

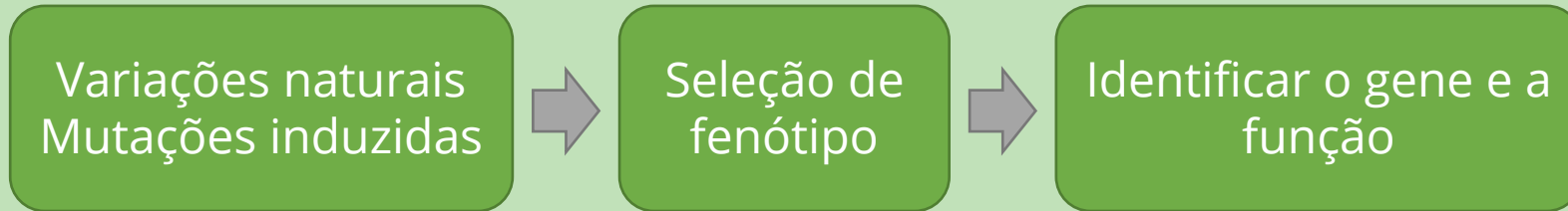
Seleção de Genes Candidatos

Alan Silva

Tipos de análise genética de função gênica

- Genética Direta (*Forward genetics*)

- Do fenótipo ao genótipo



Biblioteca de Mutantes

RNA seq

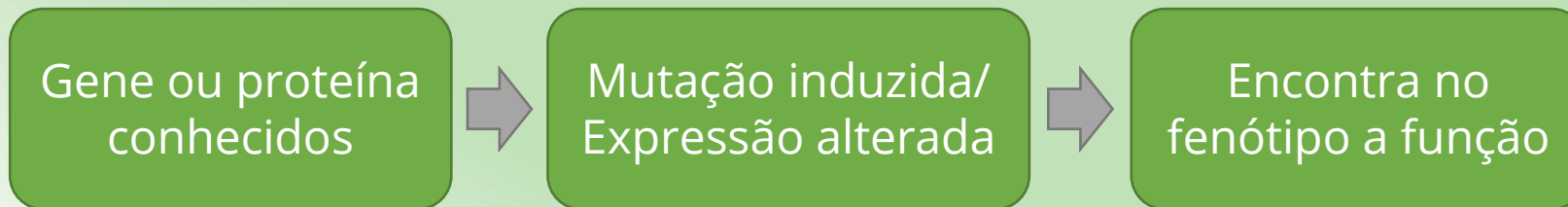
SNPs

Proteoma

Secretoma

- Genética Reversa (*Reverse genetics*)

