

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz



Plant–pathogen interactions: Sugarcane glycoproteins induce chemotaxis of smut teliospores by cyclic contraction and relaxation of the cytoskeleton

E. Sánchez-Elordi ^a, M. Vicente-Manzanares ^b, E. Díaz ^a, M.E. Legaz ^a, C. Vicente ^{a,*}

^a Intercellular Communication in Plant Symbiosis Team, Faculty of Biology, 12, José Antonio Novais St., 28040 Madrid, Spain

^b Ramón y Cajal Program, Universidad Autónoma de Madrid, School of Medicine, Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

Arnaldo Esquivel Fariña
Piracicaba - 2016

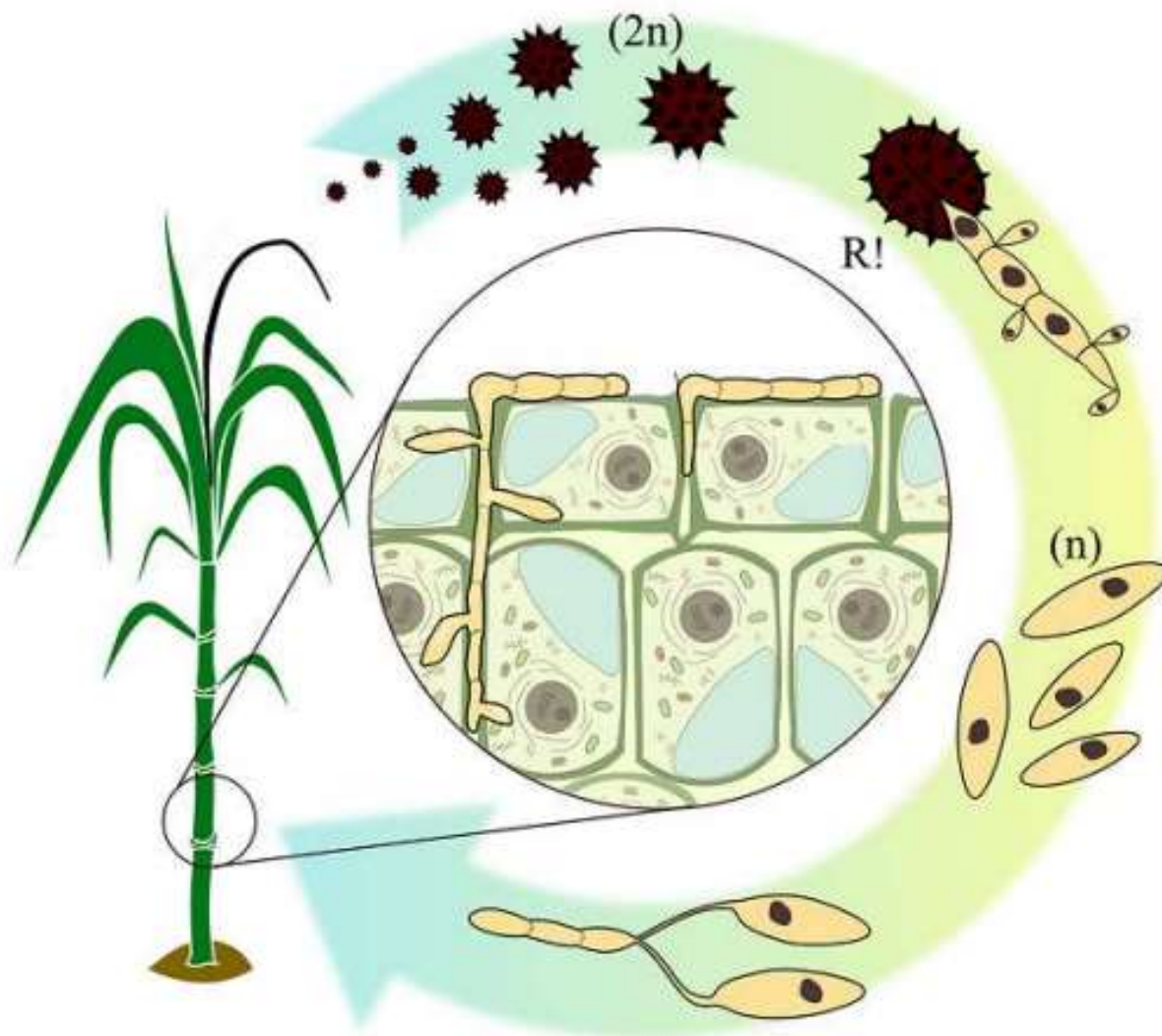
Sa

nineum



Sporisorium scitamineum





Ciclo de vida do fungo *S. scitamineum*. A cana-de-açúcar emite o chicote, liberando os teliósporos $(2n)$, que quando germinam emitem o pró-basídio que sofre meiose ($R!$), formando os esporídios (n) . Quando esporídios de tipos de reação sexual diferentes se encontram e se fundem, forma-se a hifa dicariótica infectiva $(n + n)$ (TANIGUTI et al., 2015)

PAMPS → produção de glicoproteína (MMMKG, glicoproteínas de massa molecular média e HMMKG, glicoproteínas de elevada massa molecular) Abramovitch et al. (2006).



HMMKG e MMMKG inclui diferentes glicoproteínas:

- Duas com actividades **arginase** e quitinase (Millanes et al., 2005)
- β -1,3- e β -1,4-glucanase.



A **arginase**, hidrolisa a arginina para produzir ornitina e depois putrescina, uma diamina que perturba o citoesqueleto e impede a polaridade celular necessária para a germinação e desenvolvimento.



Em cultivares de cana suscetíveis, **arginase** planta é travada e mantida fora do teliósporos pela sua ligação a um receptor específico da parede da célula fúngica (Millanes et al., 2008). Em plantas resistentes, um excesso de arginase é internalizado por teliósporos fúngicas.

Objetivo 1

Estudar a base celular da quimiotaxia de teliósporos induzidas por glicoproteínas de cana

Materiais e métodos

Teliósporos de *Sporisorium scitamineum* (Syd.)

