



Uma jornada ao Universo Microscópico

Taícia Pacheco Fill

Laboratório de Biologia Química Microbiana

LaBioQuiMi





KS

Produtos Naturais

Fonte de
diversidade
química estrutural

Estima-se que os
PN forneçam ou
inspirem o
desenvolvimento
de 50% - 70% de
todos os agentes
atualmente em
uso clínico



Nossas histórias...





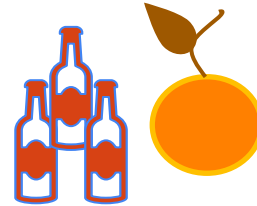
Citricultura- Produção Mundial

- Números expressivos → Importância econômica e social
- Brasil: Maior produtor mundial de **laranja** e produtor de **suco de laranja**



Citricultura Brasileira

- PIB - US\$ 6,5 bilhões
- US\$ 189 milhões em impostos



Citricultura-Empregos

- 200,000 empregos diretos e indiretos



Huanglongbing (HLB) ou Greening - Brasil

Sintomas



Causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp.

Não tem cura!

Doença mais destrutiva da
história da citricultura

Única alternativa: erradicar
totalmente as plantas
infectadas

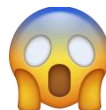


Huanglongbing (HLB) ou Greening – Pelo mundo...

EUA → Citricultura diminuiu 1/3;

Estima-se que ~90% das árvores cítricas da Flórida estejam infectadas com a bactéria.

Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA):
Processo de liberação do uso de estreptomicina e a
oxitetraciclina como tratamentos de rotina em citros



The
Counter

Donate



To combat citrus greening, farmers are spraying medically important antibiotics on their trees

by H. Claire Brown
02.18.2020, 3:09pm

Environment

Share



Save for later



nature

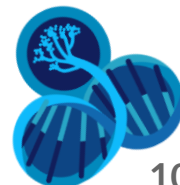
Subscribe

NEWS FEATURE · 19 MARCH 2019

Antibiotics set to flood Florida's troubled orange orchards

A desperate plan to fight a citrus scourge has public-health advocates and scientists concerned.

Maryn McKenna



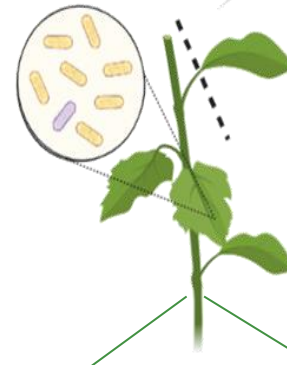
Doença Greening ou HLB

Transmissão

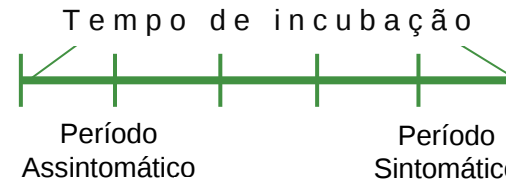


Psilídeo *Diaphorina citri*, inseto muito frequente nos pomares nas épocas de brotação das plantas

Citrus sinensis L



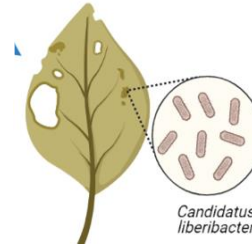
Fases da doença



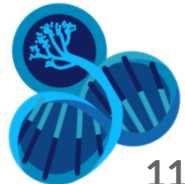
Controles
(saudáveis)



Assintomáticas
(doentes)

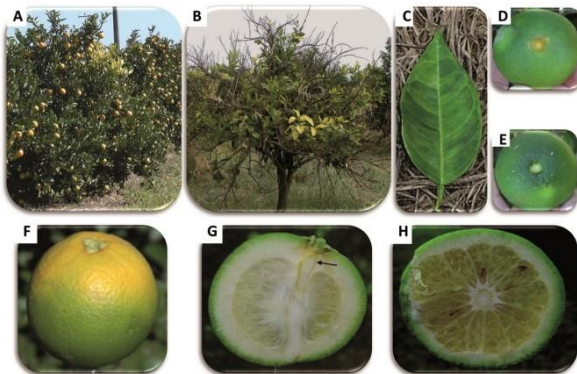


Infectadas
(doentes)



Doença *Greening* ou HLB

Não existe método de
diagnóstico eficaz

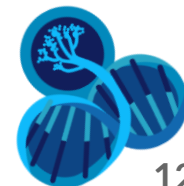


POR QUE
nós estudamos?

Ineficiente (~30-60%)

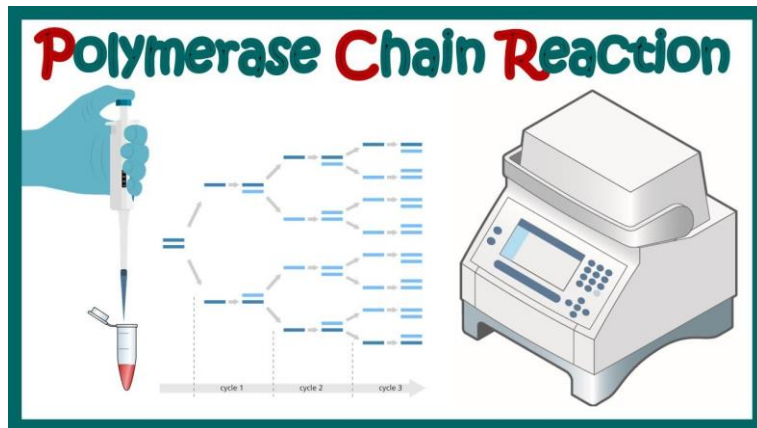
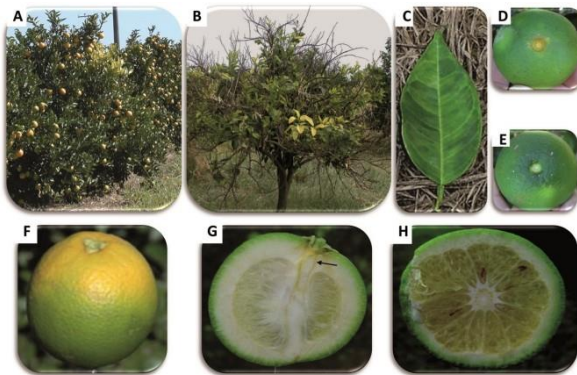
A planta precisa apresentar sintomas claros → Estágios bem avançados da doença

Falso-negativo alto e disseminação no campo



Doença *Greening* ou HLB

Não existe método de
diagnóstico eficaz

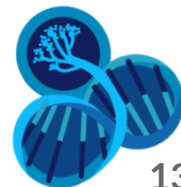


POR QUE
nós estudamos?

PCR é cara e demanda tempo de preparo da amostra;

Distribuição irregular nas folhas e baixa concentração de células CLas durante a fase inicial do período latente afetam as análises;

Falsos negativos





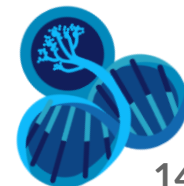
2005 - 2019
~**55.5 milhões** de
árvores tiveram que
ser eliminadas do
campo.

POR QUE
importa?

Economia

Diagnóstico
tardio

Aumenta a disseminação
da doença



Como podemos contribuir?



Huanglongbing (HLB) ou Greening – Novas ferramentas de diagnóstico

Precisamos encontrar um novo método diagnóstico para o estágio inicial da infecção!!

Rápido, barato e que possa auxiliar os produtores!

Article | [Open Access](#) | Published: 10 August 2020

Mass spectrometry imaging as a potential technique for diagnostic of Huanglongbing disease using fast and simple sample preparation

João Guilherme de Moraes Pontes, Pedro Henrique Vendramini, Laura Soler Fernandes, Fabricio Henrique de Souza, Eduardo Jorge Pilau, Marcos Nogueira Eberlin, Rodrigo Facchini Magnani, Nelson Arno Wulff & Taicia Pacheco Fill 

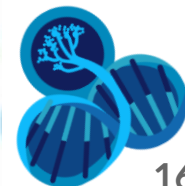
Scientific Reports **10**, Article number: 13457 (2020) | [Cite this article](#)



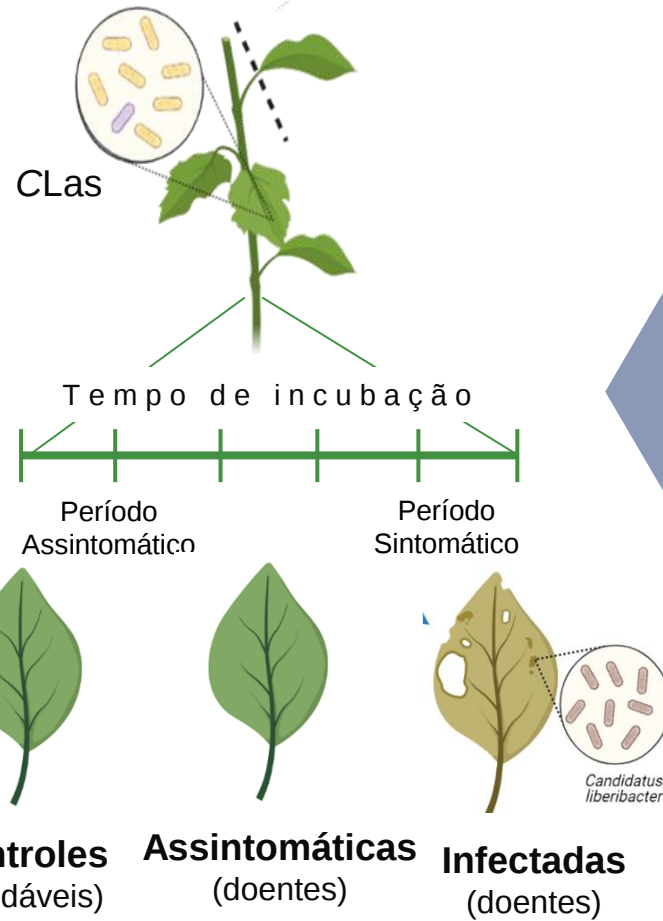
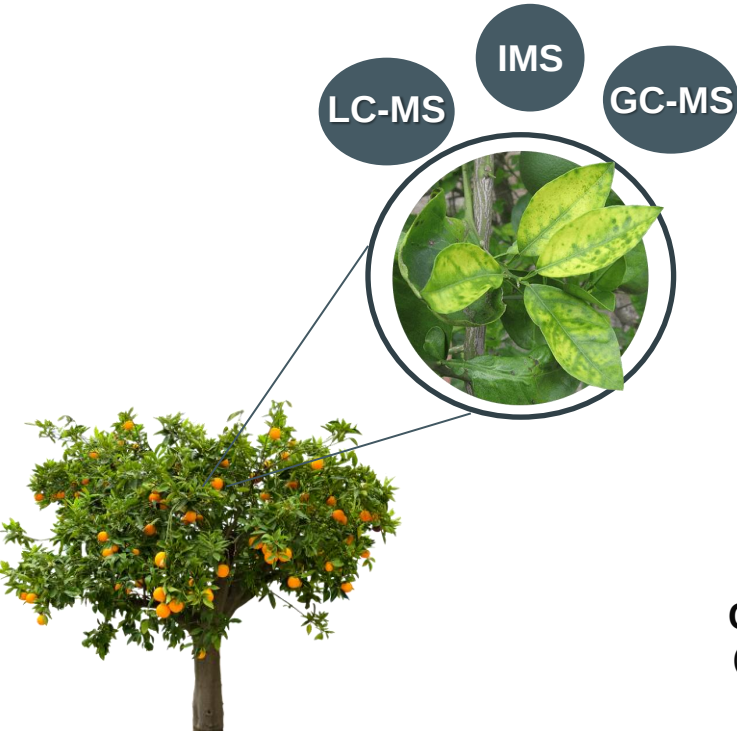
Dr. João Guilherme Pontes – Post Doc