- Do genótipo ao fenótipo



Deleção

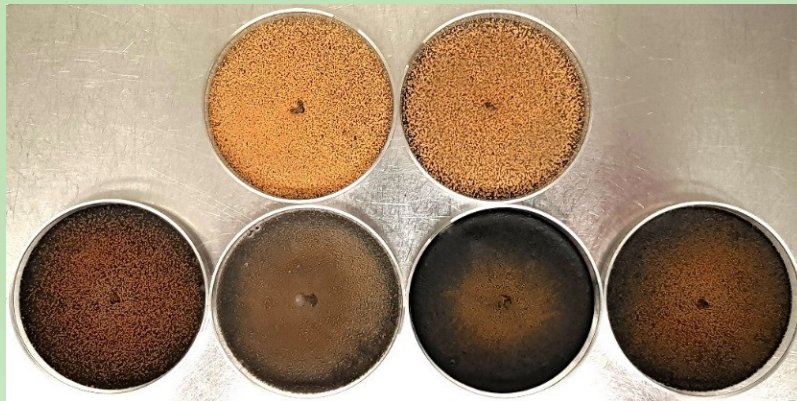
Silenciamento

Super-expressão

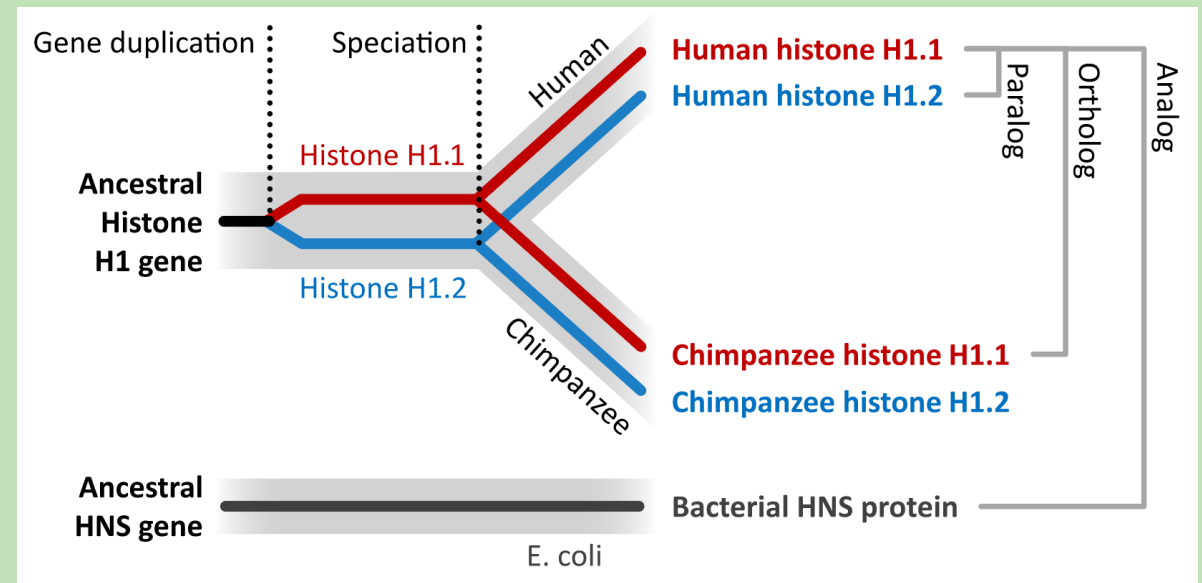
Marcação fluorescente

Métodos de seleção de genes candidatos

- Biblioteca de transformantes com mutação aleatória
- Gene semelhante em outras espécies
 - Genes Homólogos
