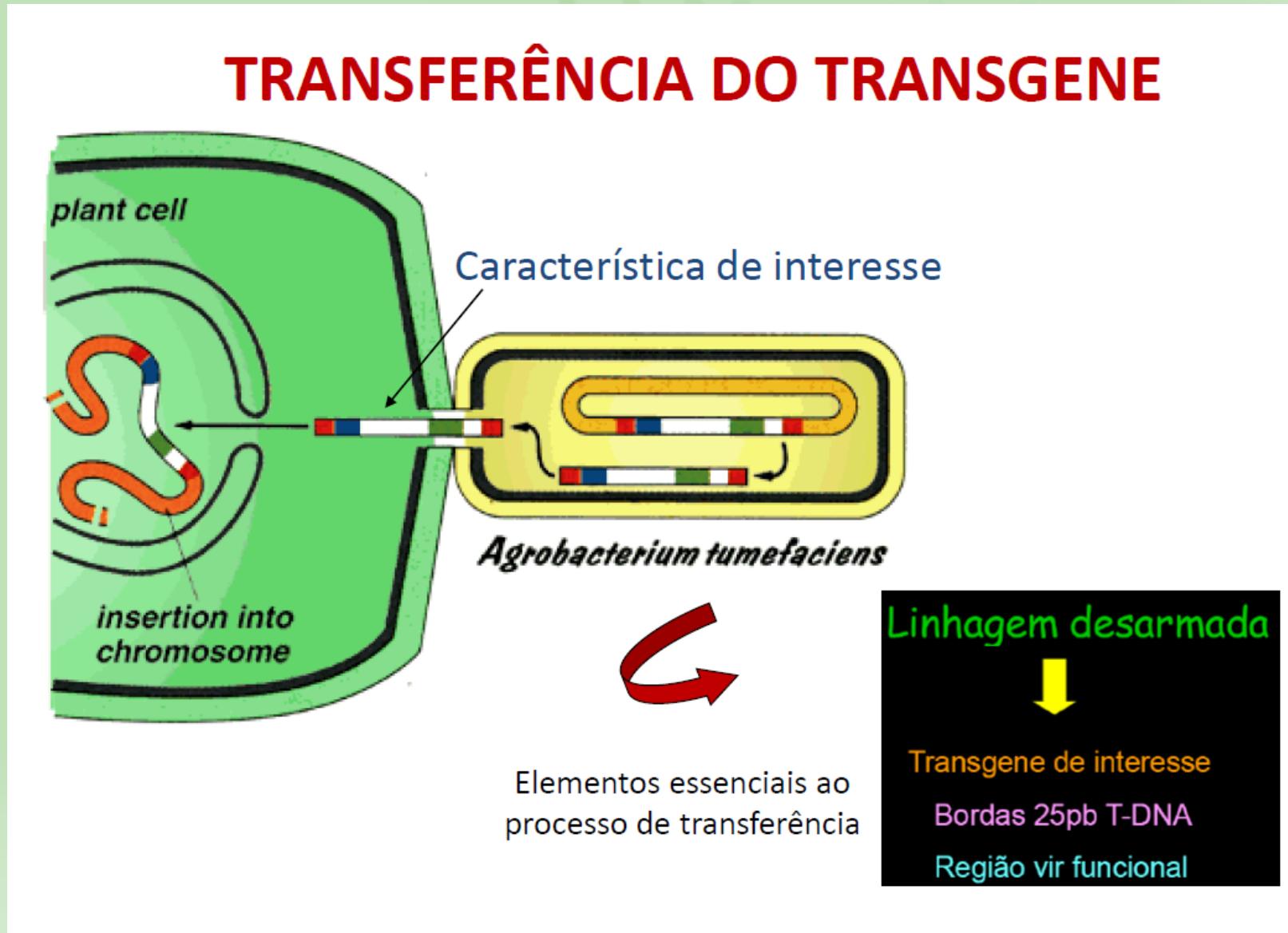
Gene indutores de tumores podem ser retirados e substituídos no T-DNA