Dr. Rodrigo Facchini and Dr. Nelson Wulff – [Fundecitrus](#)

Dr. Pedro Vendramini – Prof. Dr. Marcos Eberlin



Citrus sinensis L

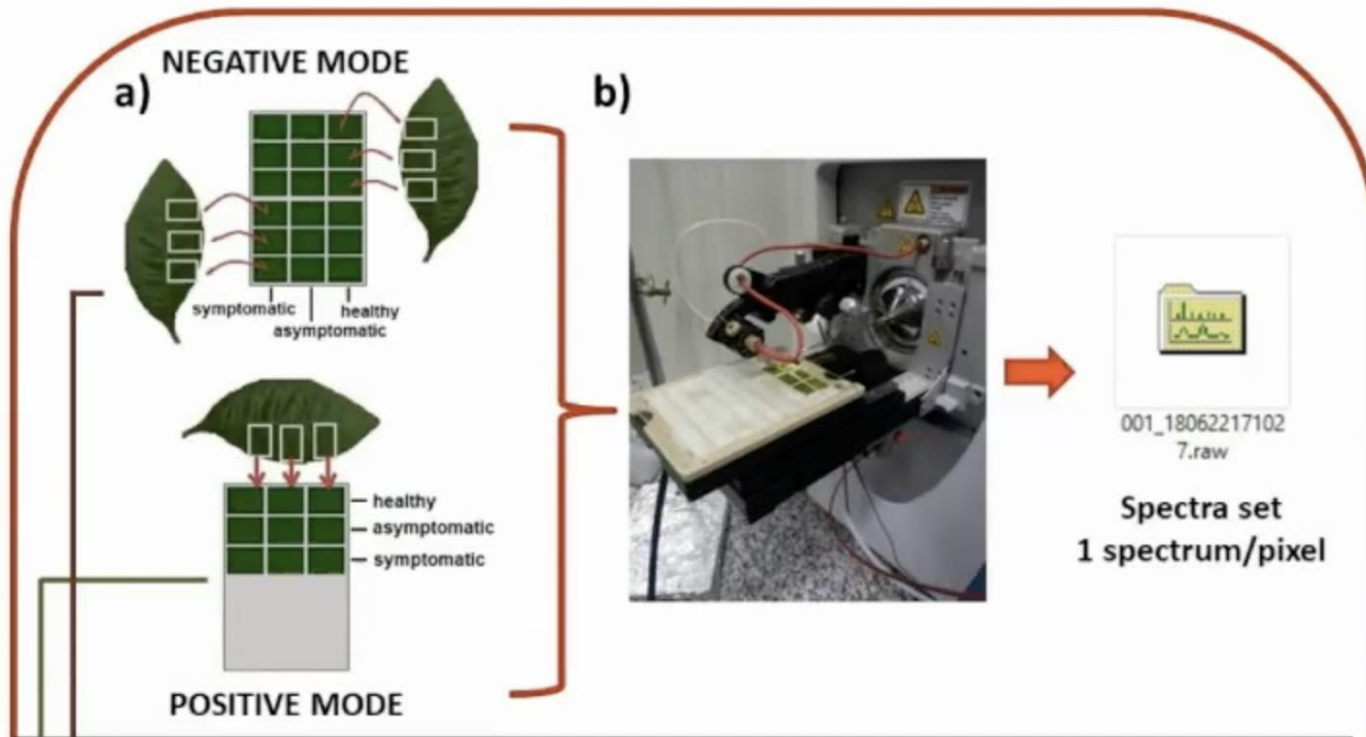


O QUE
fizemos?

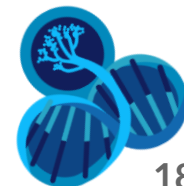


Huanglongbing (HLB) ou Greening – Novas ferramentas de diagnóstico

Imageamento Químico via Espectrometria de Massas



- Nenhum preparo de amostras;
- Análises rápidas;
- Rápido diagnóstico

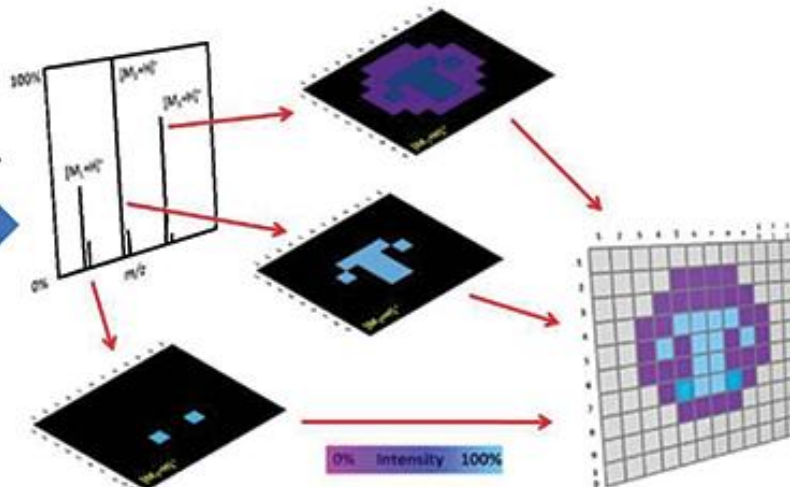


IMS

Laser (MALDI) or
electrospray (DESI)
ionization

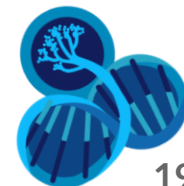
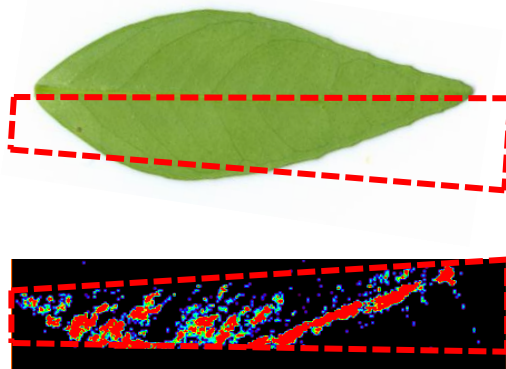
To mass
spectrometer

Sample

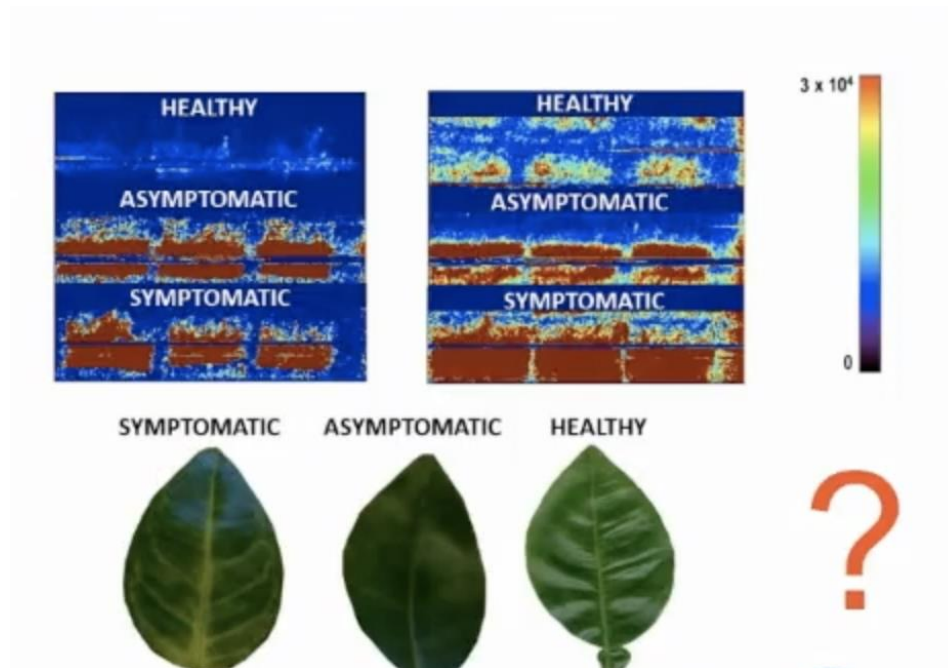


Fotografia química

Distribuição espacial
dos metabólitos



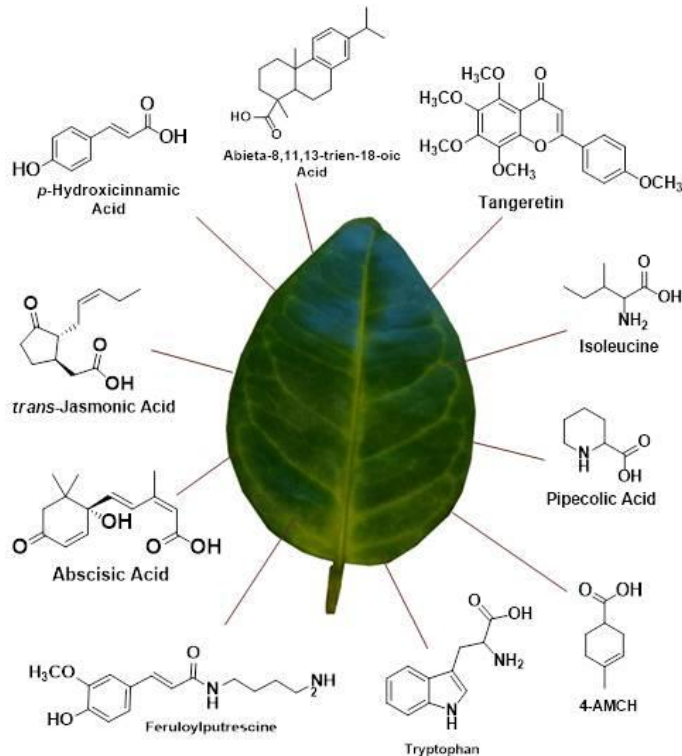
Huanglongbing (HLB) ou Greening – Novas ferramentas de diagnóstico