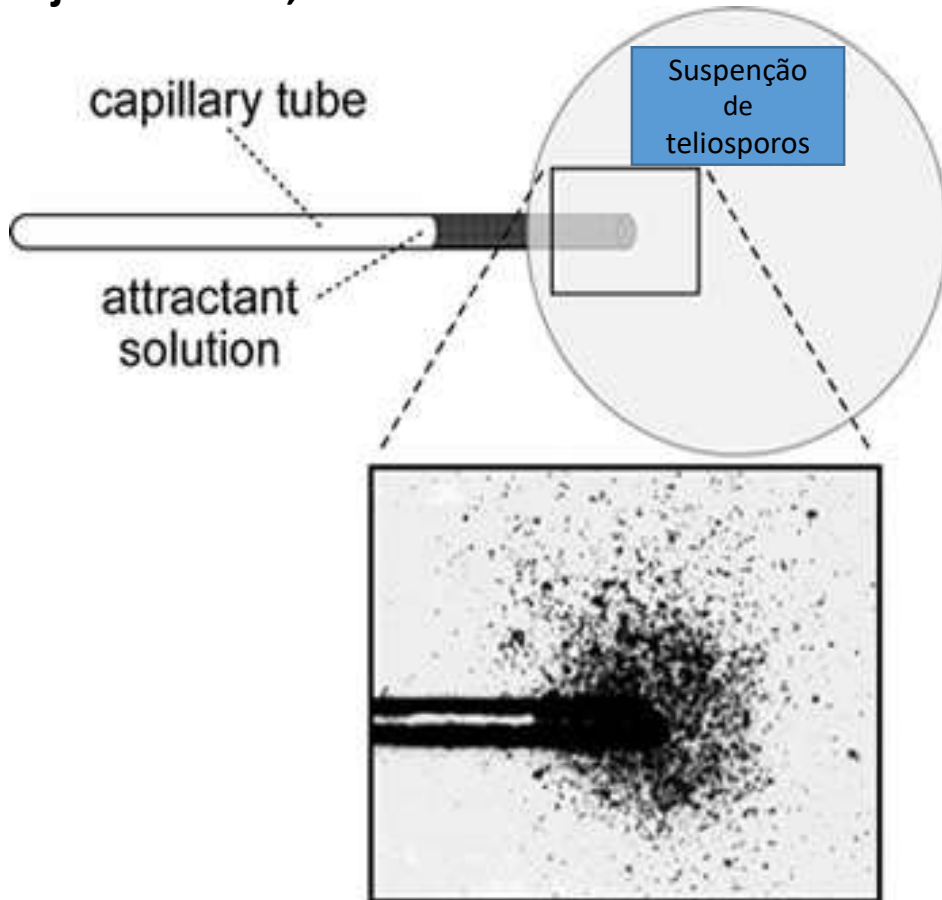
Cana cultivares sensíveis e resistentes à carvão (Ba 42–231 cv. e My 55–14 cv., respectivamente).

Purificação de glicoproteínas de cana (HMMG e MMMG).

Purificação de arginase de HMMG.