 - Genes Ortólogos
 - Genes Parálogos



Mutantes de *Colletotrichum graminicola*
Fonte: Alan Silva



Fonte: Thomas Shafee (2018)

Biblioteca de transformantes

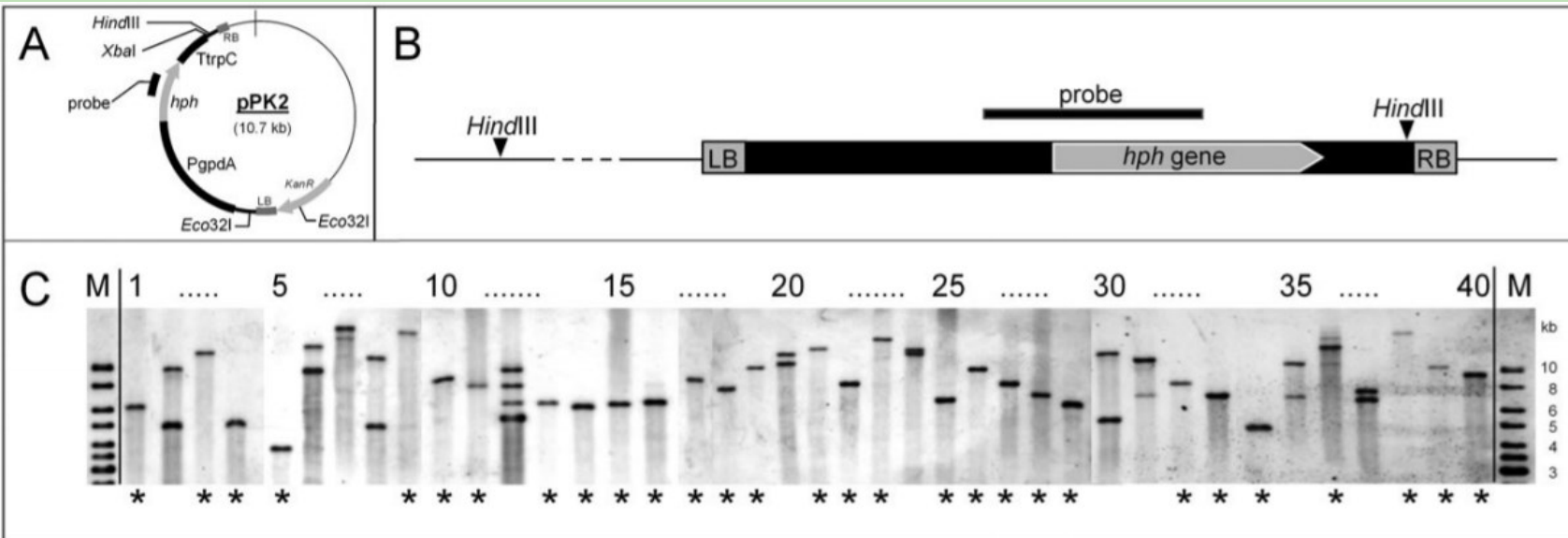
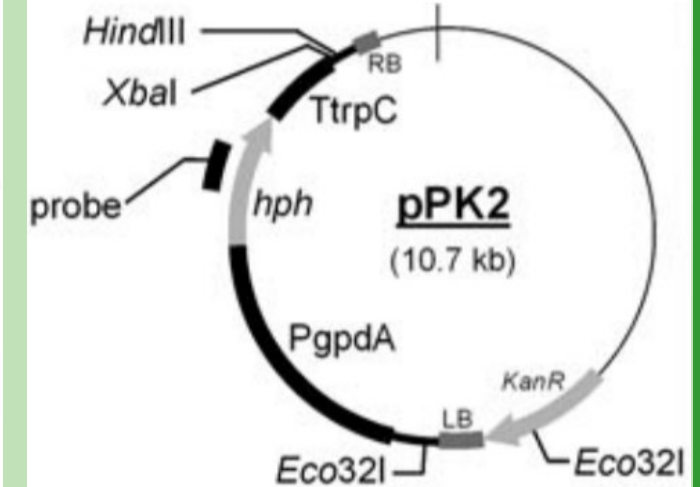
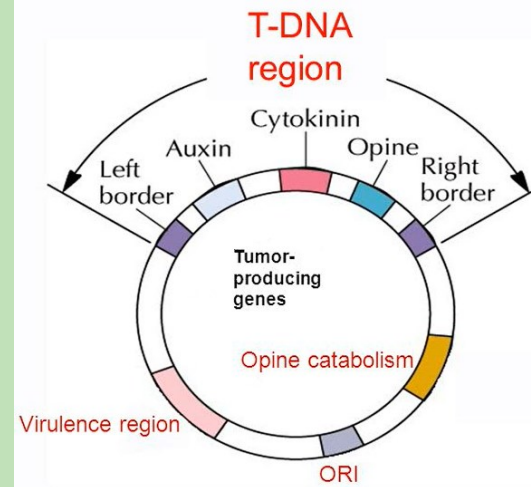
Molecular Plant Pathology