Huanglongbing (HLB) ou Greening – Novas ferramentas de diagnóstico



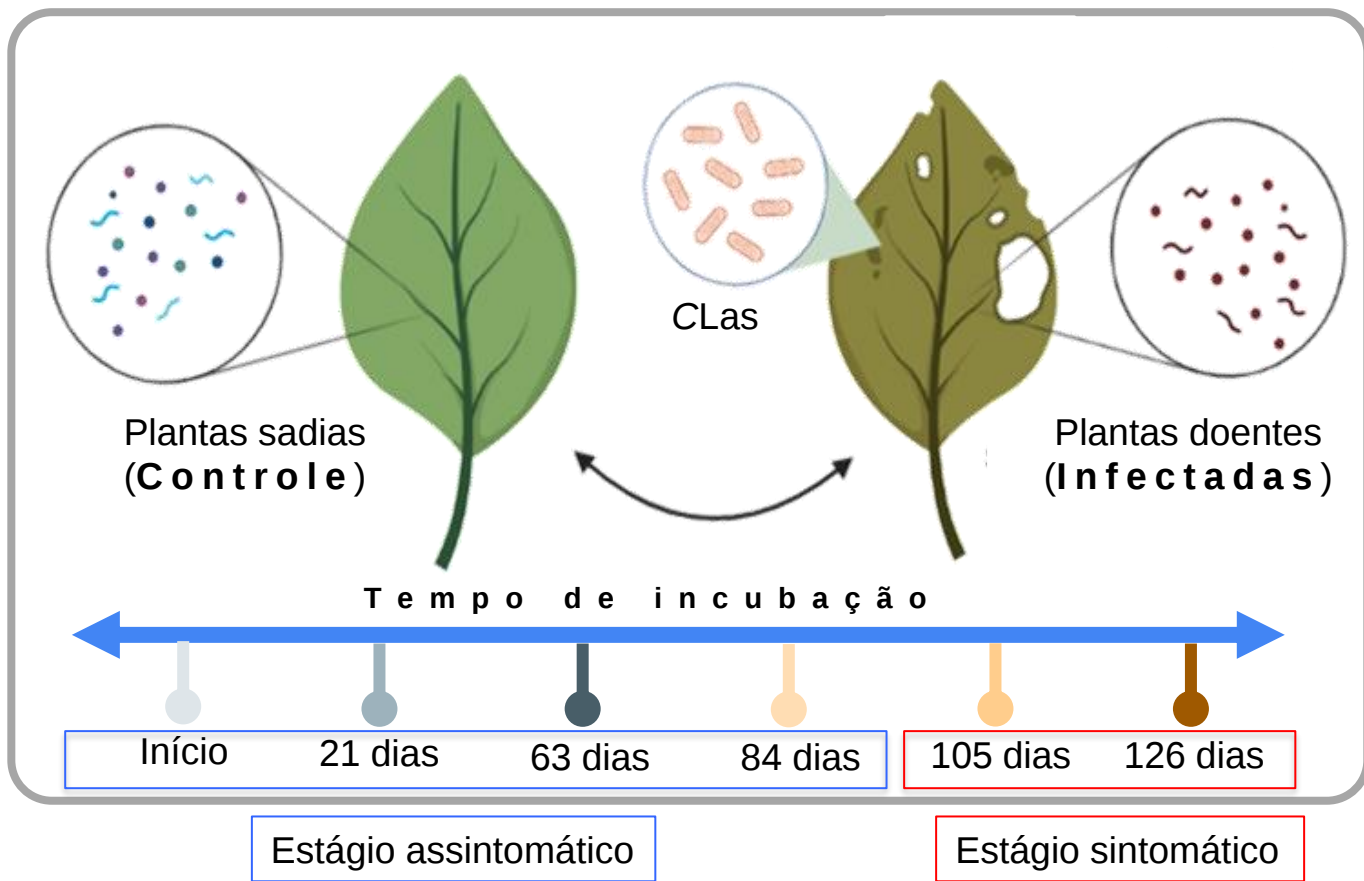
Clas-Infected leaf



Estágios iniciais da infecção?



Curva de progressão da doença – Alterações metabólicas na planta doente?



O QUE
já
alcançamos?

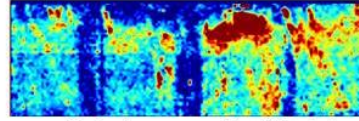


Curva de progressão da doença – Alterações metabólicas na planta doente?

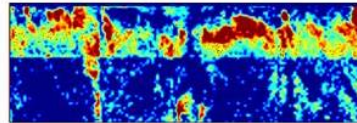


21 dias após a infecção!

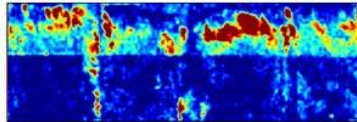
c) m/z 327



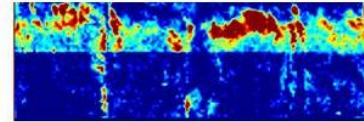
d) m/z 353



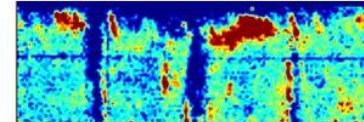
e) m/z 381



f) m/z 395



g) m/z 423



Conseguimos observar alguns biomarcadores no início da infecção- Diagnostico no estagio inicial



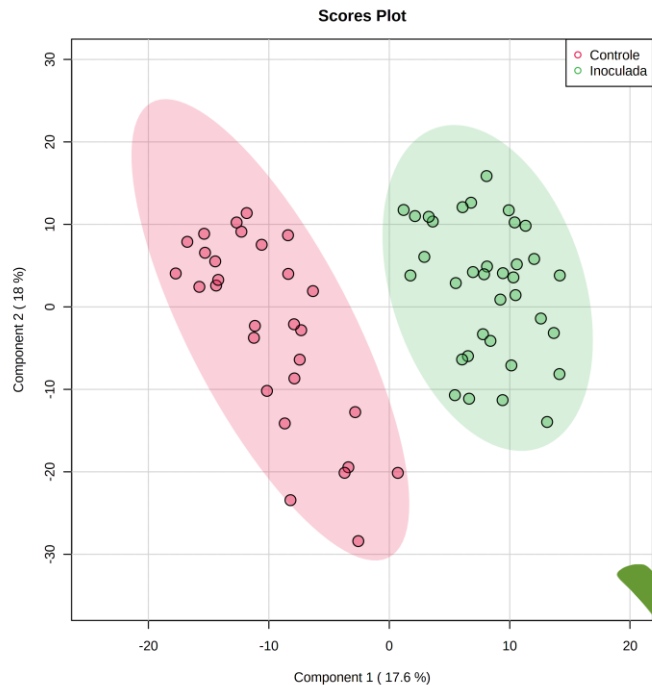
Outras ferramentas?



Metabolômica *untargeted* usando GC-MS



Dra Alana Pereira
(Pós doc do grupo)



- Plantas Sadias
- Plantas Doentes

PLS - DA

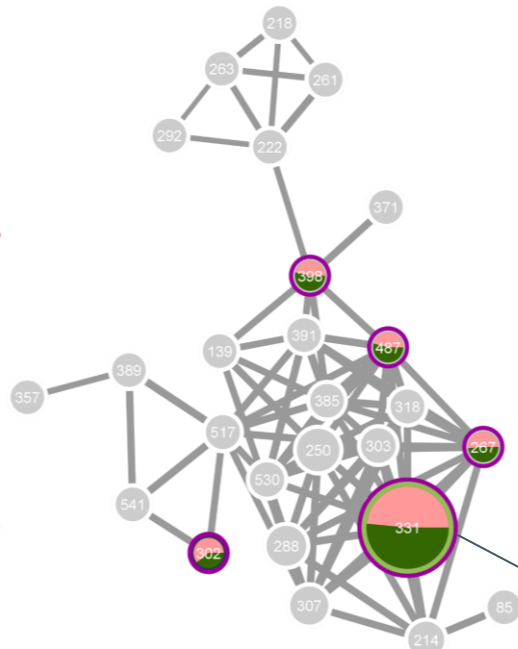
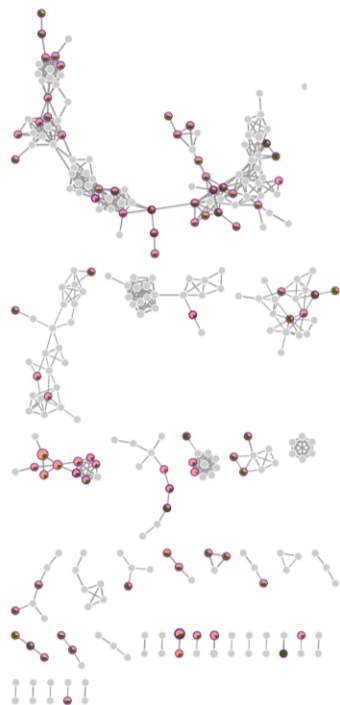
$R^2 = 0.98667$
 $Q^2 = 0.93804$
Accuracy = 0.87169
 $p < 0.01$



O QUE
já
alcançamos?

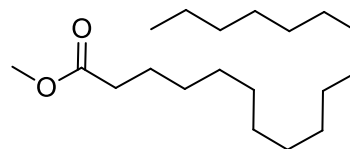
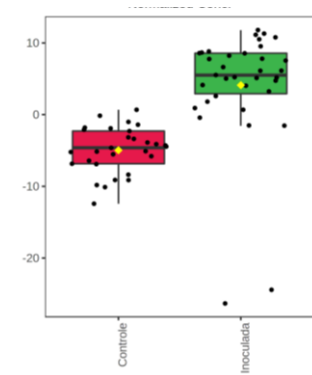


Metabolômica *untargeted* usando GC-MS – Metabólitos diferenciais

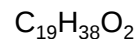


● Sadias

● Doentes

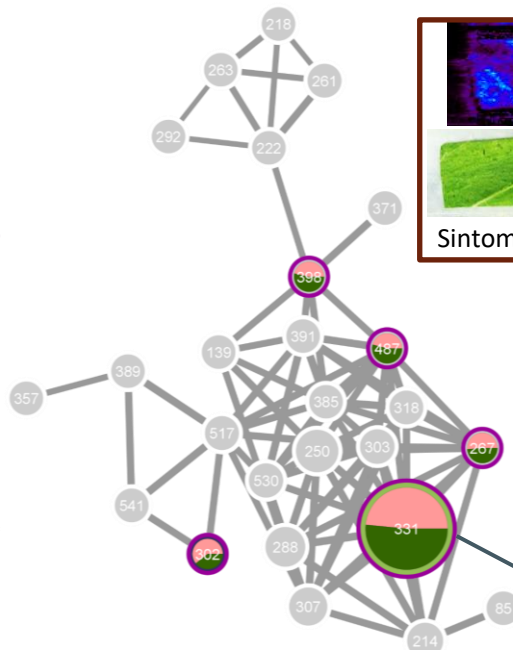
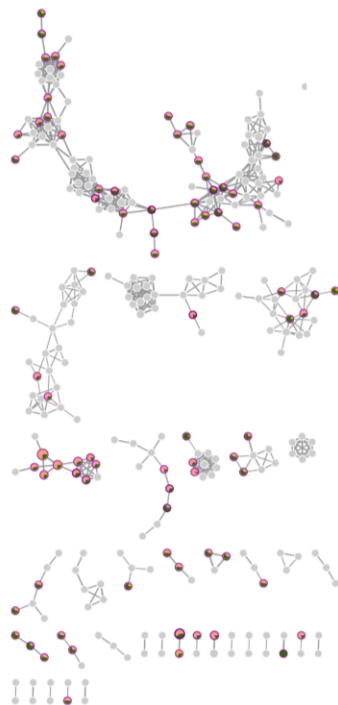


Octadecanoic acid,
methyl ester



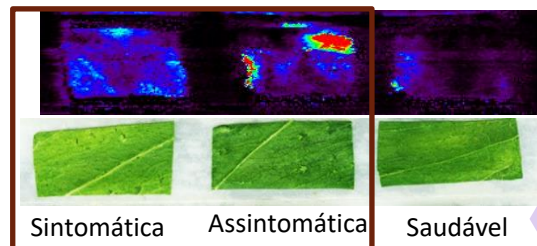
O QUE
já
alcançamos?



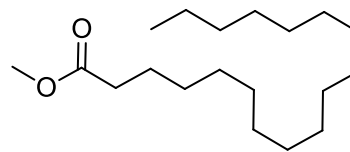


● Controle

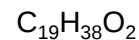
● Inoculada



O QUE
nós já temos?