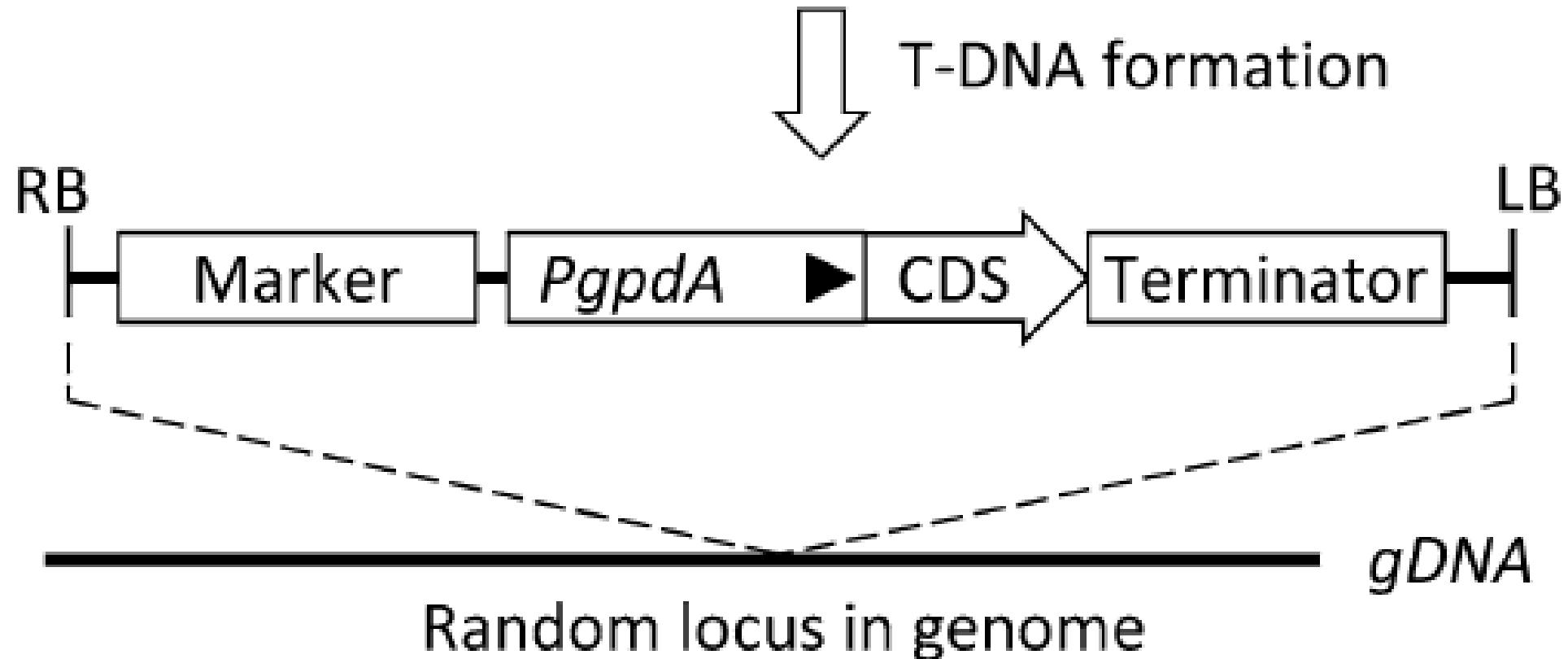
Agrotransformação



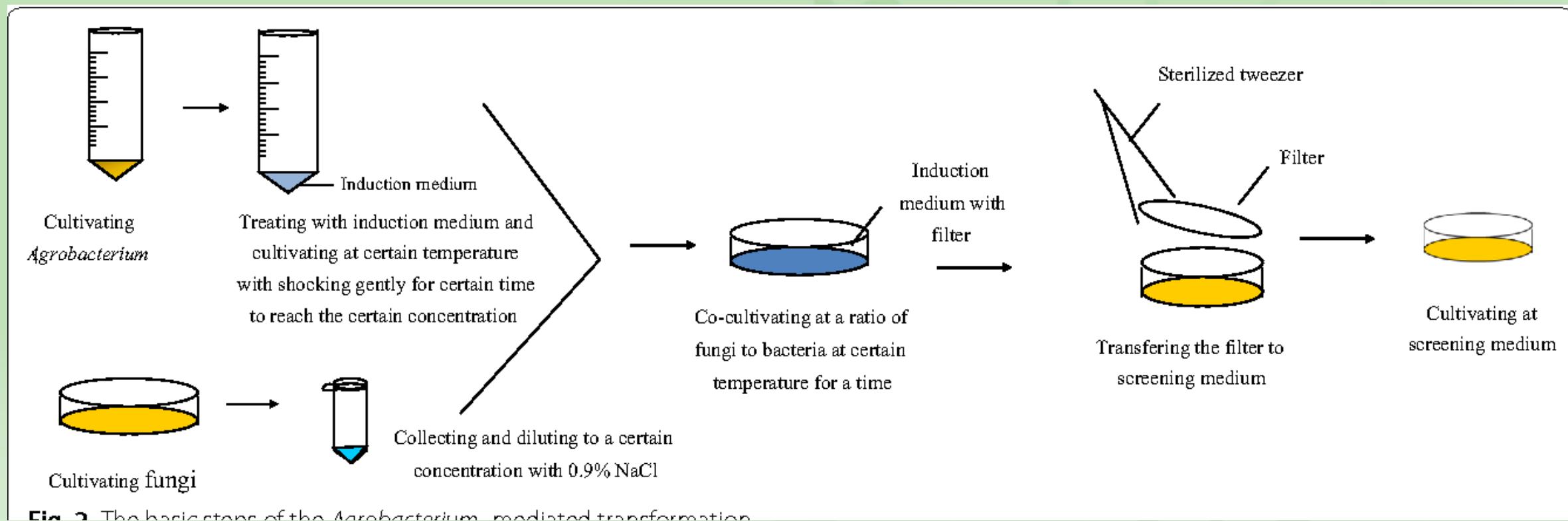
Agrotransformação



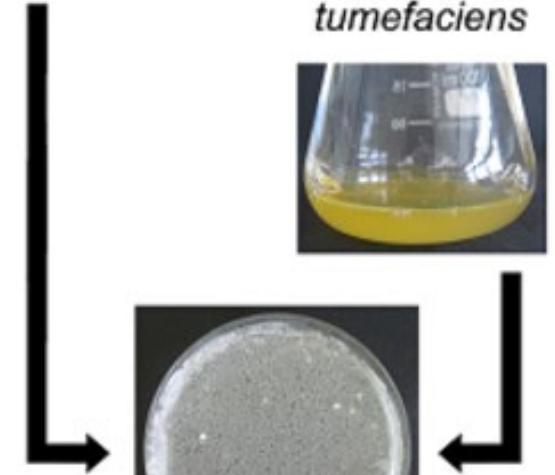
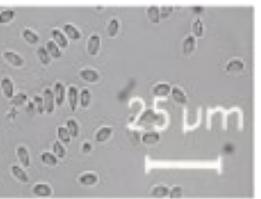
Inserção aleatória do T-DNA



Agrotransformação



*Gliocladium
roseum*

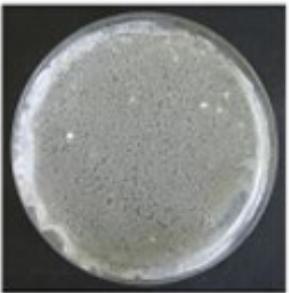


Preparation of fungal recipient

*Agrobacterium
tumefaciens*



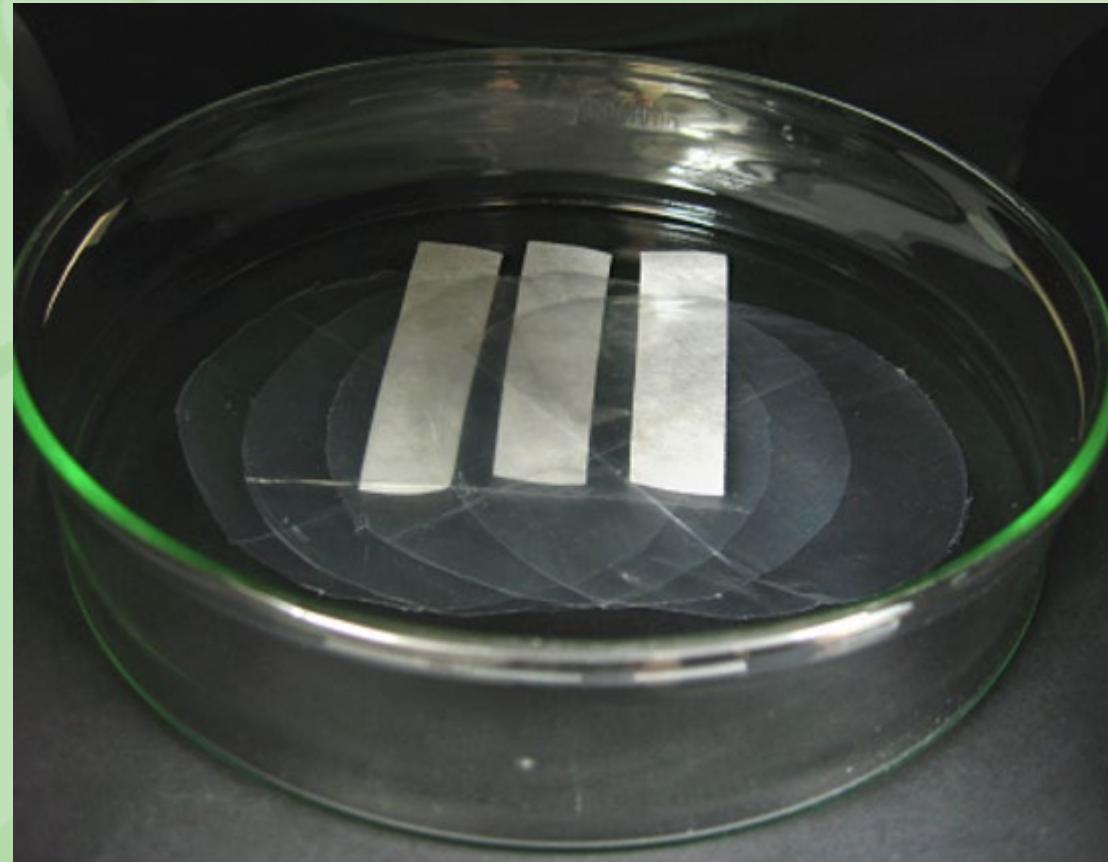
Induction of *Agrobacterium
tumefaciens*