MOLECULAR PLANT PATHOLOGY (2011) 12(1), 43–55
DOI: 10.1111/J.1364-3703.2010.00651.X

Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

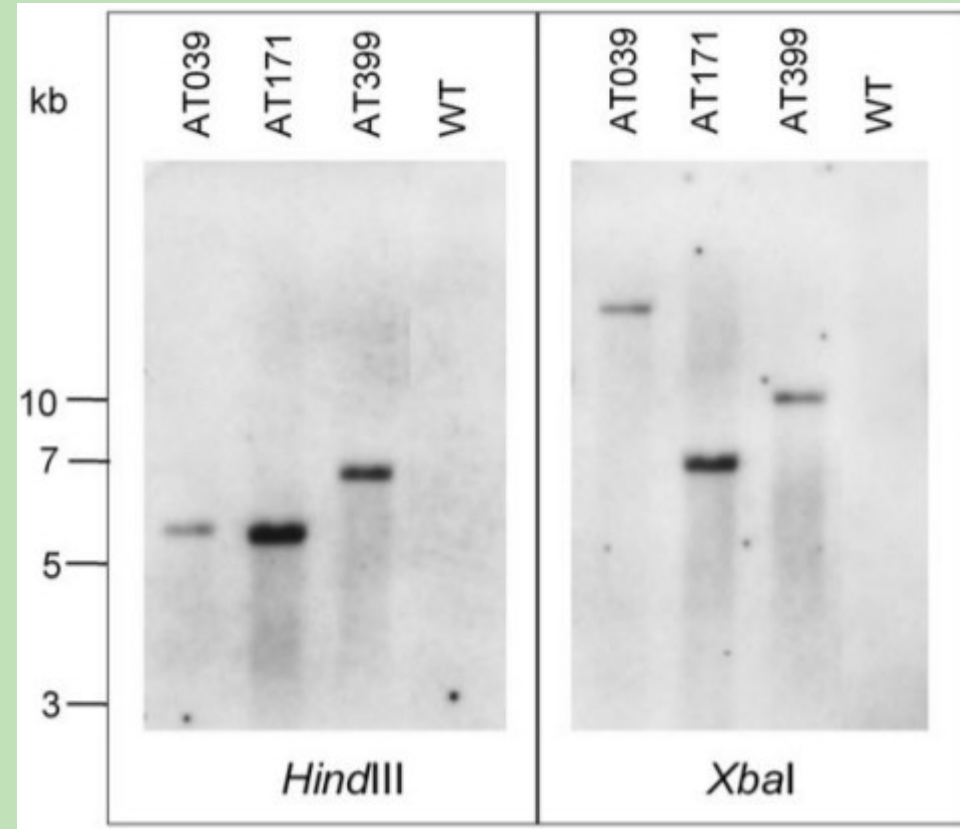
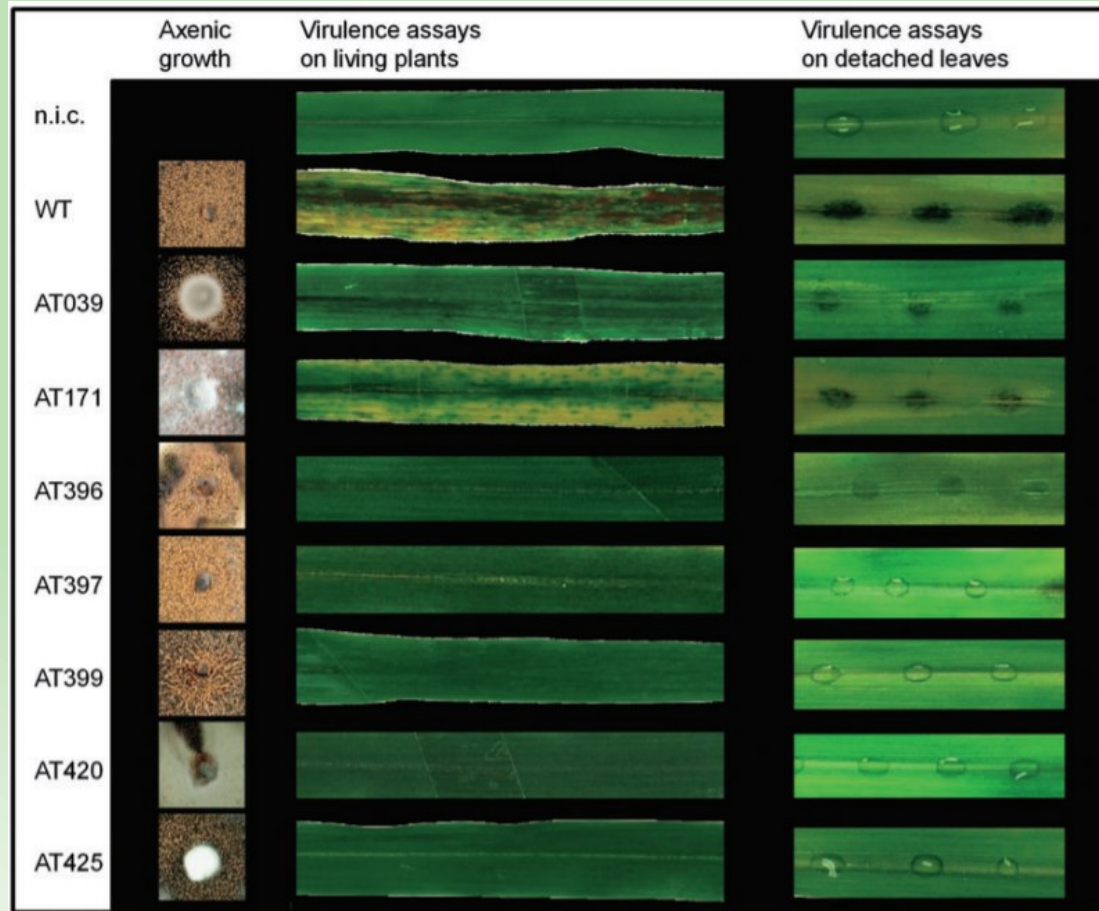
STEFFEN MÜNCH¹, NANCY LUDWIG¹, DANIELA S. FLOSS^{1,†}, JANYCE A. SUGUI^{1,‡}, ANNA M. KOSZUCKA², LARS M. VOLL², UWE SONNEWALD² AND HOLGER B. DEISING^{1,*}

¹Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Phytopathology and Plant Protection, Betty-Heimann-Str. 3, 06120 Halle (Saale), Germany
²Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Institute of Biology, Chair of Biochemistry, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen, Germany