Chemotaxis assay

Sjoblad et al., 1978



20 μ L of 10mM sodium phosphate buffer, pH 6.8

20 μ g of HMMG from My 55–14

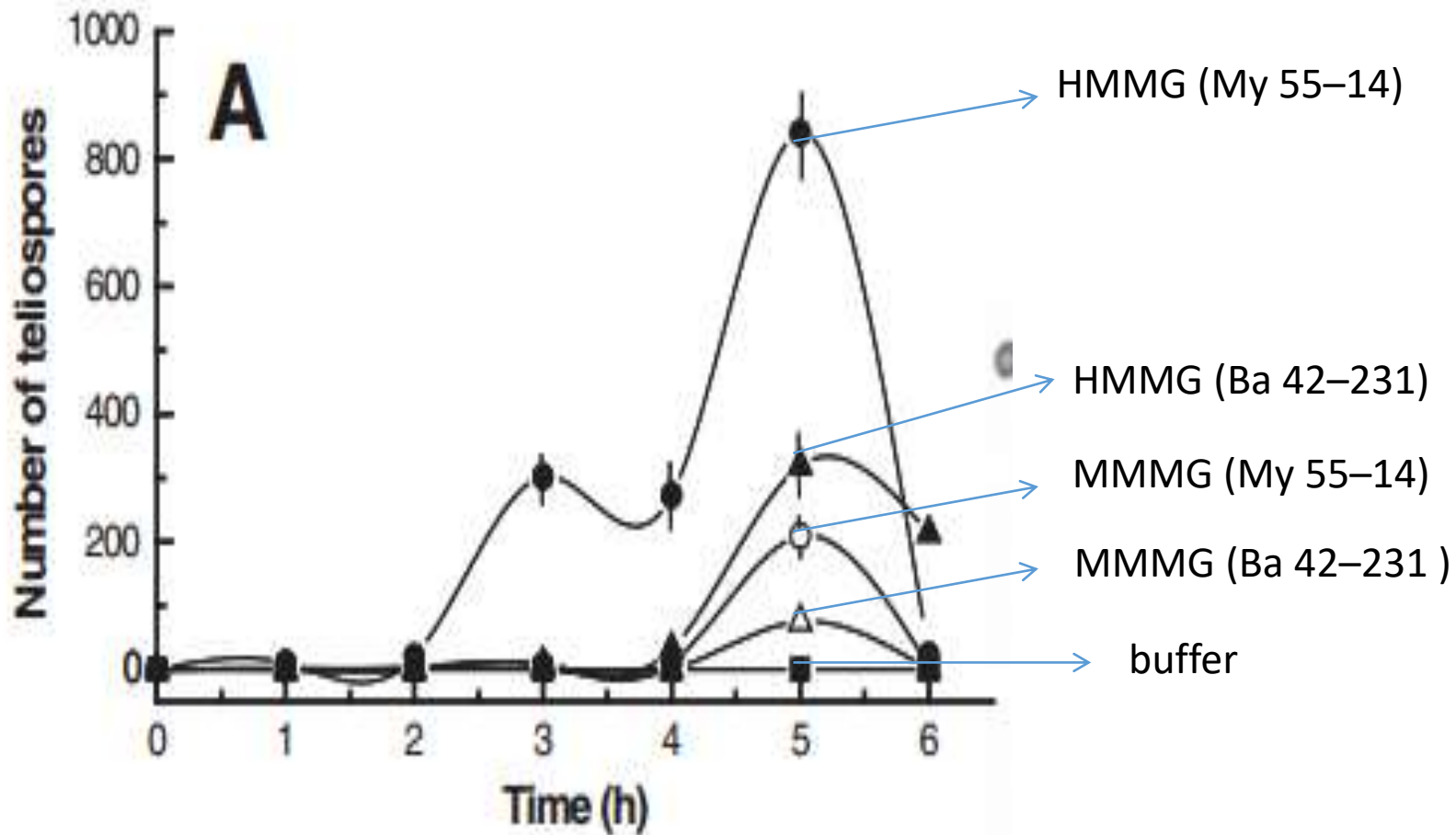
20 μ g of HMMG from Ba 42–231

20 μ g of MMMG from My 55–14

20 μ g of MMMG from Ba 42–231

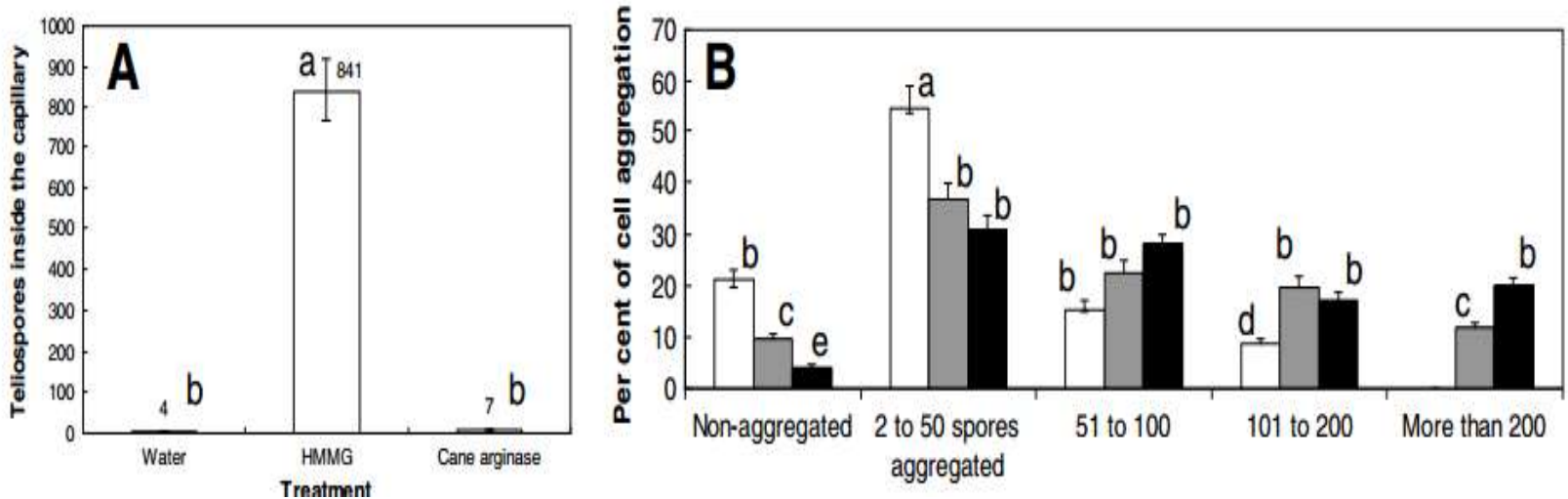
arginase from My55–14 HMMG.

O conteúdo de cada capilar foi depositado sobre uma lâmina de vidro, observado sob um microscópio óptico Olympus BX51 equipado com uma câmara Olympus DP72.

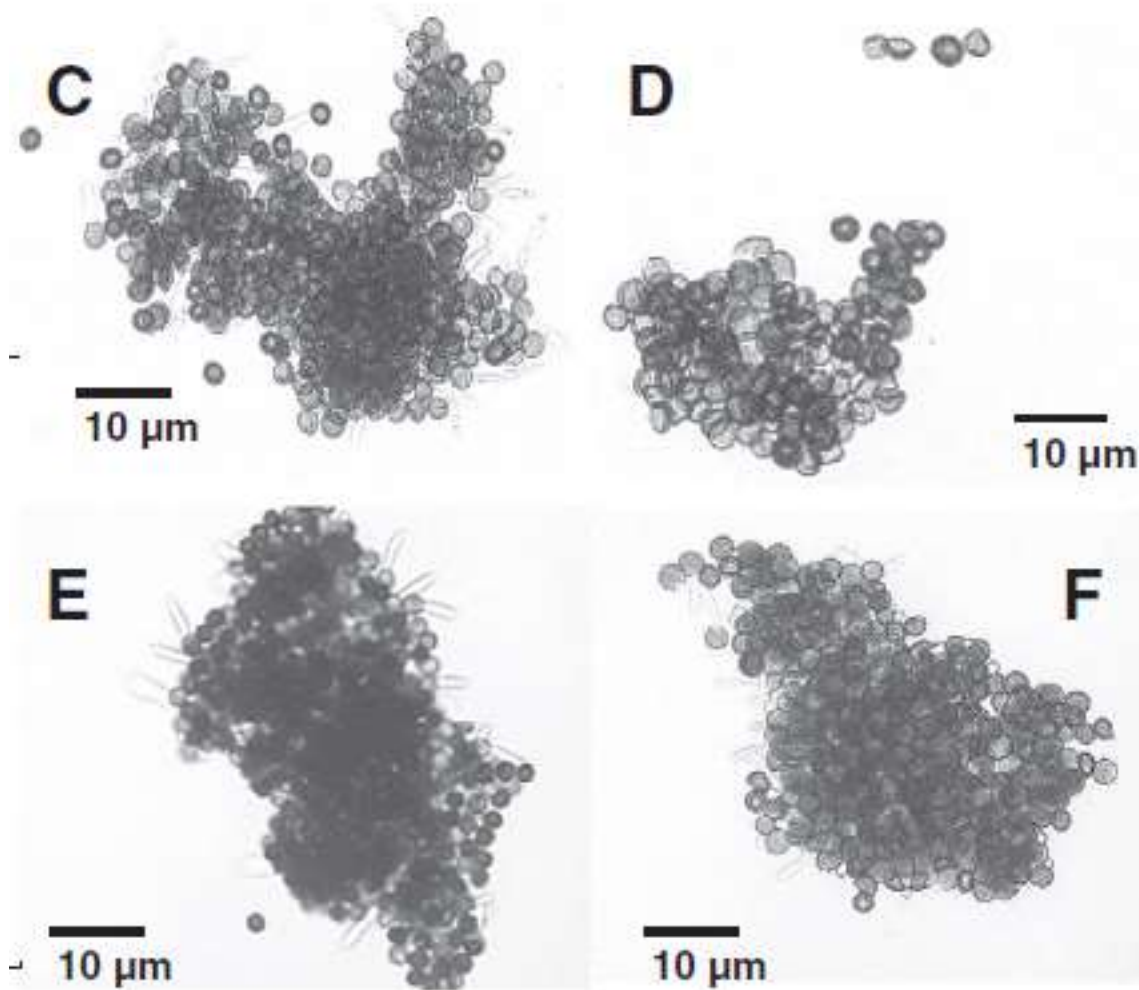


- Chemotaxis of smut teliospores toward a capillary containing different sugarcane glycoproteins. A) Time-course of teliospores displacement entering the capillary containing only 20 μ L of 10mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 (■) or 20 μ g of HMMG from My 55-14 (●), or Ba 42-231 (▲), or MMMG from My 55-14 (○), and Ba 42-231 (△) in 20 μ L of the same buffer.

Chemotaxis assay - arginase



- A) Number of teliospores inside the capillary after 5 h of chemotactic stimulation by distilled water, HMMG from My55–14 or arginase from My55–14HMMG.
- B) Cytoagglutination degree (number of teliospores per aggregate and number of total aggregates in the media) induced by distilled water (white), 41 µg/mL HMMG from My 55–14 (gray) or arginase from My 55–14 HMMG (black).