Octadecanoic acid,
methyl ester



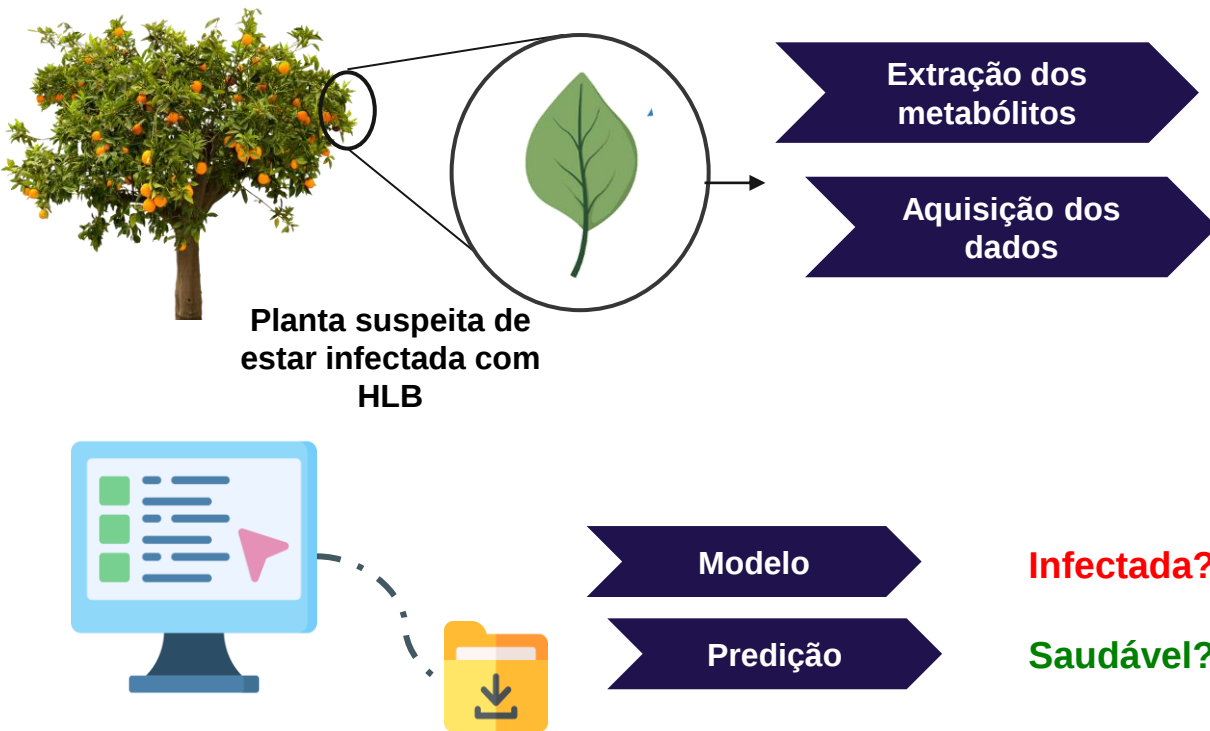
Por que não desenvolver
uma ferramenta de predição
para o diagnóstico precoce
da doença?



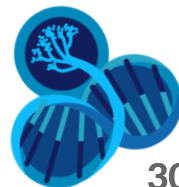
Primeira ferramenta diagnóstica na fase assintomática da doença



Dra Alana Pereira

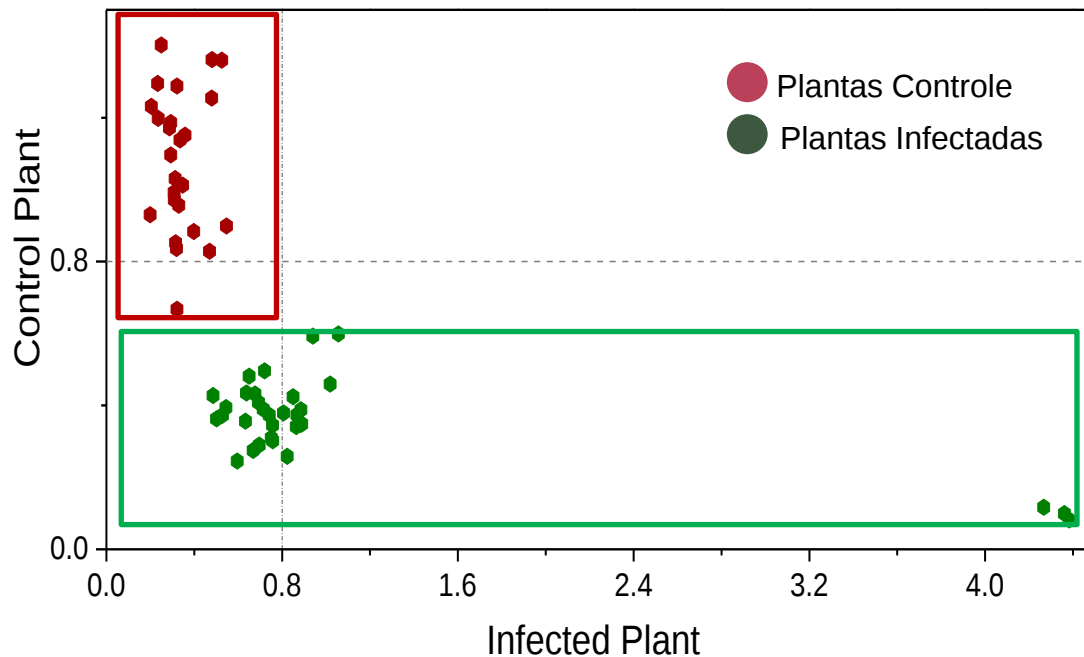


O QUE
já
alcançamos?



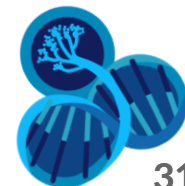


Prof. Ricardo Silva - USP



O QUE
nós já temos?

Desenvolvimento do modelo de predição



Site disponível online e gratuitamente



OPLS-DA Predict

PREDICT

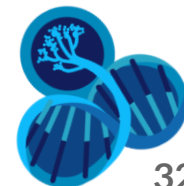
PREPROCESS

Apply the model to your file

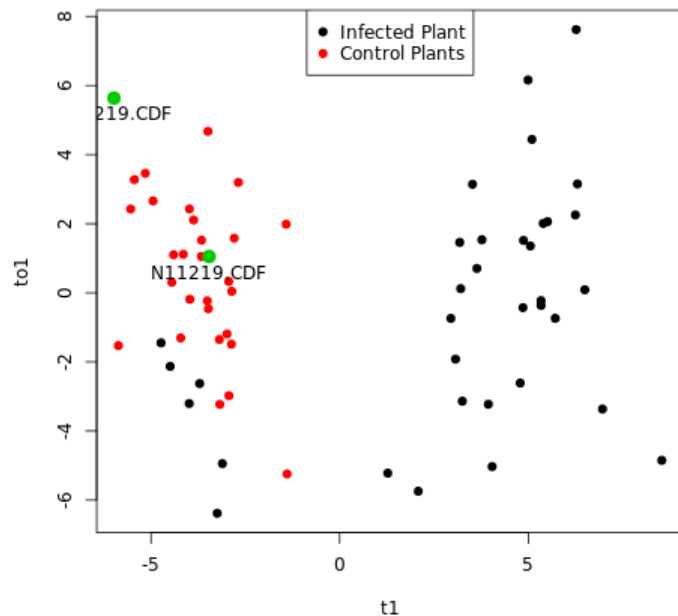
OPLS-DA predict is a web server to ~~apply a trained~~ apply a trained OPLS-DA model to a new set of data

Drop files here to upload

ABOUT OPLS



PREDIÇÃO DO N11219 → COLETA-1 Amostra Controle



TABLE

Show entries Search:

#	Predictions
N11219.CDF	Control Plants

Showing 1 to 1 of 1 entries

Previous **1** Next

"samples"
"N11219.CDF"

"prediction"
"Control Plants"

ACERTOU

Aprimorando nossa ferramenta para disponibilizar gratuitamente e online para os produtores



Primeira ferramenta diagnóstica na fase assintomática da doença

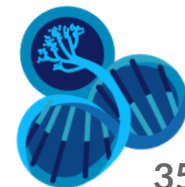
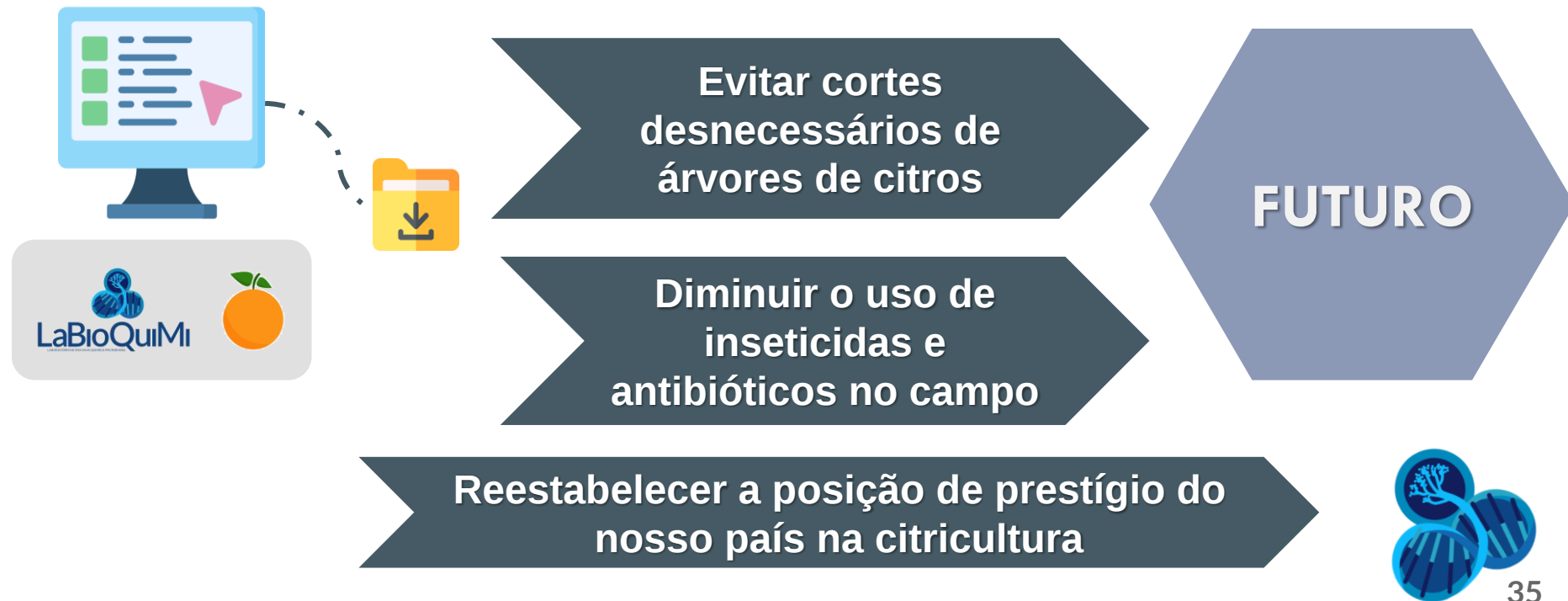
Análises rápidas e baratas;

Rápido preparo de amostra;