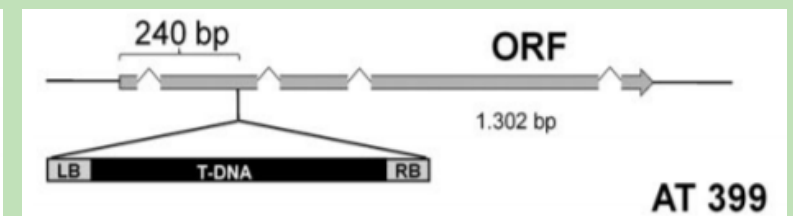
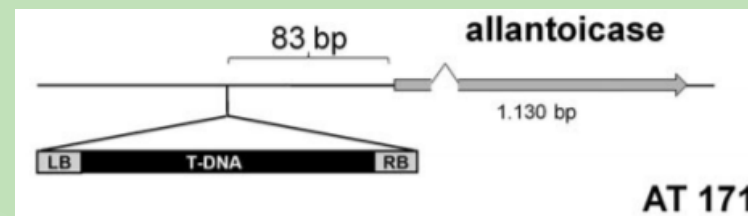
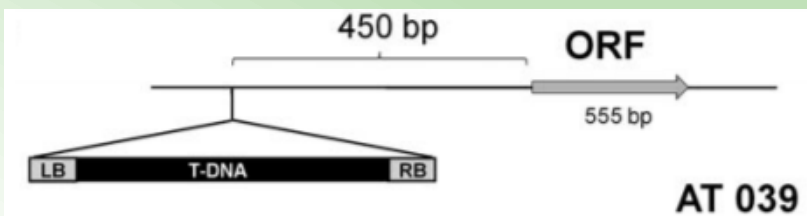
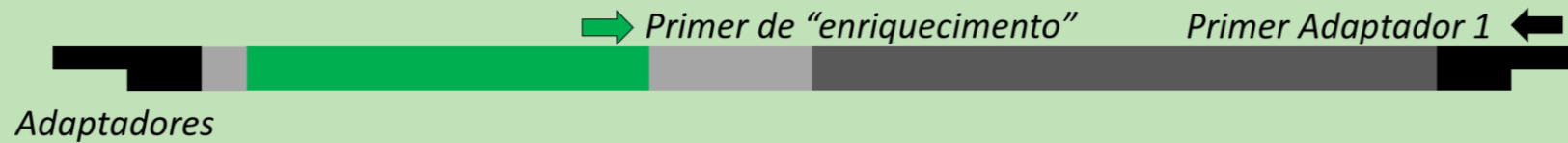
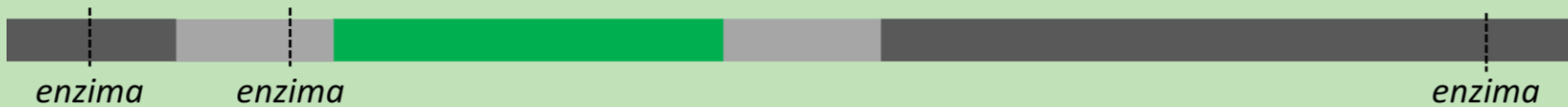
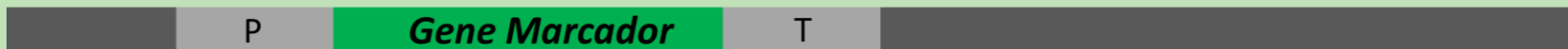
Biblioteca de transformantes

- Análise de crescimento e infecção / *Southern blot*



Biblioteca de transformantes

- Genome Walking para identificar a região de inserção



Busca de genes homólogos: Estudo de caso

- Gene descrito em outras espécies
 - Encontrar a sequência de DNA ou Aminoácidos publicada
 - Normalmente descrito como *Accession Number*
 - Blastar no genoma do seu organismo em estudo
 - Blast no NCBI / Blast local e predição com Bioedit/Augustus
 - Tipos de Blast: BlastN, BlastP, tBlastN, BlastX
 - Anotação gênica e número de cópias
 - Verificar se existe anotação no NCBI, Uniprot, Ensembl etc
 - Verificar se o gene possui cópia única
 - Baixar sequências similares de outras espécies
 - Sequências gênicas ou de aminoácidos
 - Espécies do mesmo gênero, mais distantes e um *outgroup*
 - Construir uma árvore filogenética

