

# Biologia Molecular aplicada no estudo de Microrganismos e suas interações com hospedeiro

Professores

Dra. Chirlei Glienke - UFPR

Dra. Desirrê Petters-Vandressen – UFPR

Dr. Alan de Oliveira Silva – GS Treinamento e Consultoria

# Introdução

- O entendimento da interação Microrganismo–hospedeiro (M-H) e os mecanismos de evolução dos patógenos:
  - Fundamental para adoção de medidas de controle
- Grande quantidade de genomas disponíveis:
  - elevou o estudo da genética da interação M-H ao nível genômico
  - Predição de grande número de genes que codificam para proteínas efetoras secretadas - determinando a interação M-H
  - Maior número de genomas disponíveis:
    - maior número de genes para efetores
    - mais mecanismos de adaptabilidade e evolução
    - maior compreensão de sua importância

# Efetores

- Pequenas proteínas secretadas (<300aa), muitas vezes ricas em cisteína, que interferem na função de células hospedeiras – auxiliam o patógeno a escapar da defesa do hospedeiro
  - Além de efetores proteicos, hoje são conhecidos os efetores não proteicos (metabolismo secundário, Collemare et al. 2019)
- Fundamentais para a virulência dos patógenos
  - Modulam ou permitem a interação M-H
  - Muitas interagem com proteínas dos hospedeiros
- Altamente variáveis, rápida evolução acompanhando o rápido surgimento de defesa dos hospedeiros
- Muitos participam na adaptação e no salto do patógeno para novos hospedeiros – podem contribuir para a especiação

# Efetores

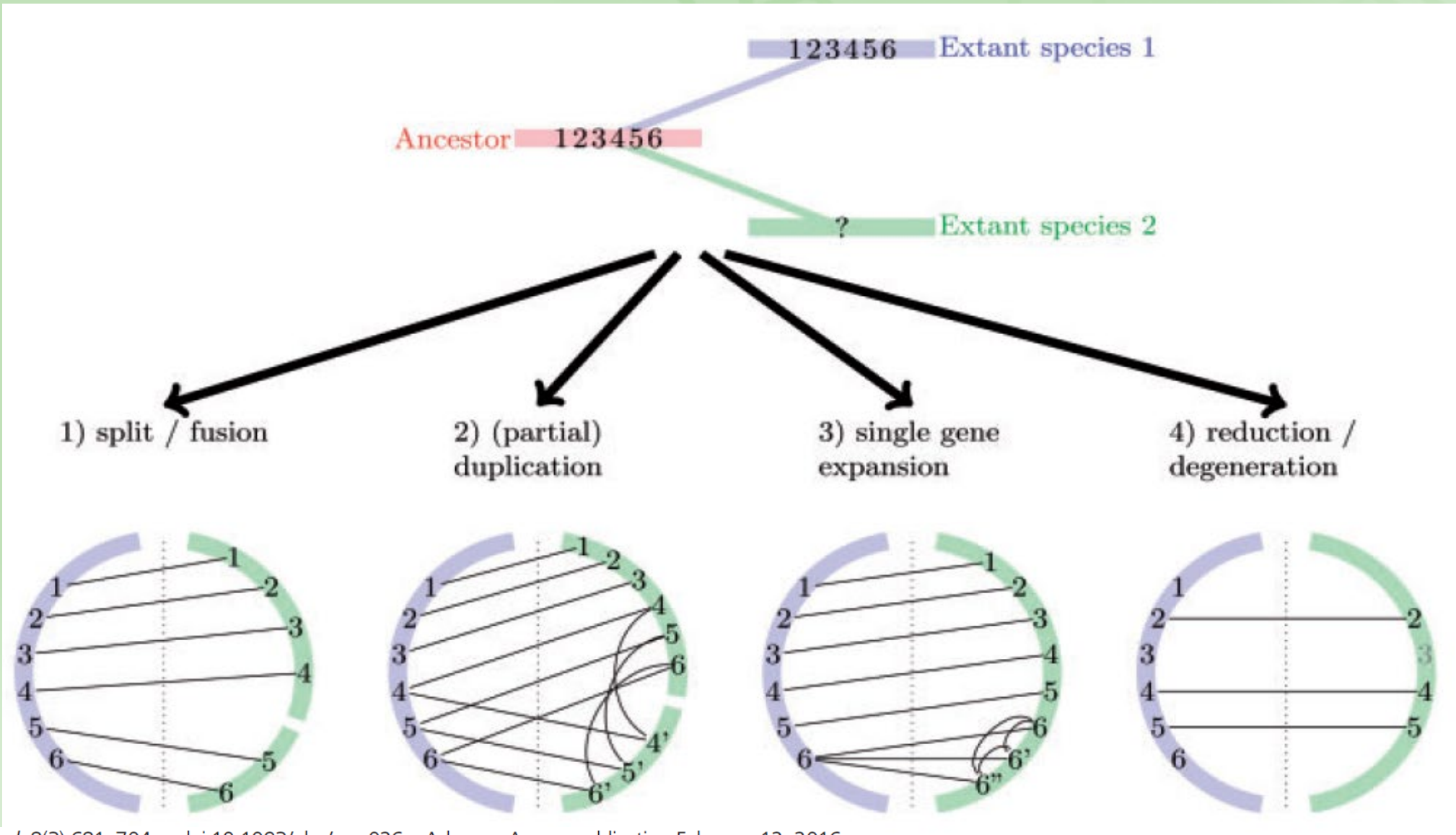
- Alguns são espécie específicos, outros conservados (em espécies colonizando mesmos hospedeiros ou compartilhando lifestyle (modo de interação M-H)
- Em algumas espécies estão organizados em clusters no genoma
- Em outras espécies encontram-se dispersos no genoma – associação com elementos repetitivos
- Associação com elementos transponíveis



# Evolução de efetores

- Surgimento de clusters:
  - Amplificação gênica (*in tandem*) seguida por rápida diversificação
- Associação de clusters com elementos transponíveis (ETs):
  - Efetores e ETs localizados em locais específicos do genoma
    - Compartimentalização de genomas
    - Rápida evolução
- Importância dos clusters para estudo da interação M-H
  - Estudo funcional de efetores: deleção de clusters:
    - linhagens menos virulentas
    - Pouco efeito em deleções individuais

# Exemplo de evolução de cluster de efetores



# Elementos Transponíveis (TEs)

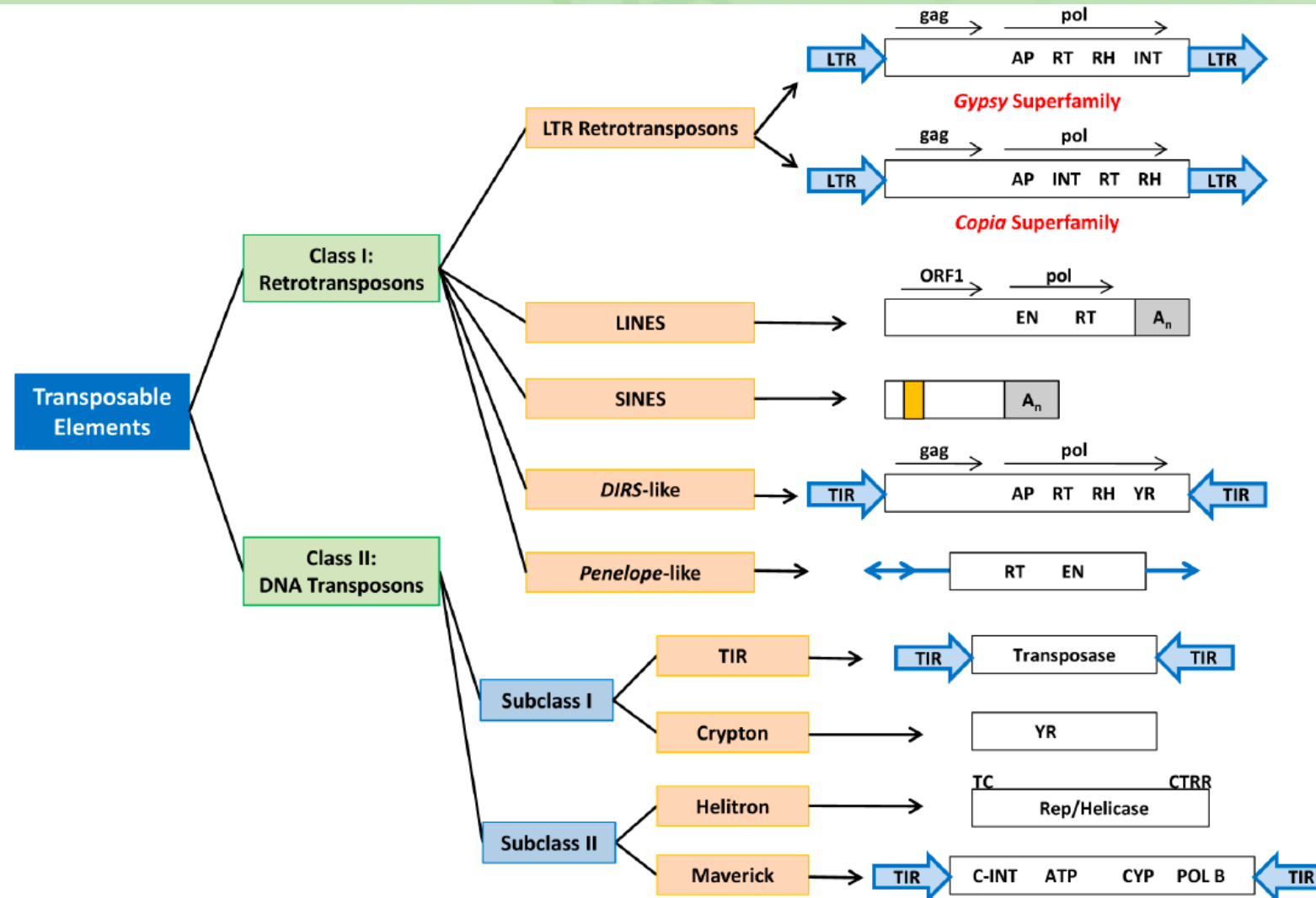
- Descobertos na década de 40: McClintock, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1950, 36, 344–355
- TEs estão presentes praticamente em qualquer genoma procariótico e eucariótico
- Apesar de abundante nos genomas, poucos TEs mantêm a mobilidade
- TEs podem ser autônomos (codificam enzimas de transposição) ou não autônomos

# Classificação hierárquica dos elementos transponíveis

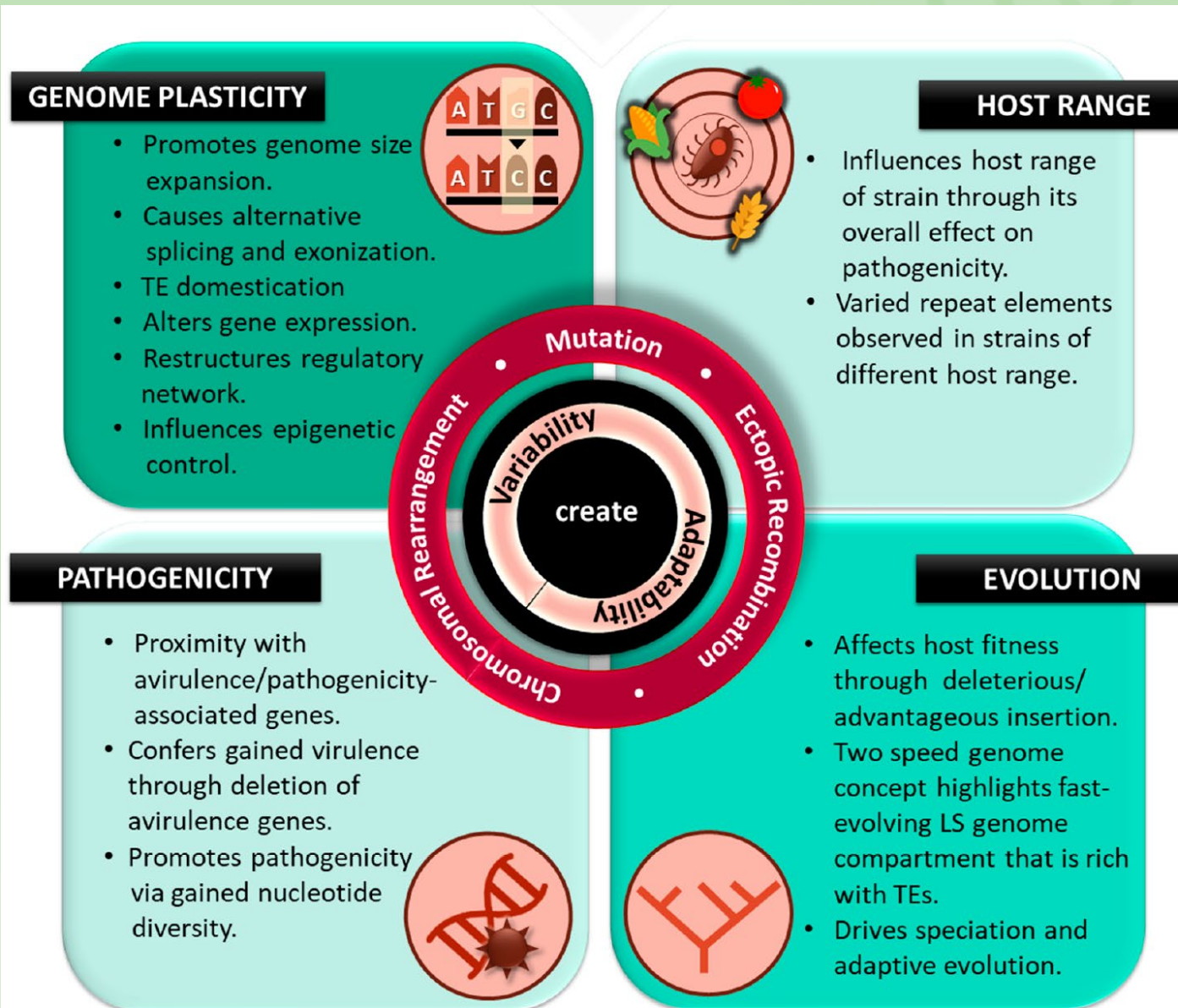
Level	Description
Class	It divides transposable elements (TEs) into two classes based on their transposition intermediate: RNA (class I or retrotransposons) or DNA (class II or DNA transposons).
Subclass	It separates TEs that transpose via “copy-and-paste” mechanism from those via “cut-and-paste” mechanism.
Order	It distinguishes TEs with different insertion mechanisms due to dissimilar encoded enzymes.
Superfamily	Superfamilies within an order share the same insertion mechanism but are different in terms of enzyme organization, non-coding domains and/or TSD.
Family	It is defined by DNA sequence conservation.
Subfamily	It is defined on the basis of phylogenetic data and might serve to differentiate autonomous and non-autonomous derivatives.