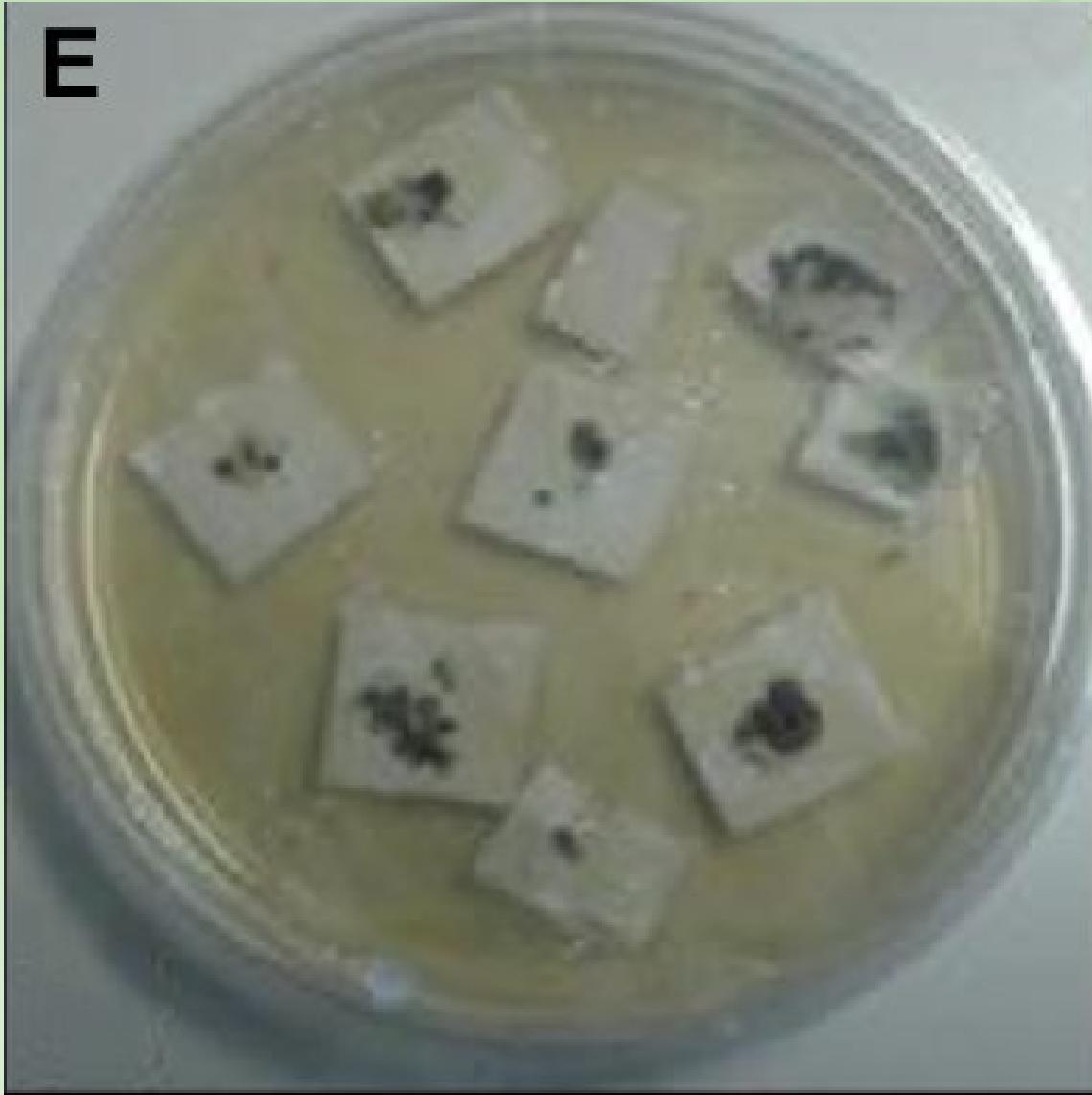
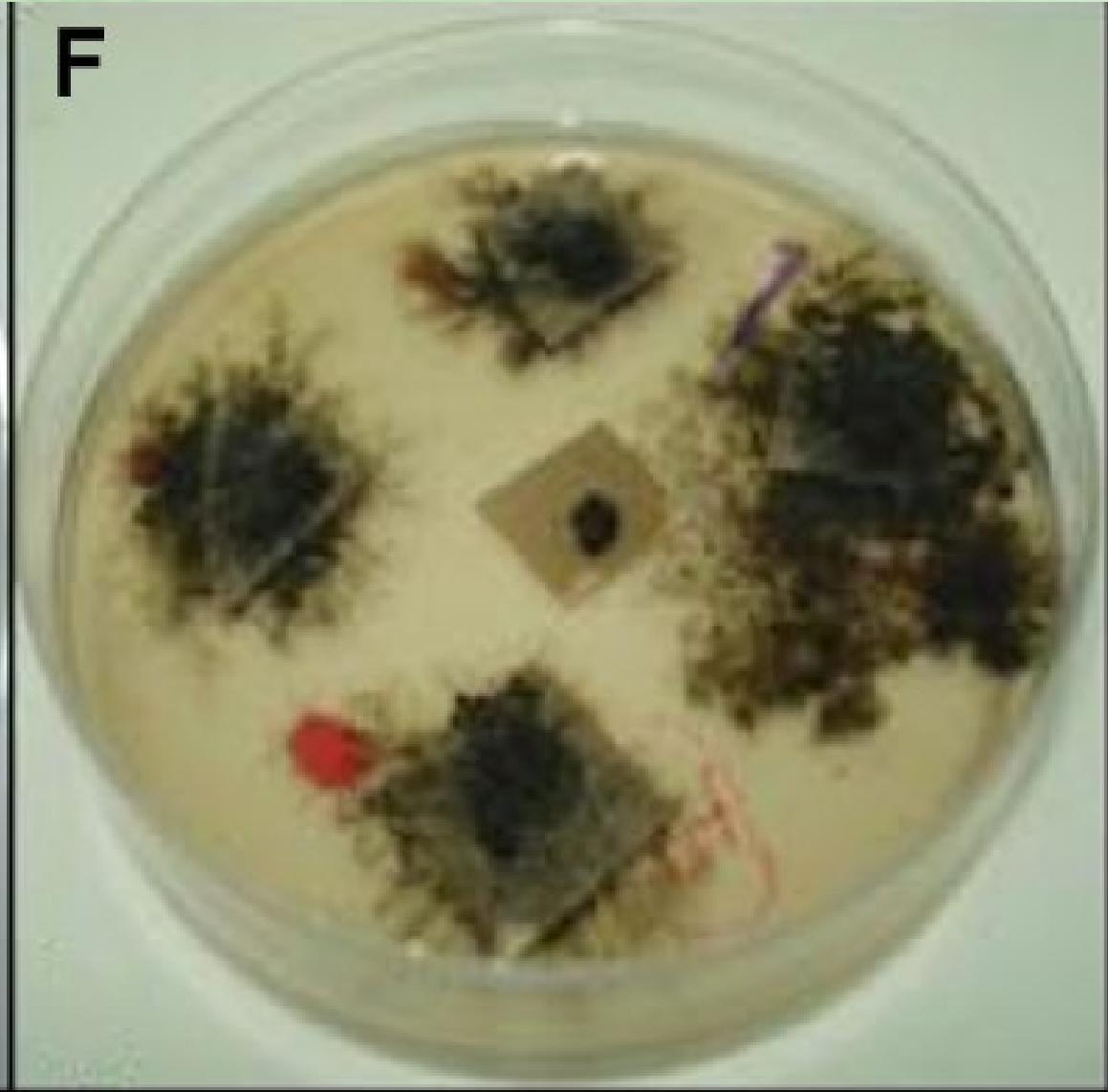
Co-cultivation of *Agrobacterium
tumefaciens* with fungal spores



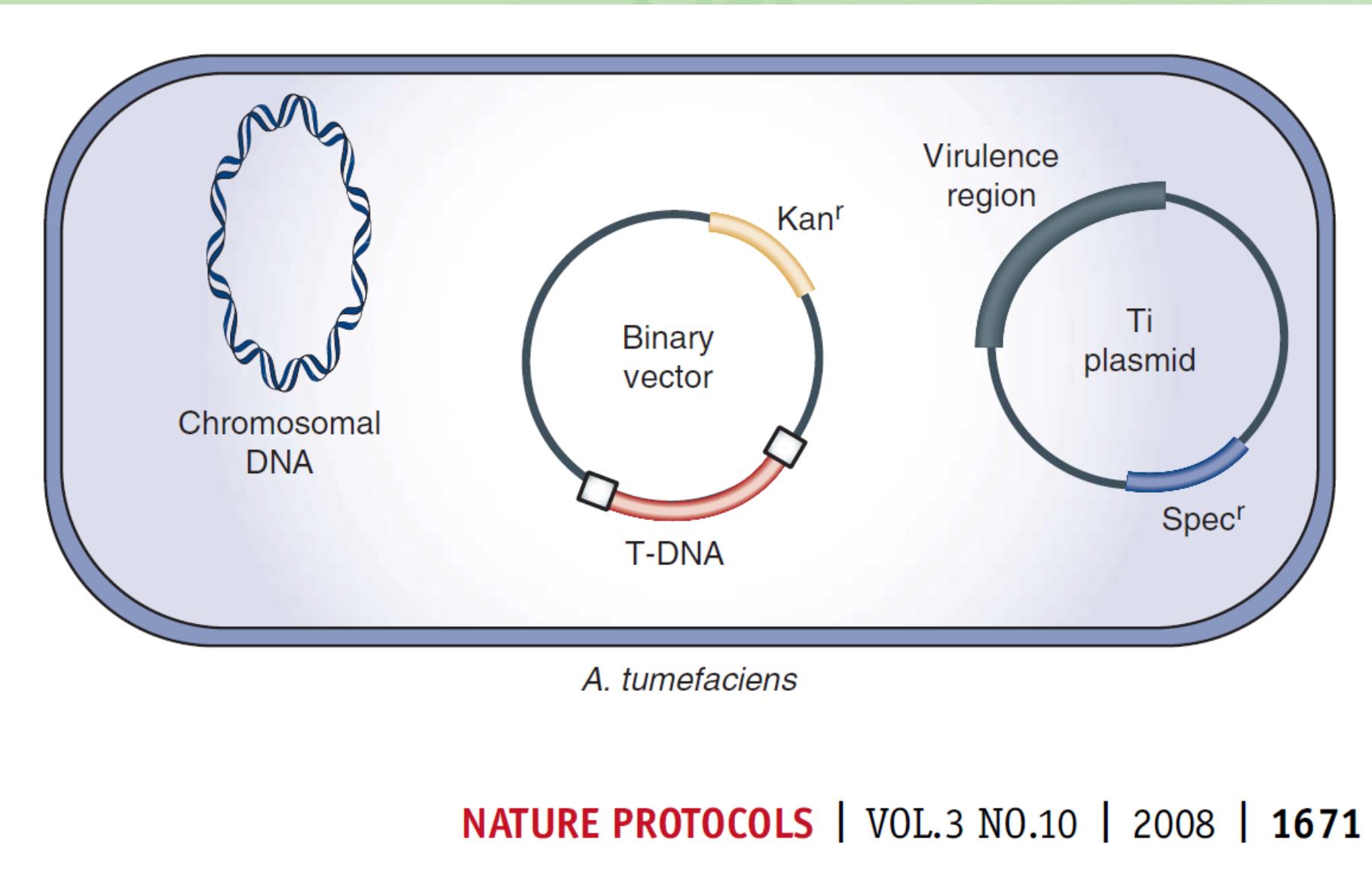
Transfer to selection plate
First round selection