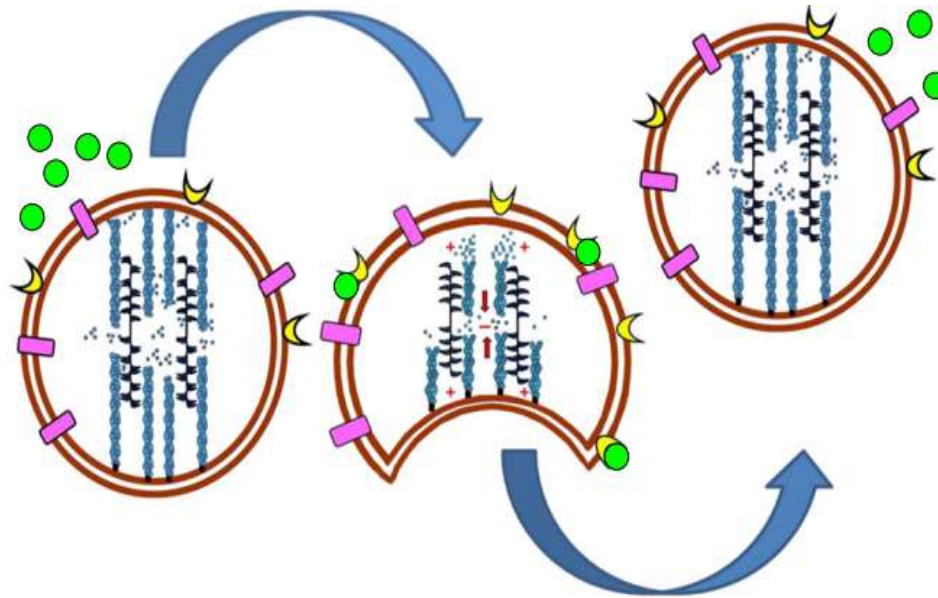
C–F: Aggregation state of smut teliospores, after 5 h of chemotactic stimulation, inside the capillary containing C)HMMG from My55–14, D)MMMGG from My 55–14, E) HMMG from Ba 42–231, and F) MMMGG from Ba 42–231.

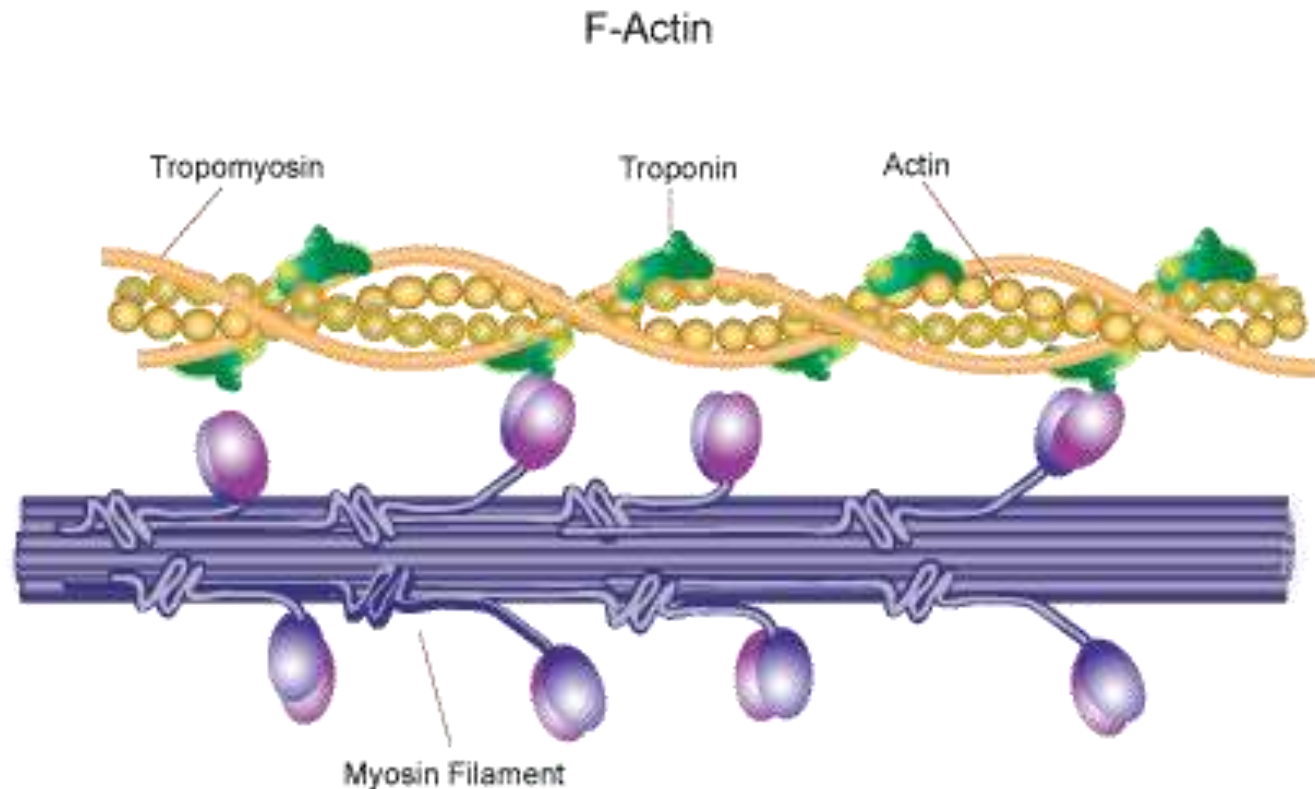
Objetivo 2

- Estudar o envolvimento de citoesqueleto no movimento na quimiotaxia.