GC-MS ferramenta presente em muitas instituições

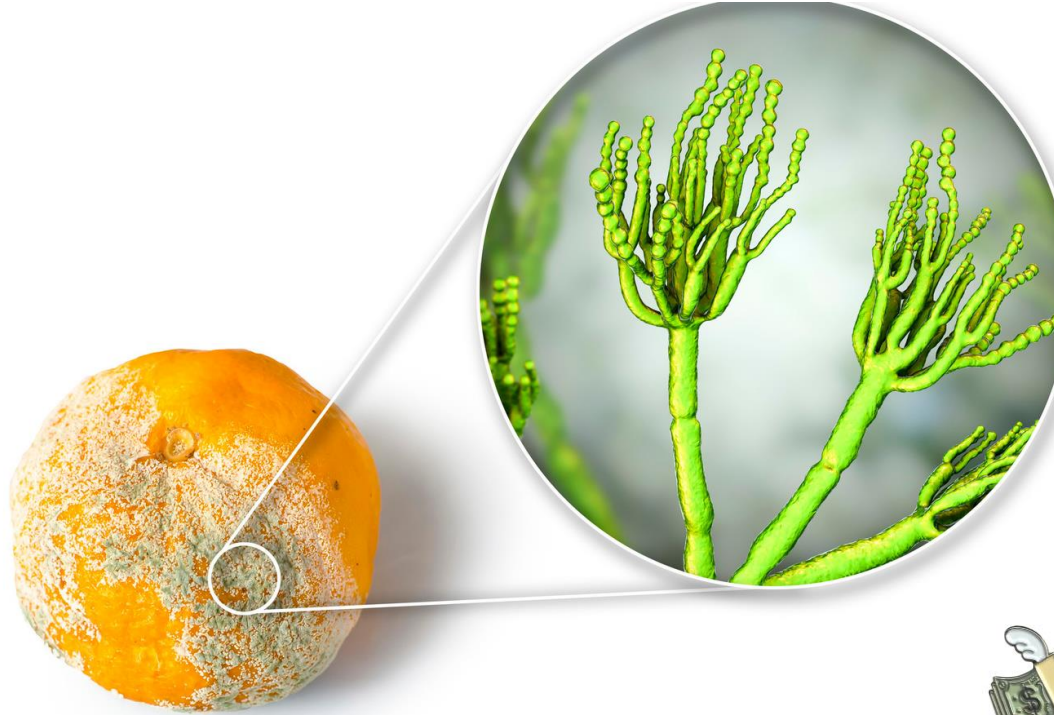


Primeira ferramenta diagnóstica na fase assintomática da doença





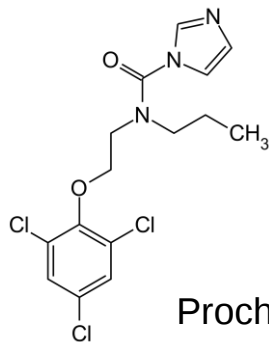
P. digitatum e a doença bolor verde



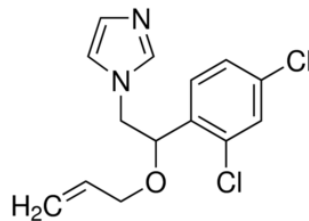
- Maior doença pós-colheita em frutas cítricas
- Responsável por 90% das perdas pós colheita
- Prejuízos anuais de bilhões de reais
- Como controlar este fungo?



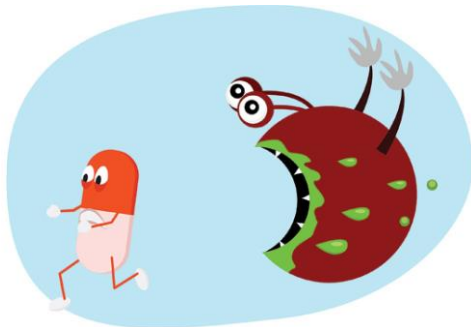
- Controle de doenças pós-colheita: Fungicidas sintéticos



Prochloraz



Imizalil



Resistência fúngica



Problemas ambientais

Riscos à saúde humana

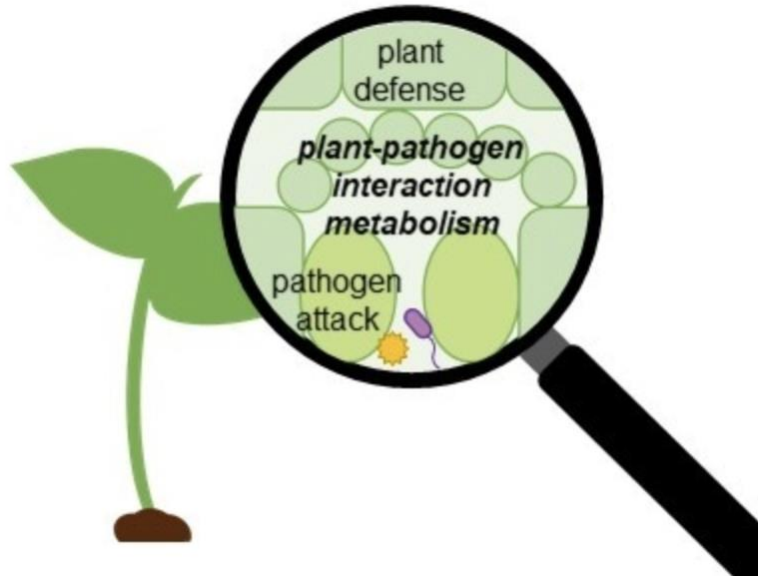
Kanetis, et al. *Phytopathol*, 100, 738-743, (2010)

Frisvad, J. C. & Samson, R. A.. *Stud Mycol* 49, 1-174, (2004)

- Como desenvolver alternativas mais seguras?
- Entender as interações patógeno-hospedeiro



- Como desenvolver alternativas mais seguras?
- Entender as interações patógeno-hospedeiro



Quais estratégias utilizadas pelo patógeno?

Moléculas são importantes para o estabelecimento da doença?

Importante compreender o metabolismo do patógeno na infecção!





Quais os produtos naturais produzidos na doença?

Estes PN são importantes para a infecção?

Qual o papel biológico dos PN?



Jonas Costa, PhD

Fungal Biology 123 (2019) 594–600



Monitoring indole alkaloid production by *Penicillium digitatum* during infection process in citrus by Mass Spectrometry Imaging and molecular networking

Jonas Henrique Costa^a, Jaqueline Moraes Bazioli^{a,b}, Eder de Vilhena Araújo^a, Pedro Henrique Vendramini^a, Mariana Cristina de Freitas Porto^c, Marcos Nogueira Eberlin^a, Jayme A. Souza-Neto^c, Taícia Pacheco Fill^{a,*}



Fungal Biology 123 (2019) 584–593



Penicillium digitatum infection mechanisms in citrus: What do we know so far?

Jonas Henrique Costa^a, Jaqueline Moraes Bazioli^{a,b}, João Guilherme de Moraes Pontes^{a,*,**}, Taícia Pacheco Fill^{a,*}

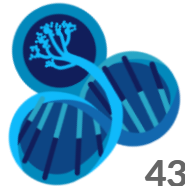
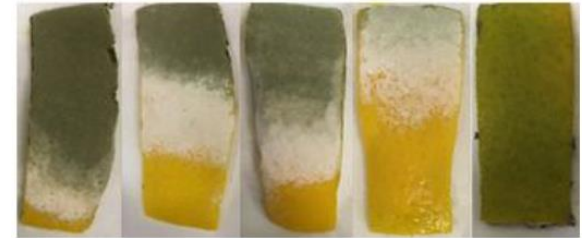
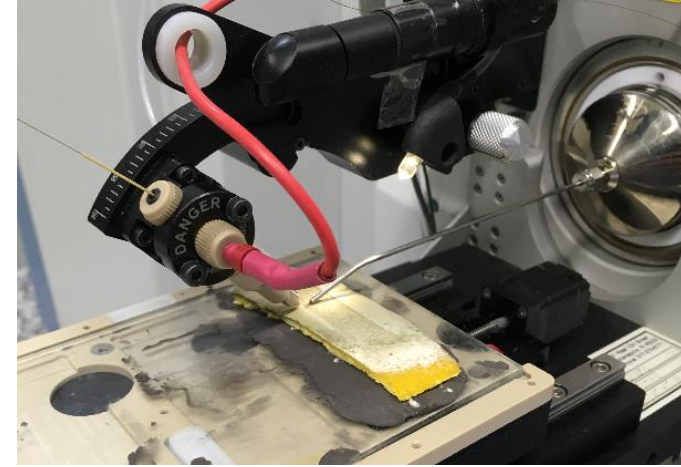
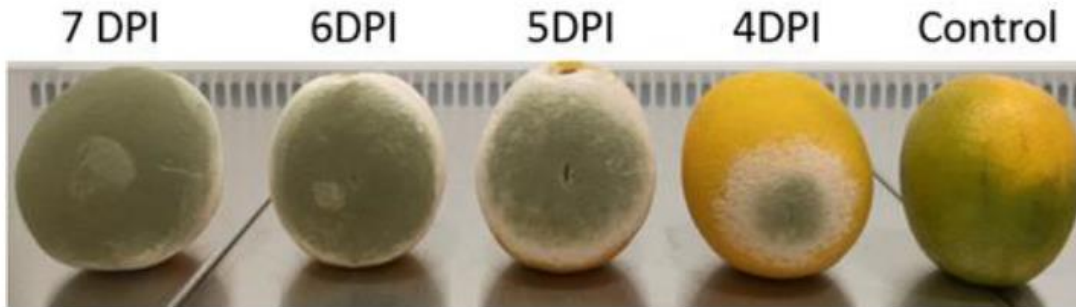
^a Institute of Chemistry, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual de Campinas, 13083-859 Campinas, SP, Brazil

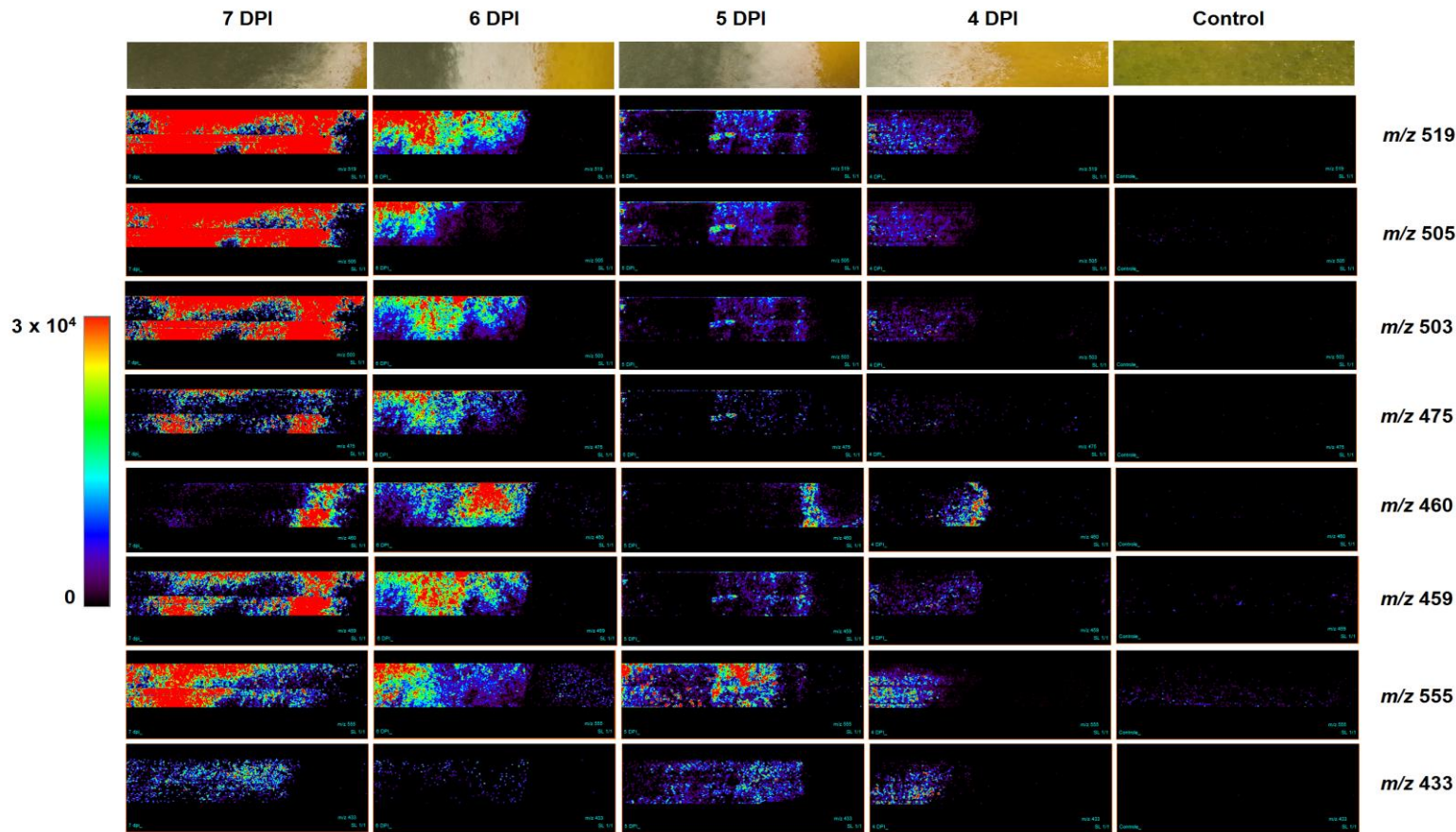


Aplicação da IMS na doença bolor verde

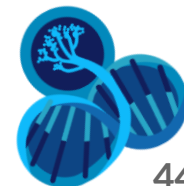
- Laranjas infectadas com o fungo *P. digitatum*
- Análises metabólicas em diferentes dias após a infecção (DPI) e controle

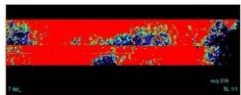


Identidade das moléculas?