# Ordens e superfamílias de elementos transponíveis presentes em fungos



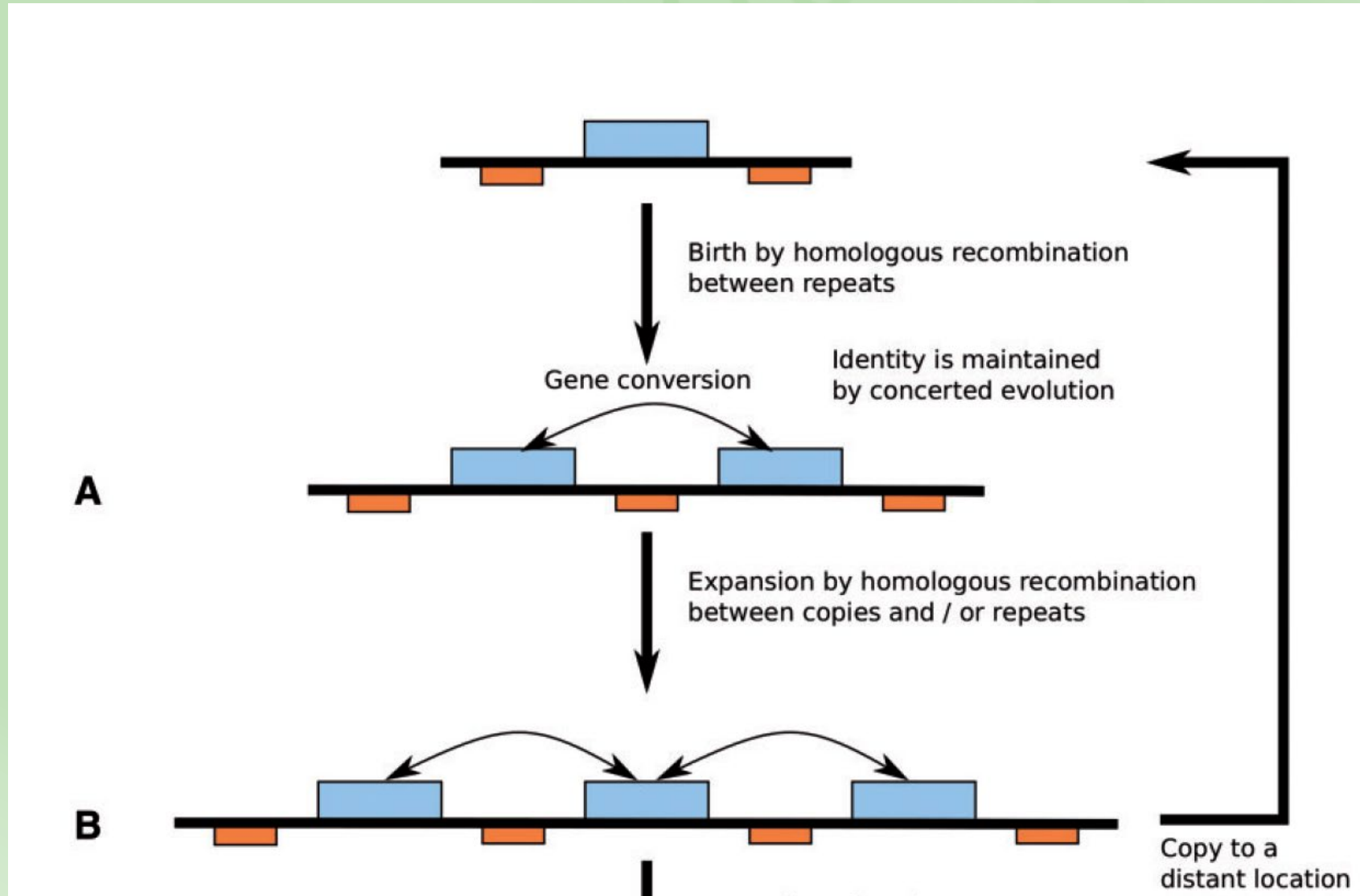
# Elementos Transponíveis



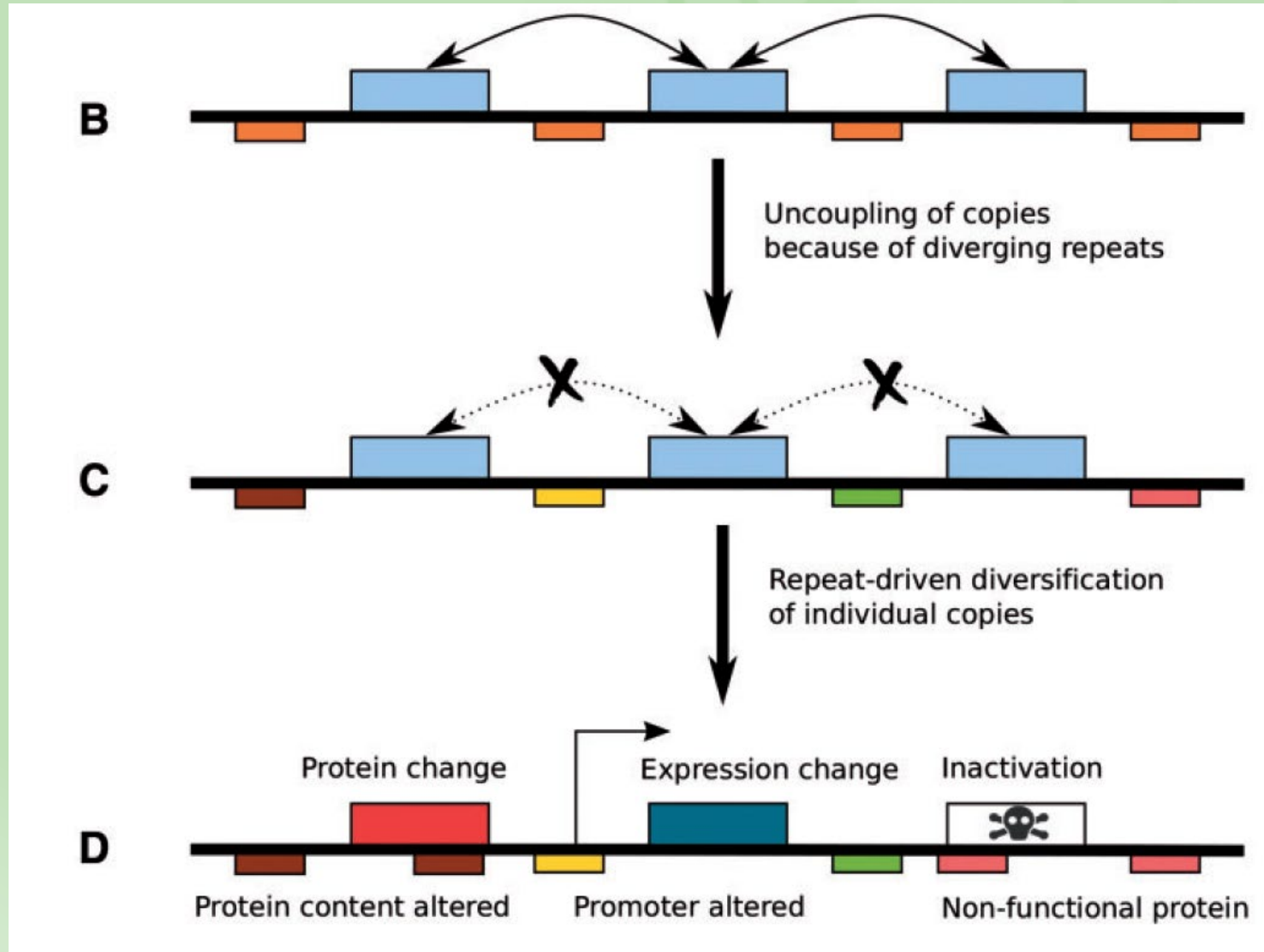
*Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3597; doi:10.3390/ijms20143597

[www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms)

# ETs na evolução de Cluster de efetores




# ETs na evolução de Cluster de efetores



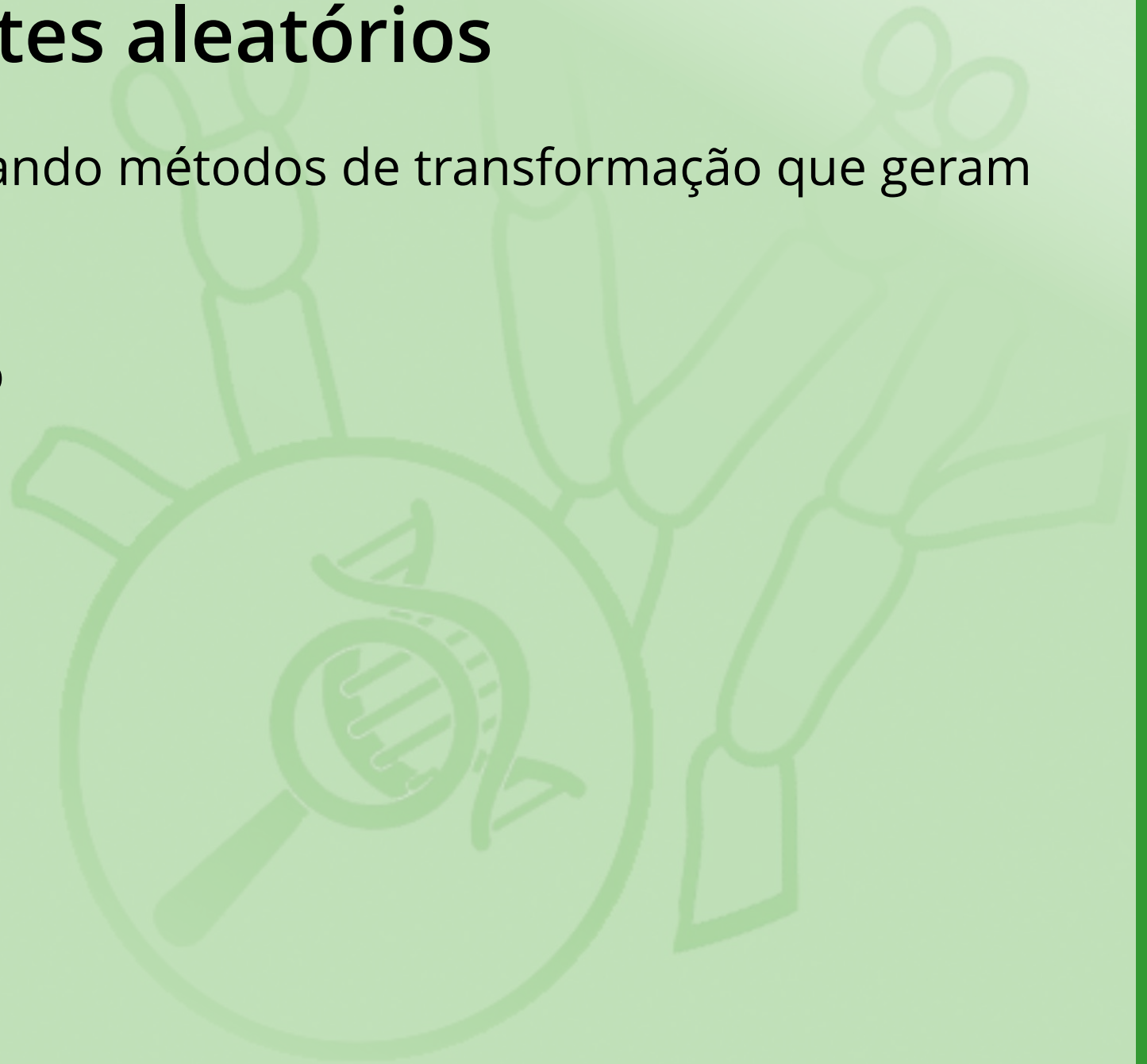


# **Exemplos de trabalhos de Genética funcional no estudo da Interação Microrganismo- hospedeiro**

A faint, light green line-art illustration in the background. It depicts a hand with the index finger pointing towards a magnifying glass. The magnifying glass is focused on a circular DNA double helix structure. The entire scene is set against a light green background with a darker green vertical bar on the right side.

# Biblioteca de mutantes aleatórios

- Construção de bibliotecas usando métodos de transformação que geram inserção aleatória
- Exemplo: Agrotransformação



# Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

- Patógeno vegetal
- Somente o T-DNA do plasmídeo é transferido para a célula hospedeira
- Inserções randômicas
- Uma ou mais cópias do T-DNA podem ser inseridas (normalmente uma)

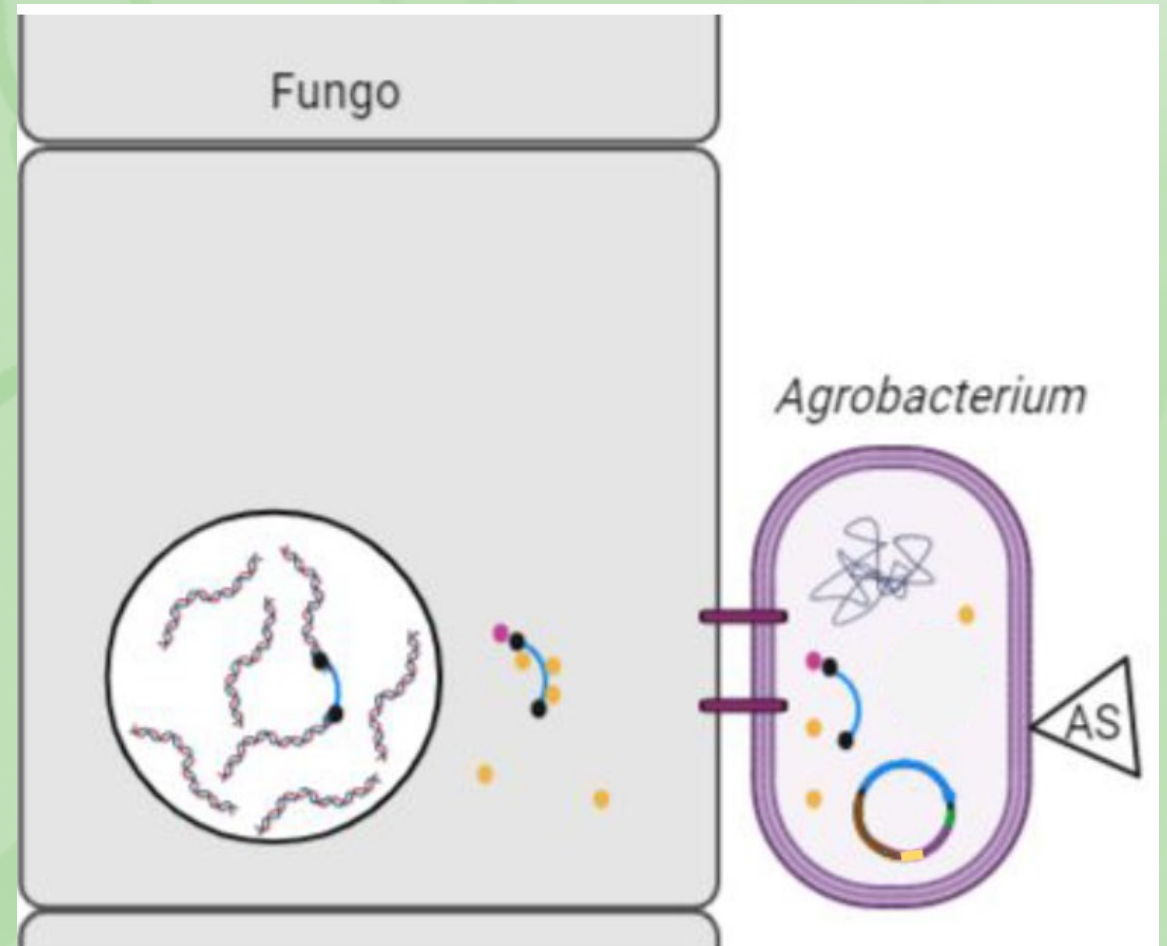


Fig. 2 Esquema da agrotransformação adaptado de Idnurm et al., 2017



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Microbiological Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micres](http://www.elsevier.com/locate/micres)



# Identification of genes associated with asexual reproduction in *Phyllosticta citricarpa* mutants obtained through *Agrobacterium tumefaciens* transformation

Eduardo Henrique Goulin<sup>a,1</sup>, Daiani Cristina Savi<sup>a,1</sup>, Desirrê Alexia Lourenço Petters<sup>a</sup>, Vanessa Kava<sup>a</sup>, Lygia Galli-Terasawa<sup>a</sup>, Geraldo José Silva Jr.<sup>b</sup>, Chirlei Glienke<sup>a,\*</sup>

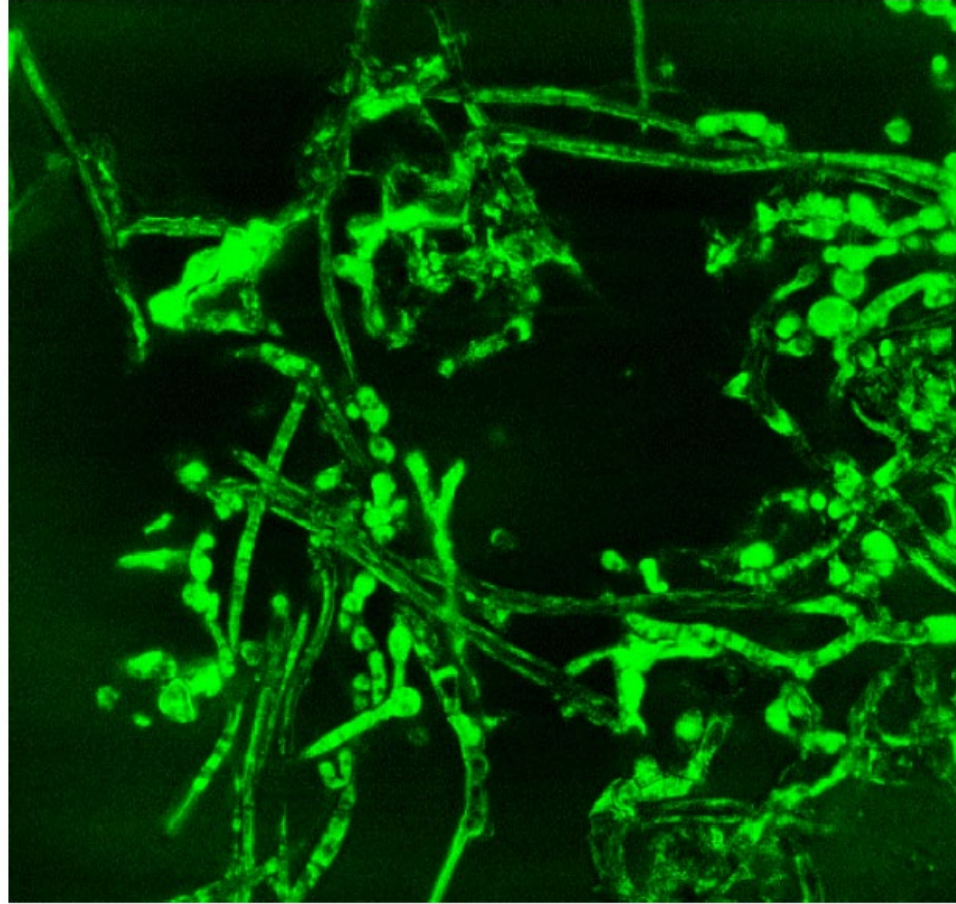
<sup>a</sup> Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, P.O. BOX 19071, CEP: 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Fund for Citrus Protection, Fundecitrus, Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros, 201, CEP: 14807-040 Araraquara, SP, Brazil





# Passo 1: Obtenção da biblioteca expressando um gene repórter



**Fig. 1.** Green fluorescence protein expression in *Phyllosticta citricarpa* mutant LGMF06t7 showing spores and mycelia under green light excitation, 40 $\times$  magnification.