1. Encontrar sequência de *SNF1* de *S. cerevisiae*

Nucleotídeos

>SNF1_Saccharomyces_cerevisiae_S288C

```
ATGAGCAGTAACAACAACACAAACACAGCACCTGCCAATGCAAATCTAGCCACCACCACCACCATCACCACCATCACCACCACCATCACGGTCATGGCGGAAGCAACTCGACGCTAAACAATCCCAAGTCGTCCTTAGCGGATGG
TGCACATATCGGGAACACCAAATCGTCAAAACGCTGGGAGAGGGGTCCTTTGGTAAAGTTAAATTGGCATATCATACCACTACGGGCCAAAAAGTTGCTCTAAAAATCATTAAATAAGAAGGTTTTGGCAAAGAGTGATATGCAG
GGCAGAATTGAAAGAGAAATATCTTATCTGAGACTCTTAAGACACCCCCACATCATCAAACGTATGATGTTATCAAATCCAAAGATGAAATCATTATGGTTATAGAGTACGCCGGGAACGAATTGTTTGACTATATTGTTTCAGAG
AGACAAAATGAGCGAGCAAGAGGCAAGAAGATTTTCCAGCAGATCATCAGTGCCGTCGAGTACTGCCATAGGCACAAAATTGTCCATAGAGATCTGAAGCCTGAAAACTTACTACTAGATGAGCATCTGAATGTAAAGATTGCC
GATTTTGGTTTGTCAAACATCATGACTGATGGTAATTTCTTAAAGACTTCTTGTGGTTCTCCAATTATGCGGCTCCTGAAGTTATCAGCGGTAAGCTGTACGCAGGCCCAGAAGTGGACGTGTGGTCATGTGGGGTTATCCTTTAT
GTTATGCTTTGTCGTCGTCTACCGTTTGACGATGAAAGCATCCAGTGCTTTTCAAGAATATCAGCAACGGTGTTTACACCTTGCCTAAATTTTATCTCCTGGAGCTGCTGGGCTAATCAAAGAATGTTAATCGTTAATCCATTGA
ACAGAATAAGCATTATGAAATTATGCAAGACGATTGGTTCAAAGTTGACCTGCCAGAATATCTACTCCACCAGATTTGAAACCACACCCAGAAGAAGAGAATGAAAATAATGACTCAAAAAAGGATGGCAGCAGCCCAGATAA
CGATGAAATTGATGACAACCTTGTCAATATTTTATCATCGACCATGGGTTACGAAAAAGACGAGATTTATGAGTCCTTAGAATCATCAGAAGACACTCCTGCATTCAACGAAATTAGGGACGCGTACATGTTGATTAAGGAGAATA
AATCTTTGATCAAGGATATGAAGGCAACAAAAGCGTCAGTGATGAAGTGGATACCTTTCTGTCCAGTCACCTCCAACCTTTTCAACAACAAAGCAAATCCCATCAAAAAGAGTCAAGTAGATCATGAAACTGCCAAGCAACACGCA
AGAAGGATGGCAAGTGCTATCACTCAACAAAGGACATATACCAATCACCTTCATGGATCAGTATAAAGAAGAAGACTCTACAGTTTCCATTTTGCCTACATCTTTACCTCAGATCCACAGAGCTAATATGTTAGCACAAGGTTTCG
CCAGCTGCCTCTAAAATATCTCCTCTTGTAAACGAAAAAATCTAAAACGAGATGGCATTTTGGTATACGATCTCGCTCATATCCATTAGACGTTATGGGTGAAATTTATATTGCCTTGAAGAATTTGGGTGCCGAATGGGCCAAGCCA
TCTGAAGAGGATTTATGGACTATCAAATTAAGGTGGAAATATGATATTGAAAAACAAGACAAACACTAATGAAAAAATACCTGATTTAATGAAAATGGTAATTCATTTTCAAATTGAAACCAATAATTATTTGGTGGATTTCAA
ATTTGACGGCTGGGAAAGTAGTTATGGAGATGATACTACTGTTTCTAATATTTCTGAAGATGAAATGAGTACTTTTTCAGCCTACCCATTTTACATTTAACAACAAAACTAATTATGGAATTAGCCGTTAACAGTCAAAGCAATTGA
```