?





The chemical structure shows a complex polycyclic system. It features a purine-like core (a fused benzene and imidazole ring system) substituted with a methyl group and a hydroxyl group. This core is linked via a glycosidic bond to a pyrimidine-like ring (a six-membered ring with two nitrogen atoms). The pyrimidine ring is further substituted with a methyl group and a carbonyl group. Stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds at the glycosidic linkage and the hydroxyl group on the purine-like ring.



New

New

Fluorescence micrograph showing a dense population of cells with blue nuclei (DAPI) and green/yellow fluorescence (likely FITC or similar). The image is labeled 'Fig. 4' in the bottom left corner.



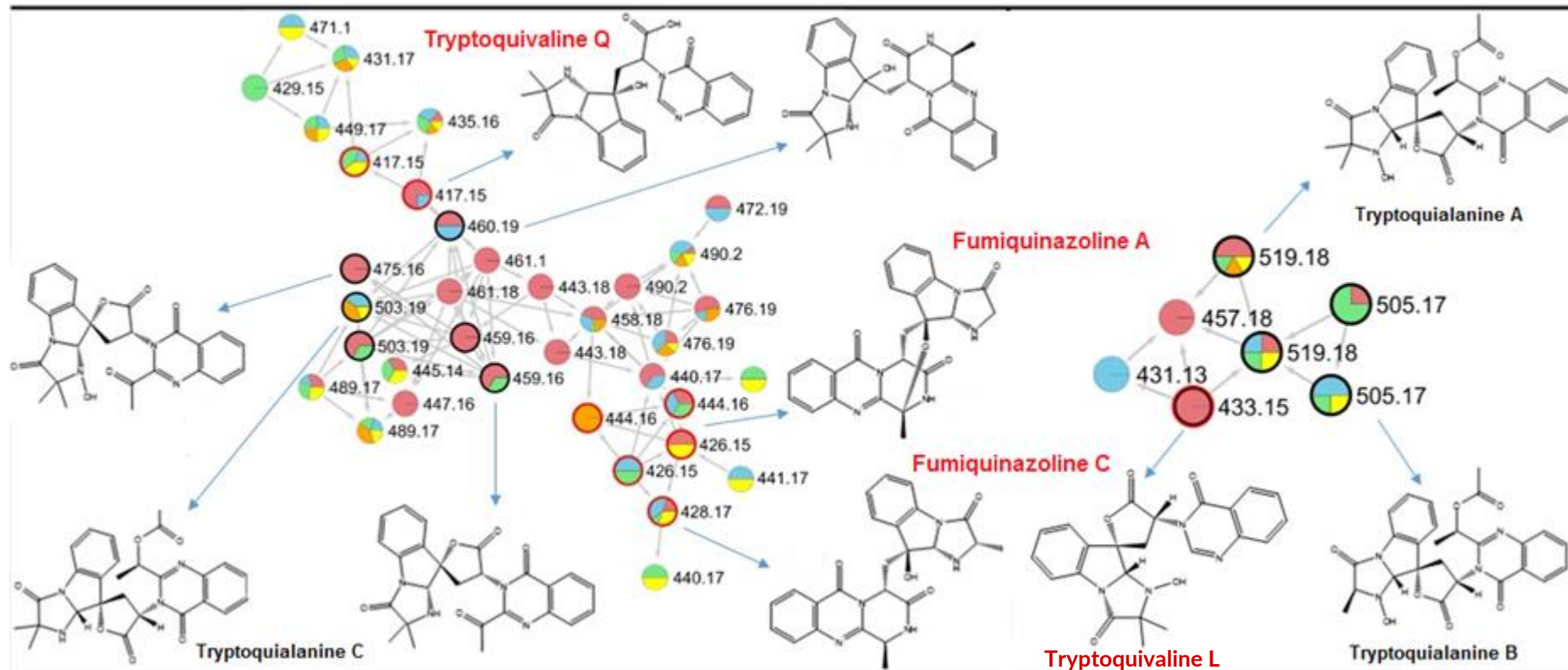


Presença em todos os
hospedeiros??



LaBioQuiMi
LA BIOLOGIA DELLA CHIMICA MICROBIANA

- PDA
 ● Orange juice
 ● Tangerine



- **Será que as triptoquialaninas tem ação fitotóxica frente ao hospedeiro?**

Método rápido para avaliação da fitotoxicidade: **germinação de sementes.**

Estágio vulnerável das plantas, mais sensíveis a condições desfavoráveis.

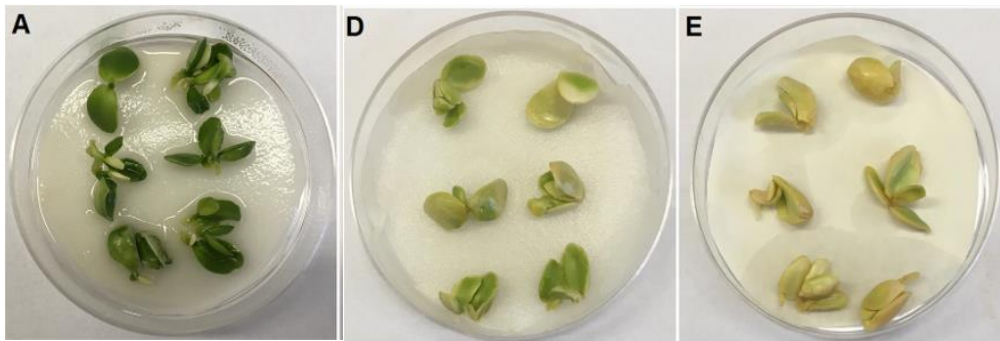
Wang XD, et al. 2001. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere* **44**, 1711-1721.

Ashagre H, Almaw D, Feyisa T. 2013. Effect of copper and zinc on seed germination, phytotoxicity, tolerance and seedling vigor of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cultivar ROMA VF). *Int J Agric Sci Res* **2**(11), 312-317.



Moléculas do fungo são tóxicas ao hospedeiro?

Fitotoxicidade utilizando ensaios de germinação com sementes de laranja



Controle -

Herbicida- Controle +

Tryptoquialanina A

Qual o mecanismo de
transporte das
triptoquialaninas para o
ambiente extracelular?



mBio. 2021 Jan-Feb; 12(1): e03393-20.

Published online 2021 Feb 9. doi: [10.1128/mBio.03393-20](https://doi.org/10.1128/mBio.03393-20)

PMCID: PMC7885104

PMID: [33563828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33563828/)

Phytotoxic Tryptoquialanines Produced *In Vivo* by *Penicillium digitatum* Are Exported in Extracellular Vesicles

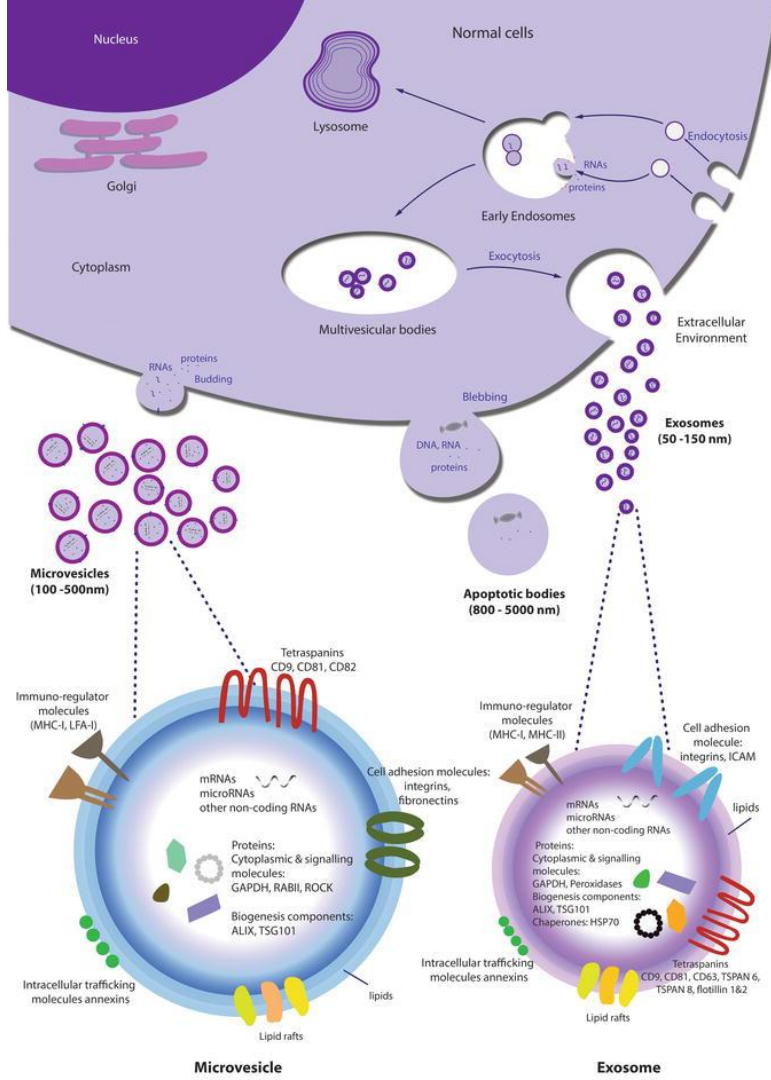
Jonas Henrique Costa,^a Jaqueline Moraes Bazoli,^{a,b} Luidy Darllan Barbosa,^a Pedro Luis Theodoro dos Santos Júnior,^a Flavia C. G. Reis,^{c,d} Tabata Klimeck,^c Camila Manoel Crnkovic,^e Roberto G. S. Berlinck,^f Alessandra Sussulini,^a Marcio L. Rodrigues,^g and Taícia Pacheco Fijl^h

Transporte de Produtos Naturais mediado por vesículas extracelulares?



Prof. Dr. Marcio Rodrigues





VEs são **estruturas esféricas** secretadas por células de bactérias, fungos e plantas.

Delimitadas por uma membrana composta por bicamada lipídica.