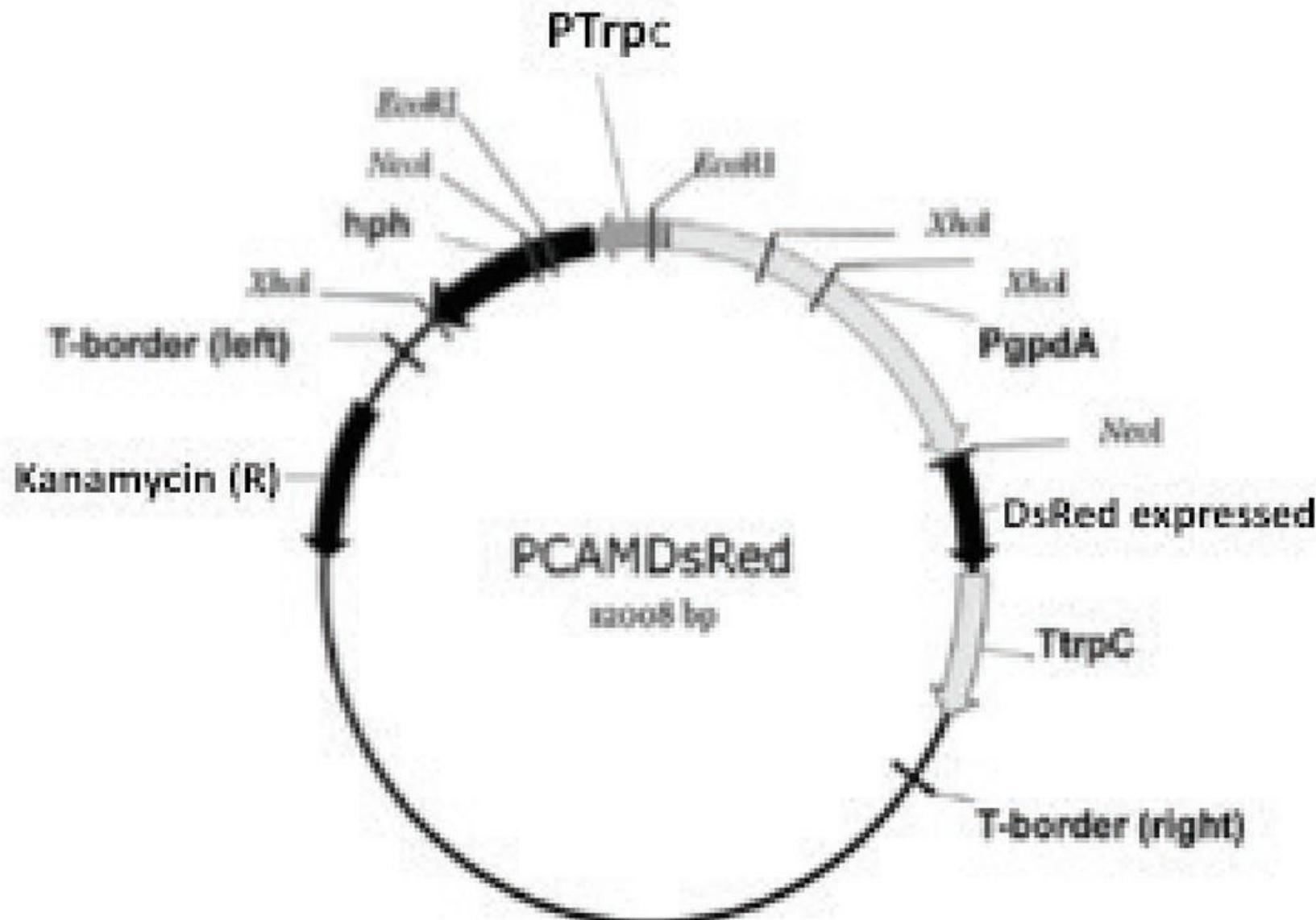
Membranas de celofane autoclavadas

E**F**

Vetor binário para agrotransformação



A



Fatores que influenciam a eficiência da agrotransformação

- 1. Concentração de Acetoseringona
 - A adição de AS durante o co-cultivo é essencial para a indução dos genes *vir* e transferência do T-DNA
 - pré-cultivo de *A. tumefaciens* – nem sempre aumenta a eficiência

Acetoseringona para ativação dos genes *vir*



– Acetosyringone



+ Acetosyringone

Fatores que influenciam a eficiência da agrotransformação

2. Células utilizadas

- Conidiósporos
- protoplastos (mais trabalhoso)
- conidiósporos germinados (crescimento residual pode levar à baixa eficiência)

Fatores que influenciam a eficiência da agrotransformação

3. Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

<i>Agrobacterium</i> strain	Chromosomal background ^c	Ti plasmid	Antibiotic selection marker on Ti plasmid ^d
LBA1100 ^a	C58 (rifampicin resistant)	pTiB6 ΔT-DNA	Spectinomycin
LBA1119 ^a (EHA105)	C58 (rifampicin resistant)	pTiBo542 ΔT-DNA	None
LBA1126 ^a	C58 (rifampicin resistant)	pTiB6 ΔT-DNA VirG I77V VirA-TAR	Spectinomycin, carbenicillin
LBA4404 ^a	Ach5 (rifampicin resistant)	pTiAch5 ΔT-DNA	Streptomycin
A348 ^b	C58 (rifampicin resistant)	pTiA6NC	None

Fatores que influenciam a eficiência da agrotransformação

4. Proporção *Agrobacterium*: esporos do fungo

As proporções a serem avaliadas:

1:1, 1:2, 1:3, 2:1 e 3:1 (esporos de fungos : células de bactérias)

Fatores que influenciam a eficiência da agrotransformação

5. Condição de cocultivo:

- Temperatura: entre 20 e 28C. Temperaturas mais baixas geralmente são benéficas para *A. tumefaciens* transferir seu T-DNA (20-25C), mas tempo necessita maior tempo de incubação
- Tempo de incubação: entre 16 e 96 h (crescimento residual dos fungos ou do *A. tumefaciens* – menor eficiência)