## Passo 2: Seleção de mutantes com alterações fenotípicas de interesse

E.H. Goulin et al. / Microbiological Research 192 (2016) 142–147

145

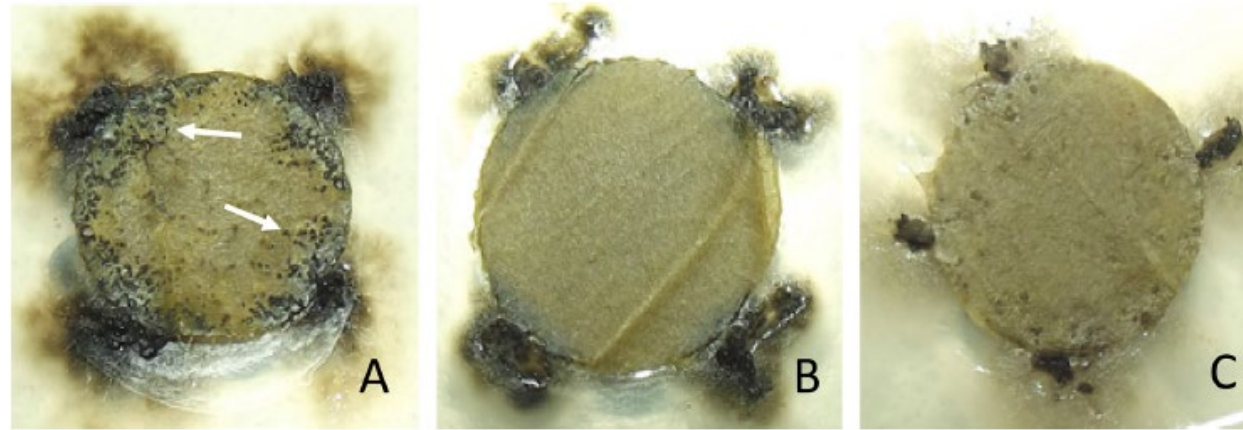


Fig. 2. Pycnidia formation assay in autoclaved citrus leaf discs 21 days after inoculation with (A) *Phyllosticta citricarpa* LGMF06 wild type – pycnidia are present on the leaf (white arrow); (B) *P. citricarpa* mutant LGMF06t7; and (C) *P. citricarpa* mutant LGMF06t9; no pycnidium observed on the leaf in both mutants.

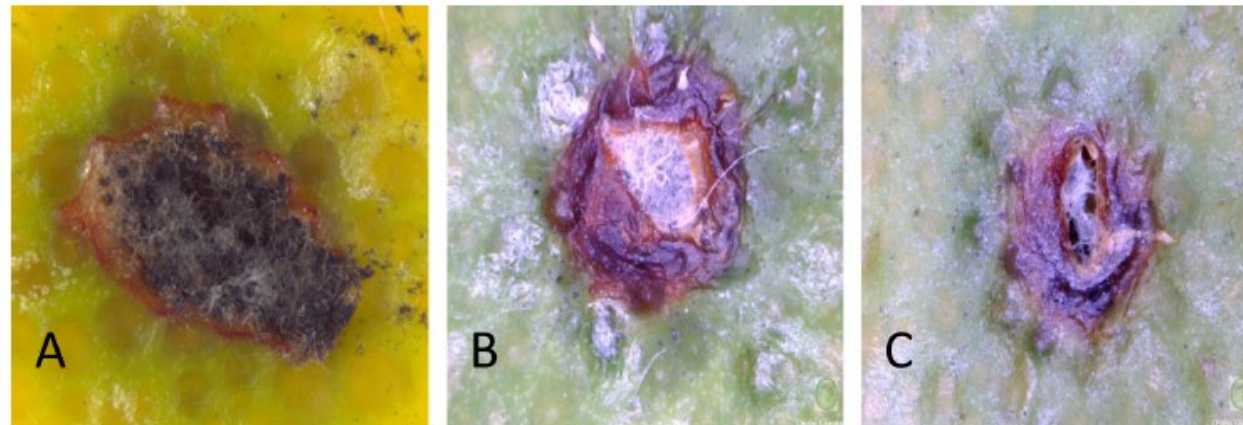


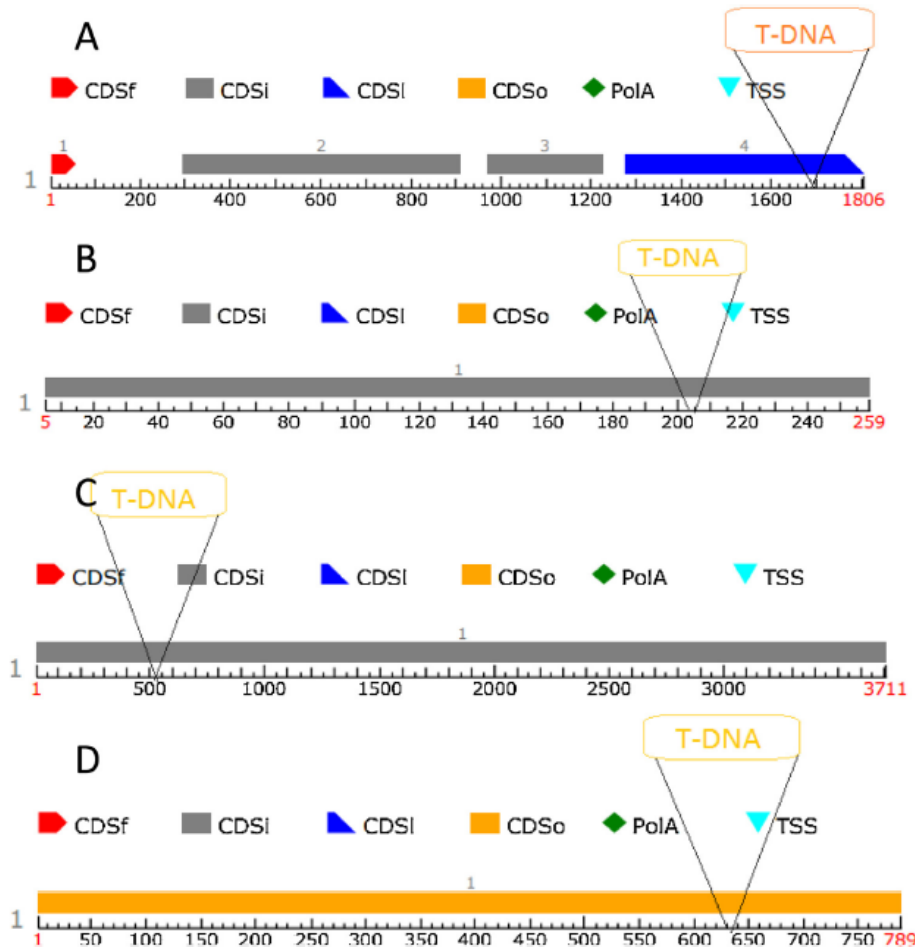
Fig. 3. Citrus Black Spot (CBS) disease symptom induction assays in *Citrus sinensis* fruits 21 days after inoculation with (A) *Phyllosticta citricarpa* LGMF06 wild type—CBS lesion development and pycnidia production; (B) *P. citricarpa* mutant LGMF06t7—no pycnidium development; and (C) *P. citricarpa* mutant LGMF06t9—no pycnidium development.

# Passo 3: Localização do local de inserção do T-DNA

## Associação de *genome walking* e genômica

146

E.H. Goulin et al. / Microbiological Research 192 (2016) 142–147



**Fig. 4.** Structure of genes predicted in which the T-DNA insertion occurred in the gene product of two mutants strains of *Phyllosticta citricarpa*. (A) T-DNA insertion in amino acid 455 of the *Spindle Poison Sensitivity Scp3* gene from mutant LGMF06t9 (1806 bp). (B) T-DNA insertion in amino acid 68 of the *Ion Transport* gene from mutant LGMF06t7 (259 bp). (C) T-DNA insertion in amino acid 531 of the *Cullin Binding* gene from mutant LGMF06t7 (3711 bp). (D) T-DNA insertion in amino acid 212 of a hypothetical protein gene from mutant LGMF06t7 (789 bp).



# Passo 4: Realizar a prova de conceito

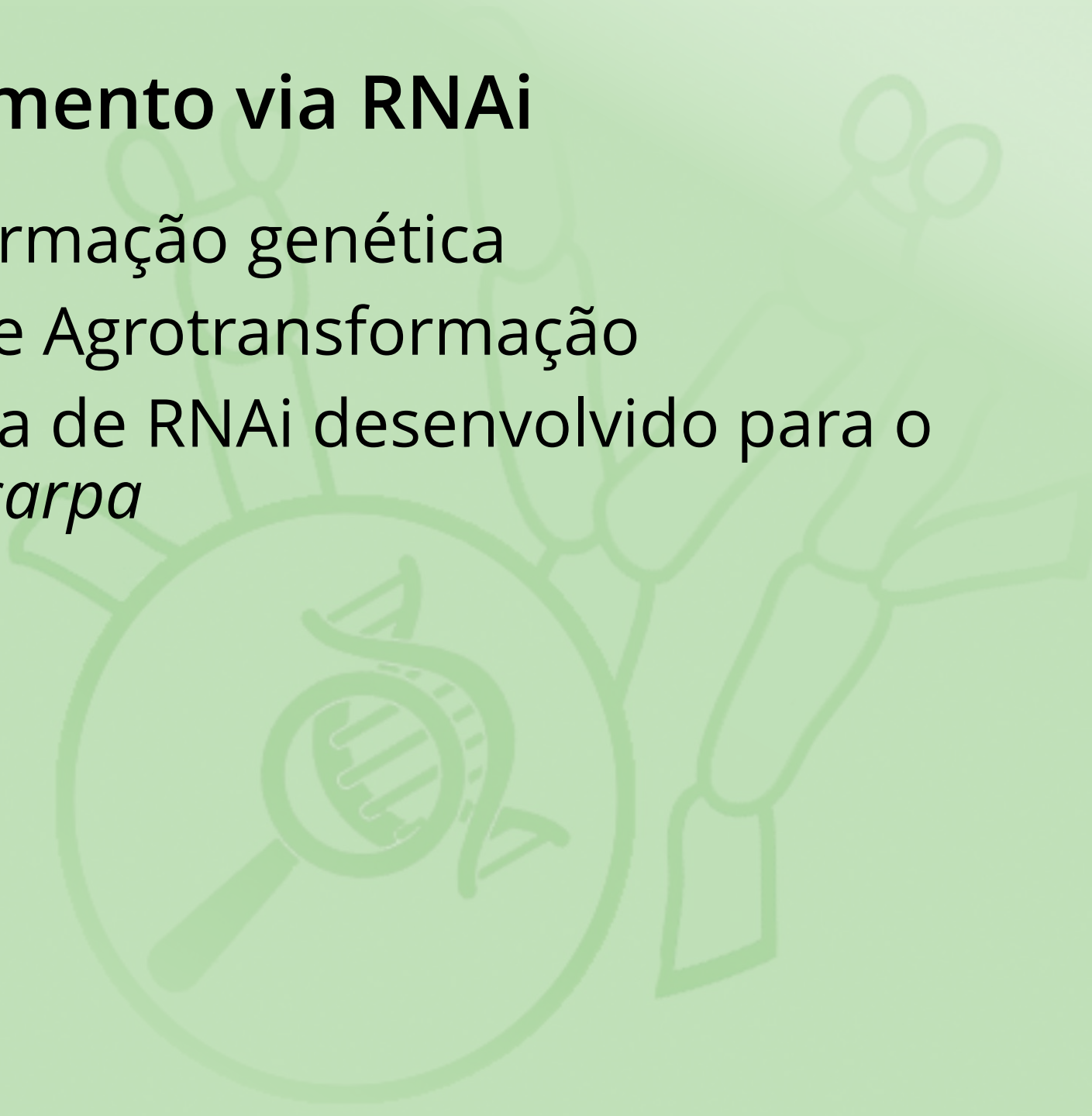
- Validação do gene:
  - Provar que aquele gene realmente está associado ao fenótipo
  - perda de patogenicidade por exemplo
- Metodologias:
  - Deleção de genes (knockout)
  - Silenciamento de genes (knockdown - RNAi por exemplo)





# Exemplo de Silenciamento via RNAi

- Dificuldade de transformação genética
- Necessidade de uso de Agrotransformação
- Inexistência do sistema de RNAi desenvolvido para o fungo *Phyllosticta citricarpa*



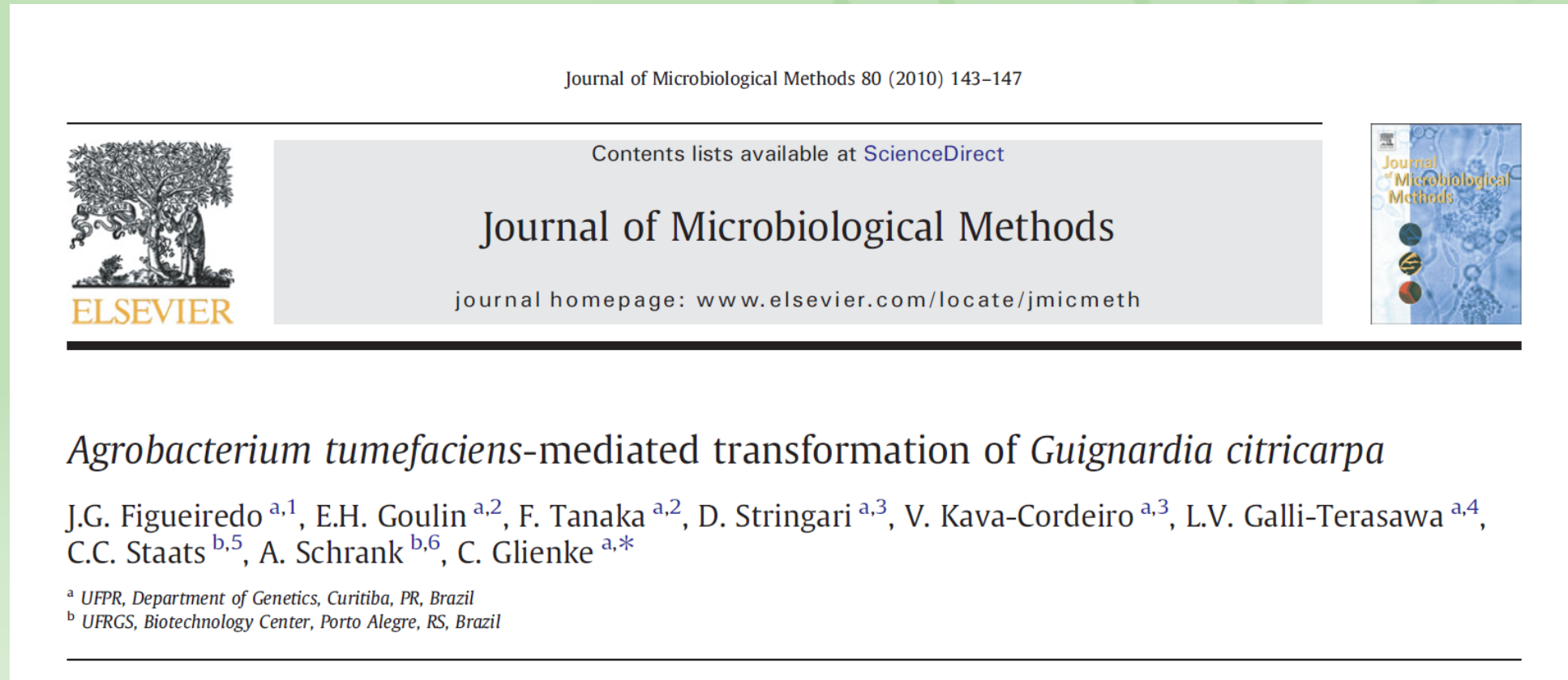
# Construction of an RNAi expression vector and agrotransformation into *Phyllosticta citricarpa*

- **Objetivos:**

- Verificar in silico a possibilidade de usar o sistema RNAi em espécies de *Phyllosticta*, com ênfase em *P. citricarpa*
- Construir um vetor para aplicação de RNAi via agrotransformação para fungos filamentosos
- Fazer a prova de conceito para uso de RNAi em *P. citricarpa* usando DsRed.
- Após, aplicar o sistema para a validação dos genes associados a patogenicidade em *P. citricarpa*