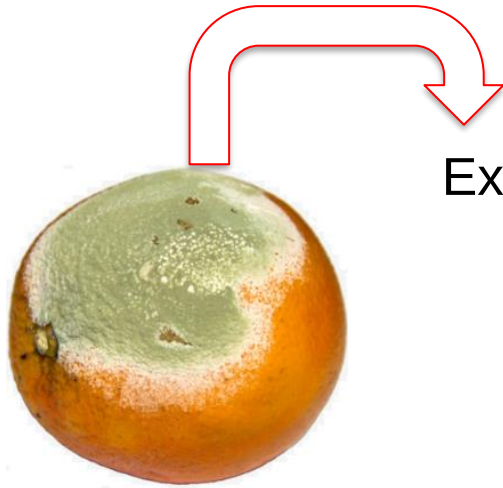
No seu interior podem carregar proteínas, lipídeos, enzimas, RNAs e outros.

Em patógenos humanos, as EVs são consideradas mediadores-chave na virulência apresentada por estes organismos.



Experimental

- *P. digitatum* produz vesículas extracelulares?



Extração de vesículas
extracelulares

Caracterização das vesículas:
Microscopia de transmissão



Análise da composição das
vesículas extracelulares*

Costa et al, mBio, 2021

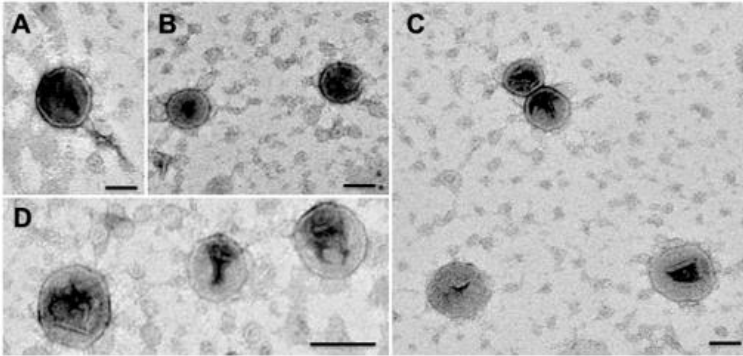
*Em colaboração com o Prof. Dr. Roberto Berlinck e Profa Dra Camila Crnkovic



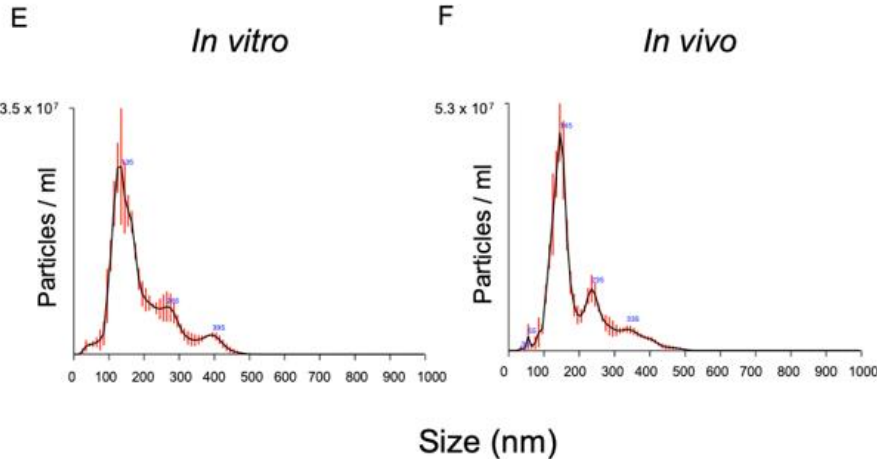
- *P. digitatum* produz vesículas extracelulares?

SIM

LaBioQuiMi
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA QUÍMICA E MICROBIANA



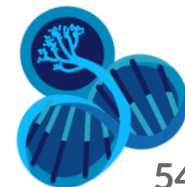
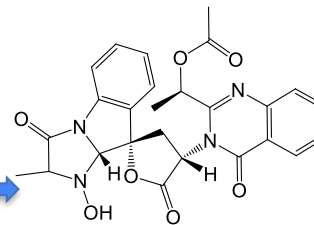
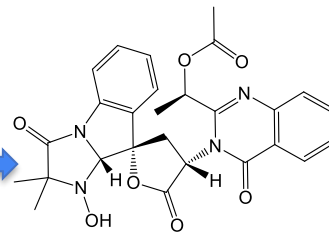
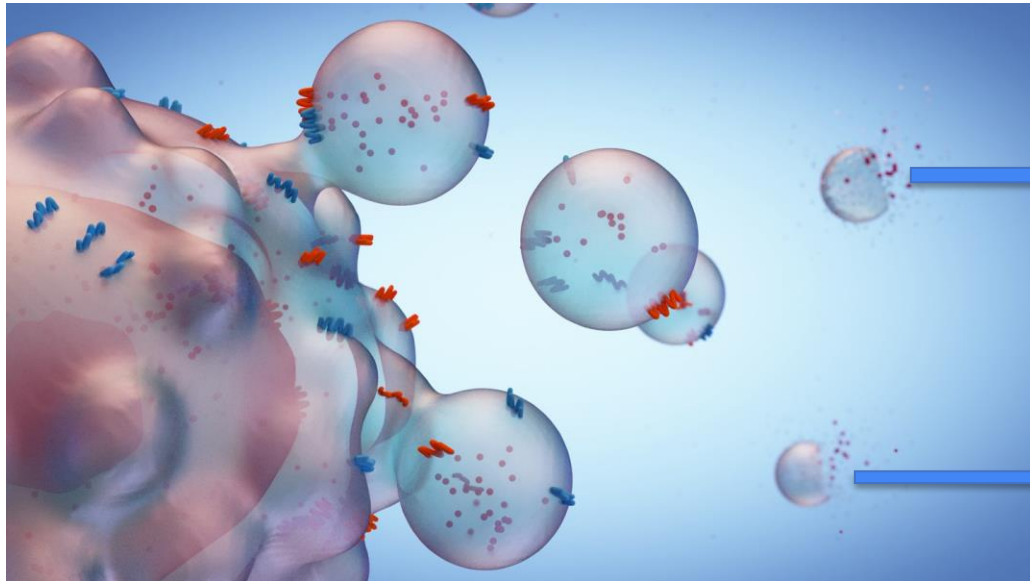
Típicas estruturas com dupla membrana
in vivo (A e B) e *in vitro* (C e D).



Maioria concentrada na faixa de tamanho de 100-200 nm, com subpopulações nas faixas de 200-300 e 300-400.



SIM!!! Triptoquialaninas estão presentes nas vesículas extracelulares!!

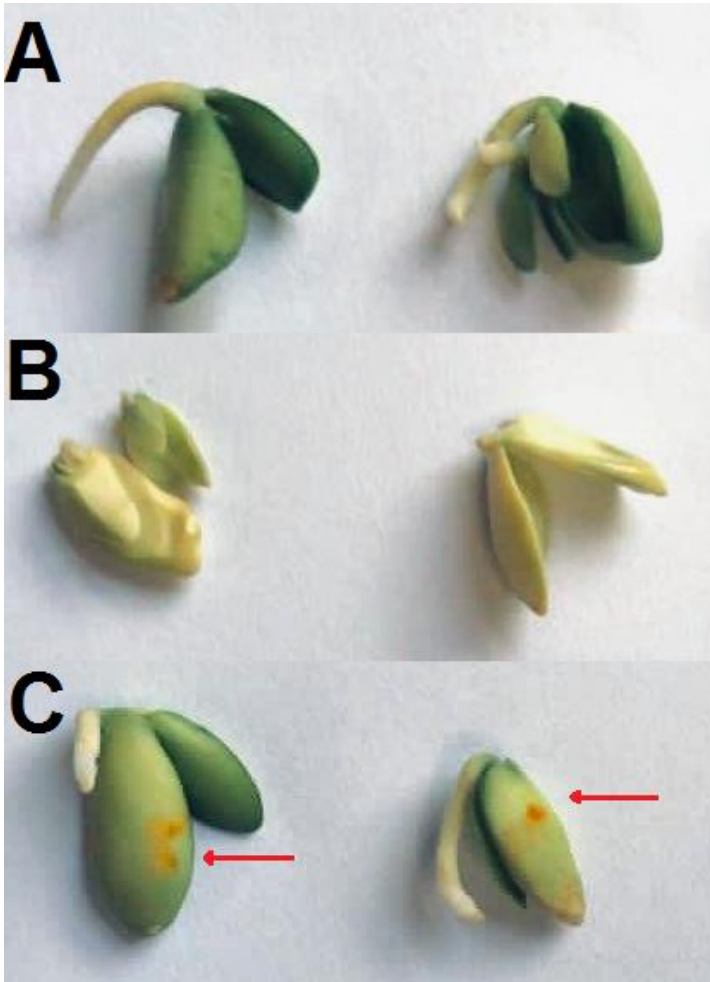


As vesículas extracelulares são tóxicas às laranjas?

Testes de germinação de sementes na presença das vesículas

Após 10 dias de incubação as sementes que foram expostas às EVs de *P. digitatum* apresentaram tecidos danificados.

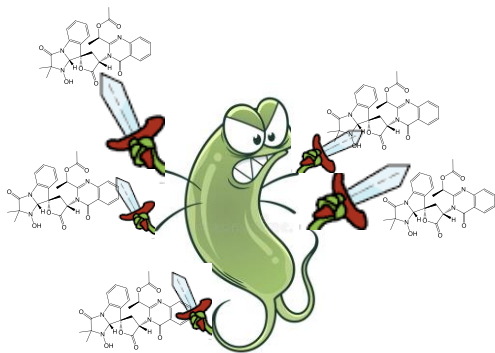
A alteração tecidual incluiu áreas lesadas com diferenças de pigmentação, indicando um efeito fitotóxico de EVs puras



Descobrimos as armas químicas do fungo. Mas e a planta?

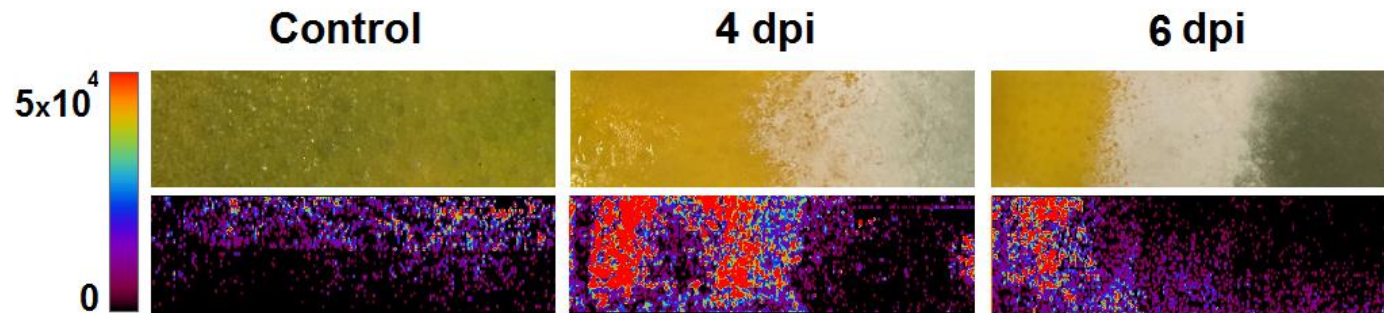
LaBioQuiMi
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA QUÍMICA E MICROBIANA