Mecanismos de deslocamentos

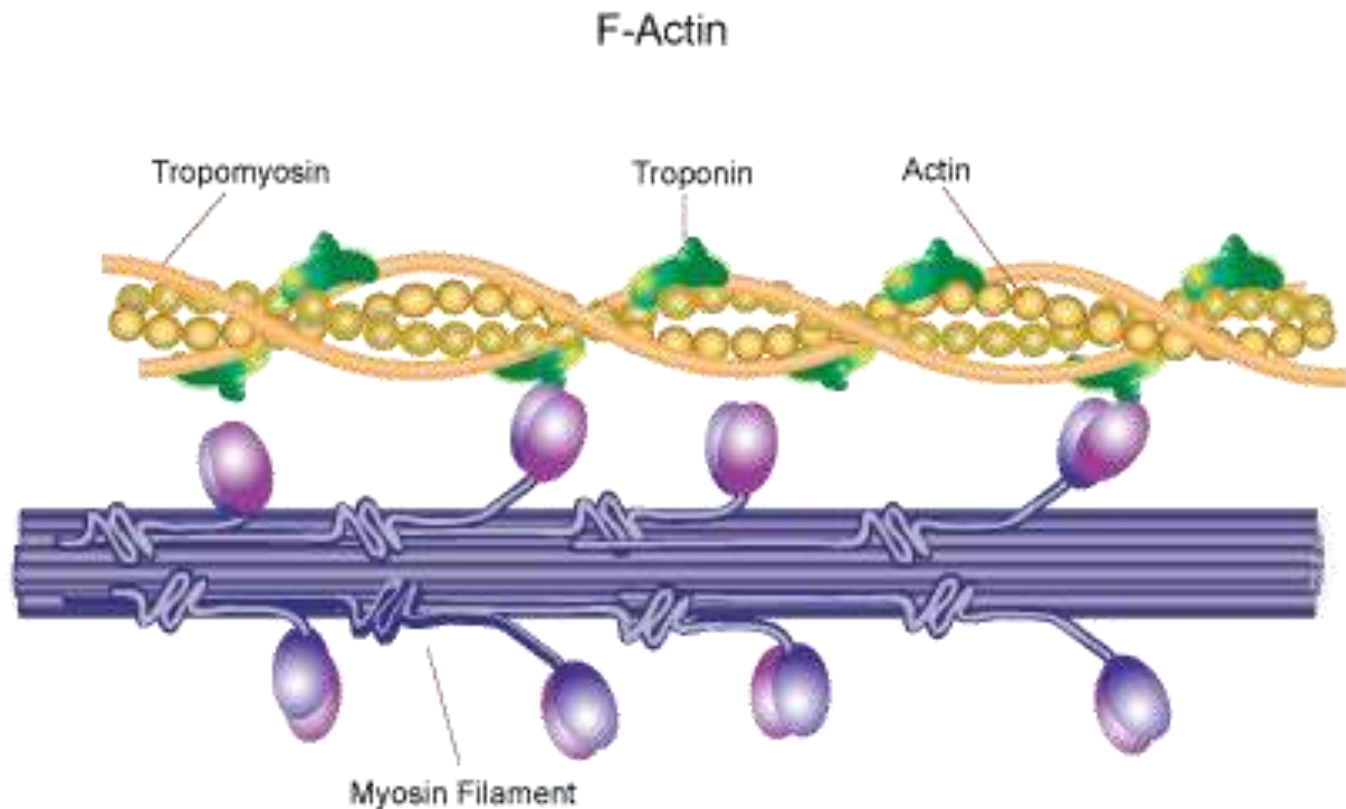
1. Submicroscopical contractions of helically arranged fibrils within the cell walls
2. The occurrence of motile appendages in zoospores





Fuchs et al. (2005) mostram que a F-actin é essencial para o crescimento polarizado durante a infecção por *Ustilago maydis* em milho.

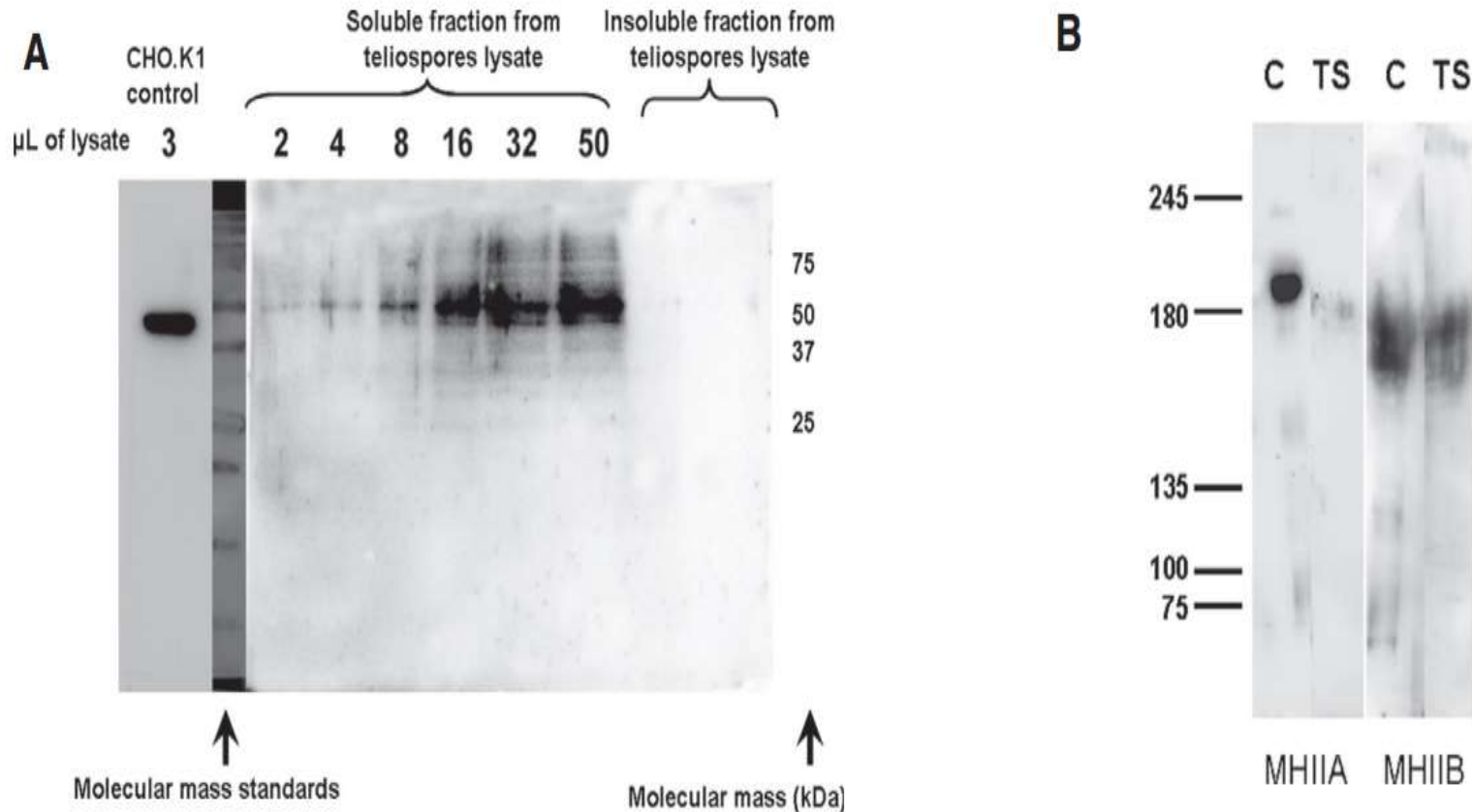
Em células fúngicas, o estabelecimento polaridade e a manutenção da assimetria celular são propriedades essenciais que regem a morfogênese, favorecendo a germinação de esporos e causando o crescimento de filamentos monopolar (Berepiki et al., 2011)



Existe uma infinidade de proteínas de ligação de actina que controlam a estabilidade filamento, agregação e cross-linking. Destes, a miosina superfamília é um dos mais importantes.

Actina e miosina estão fortemente envolvidos na motilidade e migração de numerosos tipos de células (Stewart et al., 2011).