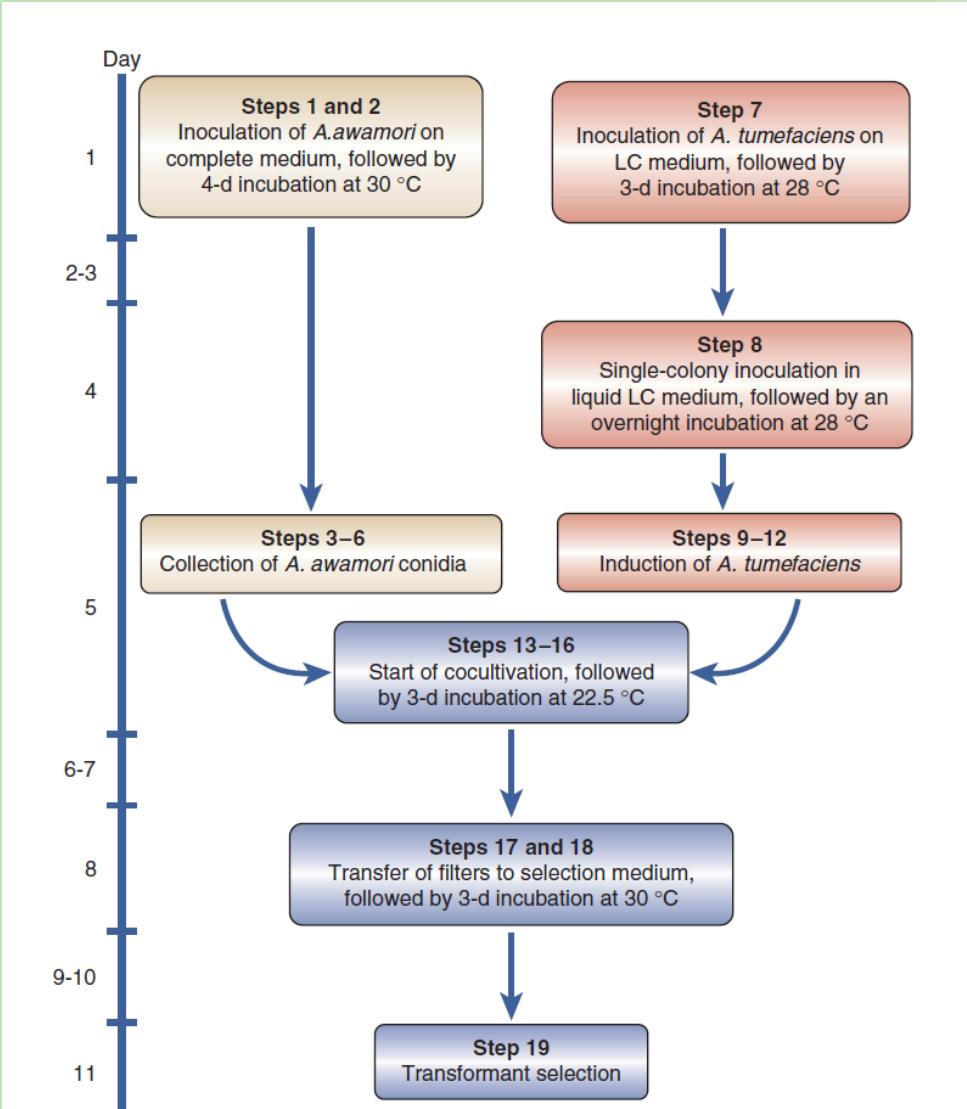
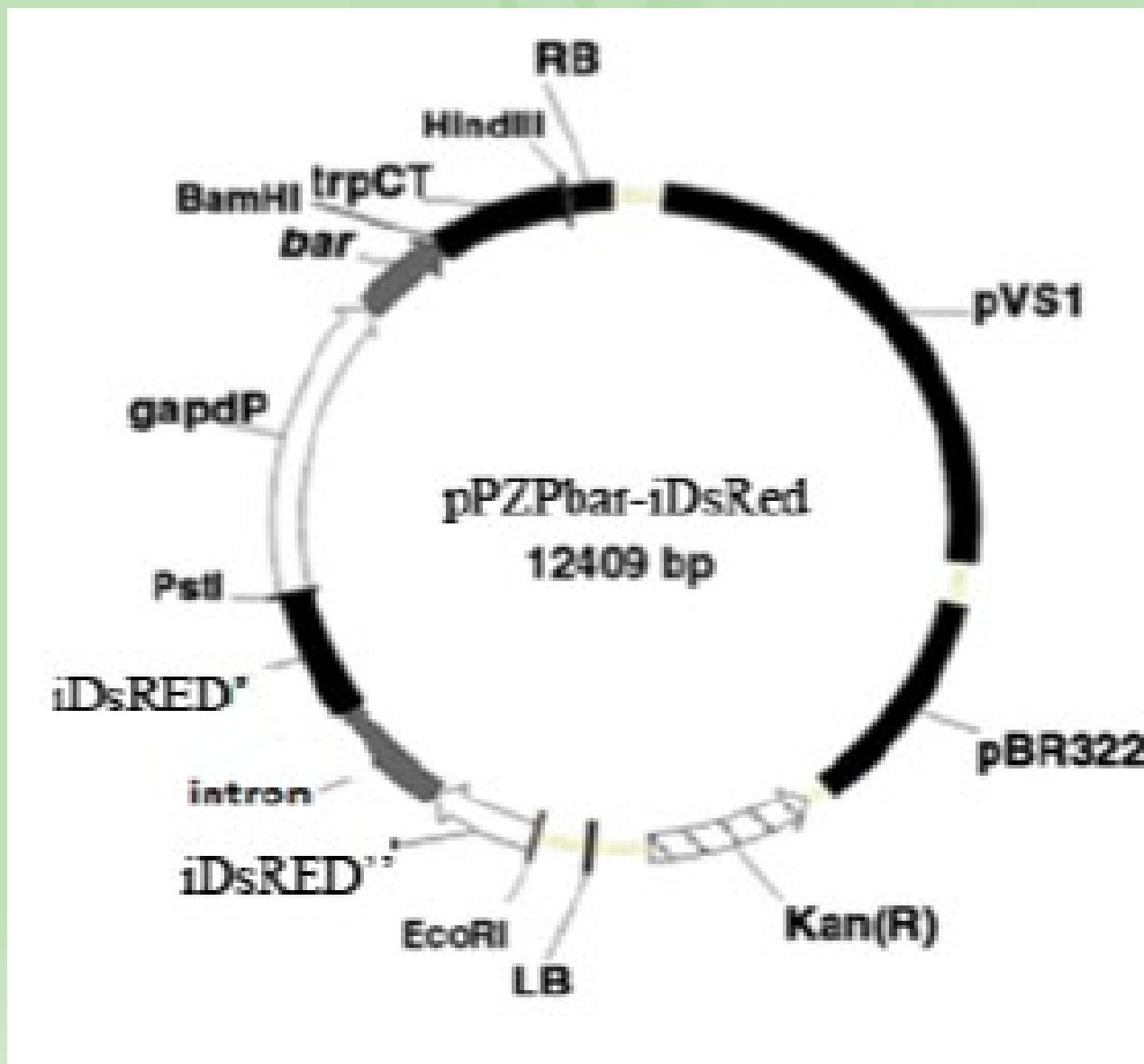


Figure 3 | Flow diagram and time line of the *Agrobacterium*-mediated transformation