# Prova de conceito para o RNAi em *P. citricarpa*

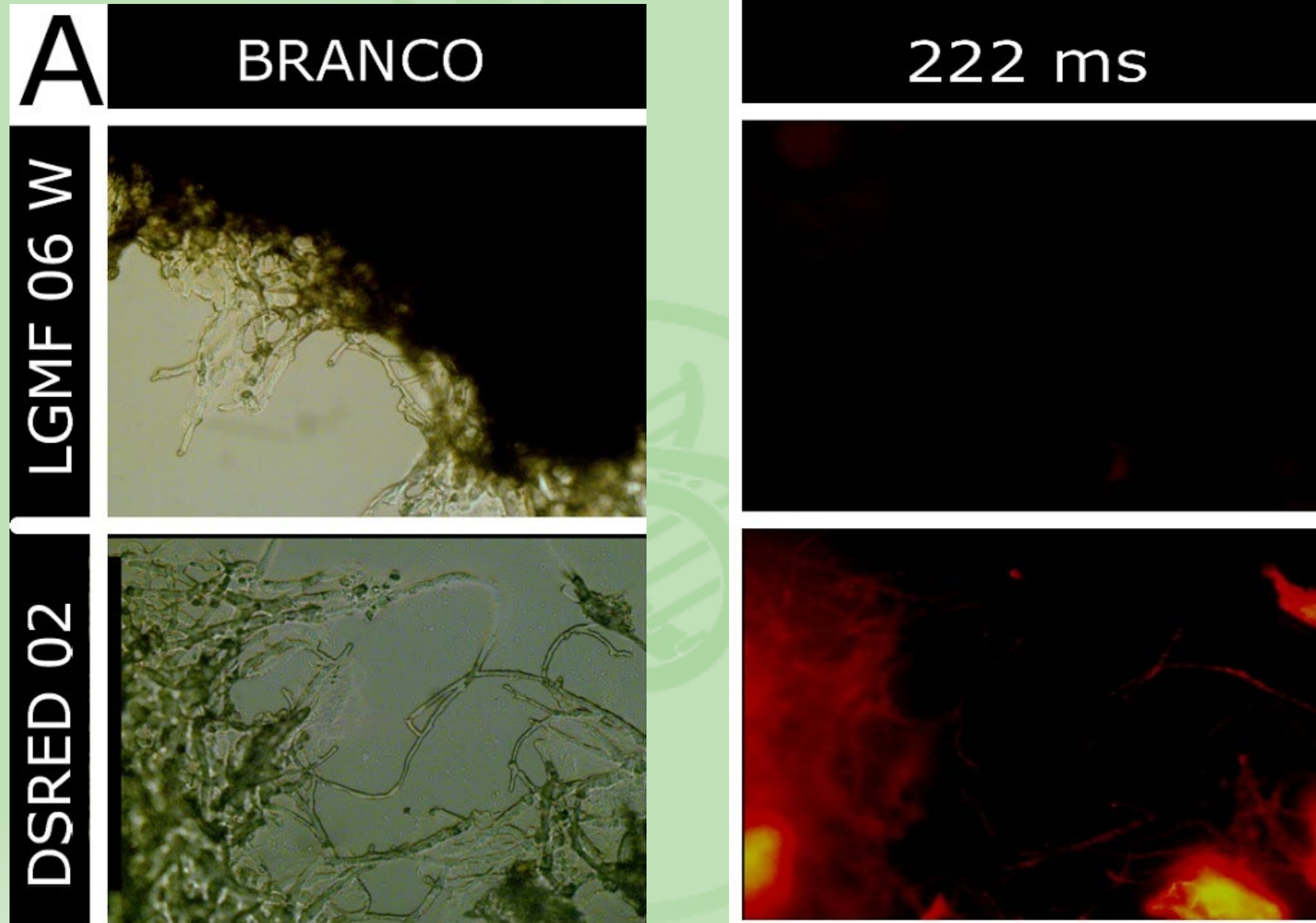
- Passo 1: inserir um gene reporter no fungo:





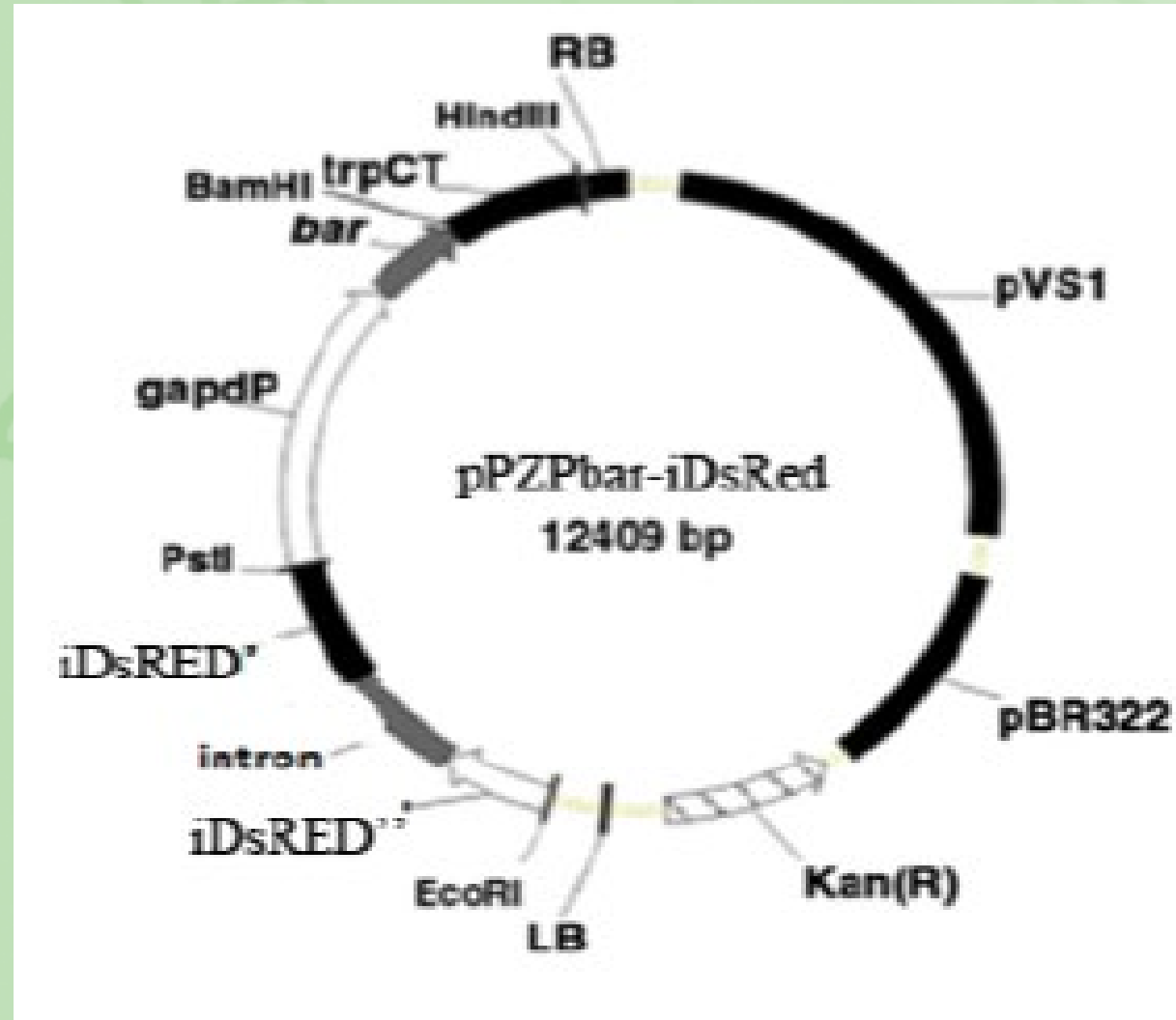
# Prova de conceito para o RNAi em *P. citricarpa*

Passo 1:  
inserir um  
gene  
reporter no  
fungo  
(DsRed):



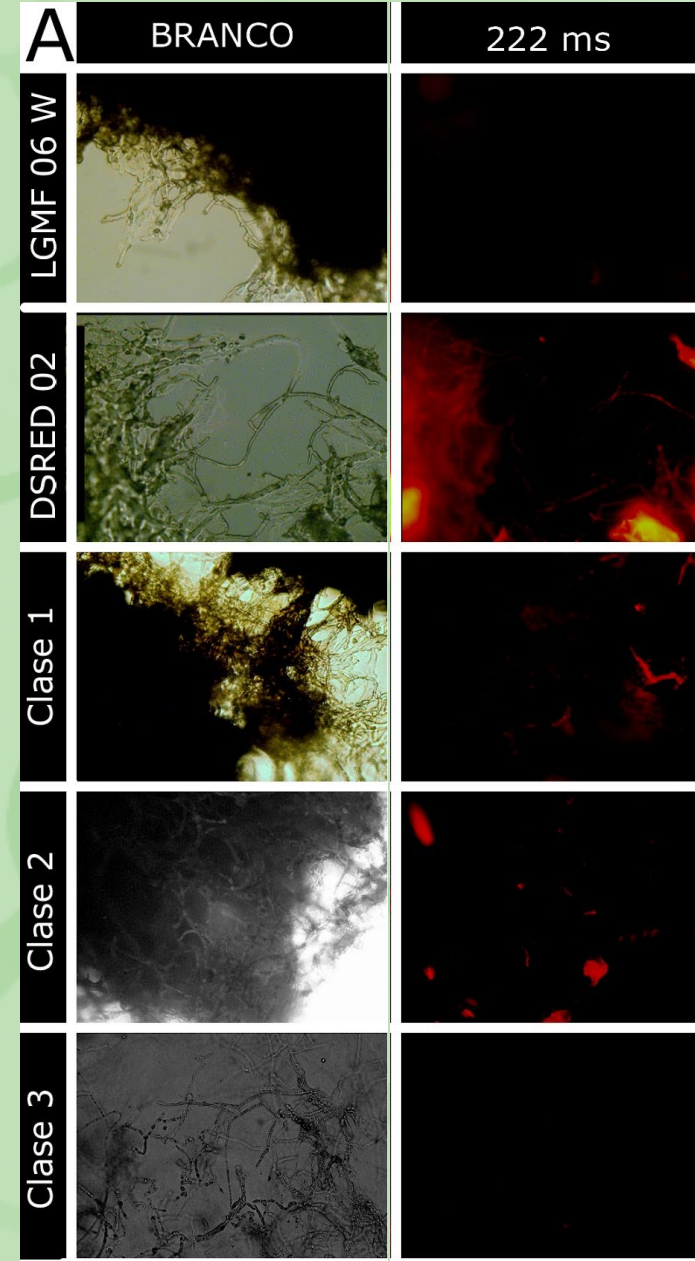
# Prova de conceito para o RNAi em *P. citricarpa*

Passo 2:  
Construir um  
vetor binário  
(agrobacterium)  
com RNAi para o  
DsRed



# Prova de conceito para o RNAi em *P. citricarpa*

Passo 3:  
Retransformar os  
mutantes  
expressando DsRed  
(usando agora o  
vetor de RNAi)

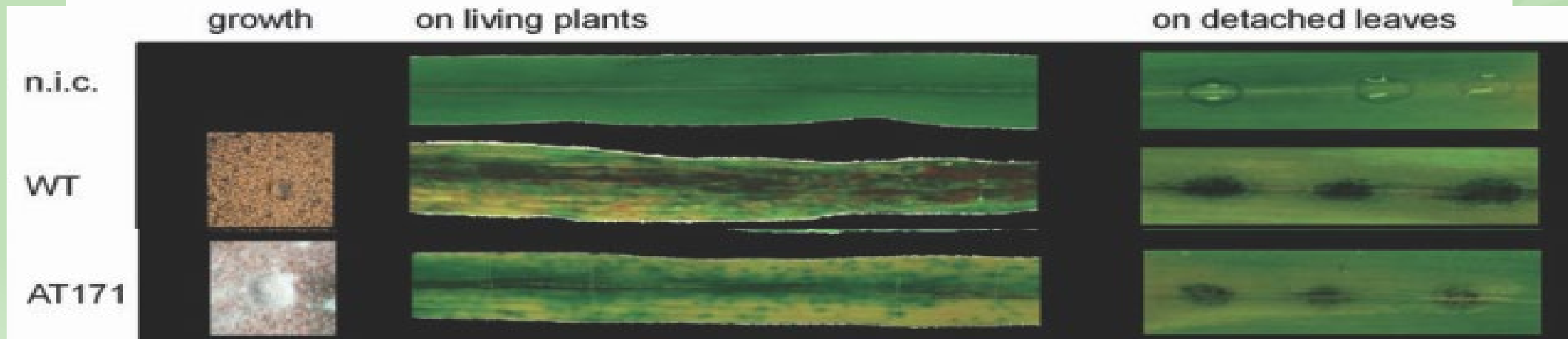
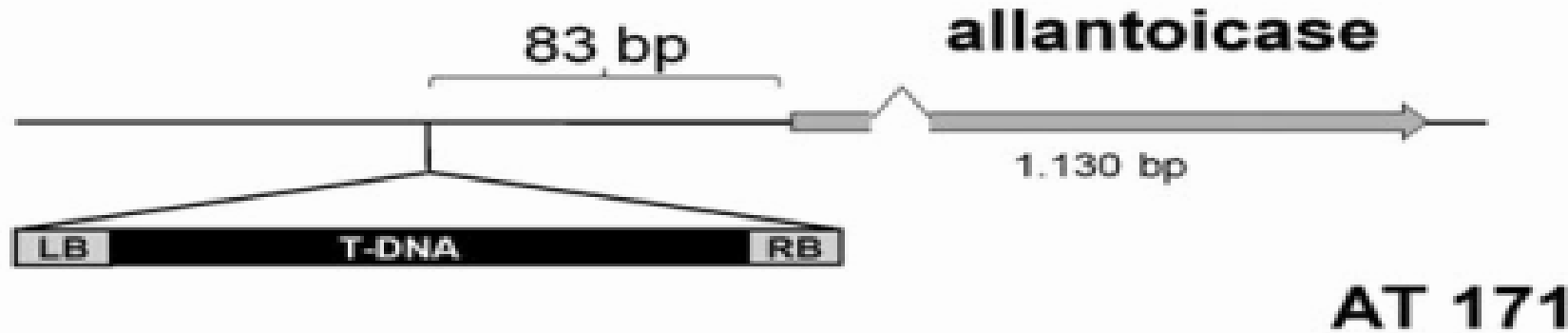


# Exemplo de Deleção gênica



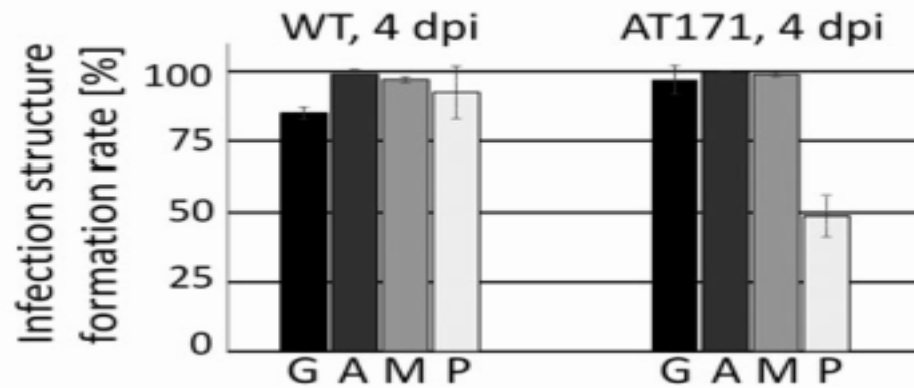
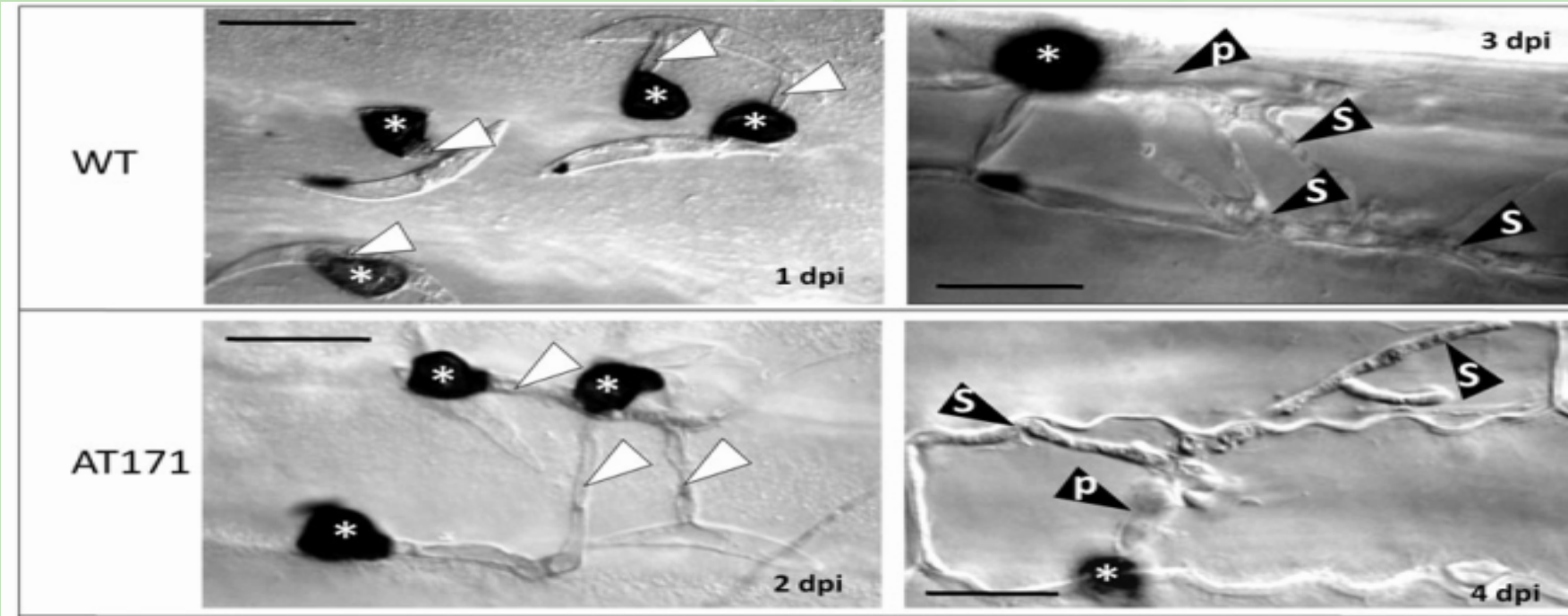