Western blotting of a lysate of teliospores separated by SDS-PAGE to identify actin and myosin



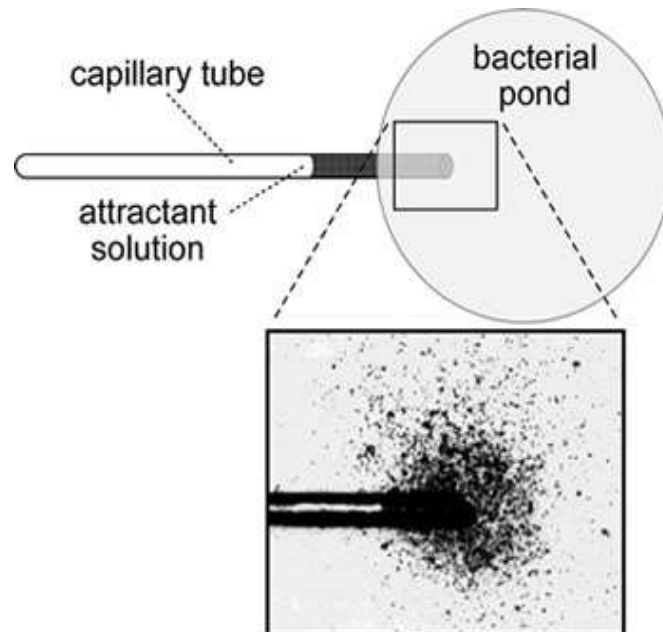
A) Western blotting using as a standard β -actin

B) Western blotting of using heavy chains MH-IIA and MH-IIB myosin as controls

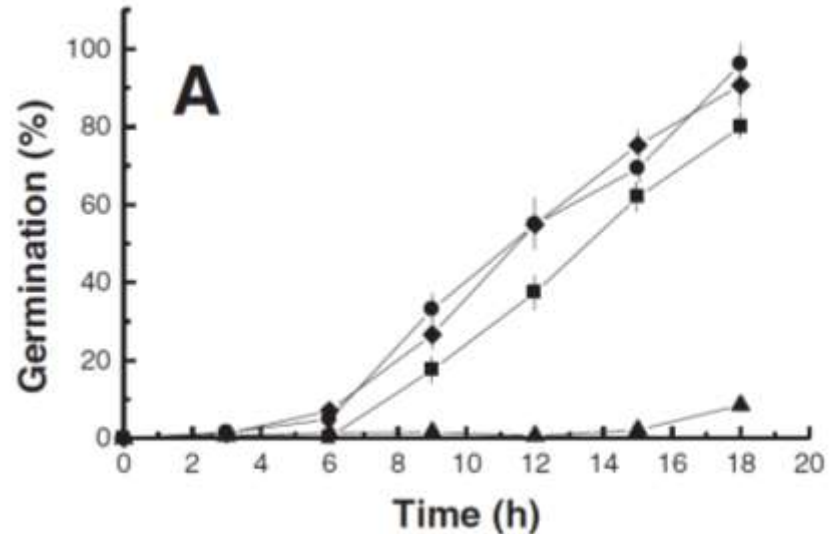
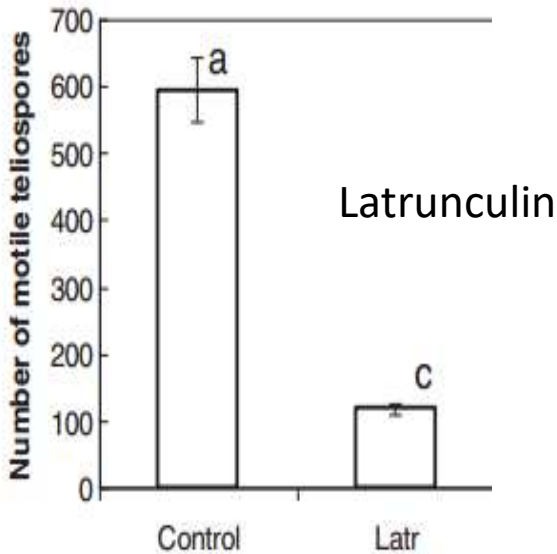
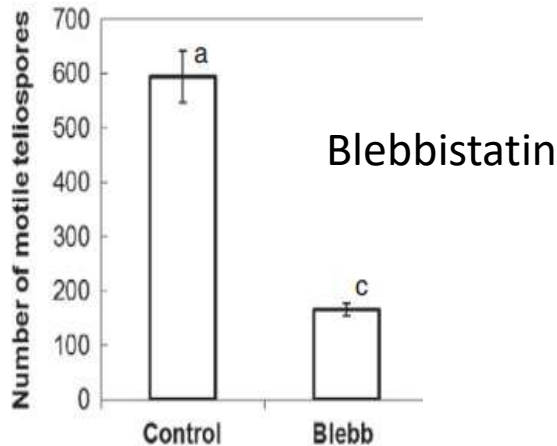
Chemotaxis assay in the presence of inhibitors of cytoskeleton dynamics

- Os inibidores foram **phalloidin**, que impede a despolimerização de F-actin (Cooper, 1987)
- **Latrunculin**, que inibe a polimerização F-actin (Kazami et al., 2011)
- **Blebbistatin**, que é um inibidor de ATPase específico de miosina (Kovacs et al., 2004).