protocol of *A. awamori*.

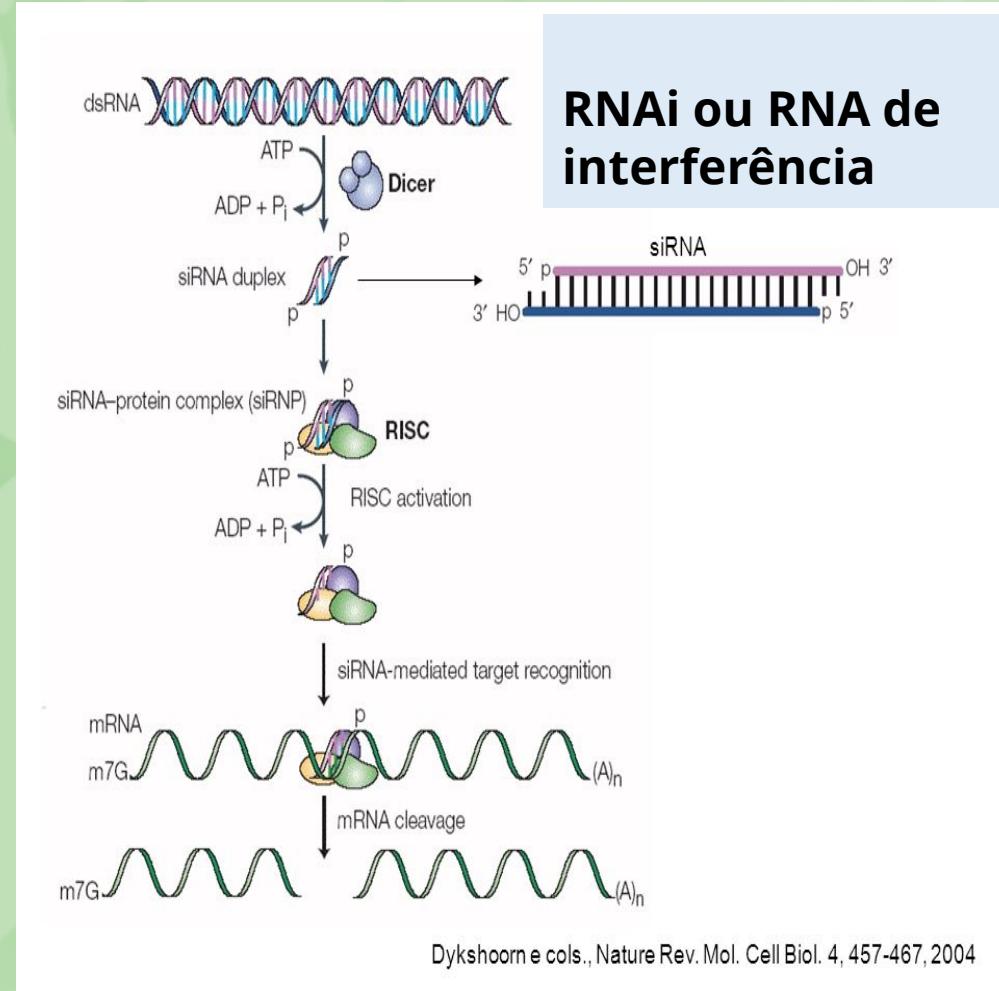
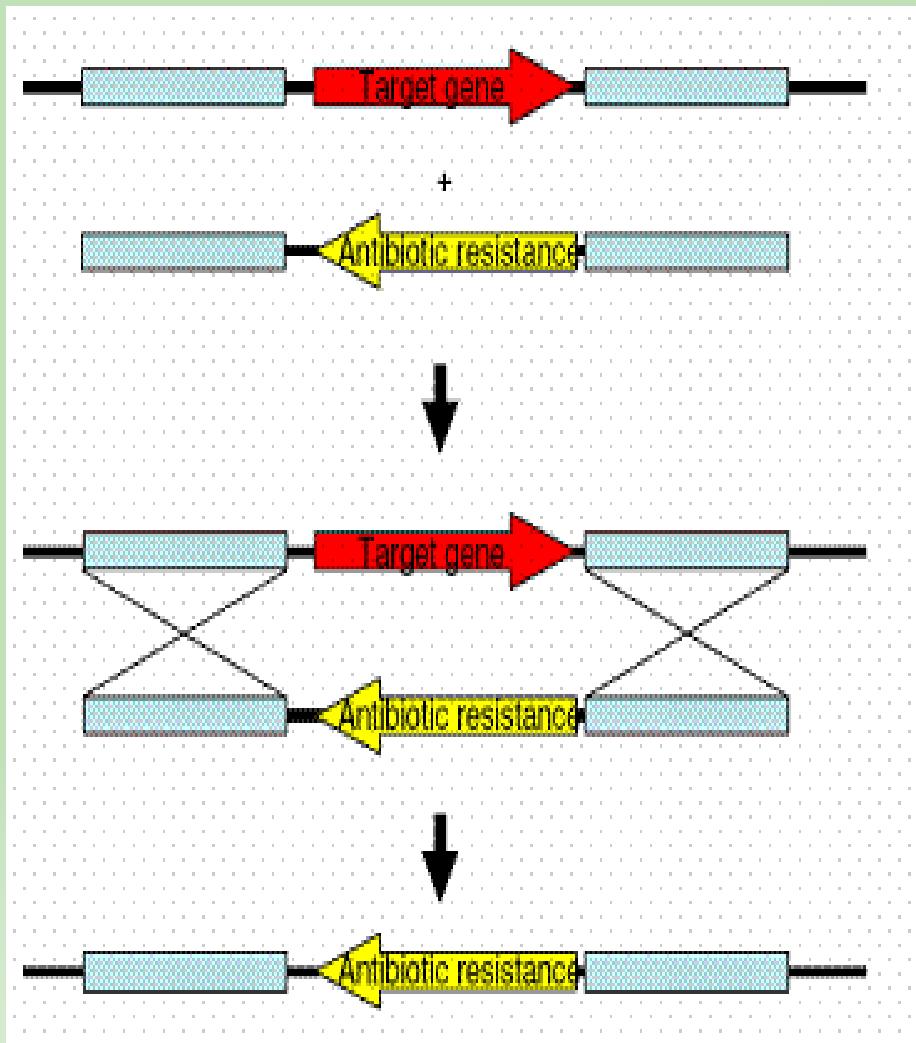
Vetor de agrotransformação em fungos - binário