# ATMT: mutante de *Colletotrichum graminicola* com virulência reduzida em milho



**Münch et al. (2011):** mutante AT171 inserção do T-DNA no promotor do gene que codifica a enzima allantoicase

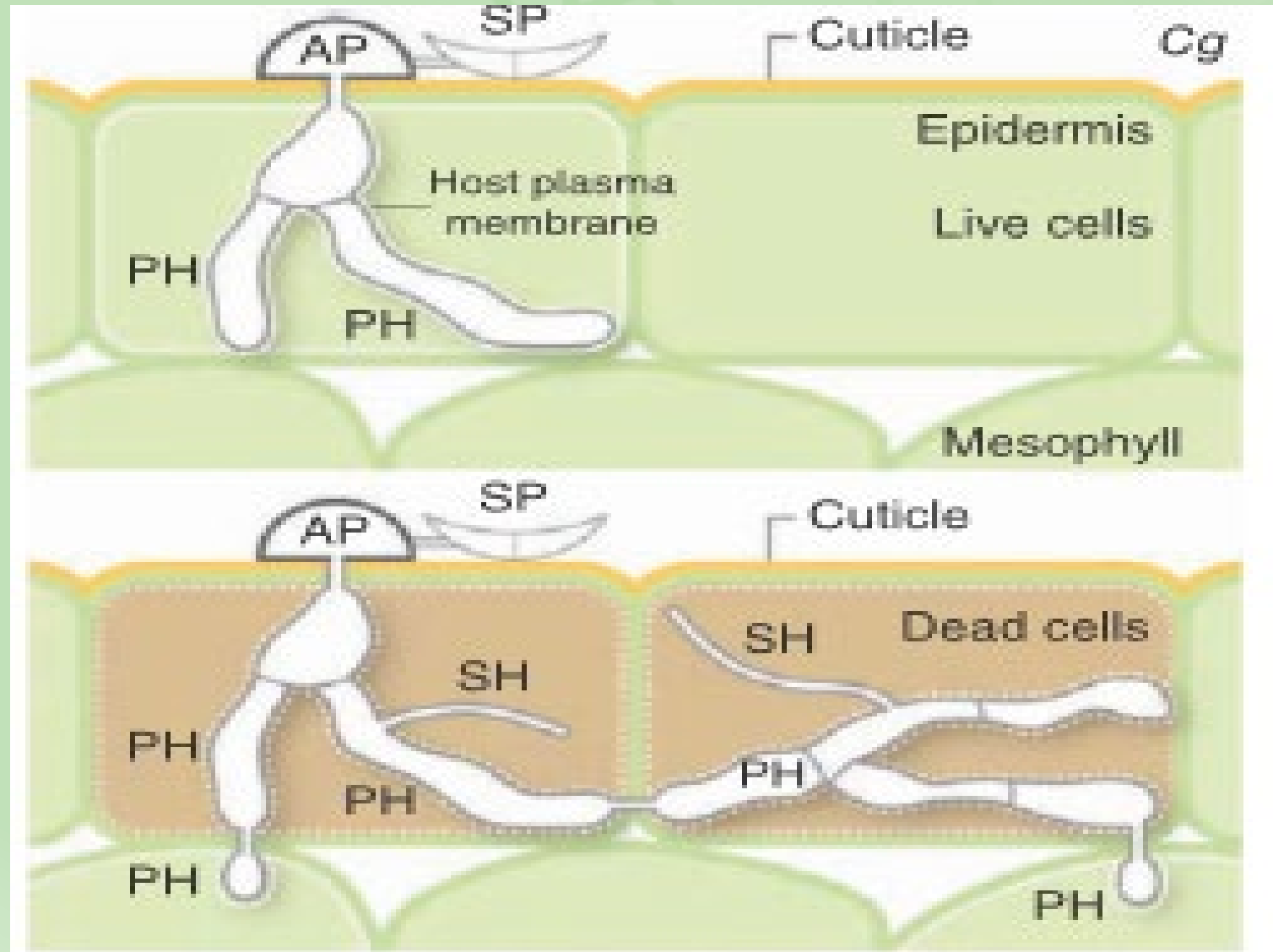
# Alterações na virulência



**G**, germ tubes; **A**, appressoria;  
**M**, melanized appressoria; **P**, penetration.

White arrowheads indicate germ tubes, black arrowheads mark in planta differentiated hyphae; **p** and **s** indicate primary and secondary hyphae. Appressoria are marked by asterisks.

# *Colletotrichum graminicola*: tipo de interação com o milho: fungo hemibiotrófico



# Prova de conceito – Deleção gênica

Phytopathology • 2020 • 110:1530-1540 • <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0114-R>

**Mycology**

*e-Xtra\**

## **Molecular Characterization of the Purine Degradation Pathway Genes *ALA1* and *URE1* of the Maize Anthracnose Fungus *Colletotrichum graminicola* Identified Urease as a Novel Target for Plant Disease Control**

Elvio Henrique Benatto Perino,<sup>1</sup> Chirlei Glienke,<sup>1,2,†</sup> Alan de Oliveira Silva,<sup>1,2</sup> and Holger B. Deising<sup>2,†</sup>

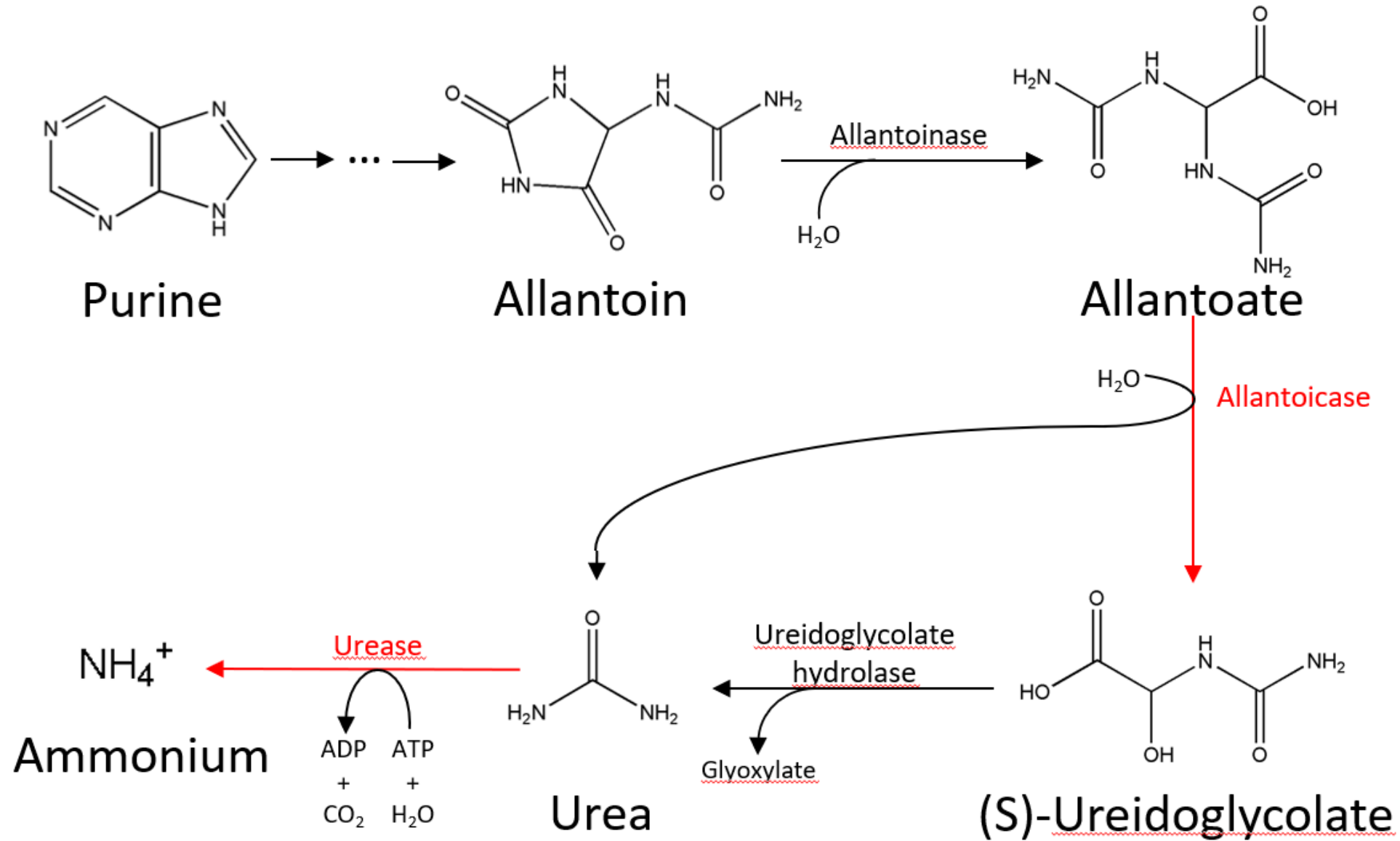
<sup>1</sup> Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná State, Brazil

<sup>2</sup> Martin Luther University Halle-Wittenberg, Faculty of Natural Sciences III, Institute for Agricultural and Nutritional Sciences, Chair for Phytopathology and Plant Protection, Betty-Heimann-Str. 3; D-06120 Halle (Saale), Germany

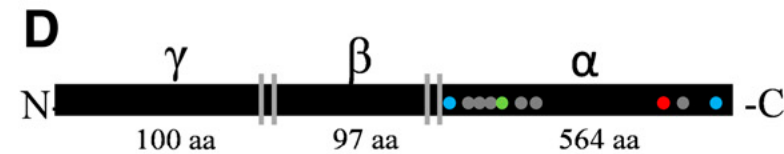
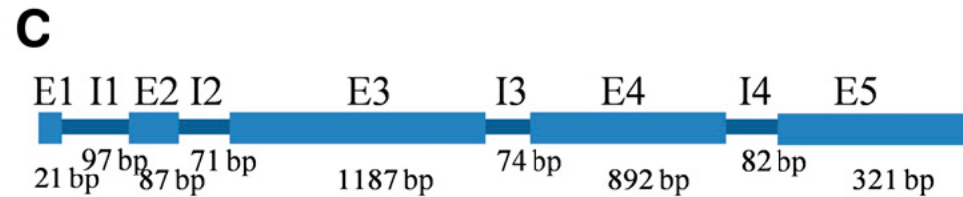
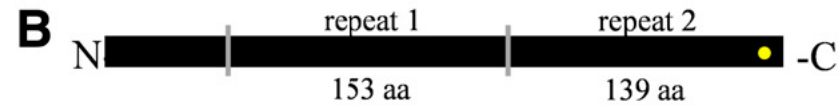
Accepted for publication 27 April 2020.

---





# Estrutura dos genes (A, C) e das proteínas (B, D)

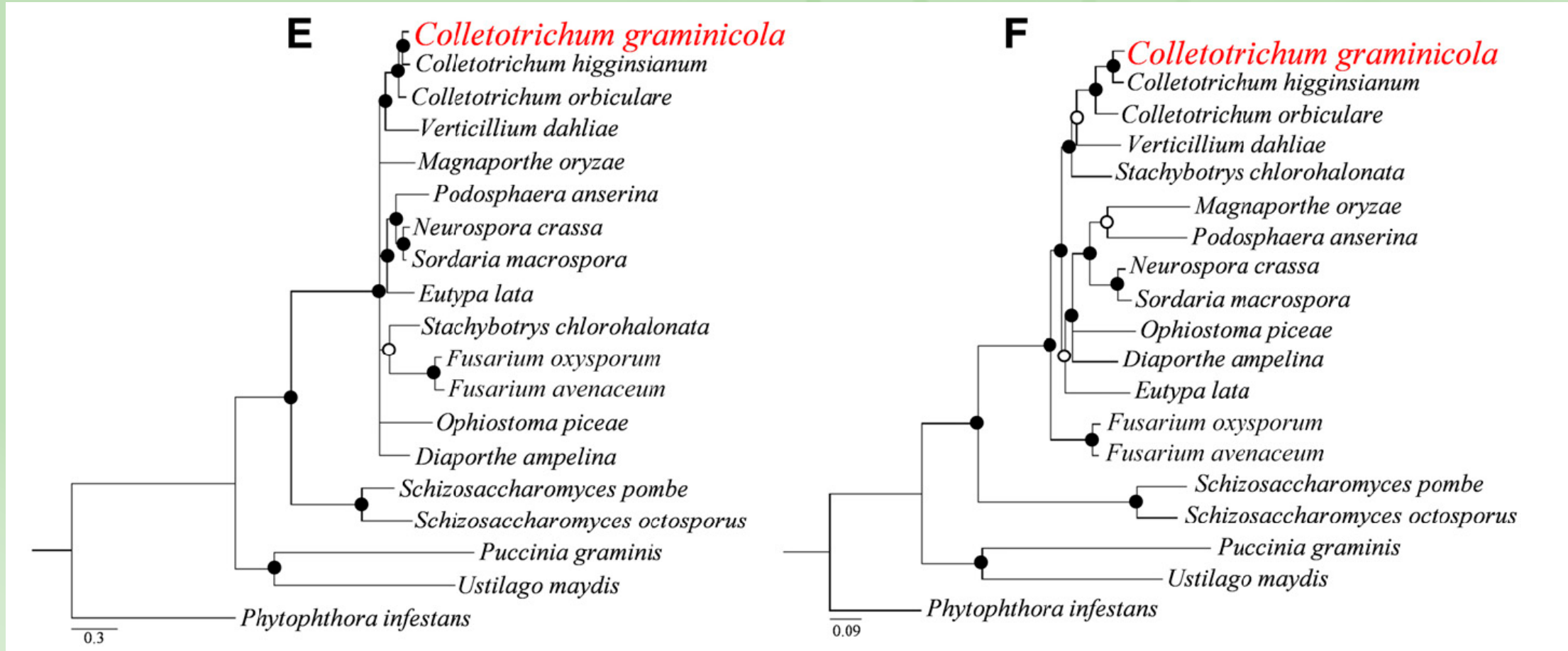


- nikel binding site
- substrate binding site
- active center (proton donor site)
- tyrosine kinase phosphorylation site
- amidation site