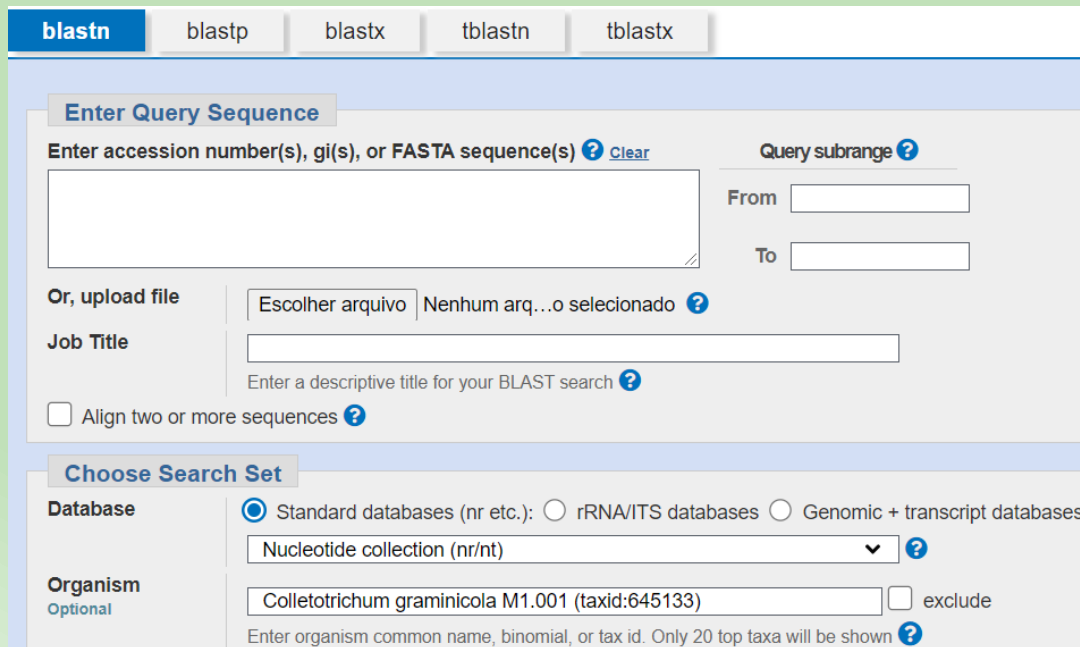
Aminoácidos

>SNF1_Scerevisiae_protein

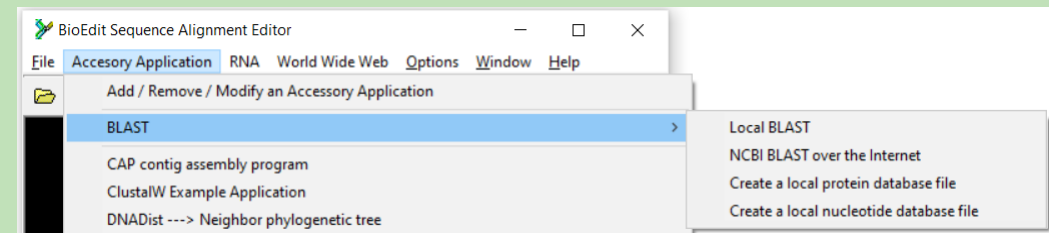
```
MSSNNNTNTAPANANSSHHHHHHHHHHHHGHGGSNSTLNNPKSSLADGAHIGNYQIVKTLGEGSFGKVKLAYHTTTGQKVALKIINKKVLAKSDMQGRIEREISYLRLLRHPHIKLYDVIKSKDEIIMVIEYAGNELFDYIVQRDKMSEQE
ARRFFQQIISAVEYCHRHKIVHRDLKPENLLLDEHLNVKIADFGLSNIMTDGNFLKTSCGSPNYAAPEVISGKLYAGPEVDVWSCGVILYVMLCRRLPFDDSEIPVLFKNISNGVYTLPKFLSPGAAGLIKRMILIVNPLNRISIHEIMQDDWFKVD
LPEYLLPPDLKPHPEEENENNDSKKGSSPDNDEIDNVLNLSSTMGYEKDEIYESLESSEDTPAFNEIRDAYMLIKENKSLIKDMKANKSVSDELDTFLSQSPPTFQQQSKSHQKSQVDHETAKQHARRMASAITQQRTHQSPFMDQYKE
EDSTVSILPTSLPQIHRANMLAQGSPAASKISPLVTKSKTRWHFGIRSRSYPLDVMGEIYIALKNLGAEWAKPSEEDLWTIKLRWKYDIGNKTNNTNEKIPDLMKMVIQLFQIETNNYLVDKFDGWESSYGDDTTVSNISEDEMSTFSAYPFL
HLTTKLIMELAVNSQSN
```


2. Encontrar *SNF1* em *C. graminicola*

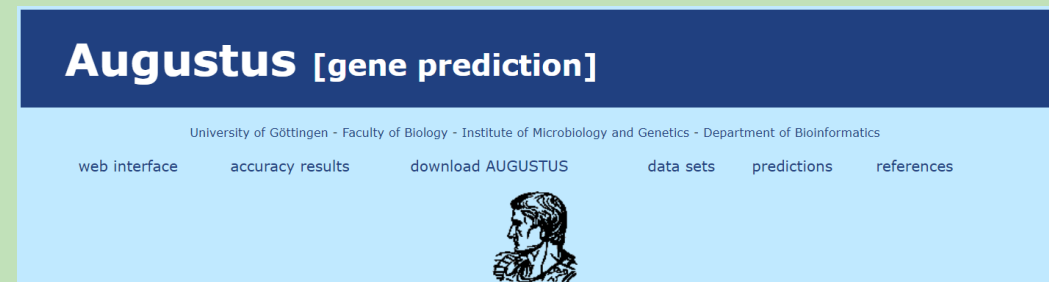
- Com genoma no NCBI
 - Blastar escolhendo espécie



- Sem genoma no NCBI
 - Instalar genoma no Bioedit
 - Blastar localmente



- Fazer predição no Augustus



3. Anotação gênica e número de cópias

- Anotação
 - Verificar anotação no NCBI/Ensembl/Uniprot
 - Verificar função descrita em outras espécies
- Número de cópias
 - Blastar da outra espécie para encontrar homólogos
 - Blastar da própria espécie para encontrar outras cópias
 - Verificar os hits e valores de similaridade
 - Accession length: tamanho da sequência encontrada
 - Query cover: quanto de uma sequência cobre a outra
 - Percentage identity: nº de caracteres idênticos na sequência coberta
 - Expectation value: probabilidade do match ser ao acaso