A grande batalha química: *Penicillium digitatum* x Citros

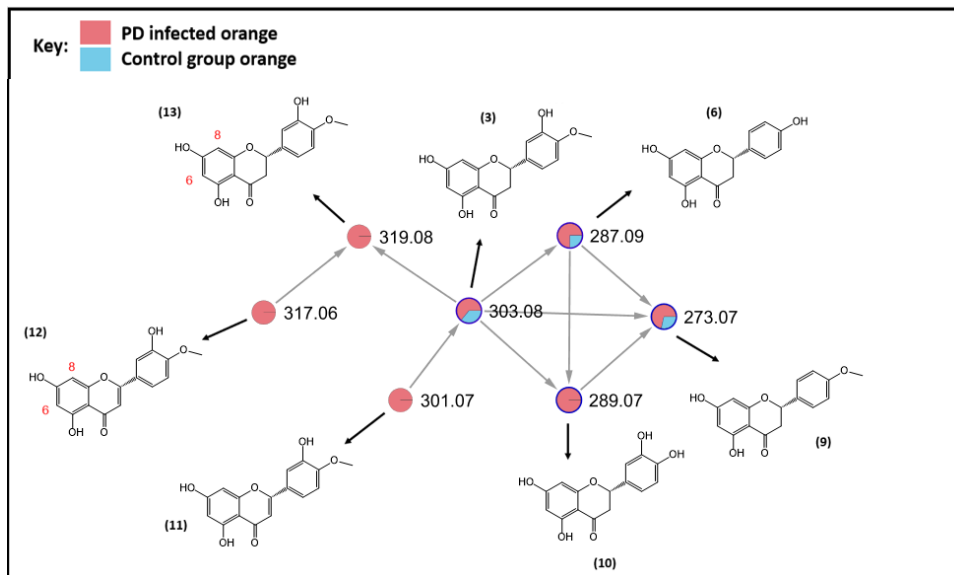


VS





m/z 319.08



Bioorganic Chemistry

Volume 102, September 2020, 104126



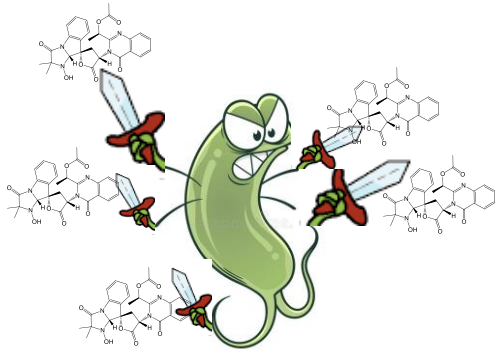
Exploring the interaction between citrus flavonoids and phytopathogenic fungi through enzymatic activities

Jonas Henrique Costa, Laura Soler Fernandes, Daniel Yuri Akiyama, Taícia Pacheco Fill

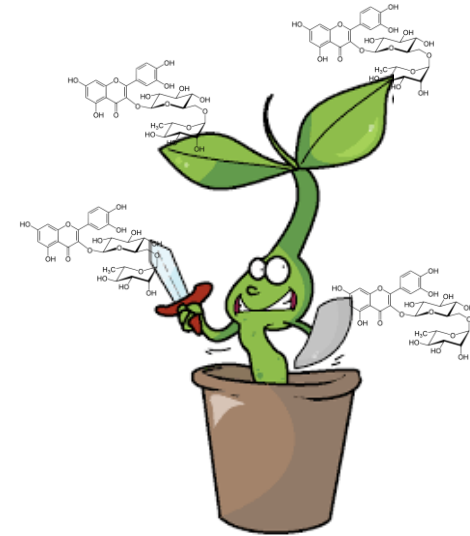
Descobrimos as armas químicas do fungo. Mas como desarmar o fungo e criar estratégias de controle?

LaBioQuiMi
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA QUÍMICA E MICROBIANA

A grande batalha química:
Penicillium digitatum x Citros



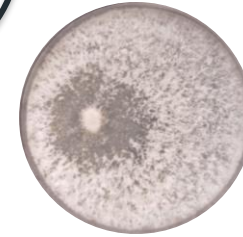
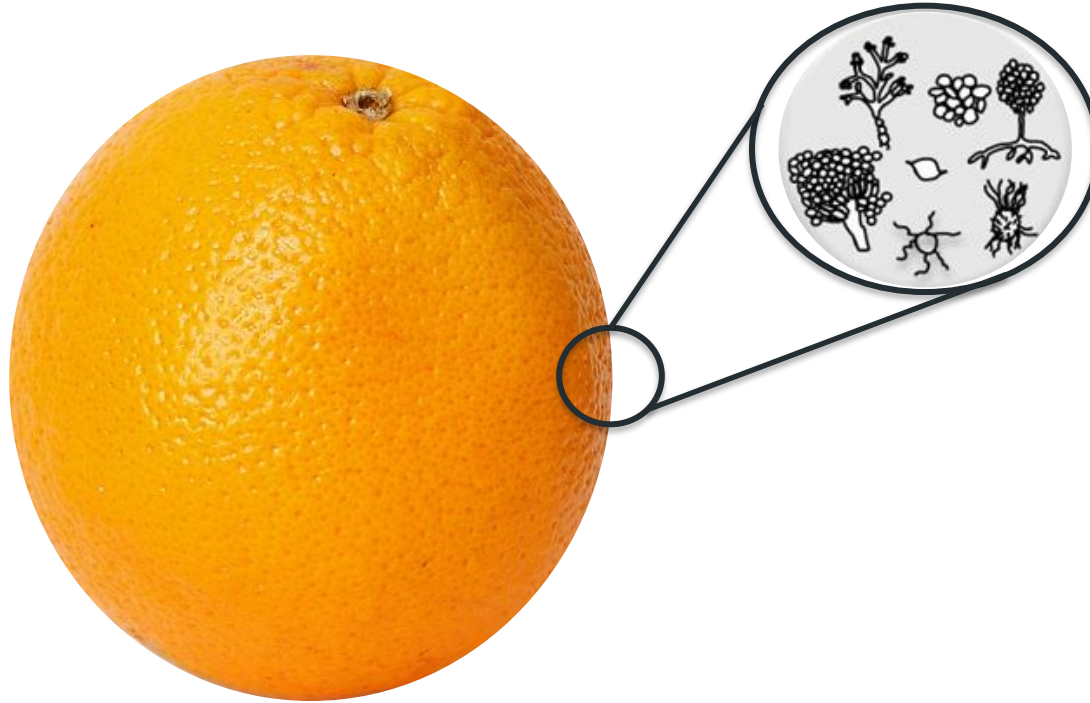
VS



Como desarmar o fungo *P. digitatum*?



Mestrando Rodrigo Maciel



Diaporthe sp



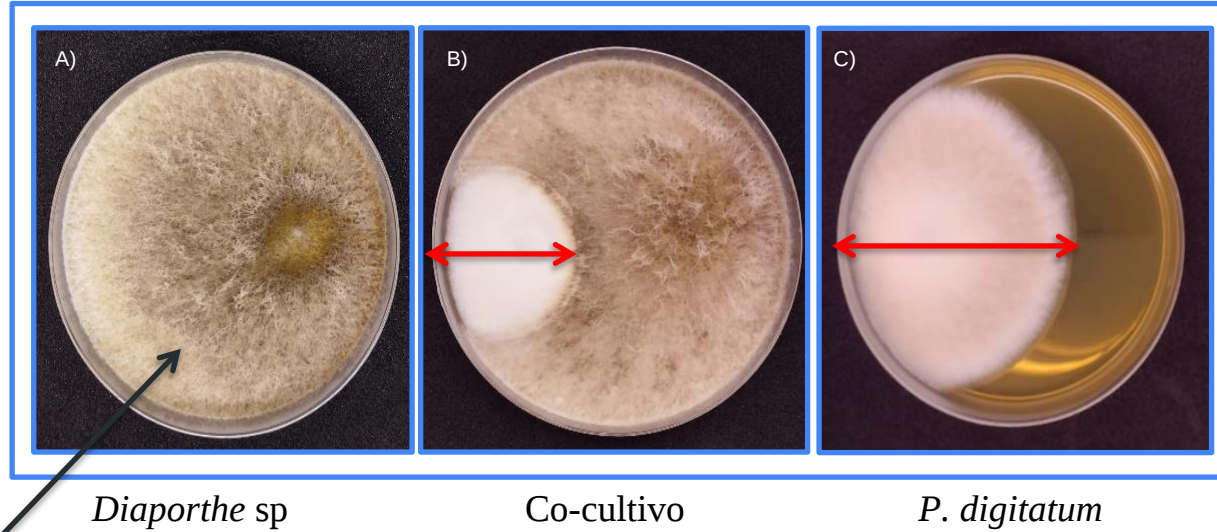
Colletotrichum sp.



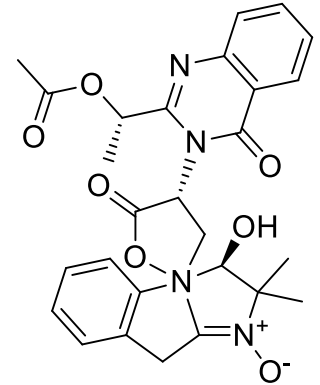
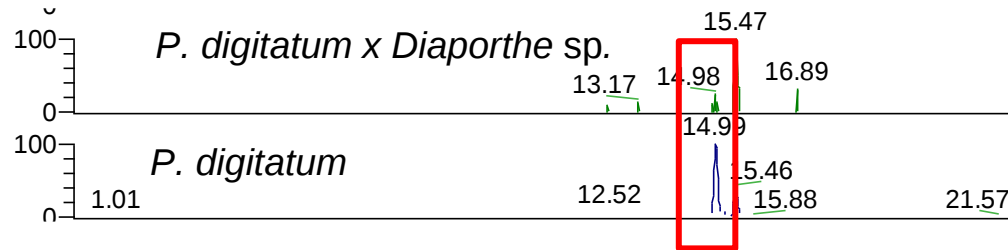
- Estratégias para simular condições mais naturais
- Co-cultivos: levam em conta a comunidade microbiana, competição por espaço e nutrientes.



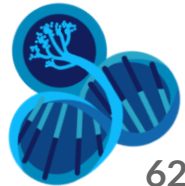
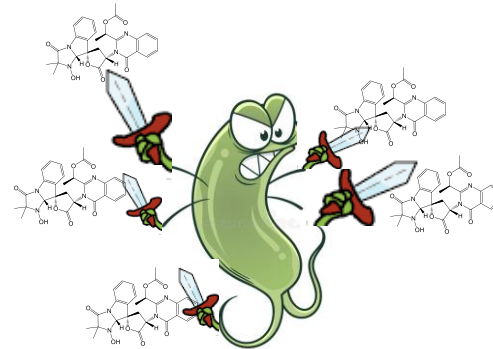
Co-cultura: *Diaporthe* sp. x *P. digitatum*



Co-cultura: *Diaporthe* sp. x *P. digitatum*



Estratégia de biocontrole frente ao fungo *P. digitatum*?





Laboratório de Biologia Química Microbiana

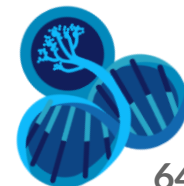
#MulheresnaCiência

LaBioQuiMi

FAPESP



CNPq



64

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
Profa. Dra Katia Kupper;
Prof. Dr. Marcos Eberlin;
Prof. Dr. Jayme Souza-Neto;
Prof. Dr. Roberto Berlinck
Prof. Dr. Iran Malavazi;
Prof. Dr. Gustavo Goldman;
Prof. Dr. Marcio Rodrigues;
Prof. Dr. Célio Angolini;
Prof. Dr. Eduardo Pilau;
Prof. Dr. Nelson Wulff;
Dr. Rodrigo Facchini;
Dr. Luis Fernando Santos;
Dr. Diego Assis;
Prof. Dr. Christian Hertweck
Profa Dra Camila Crnkovic

Obrigada pela atenção e oportunidade !!

taicia@unicamp.br

 @labioquimi