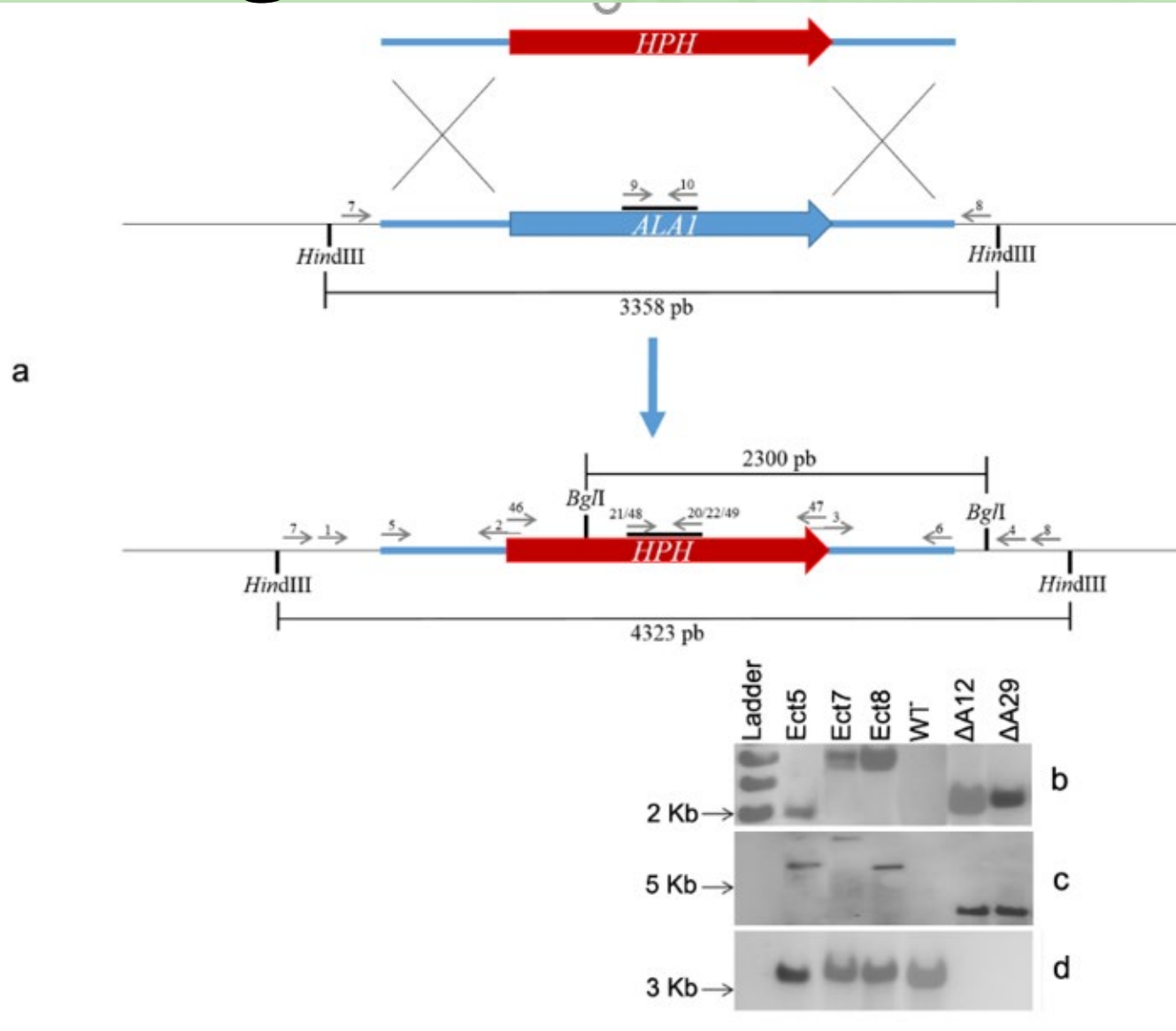
A) Ala1

C) Ure1

# Filogenia dos genes Ala1 e Ure1

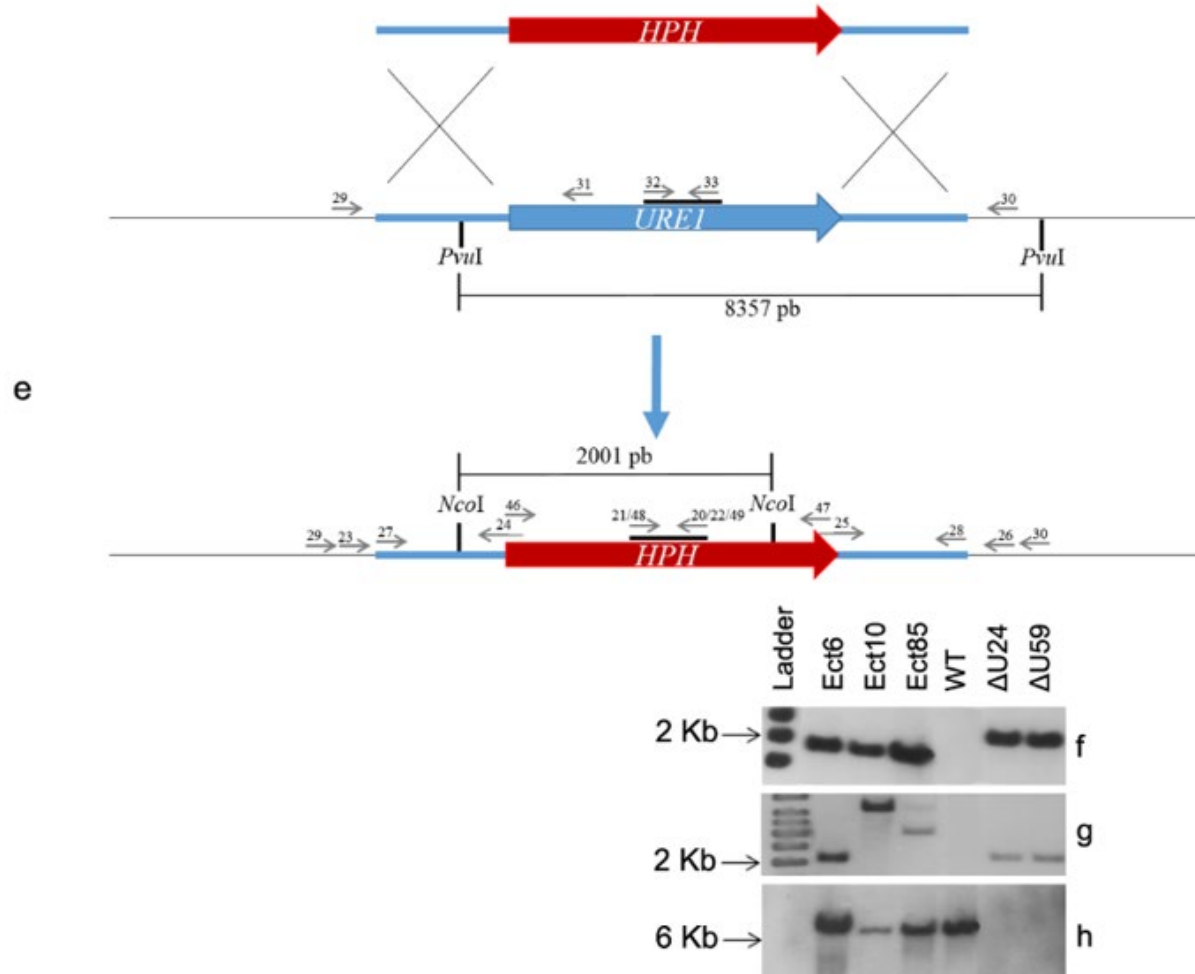


# Deleção do gene Ala1

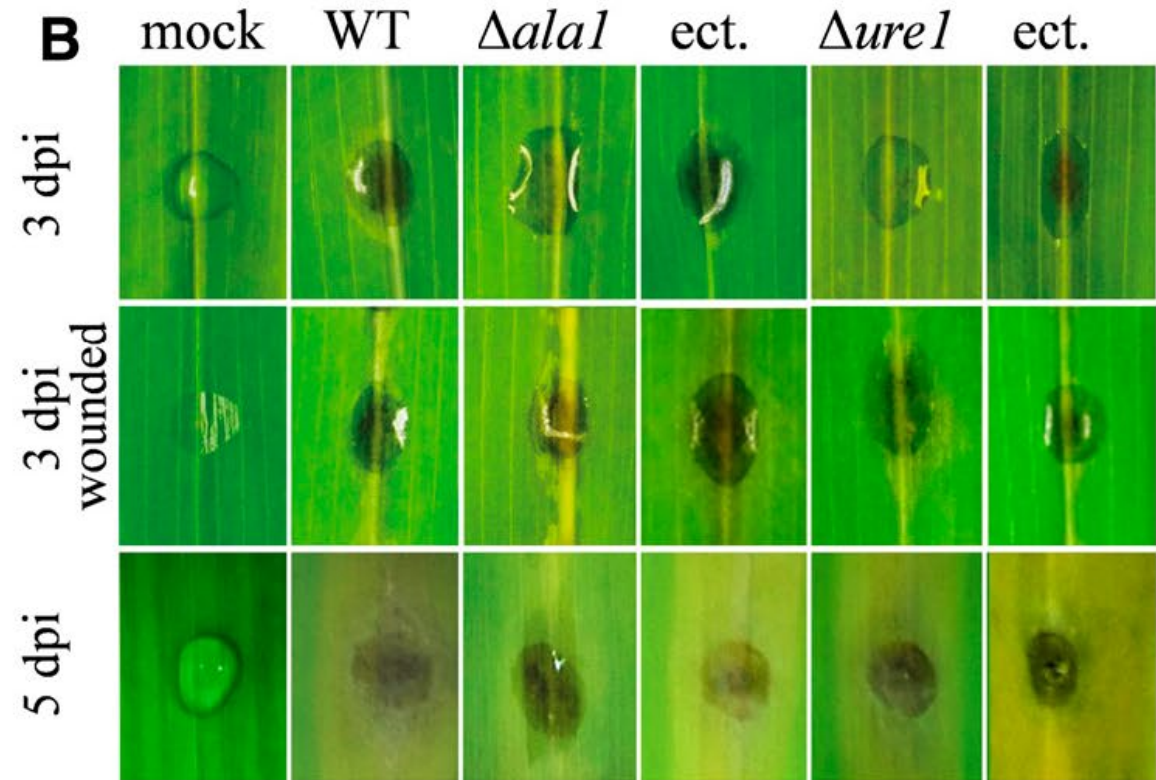
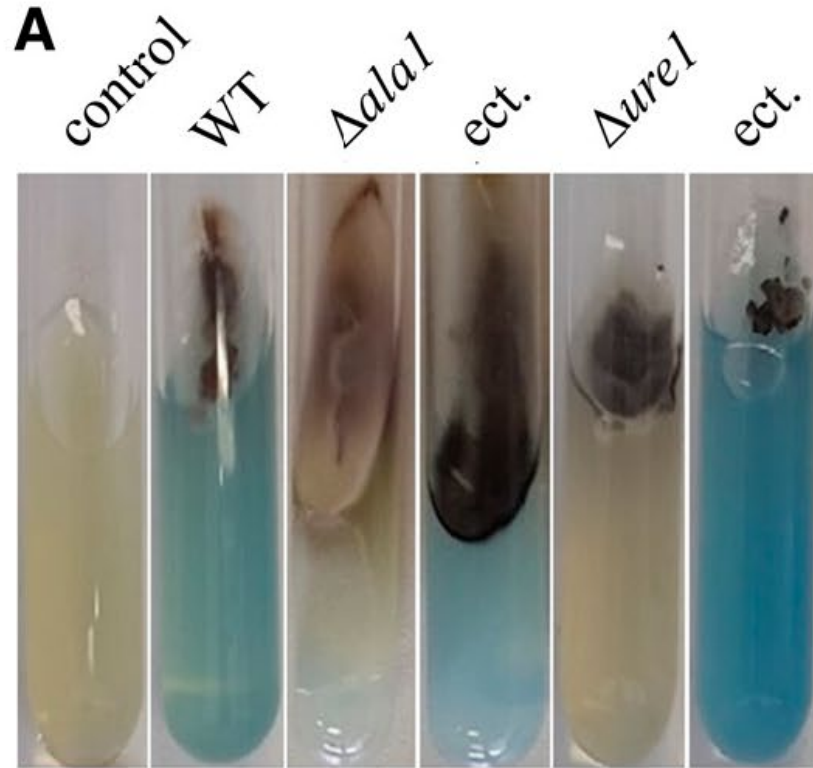




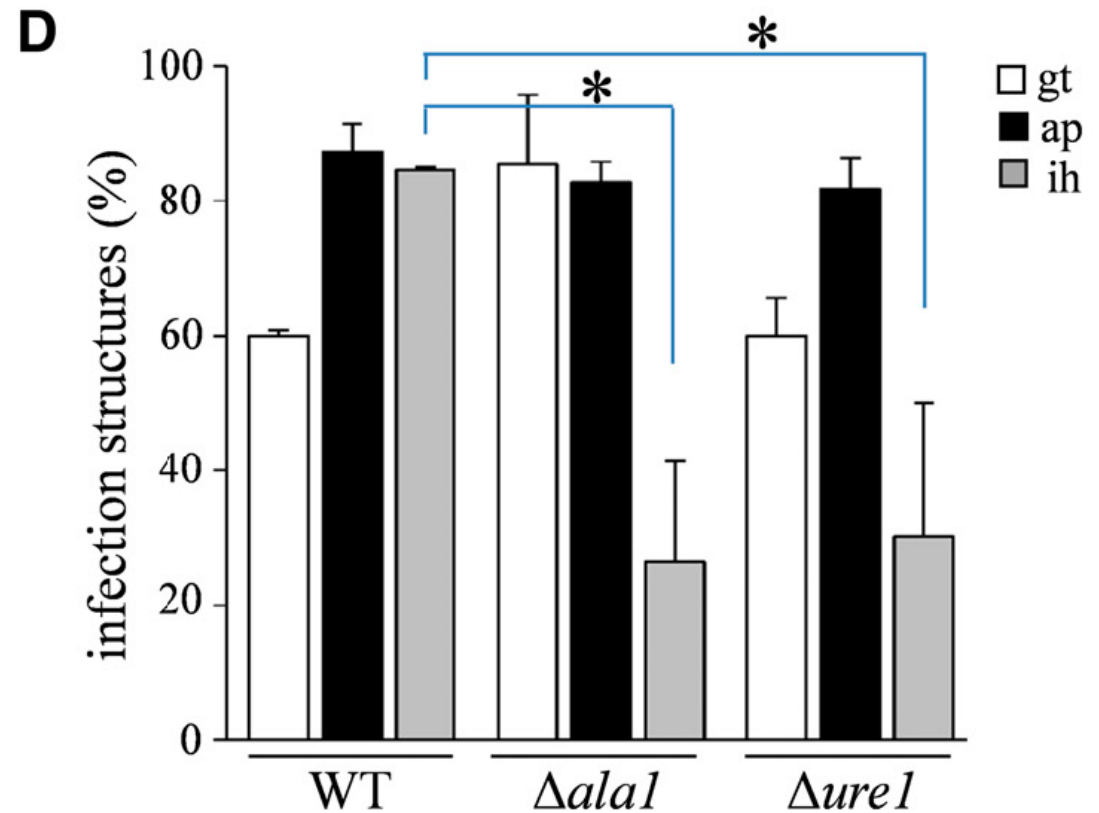
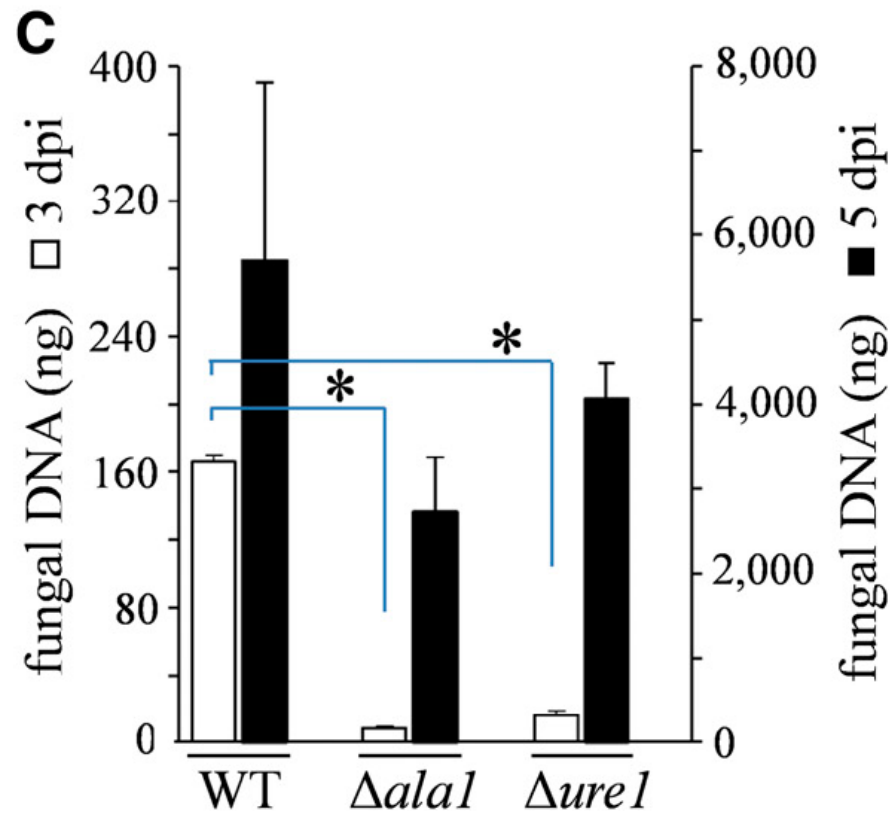
# Deleção do gene Ure1