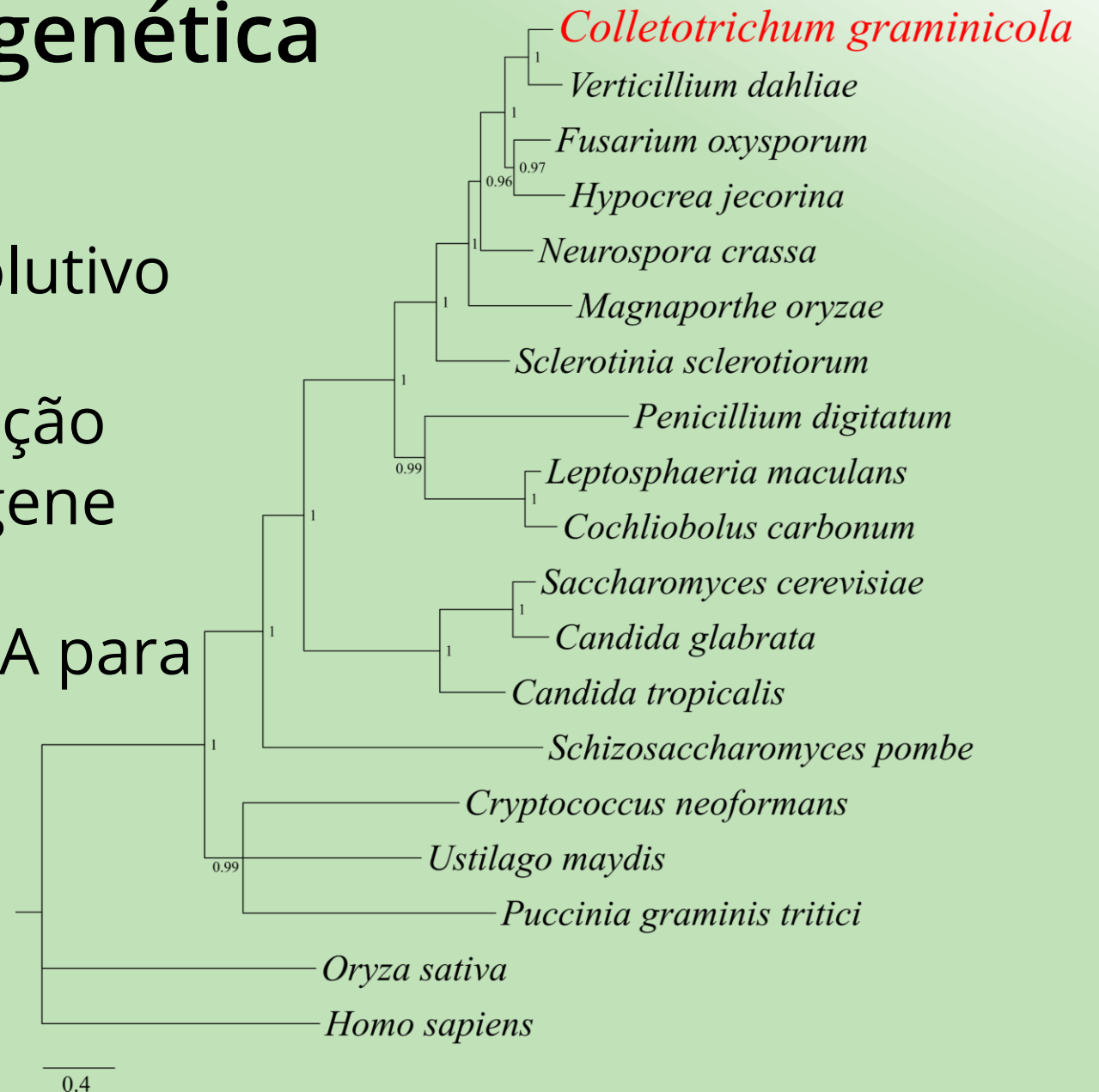
4. Baixar sequências similares de outras espécies

- Procedimento ideal
 - Encontrar sequências de estudos publicados (validados)
 - Usar sequências presentes em outras árvores publicadas
 - Alinhar no Mega e fazer vistoria
- Procedimento alternativo
 - Blastar o seu gene/proteína e selecionar vários hits
 - Alinhar no Mega e fazer vistoria

4. Construir árvore filogenética

- Objetivo da Árvore

- Reproduzir o caminho evolutivo das espécies utilizadas
- Agrupar conforme a evolução
- Confirmar homologia do gene entre as espécies
- Árvore preliminar no MEGA para conferir agrupamentos
- Árvore final mais robusta



Programas e Ferramentas

- Mega 7 ou superior
- Bioedit
- Notepad ++
- Mrbayes
- R
- RStudio
- Figtree
- Inkscape