RNA de interferência

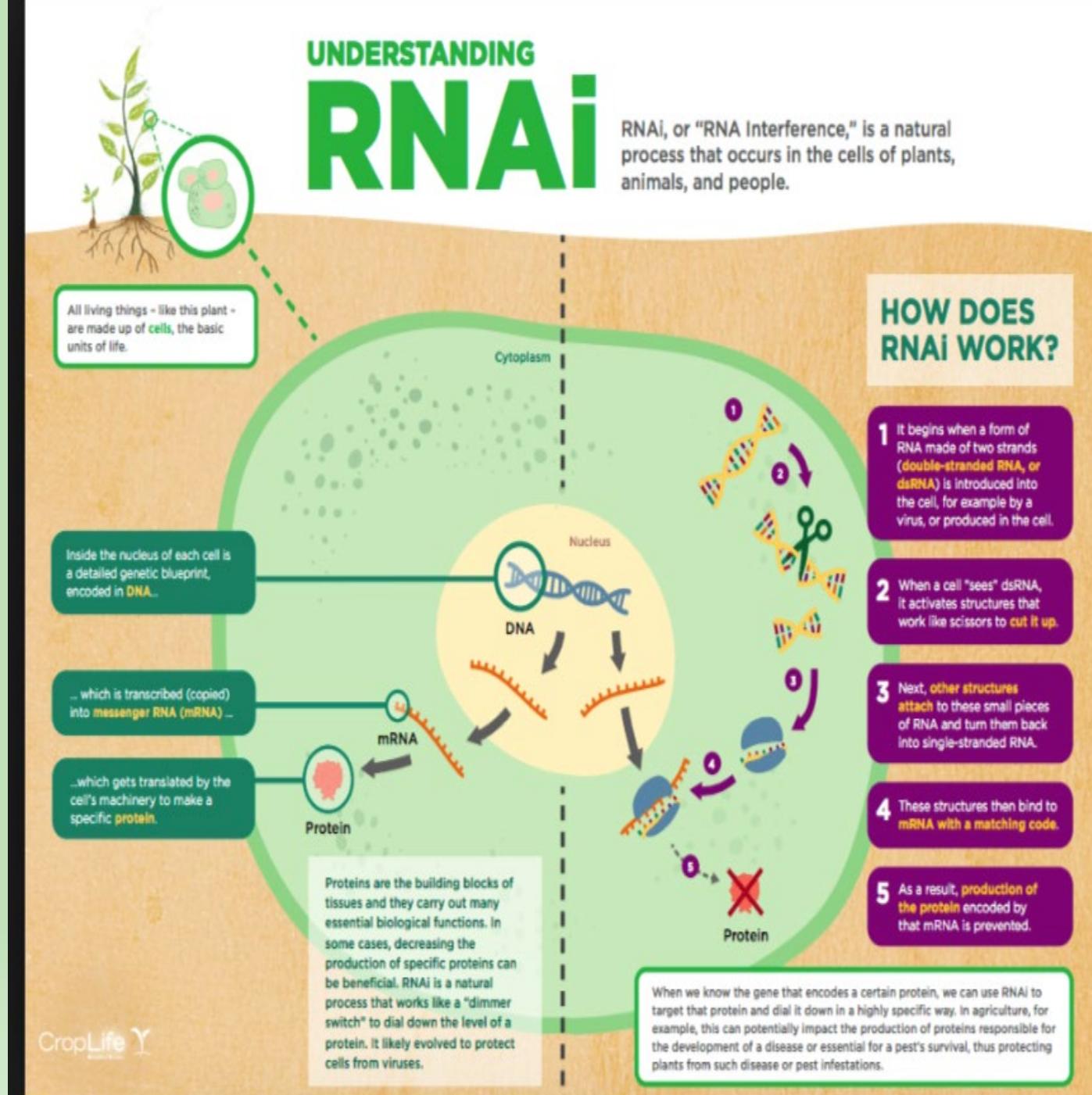


Deleção x Silenciamento gênico

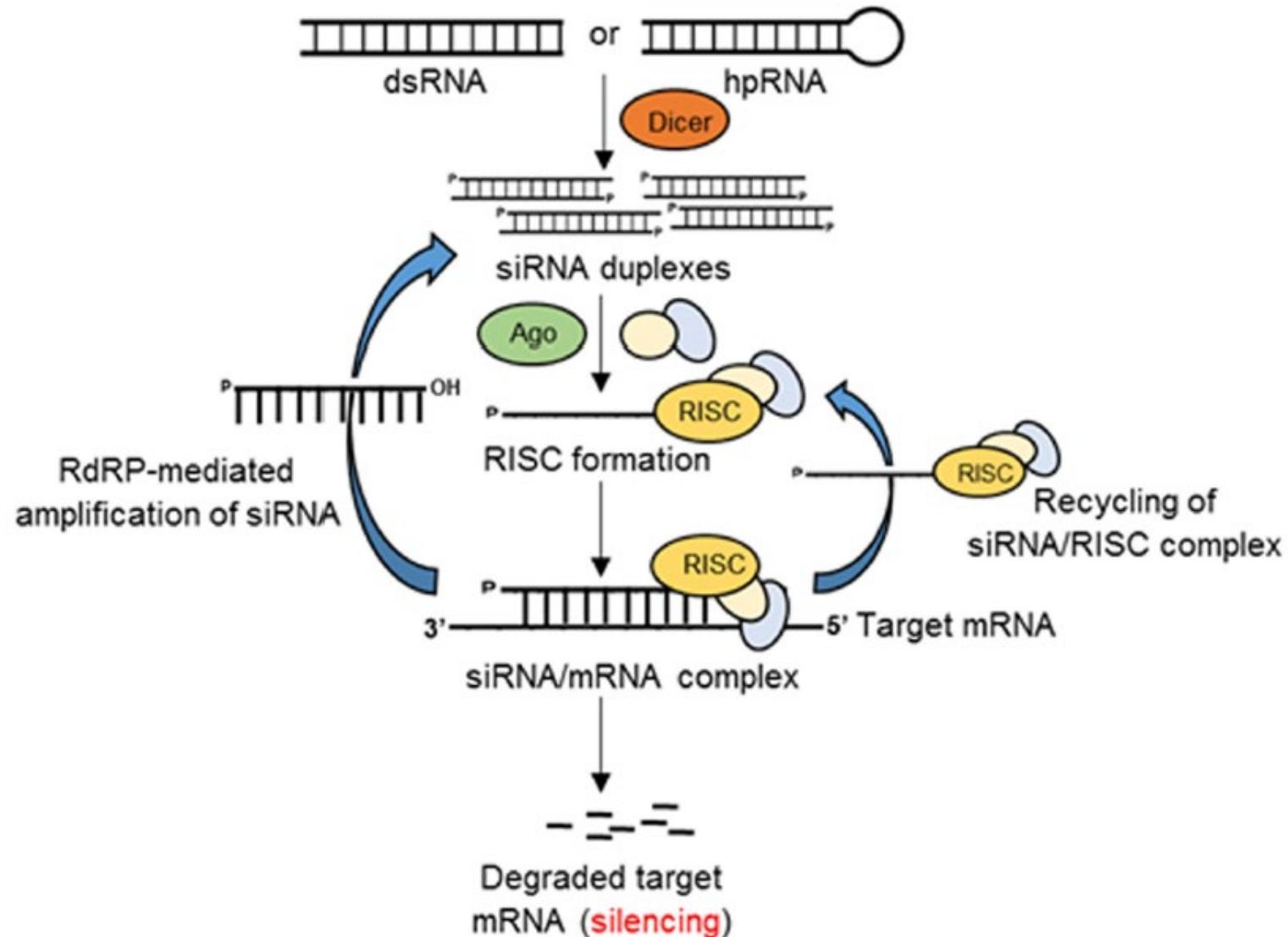


(knockdown)

UNDERSTANDING RNAi



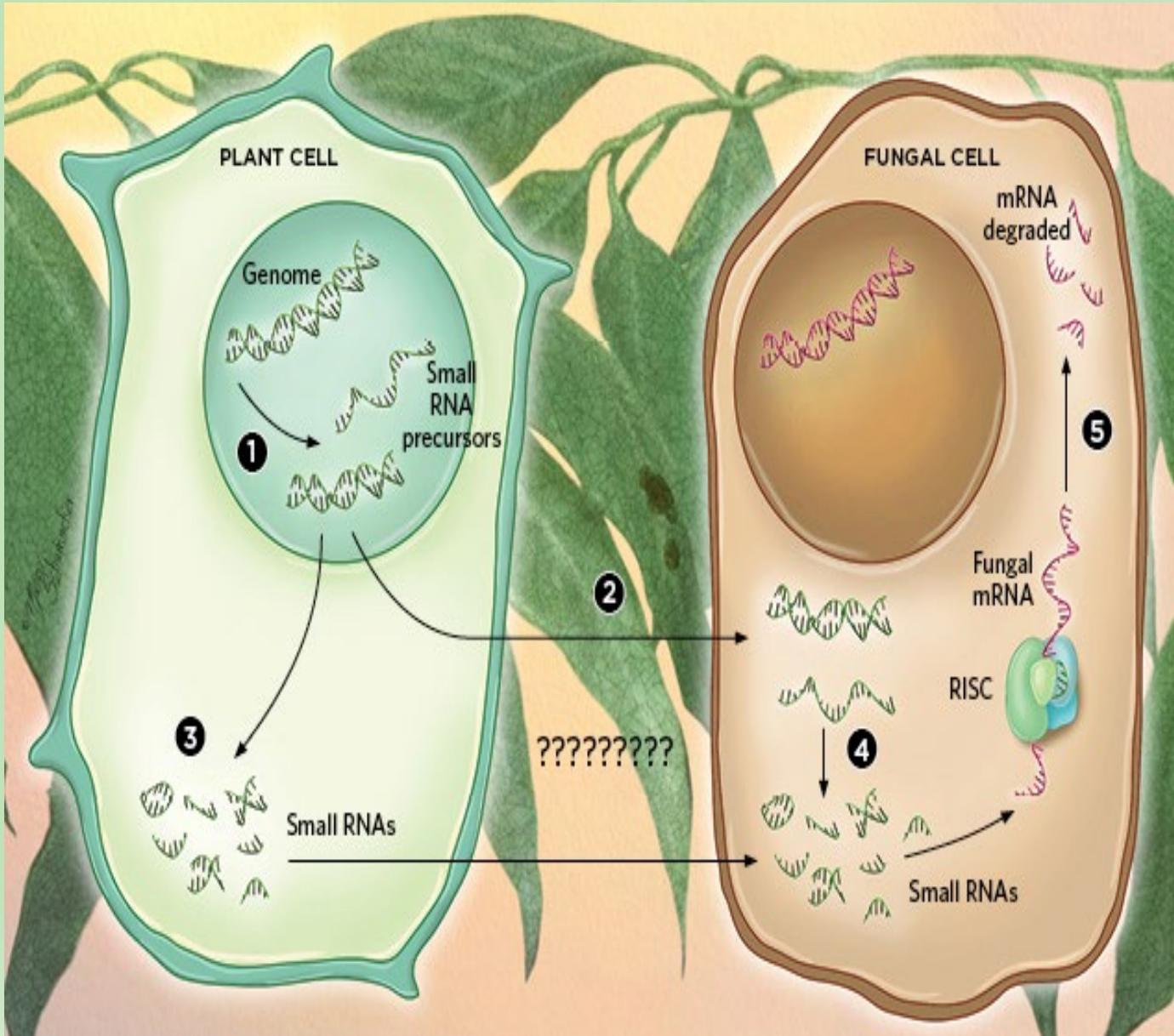
Esquema do silenciamento gênico mediado por RNAi em eucariotos