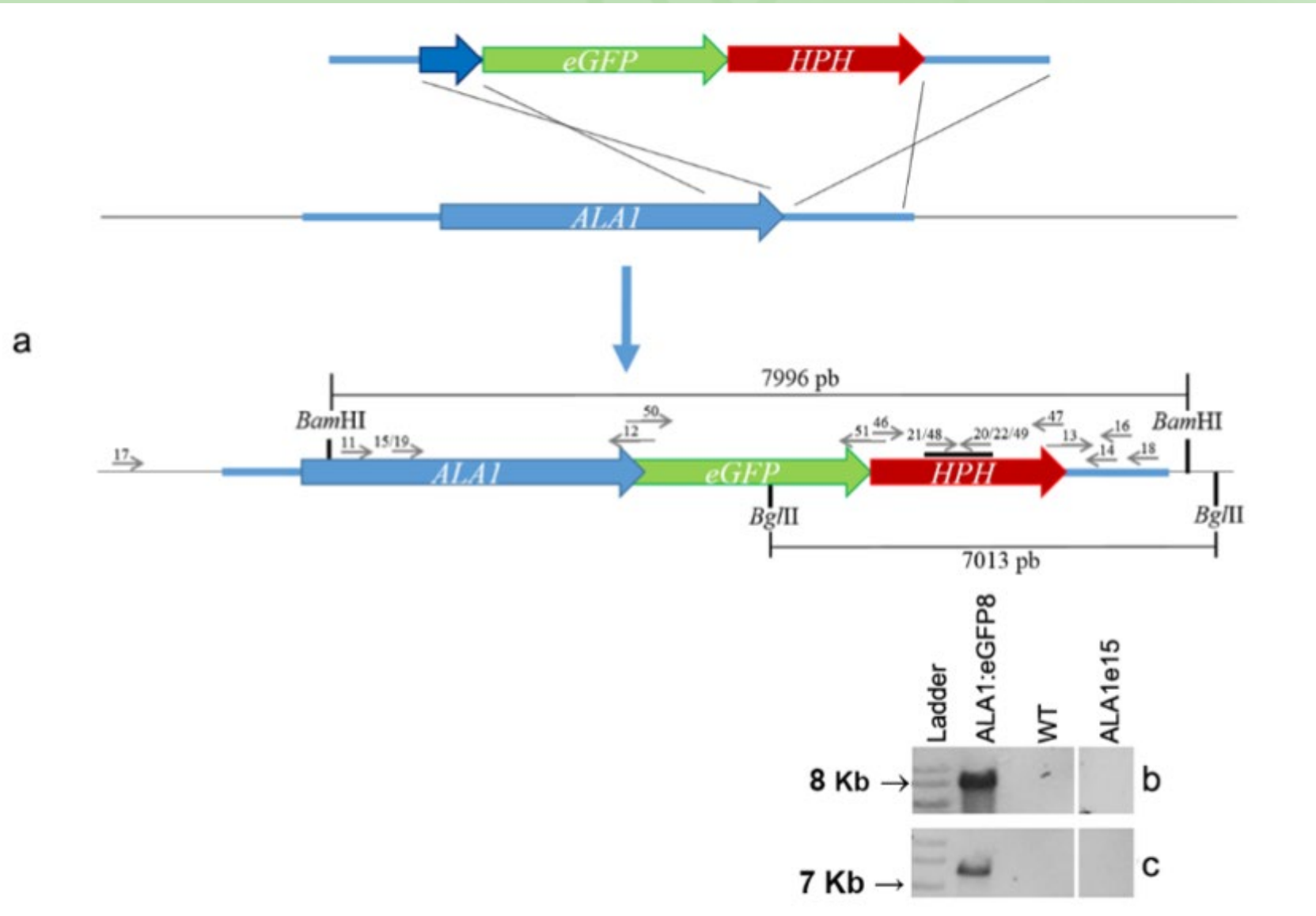
# Avaliação dos mutantes



# Avaliação dos mutantes qPCR

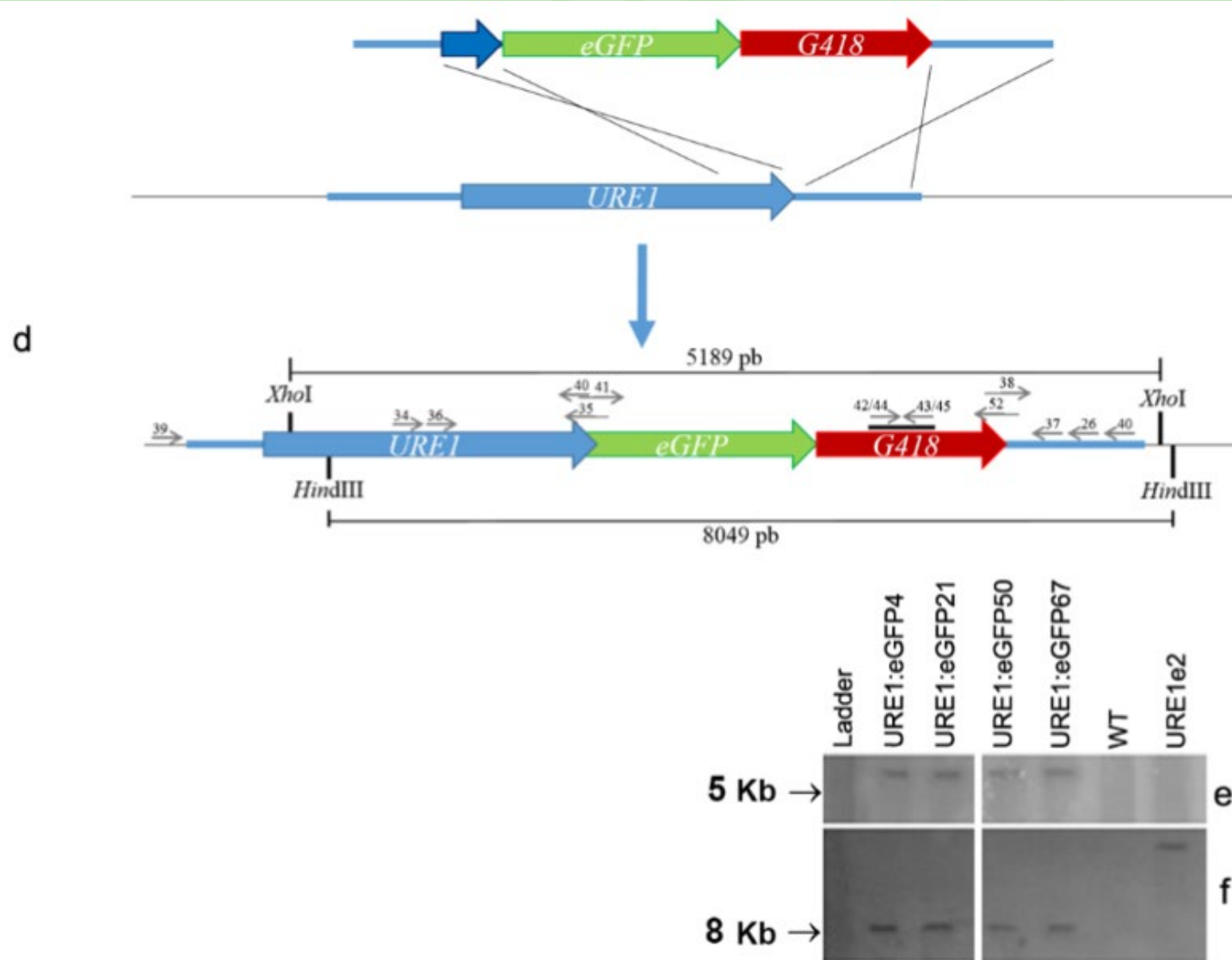


# Análise da expressão do gene Ala1 – fusão com eGFP

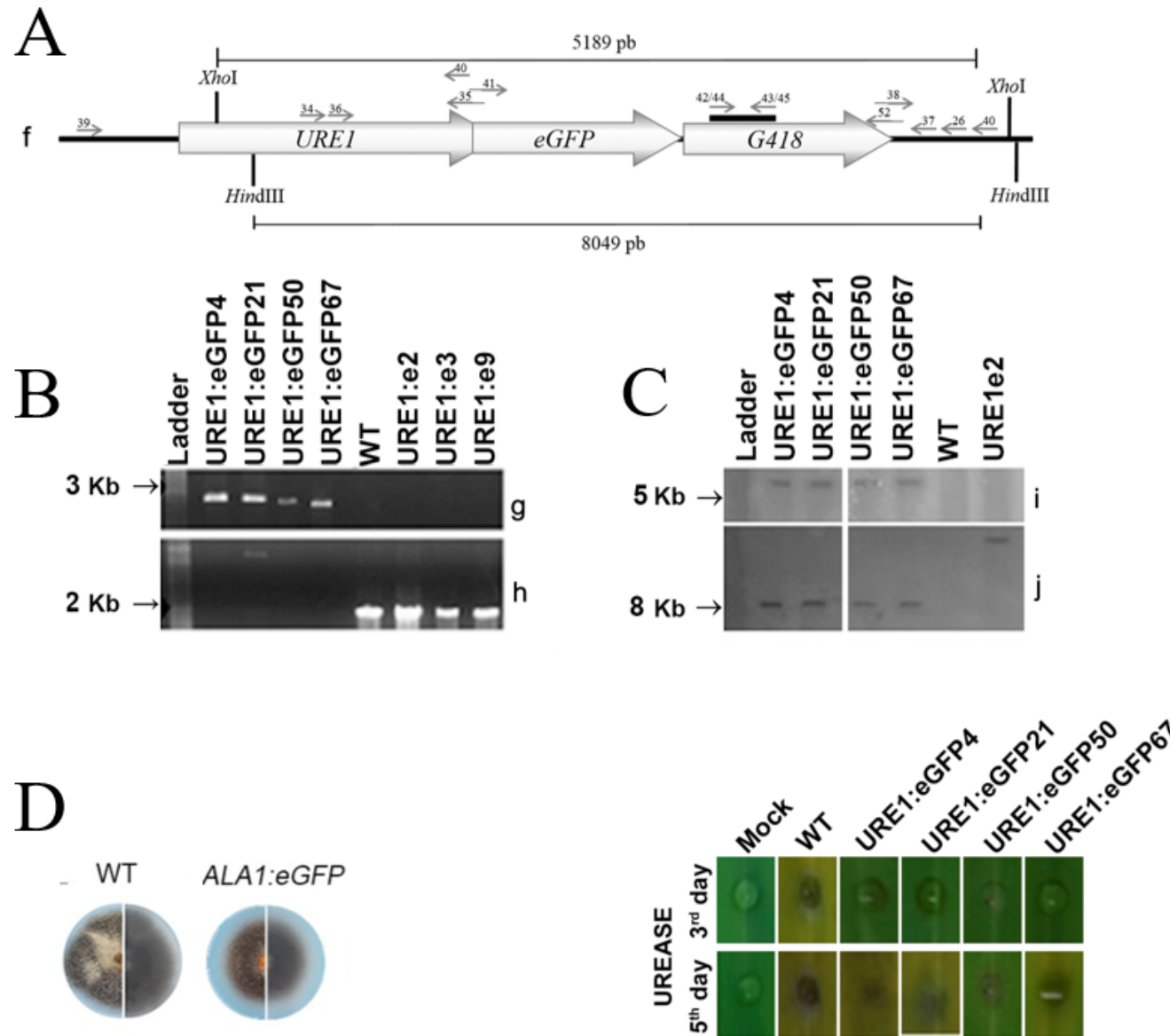




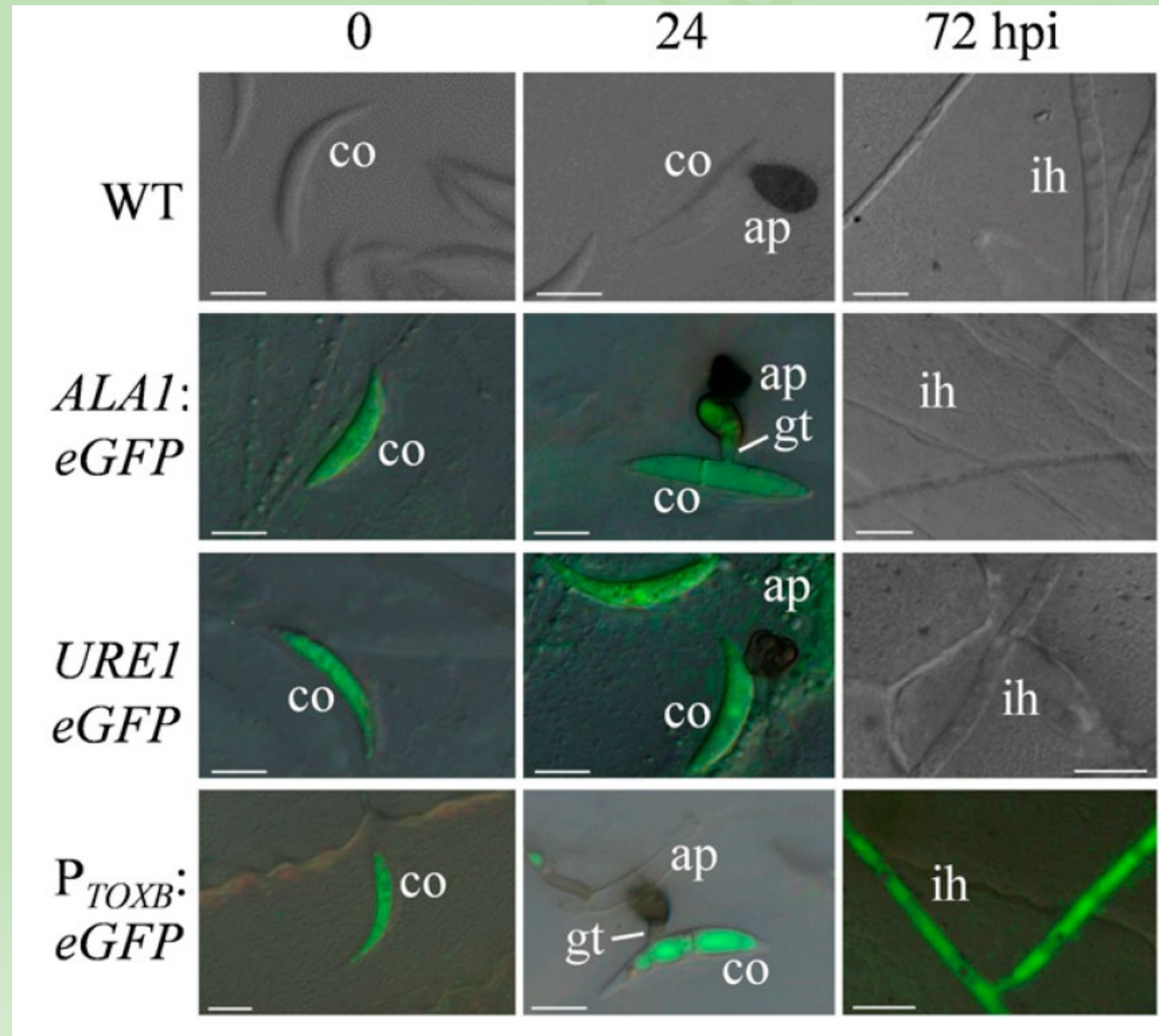
# Análise da expressão do gene Ure1 – fusão com eGFP



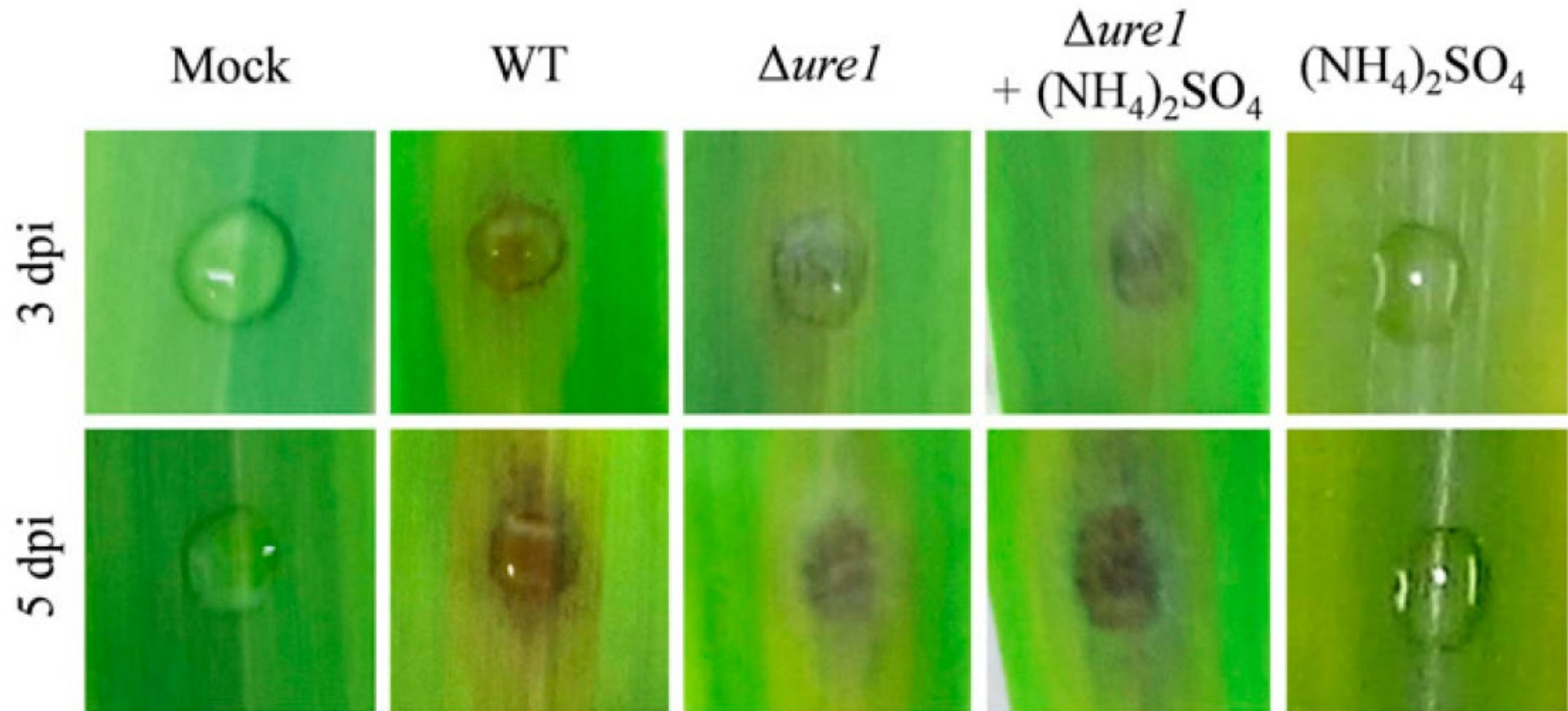
# Análise da expressão do gene Ure1 – fusão com eGFP