Control: absence of inhibitors

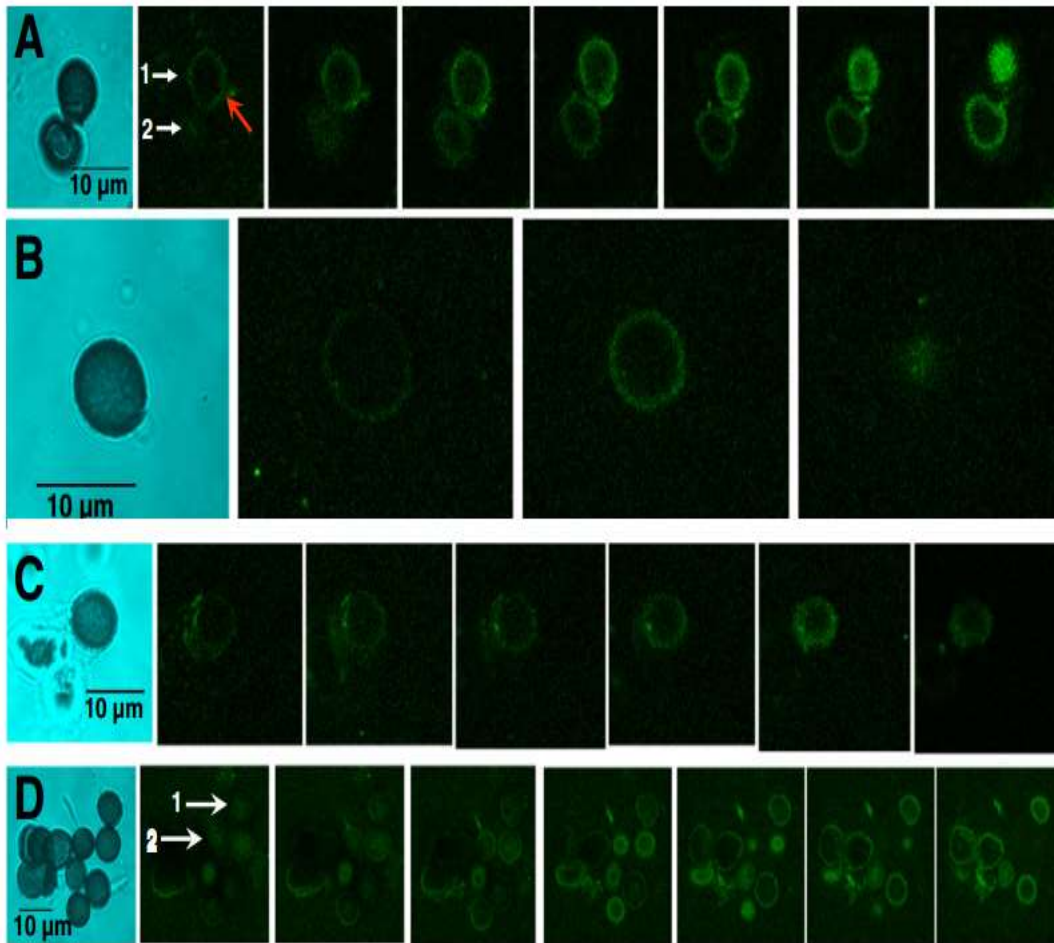


Chemotaxis assay in the presence of inhibitors of cytoskeleton dynamics



Effect of 0.13 μ M phalloidin (■), 5.0 μ M latrunculin A (▲), and 13 μ M blebbistatin (◆) in distilled water on teliospore germination. (●) Control in absence of inhibitors

CONFOCAL MICROSCOPY

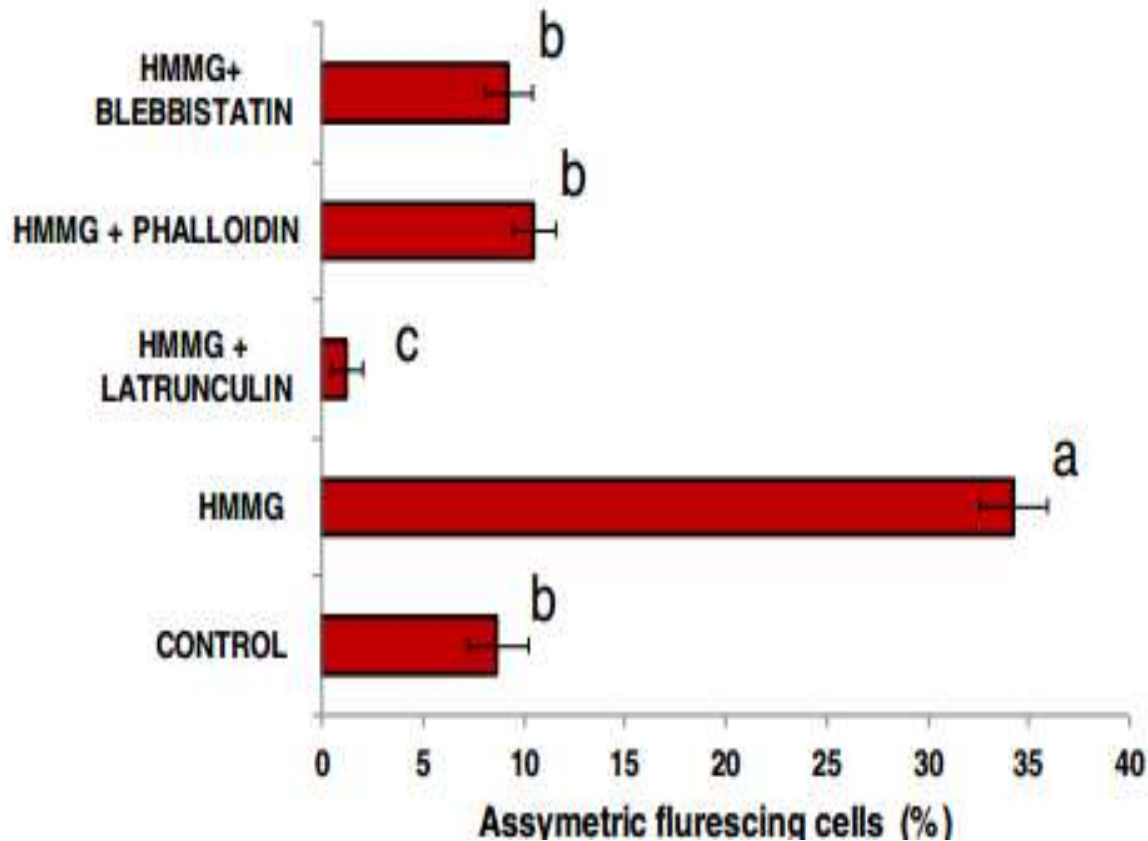


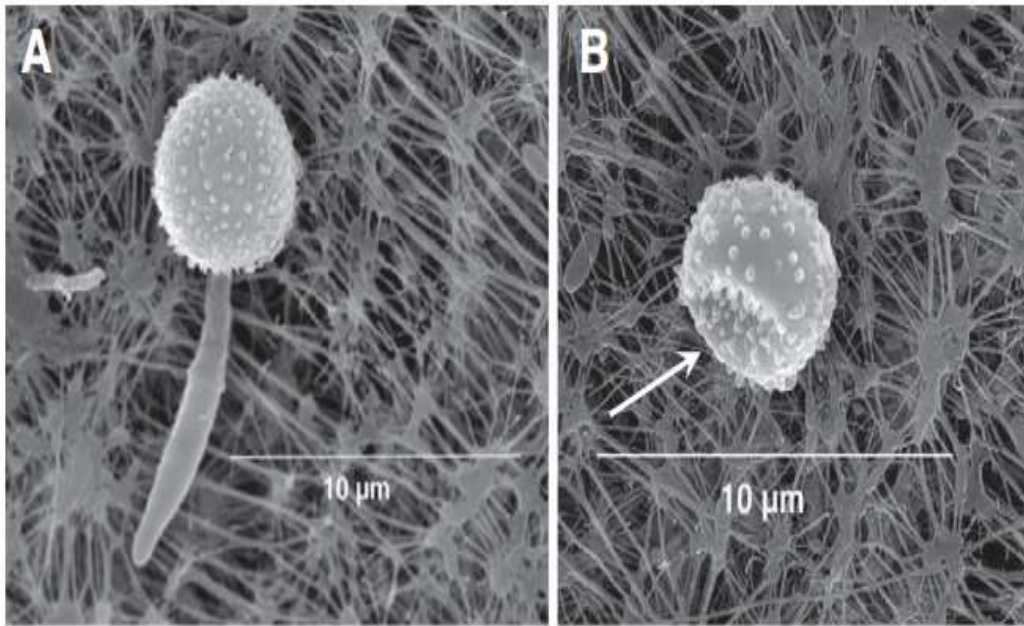
Fluorescein
isothiocyanate-conjugated
phalloidin foi usado para
visualização de
citoesqueleto de actina

Fig. 7. Confocal microscopy of chemotactic stimulated teliospores with HMMC from My 55-14 for 5 h, moving in absence of inhibitor (series A) or incubated during stimulation on phalloidin (series B), latrunculin A (series C) and blebbistatin (series D). White arrows in series A and D indicate two individual cells (1 and 2) used for sequencing confocal images, the laser plane moving from the bottom to the top.