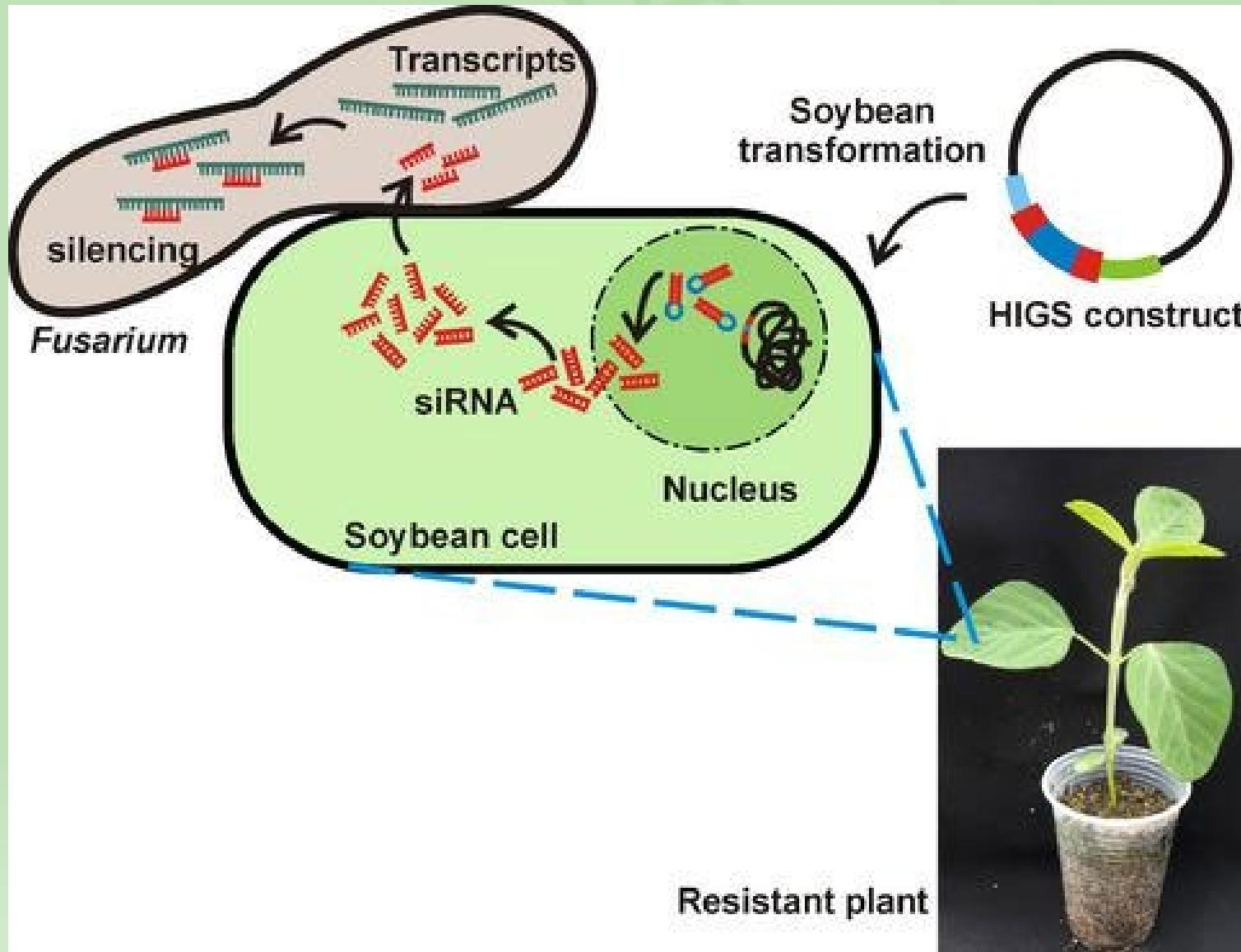
RNAi em eucariotos

- Iniciado por uma enzima RNase III (Dicer) que cliva um RNA de fita dupla longa (dsRNA) em RNAs interferentes de fita dupla pequena (nucleotídeo de 20-25 bp) (siRNAs) com uma saliência de dois nucleotídeos na extremidade 3'
- Cada siRNA é composto por uma fita sense e uma anti-sense.
- Fita antisense é incorporada em um complexo de silenciamento induzido por RNA ativo (RISC)
- Fita sense é degradada por eventos celulares subsequentes no citoplasma.
- A fita antisense do complexo siRNA-RISC, pareia com as sequências alvo de mRNA complementares e inicia a clivagem endonucleolítica através da ação da Proteína argonauta (AGO; componente catalítico do complexo RISC), evitando assim a tradução da transcrição alvo

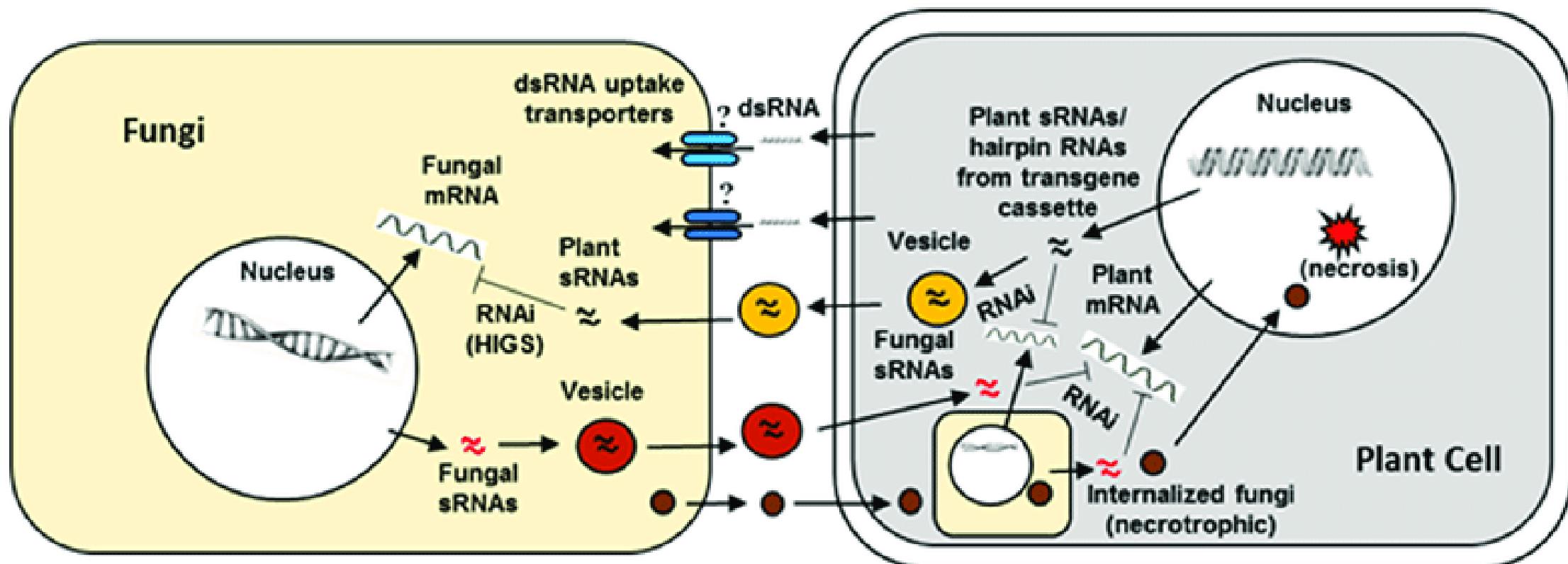
Host-induced Gene Silencing (HIGS)

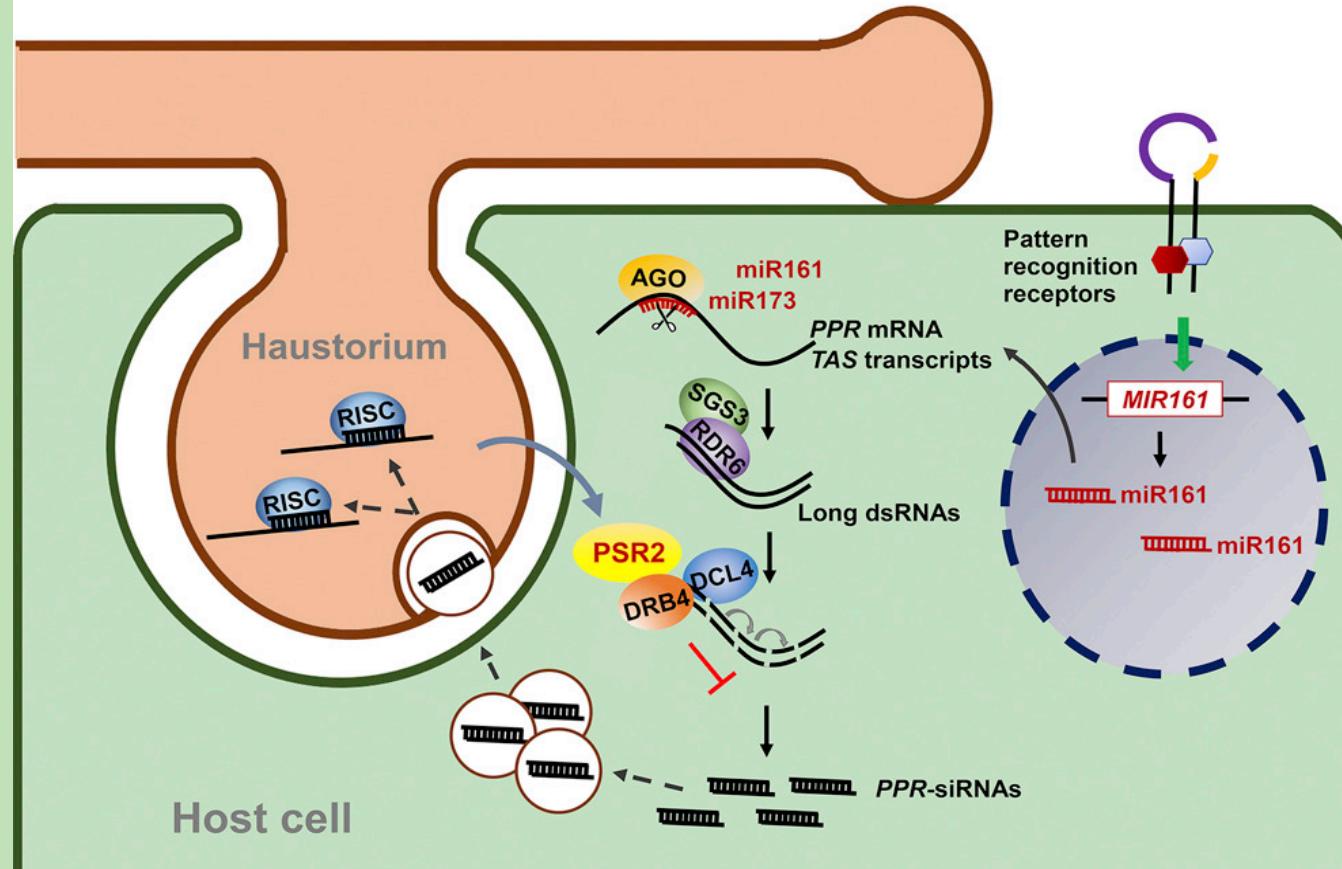


Host-induced Gene Silencing (HIGS)



Interação entre uma célula vegetal e o fungo patogênico no contexto do silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro, mediado por RNA de planta





Virus-induced Gene Silencing (VIGS)