# Análise da expressão dos genes – fusão com eGFP

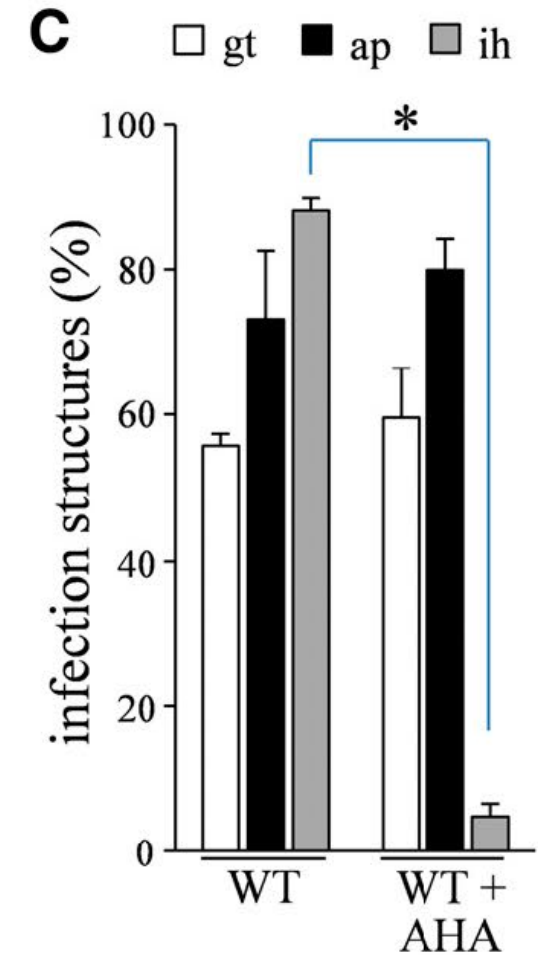
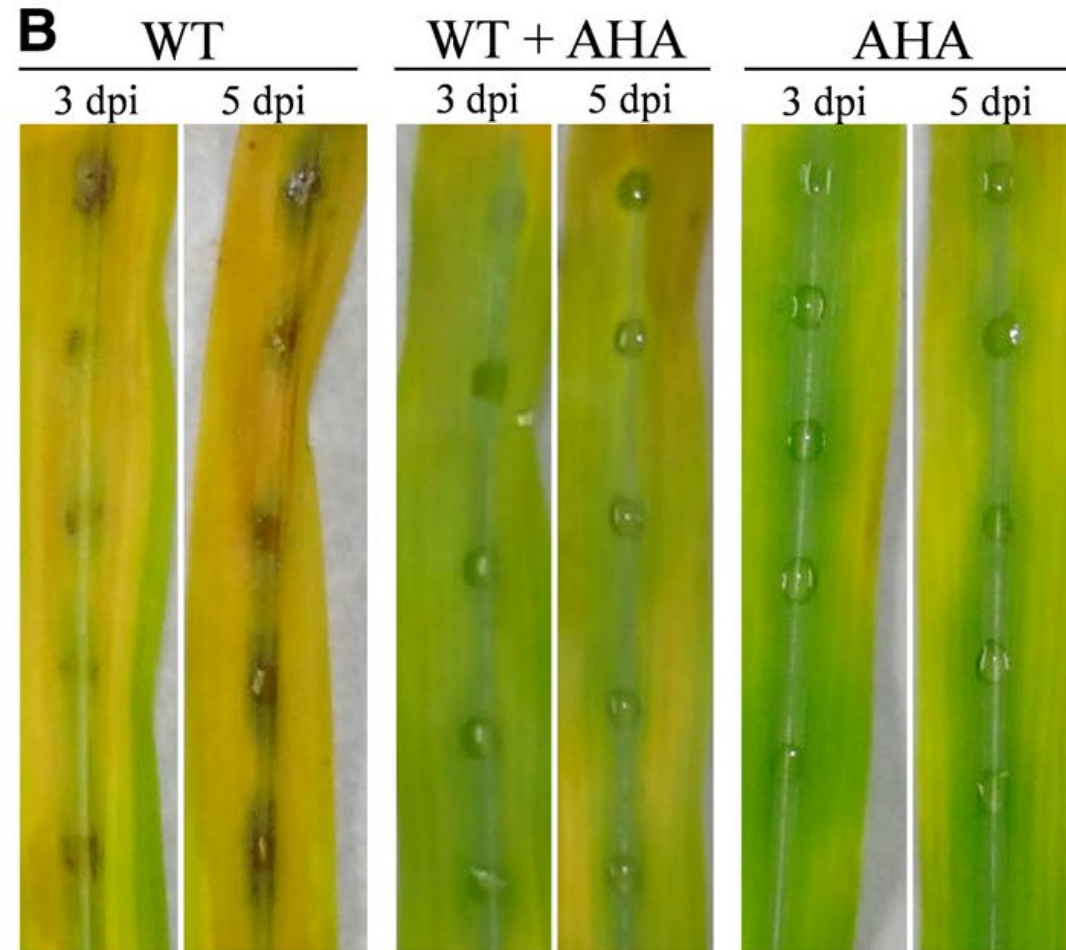


# Suplementação com amônia – mutantes voltam a causar sintomas



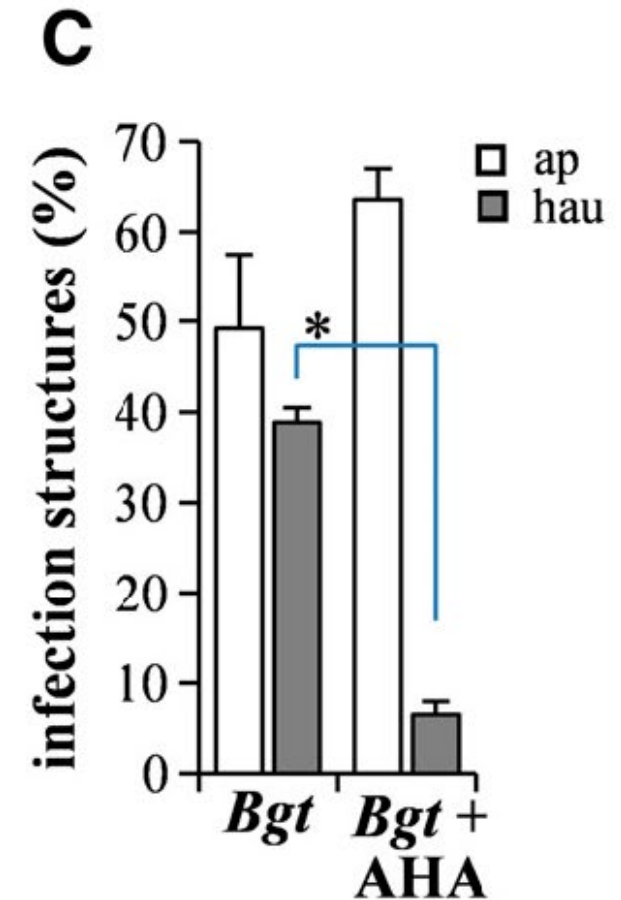
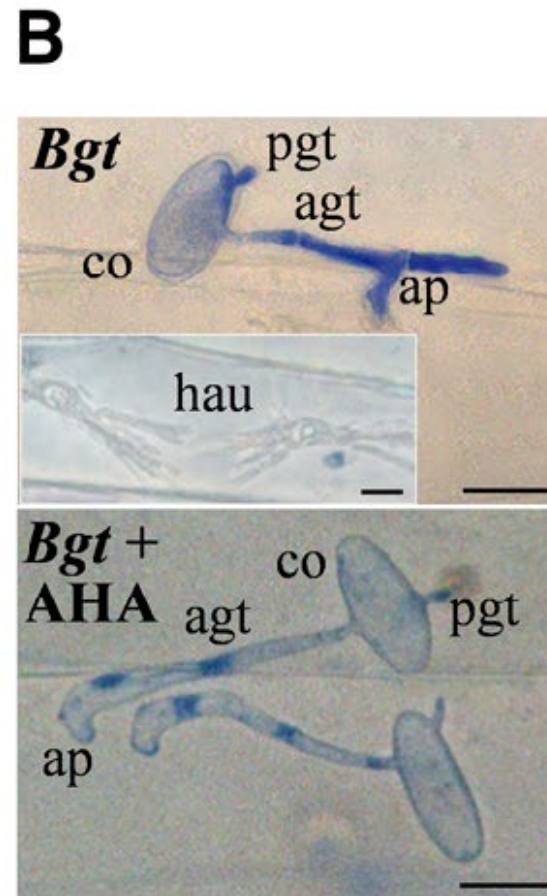
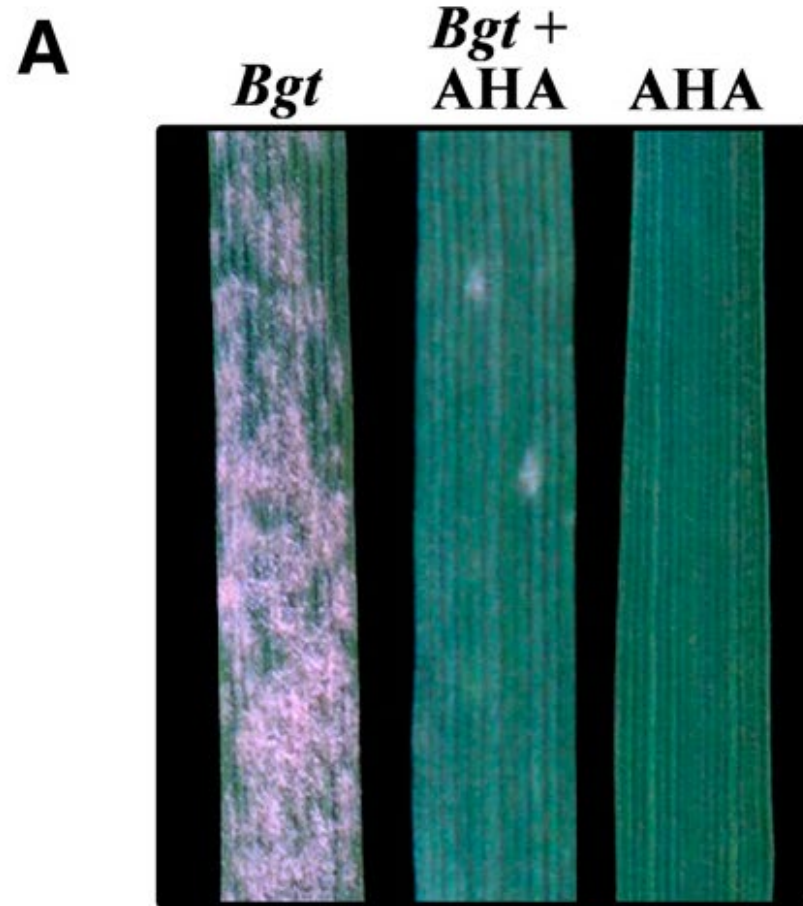


# Inibidor de Urease – Selvagem com fenótipo semelhante aos mutantes



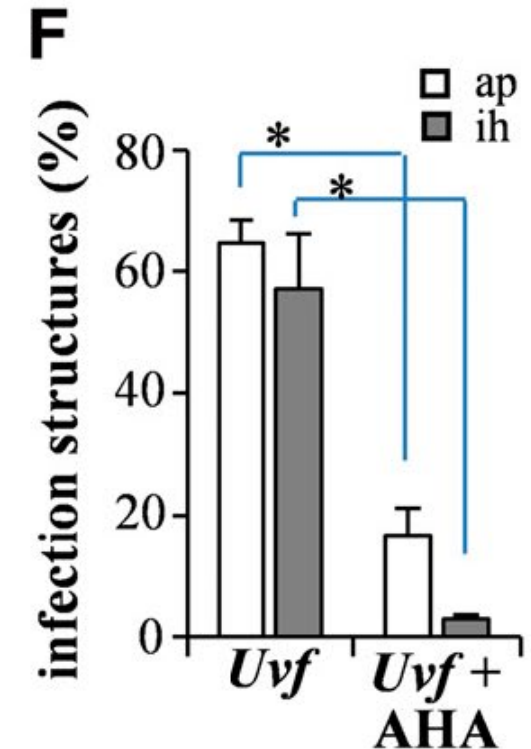
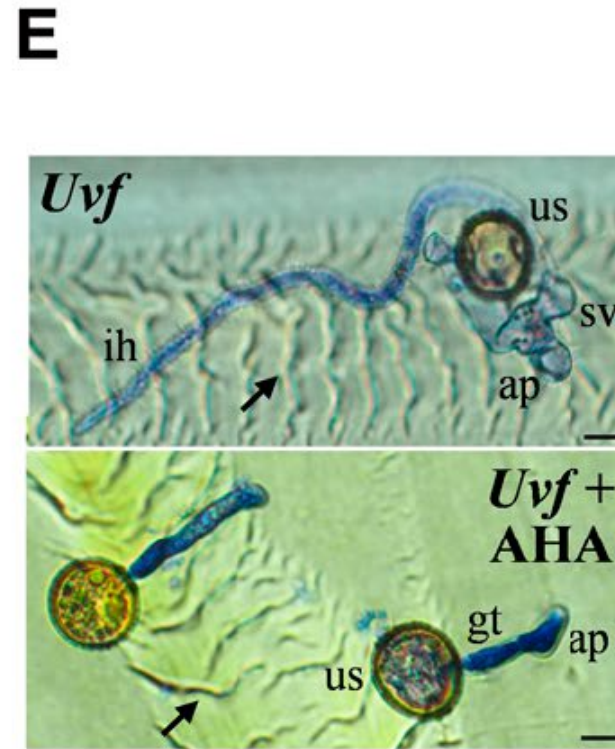
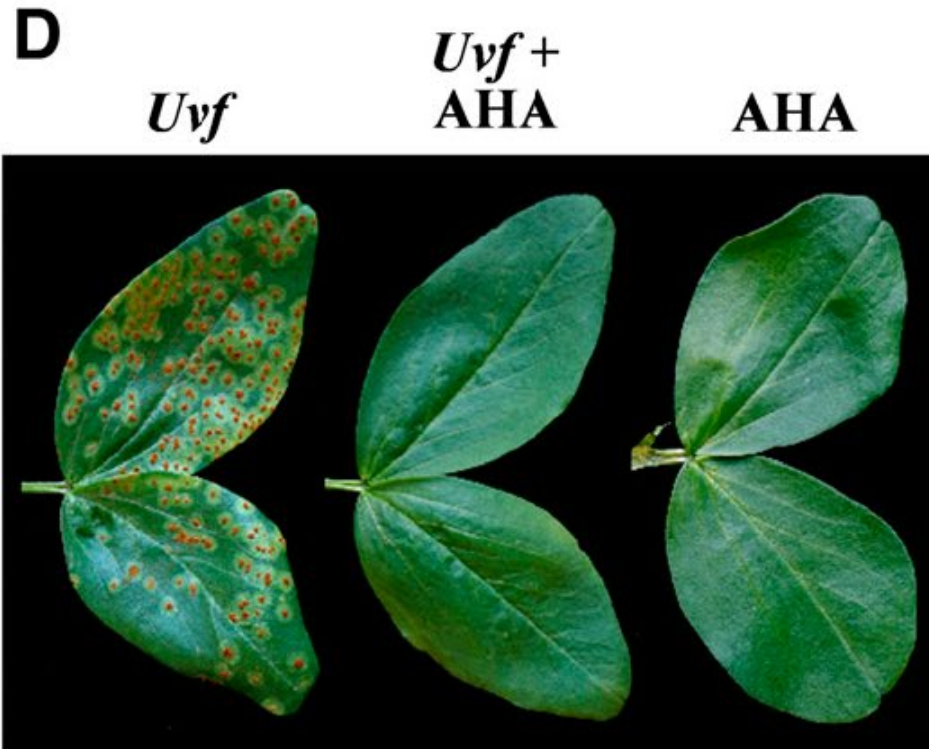
Acetohydroxamic acid (AHA)

# Avaliação do Inibidor de Urease em outros patossistemas



Milho e *Blumeria graminis* f sp. *Tritici* (*Bgt*)

# Avaliação do Inibidor de Urease em outros patossistemas





# Avaliação do Inibidor de Urease em outros patossistemas

**G**  
*Ps*      *Ps* +  
AHA      AHA



**H**  
*Pi*      *Pi* +  
AHA      AHA



**G)** *Puccinia sorghi* (*Ps*)

**H)** *Phytophthora infestans* (*Pi*)