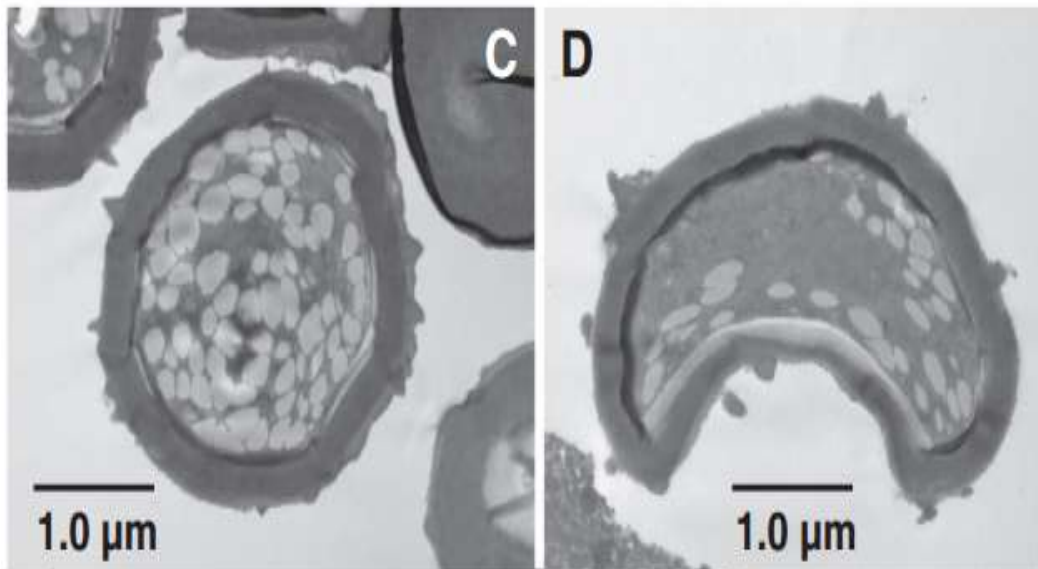
A) Percent of cells showing asymmetrical fluorescence distribution

A

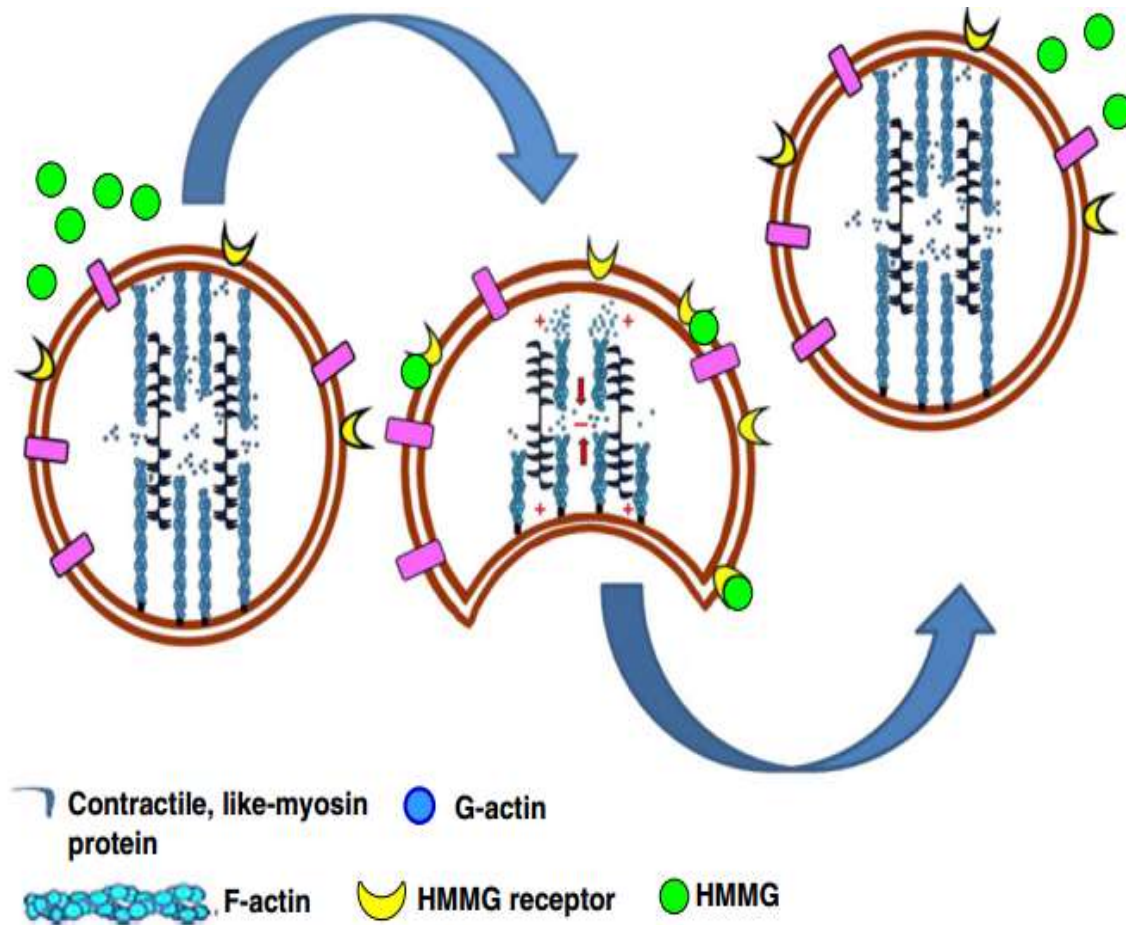




SEM micrographs of A) a germinated teliospore, and B) an invaginated teliospore inside the capillary containing HMMG from My 55–14



TEM micrographs of C) a pre-aggregated teliospore, and D) an invaginated teliospore inside the capillary containing HMMG from My 55–14.



Esquema hipotético de motilidade teliósporos através de um gradiente de HMMG de Meu 55-14. A primeira ligação da glicoproteína aos seus receptores induz a invaginação celular polar produzida pela interacção de uma ATPase com capacidade contráctil, com o citoesqueleto de F-actina. Após isso, a despolimerização da F-actina é conseguido no pólo oposto, re-polimerização dos quais produz o avanço da célula.

Obrigado.